

(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
11 janvier 2007 (11.01.2007)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2007/004197 A2

(51) Classification internationale des brevets :
C08F 2/00 (2006.01) *G01N 30/00* (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/IB2006/052250

(22) Date de dépôt international : 4 juillet 2006 (04.07.2006)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
05 52032 4 juillet 2005 (04.07.2005) FR

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : **POLY-INTELL** [FR/FR]; 15 rue de la Carue, F-76000 Rouen (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **BAY-
OUDH, Sami** [FR/FR]; 15 rue de la Carue, F-76000
Rouen (FR). **NARAGHI, Kaynoush** [FR/FR]; 15 rue
de la Carue, F-76000 Rouen (FR). **AROTCARENA,
Michel** [FR/FR]; 54 Route Du Havre Résidence Caravelle,
Bâtiment Letillac, F-76000 Rouen (FR).

(74) Mandataire : **LE COUPANEC, Pascale**; NONY &
PARTNERS, 3 Rue De Penthievre, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible*) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD,
SE, SG, SK, SL, SM, SY, 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, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— *sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport*

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
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: MOLECULAR FINGERPRINTS WITH ENHANCED IDENTIFYING CAPABILITY, METHOD FOR PREPARING
SAME AND USE THEREOF

(54) Titre : EMPREINTES MOLECULAIRES A CAPACITE DE RECONNAISSANCE AMELIOREE, LEUR PROCEDE DE
PREPARATION ET LEUR UTILISATION

(57) Abstract: The invention concerns a method for preparing a molecular fingerprint comprising sites for identifying at least one
target molecule, said fingerprint being obtained from at least one master molecule of polymeric type, called master molecule. The
invention is characterized in that said master polymer is different from the target molecule(s), and is capable of being eliminated by
degradation and/or washing, and that at least 5 % in number of monomer units constituting same are involved in the formation of
the sites for identifying the target molecule(s).

(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé de préparation d'une empreinte moléculaire comprenant des sites de
reconnaissance pour au moins une molécule cible, ladite empreinte étant obtenue à partir d'au moins une molécule patron de nature
polymérique, dite polymère patron, caractérisé en ce que ledit polymère patron est différent de la ou des molécule(s) cible(s), est
éliminable par dégradation et/ou par lavage, et en ce qu'au moins 5 % en nombre des unités monomères le constituant interviennent
dans la formation des sites de reconnaissance de la ou des molécule(s) cible(s).



WO 2007/004197 A2

Empreintes moléculaires à capacité de reconnaissance améliorée, leur procédé de
préparation et leur utilisation

La présente invention se rapporte au domaine des empreintes moléculaires préparées à partir de patrons, utiles pour la reconnaissance de molécules cibles.

5 La présente invention vise en particulier un nouveau procédé de préparation d'empreintes moléculaires à partir de molécules de type polymère dites polymères patrons, présentant notamment une capacité de reconnaissance améliorée à l'égard de molécules cibles ne possédant qu'une partie des motifs constitutifs des molécules patrons, ainsi qu'une stabilisation améliorée du complexe formé par l'empreinte et les molécules patrons.

10 La présente invention est également relative aux empreintes moléculaires susceptibles d'être obtenues par ce procédé ainsi qu'à leur utilisation.

Les matériaux à empreintes moléculaires, encore appelés MIPs en langue anglaise, sont obtenus par une technique d'impression moléculaire.

De façon générale, on obtient ces empreintes moléculaires en copolymérisant
15 des monomères et des agents de réticulation en présence d'une molécule dont on cherche précisément à fixer l'empreinte. Les monomères s'arrangent spécifiquement autour de cette molécule patron par des interactions fortes ou faibles, puis sont polymérisés généralement avec un haut taux d'agent de réticulation. Après polymérisation la molécule est extraite du matériau polymère et laisse ainsi son empreinte moléculaire donc des
20 cavités au sein du matériau. Ces cavités sont de réels récepteurs synthétiques comparables aux récepteurs biologiques de type anticorps. Ces anticorps artificiels, matériaux à empreintes moléculaires, ont été utilisés dans les applications de séparation en chromatographie, les capteurs, la catalyse de réaction chimique, l'extraction en phase solide, l'immunoanalyse, le criblage de bibliothèques moléculaires.

25 Il existe deux approches possibles pour faire des empreintes moléculaires : l'approche covalente développée par Wulff dans le document US 4 127 730 et l'approche non covalente développée par Mosbach dans le document US 5 110 833.

Dans l'approche covalente, les interactions entre les monomères et la molécule patron sont de types liaisons covalentes labiles. Dans ce cas, après l'extraction de la
30 molécule patron par rupture de la liaison covalente, la reconnaissance s'effectue également par la formation d'une liaison covalente entre l'empreinte et la molécule cible.

Dans l'approche non covalente de Mosbach, les interactions entre les monomères et la molécule cible sont des liaisons faibles de type liaisons hydrogène, liaisons ioniques, pi donneur - pi accepteur, liaisons Van Der Waals et interactions hydrophobiques. Après l'extraction de la molécule patron, la reconnaissance s'effectue également par des interactions non covalentes entre l'empreinte et la molécule cible.

Les deux approches peuvent être combinées en utilisant la première approche de type covalente pour la préparation du matériau à empreinte moléculaire et obtenir une reconnaissance par des interactions non covalentes, comme cela est par exemple divulgué dans M.J. WHITCOMBE et al. "A New Method for the Introduction of Recognition Site Functionality into Polymers prepared by molecular Imprinting: Synthesis and Characterization of Polymeric Receptors for Cholesterol " *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 7105-7111.

Toutes les approches rappelées ci-dessus utilisent généralement une "molécule patron" identique ou analogue à la molécule cible à reconnaître, en particulier de taille moléculaire similaire.

Cette technique d'impression a montré son efficacité quand l'impression est réalisée dans des solvants organiques aprotiques mais, en revanche, a montré des faiblesses et des limitations quand l'impression est réalisée dans des solvants protiques polaires (eau, alcools). On est alors confronté à un défaut de stabilisation du complexe entre les monomères et la molécule patron qui repose essentiellement sur des liaisons hydrogènes, ioniques et Van Der Waals dans les cas les plus classiques.

Des tentatives ont été faites pour favoriser la reconnaissance dans l'eau ou dans des solvants protiques polaires, notamment de sucres en mettant en œuvre des interactions de type coordination métallique (Striegler et al. "Evaluation of new strategies to prepare templated polymers with sufficient oligosaccharide recognition capacity", *Analytica Chimica Acta* 484, **2003**, 53-62) sans toutefois donner entière satisfaction.

Egalement dans le cadre de la mise au point d'empreintes utiles pour une reconnaissance dans l'eau, des matrices très hydrophiles ont été préparées pour la riboflavine et ses dérivées dans le document WO 2004/067578.

Un autre inconvénient de l'utilisation d'empreintes moléculaires préparées à partir de molécules patrons sensiblement de la même taille moléculaire réside dans la difficulté à garantir une extraction totale des molécules patrons à l'issue de la réalisation de

l'empreinte. Ainsi, on ne peut totalement s'affranchir du risque que ces molécules patrons résiduelles soient relarguées pendant l'utilisation des empreintes à des fins de détection de ces mêmes molécules, conduisant alors à des faux positifs.

Une solution a été apportée à ce problème, consistant à utiliser un analogue que l'on choisit de sorte à pouvoir le distinguer au moment de l'analyse. Toutefois, l'analogue étant également relargué et l'analyse ne permettant pas toujours de distinguer entièrement l'analogue de la cible, la méthode présente quelques inconvénients. Des exemples de cette méthode peuvent être trouvés dans A. Blomgren et al. "Extraction of Clenbuterol from calf urine using a molecularly imprinted polymer followed by quantitation by high-performance liquid chromatography with UV detection" *Journal of Chromatography A*, 975 (2002), 157-164, où le clenbuterol est la cible et le brombuterol, à savoir l'analogue, est le patron. On peut également citer les deux articles suivants : L.I. Anderson et al. "A Highly Selective Solid Phase Extraction Sorbent for the Concentration of Sameridine Made by Molecular Imprinting", *Chromatographia* 46 (1997) 57-62, C. Crescenzi et al., "Determination of Clenbuterol in bovine liver by Combining Matrix Solid-phase dispersion and Molecularly Imprinted Solid-phase extraction followed by Liquid Chromatography/Electrospray ion trap multiple stage Mass Spectrometry", *Anal. Chem.* 73 (2001) 2171, 1986.

D'autres méthodes de préparation d'empreintes moléculaires ont été développées.

L'approche "épitope", développée dans un souci de reconnaissance de macromolécules, est notamment décrite dans les demandes de brevet WO 01/61355 et WO 01/61354. Dans cette méthode, contrairement aux approches classiques, la molécule patron est de taille moléculaire inférieure à celle de la molécule cible. Typiquement un fragment de peptides est utilisé à titre de patron pour la reconnaissance par l'empreinte moléculaire d'une protéine.

Selon encore une autre méthode, notamment divulguée dans la demande de brevet WO 01/32760, la molécule patron ou un de ses analogues est greffée sur un support de silice solide poreux avant de procéder à la polymérisation pour obtenir l'empreinte moléculaire à l'intérieur du support. On réalise ainsi l'extraction du support et de la molécule. L'utilisation d'un tel support pour le greffage de molécules patrons a également été divulguée dans WO 95/21673 avec un support par exemple en agarose, ainsi que dans

WO 01/90228. Dans ce dernier document la nature du support a été généralisée. Cette dernière technique permet de former des empreintes moléculaires dont les sites de reconnaissance sont situés le plus près possible de la surface du polymère et/ou des pores du polymère et répond pour l'essentiel à un besoin de fournir des empreintes moléculaires

5 comportant des sites de reconnaissance homogènes, orientés de façon uniforme, ne nécessitant plus de solvants porogènes et améliorant l'accessibilité des sites. Toutefois, l'utilisation de ce type d'empreinte peut poser des problèmes de compatibilité entre l'empreinte elle-même et le solvant de fabrication, à savoir le solvant dans lequel la polymérisation de l'empreinte est mise en œuvre. Autrement dit, il n'est pas toujours

10 possible de trouver un support adapté, particulièrement en terme de mouillabilité, pour un type de solvant donné.

Il existe par conséquent un besoin pour optimiser de façon conjointe à la fois la maniabilité de ces empreintes moléculaires tant dans leur préparation que dans leur utilisation dans des solvants protiques et polaires et notamment aqueux et à la fois leur

15 capacité de reconnaissance.

Il existe de plus un besoin de disposer d'empreintes moléculaires dont le relargage non désiré de molécules patrons n'est pas susceptible de fausser les performances de l'empreinte moléculaire lors de son utilisation.

Il existe par ailleurs un besoin d'améliorer les propriétés de stabilisation du complexe en équilibre formé par la molécule patron et la matrice de l'empreinte moléculaire, en particulier dans les solvants protiques.

20

Il existe en outre un besoin de disposer d'empreintes moléculaires dont les molécules patrons peuvent être aisément recyclées.

Il existe en plus un besoin de disposer d'empreintes moléculaires dont les molécules patrons peuvent être aisément récupérées, notamment dans le cas de molécules toxiques.

25

Il existe enfin un besoin d'obtenir des empreintes moléculaires présentant une capacité de reconnaissance améliorée, à savoir très denses en sites de reconnaissance et/ou dotées d'une bonne accessibilité pour les molécules cibles.

La présente invention a plus précisément pour objet un procédé de préparation d'une empreinte moléculaire comprenant des sites de reconnaissance pour au moins une molécule cible, ladite empreinte étant obtenue à partir d'au moins une molécule patron de

30

nature polymérique, dite polymère patron, caractérisé en ce que ledit polymère patron est différent de la ou des molécule(s) cible(s), est éliminable par dégradation et/ou par lavage, et en ce qu'au moins 5 % en nombre des unités monomères le constituant interviennent dans la formation des sites de reconnaissance de la ou des molécule(s) cible(s).

5 Selon encore un autre de ses aspects, la présente invention est relative à un procédé de préparation d'une empreinte moléculaire destinée à la reconnaissance d'au moins une molécule cible, caractérisé en ce qu'il comprend au moins :

- une étape de polymérisation de monomères destinée à former la matrice de l'empreinte moléculaire en présence d'un polymère patron tel que défini précédemment,
- 10 et
- une étape d'élimination du polymère patron par dégradation et/ou lavage.

Selon encore un autre aspect, l'invention concerne l'empreinte moléculaire susceptible d'être obtenue par le procédé selon la présente invention.

15 Enfin, selon un dernier aspect, la présente invention a pour objet l'utilisation de l'empreinte moléculaire obtenue selon le procédé de la présente invention à des fins d'extraction, de détection, de séparation, de purification, d'absorption, d'adsorption, de rétention ou de libération contrôlée ou encore dans des applications choisies parmi les capteurs, la catalyse, le criblage de molécules, la synthèse chimique dirigée, le traitement
20 d'échantillon, la chimie combinatoire, la séparation chirale, la protection de groupement, le déplacement d'équilibre, les médicaments polymériques ou encore l'encapsulation.

Ainsi, les inventeurs ont pu constater que l'empreinte préparée selon le procédé objet de la présente invention permet de stabiliser le complexe en équilibre entre le polymère patron et l'empreinte moléculaire en formation. Cette stabilisation permet
25 d'obtenir des effets de reconnaissance supérieurs à l'état de l'art existant et permet la stabilisation du complexe dans des milieux polaires et protiques tels que l'eau, alcools etc. La reconnaissance dans ces milieux est donc plus efficace.

Ce type d'interaction interpolymères a notamment été étudié dans G. Zhang *et al.*, "Interpolymer complexes comprising block copolymers due to specific interactions",
30 *Materials Science and Engineering C 10* (1990) 155-158, et dans G. Zhang *et al.*, "Intermacromolecular Complexation because of Specific Interactions 11. Ionic Interaction

Complexation an dits Comparison with Hydrogen-bonding Complexation", *Polymer* 42 (2001) 151-159.

Les empreintes préparées selon le procédé objet de la présente invention contiennent en outre avantageusement des zones de forte densité de sites de reconnaissance dans le matériau grâce à la bonne affinité existant entre le matériau polymérique constituant la matrice de l'empreinte et le polymère patron. Cette bonne affinité privilégie l'internalisation d'un plus grand nombre de polymères patrons et conduit donc au final à des empreintes dotées d'une capacité de reconnaissance significative et accrue.

Par "capacité de reconnaissance significative et accrue", on entend par exemple, dans le cadre de la présente invention, que la capacité de reconnaissance de l'empreinte formée à partir d'un polymère patron est augmentée d'au moins 15 %, par rapport à la capacité de reconnaissance d'une empreinte formée à partir de la même matrice mais avec, comme molécule patron, une molécule non polymérique, à savoir la molécule cible ou un de ses analogues, dans des conditions de préparation similaires. Cette amélioration est notamment illustrée dans les exemples 4 et 8 en relation avec la reconnaissance du naphthol et de la BOC-(L)-Tyrosine, respectivement.

L'invention présente par ailleurs l'avantage de résoudre le problème dû au relarguage de molécules patrons venant fausser les performances de l'empreinte lorsque la molécule patron est identique ou est un analogue de la molécule cible. Ainsi, dans le cadre de la présente invention, la molécule cible n'étant pas le patron, qui est un polymère, les mesures d'analyse de traces ne sont pas faussées par cette libération.

L'invention permet également d'accroître la porosité du matériau et donc facilite l'accès des molécules cibles et permet, le cas échéant, de ne pas utiliser de solvant porogène.

Les sites de reconnaissance des empreintes préparées selon le procédé objet de la présente invention présentent en outre l'avantage d'être homogènes, en ce qu'ils présentent des tailles et des configurations voisines. Leur accessibilité par une molécule cible, ainsi que l'étape de reconnaissance de ladite molécule cible sont par conséquent similaires, pour l'ensemble des sites de reconnaissance, ce qui peut par exemple se traduire par une plus faible largeur à mi-hauteur des pics chromatographiques rendant compte des temps de rétention desdites molécules cibles dans une colonne chromatographique remplie

d'une empreinte selon l'invention, par rapport à une colonne remplie par une empreinte de l'art antérieur.

Cette plus grande homogénéité tant des sites de reconnaissance, que de leur accessibilité est en particulier illustrée par les mesures d'HPLC qui figurent dans l'exemple

5 7.

Dans le cadre de la présente invention, on entend désigner par :

- "molécule cible", toute entité capable de se lier spécifiquement à l'empreinte moléculaire,
- "polymère patron", le polymère utilisé dans le cadre de la présente invention à titre de patron pour la préparation de l'empreinte moléculaire,
- "motif de l'unité monomère utile à la formation du site de reconnaissance", une partie de ladite unité monomère qui intervient dans la formation du site de reconnaissance,
- "fragment de molécule cible utile à la reconnaissance", la partie de la molécule cible qui intervient dans la reconnaissance lors de l'utilisation de l'empreinte moléculaire,
- "site de reconnaissance", la cavité de la matrice de l'empreinte moléculaire qui intervient effectivement dans la reconnaissance de la ou des molécules cible(s),
- "capacité de reconnaissance", la quantité de molécules cibles pouvant être reconnues par rapport à la quantité totale d'empreinte moléculaire, la quantité étant exprimée dans la même unité. Elle peut avantageusement être mesurée en masse de molécules cible reconnue par masse d'empreinte moléculaire,

Il est entendu, dans le cadre de la présente invention, que l'empreinte moléculaire selon l'invention peut être destinée à reconnaître plusieurs molécules cibles suivant l'utilisation souhaitée. Ainsi, sauf indication contraire, l'invention n'est pas limitée au seul mode de réalisation où les propriétés de reconnaissance visent une seule molécule cible.

Au sens de la présente invention on entend désigner par "polymère" un produit constitué par un ensemble de macromolécules obtenues à l'issue de la polymérisation ou de la copolymérisation de monomères et caractérisé par certaines propriétés telles que la masse moléculaire. Ainsi, par exemple un homopolymère comprend une seule sorte

d'unités monomères mais peut comprendre des macromolécules de masses moléculaires différentes.

Au sens de la présente invention, le terme "monomère" couvre une molécule capable d'être convertie en un polymère par combinaison avec elle-même ou avec d'autres molécules du même type.

Au sens de la présente invention on entend désigner par "copolymère" un polymère issu d'au moins deux types de monomères.

De plus, au sens de la présente invention :

- le terme "unité monomère" désigne l'unité constitutive la plus grande de la structure d'une macromolécule formée à partir d'une seule molécule de monomère,
- le terme "unité constitutive" désigne un atome ou un groupe d'atomes, incluant les atomes ou groupes d'atomes éventuellement attachés, qui constitue une partie fondamentale de la structure d'une macromolécule,
- le terme "bloc" désigne une partie d'une macromolécule comprenant de nombreuses unités constitutives et qui possède au moins une particularité de constitution ou de configuration qui n'apparaît pas dans les parties adjacentes,
- le terme "chaîne polymérique" ou "chaîne" désigne une macromolécule ou une partie d'une macromolécule comportant une séquence linéaire ou ramifiée d'unités consécutives située entre deux unités consécutives limites qui peuvent être chacune un groupe terminal, un point de branchement ou une particularité caractéristique de la macromolécule,
- les termes "polymère à blocs" et "copolymère à blocs" couvrent respectivement un polymère dont les macromolécules sont constituées de blocs enchaînés linéairement et un polymère à blocs issu de plusieurs espèces de monomères. Ils peuvent être réguliers, irréguliers ou séquencés,
- les termes "polymère greffé" et "copolymère greffé" couvrent un polymère composé de macromolécules comportant des blocs liés à la chaîne principale; ces blocs constituent des chaînes latérales et présentent des caractéristiques de constitution ou de conformation différentes de celles de la chaîne principale et respectivement un polymère greffé issu de plusieurs espèces de monomères,
- le terme "polymère en peigne" ou "copolymère en peigne", qui est une sous-catégorie de polymères ou copolymères greffés, désigne un polymère ou un

copolymère présentant un squelette linéaire d'une certaine nature chimique et des chaînes polymériques appelées "branches latérales", d'une nature chimique identique ou différente, également linéaires mais significativement plus courtes que le squelette, attachées de façon covalente audit squelette par une de leurs extrémités,

- 5 - le terme "copolymère alterné" couvre un copolymère constitué de macromolécules comportant deux sortes d'unités monomères distribuées en alternance,
- le terme "copolymère statistique" couvre un copolymère constitué de macromolécules dans lesquelles la distribution des unités monomères obéit à des lois statistiques connues, et le terme "copolymère aléatoire" couvre un copolymère constitué de
10 macromolécules dans lesquelles la probabilité de trouver une unité monomère donnée en un point donné de la chaîne est indépendante de la nature des unités adjacentes,
- le terme "copolymère à gradient", qui est une sous-catégorie des copolymères statistiques, désigne des copolymères présentant une évolution du ratio des différents monomères tout au long de la chaîne. La distribution dans les chaînes
15 polymériques des comonomères, dépend de l'évolution pendant la synthèse des concentrations relatives des comonomères,
- le terme "copolymère séquencé" désigne un copolymère dont les unités constitutives se succèdent dans un ordre défini,
- le terme "polymère hyperbranché" couvre les polymères de structure
20 arborescente,
- le terme "dendrimère" caractérise une structure tridimensionnelle. Les dendrimères sont apparentés à des polymères hyperbranchés, où les monomères branchés sont associés selon un processus arborescent autour d'un cœur central multivalent.

25 Dans le cas d'une ramification comprenant un point d'attache unique, on a affaire à un "polymère en étoile".

Le terme "compris entre ... et ..." signifie que les bornes sont également décrites.

POLYMER PATRON : HOMOPOLYMER OU COPOLYMER

30 Dans le cadre de la présente invention, les empreintes moléculaires se forment, lors de leur procédé de préparation, autour des macromolécules constituant le polymère patron. Le procédé peut mettre en œuvre simultanément plusieurs types de polymères patron.

L'empreinte ainsi obtenue est ensuite utilisée pour ses propriétés de reconnaissance vis-à-vis de motifs constitutifs des macromolécules, et non des macromolécules elles-mêmes.

5 Selon la présente invention, au moins 5 % en nombre d'unités monomères constituant le polymère patron interviennent dans la formation des sites de reconnaissance de la ou des molécule(s) cible(s). Avantageusement, les unités monomères intervenant dans la formation des sites de reconnaissance de la ou des molécule(s) cible(s) constituent ensemble ou isolément au moins un fragment de la ou des molécule(s) cible(s).

10 Plus précisément, selon un mode de réalisation privilégié de la présente invention, le polymère patron contient au moins 5 % d'unités monomères comprenant au moins un motif utile à la formation des sites de reconnaissance de la ou des molécule(s) cible(s).

Lorsque l'empreinte moléculaire est apte à reconnaître une seule molécule cible, plusieurs cas de figure peuvent se présenter, qui font tous partie de l'invention.

15 Dans un premier cas, au moins 5 % en nombre d'unités monomères comprennent chacune au moins un motif utile à la formation d'un site de reconnaissance, chacune correspondant à la molécule cible en tant que telle.

20 Dans un deuxième cas, au moins 5 % en nombre d'unités monomères comprennent au moins un motif utile à la formation d'un site de reconnaissance correspondant à un fragment de la molécule cible. Autrement dit, seule une partie de la molécule cible est retenue dans le site de reconnaissance.

25 Dans un troisième cas, c'est l'unité monomère en entier qui correspond à la molécule cible en tant que telle. Donc, au moins 5 % en nombre d'unités monomères sont chacune utiles à la formation d'un site de reconnaissance, chacune correspondant à la molécule cible.

Dans un quatrième cas, c'est l'unité monomère en entier qui correspond à un fragment de la molécule cible. Donc au moins 5 % en nombre d'unités monomères sont chacune utiles à la formation d'un site de reconnaissance, chacune correspondant à un fragment de la molécule cible.

30 On précise que l'on a employé le terme "correspond" pour comprendre le cas où il n'y a pas identité totale, à savoir où des substitutions mineures conduisent à des analogues chimiques qui n'affectent pas l'étape de reconnaissance.

Pour illustrer l'emploi de molécules patrons légèrement différentes des molécules cibles pouvant être nommées "analogues", on peut notamment citer F. Chapuis et al. "Optimization of the Class-selective Extraction of Triazines from Aqueous Samples using a Molecularly Imprinted Polymer by a Comprehensive Approach of the Retention Mechanism", *Journal of Chromatography A*, 999 (2003) 23-33, où le terbutylazine est utilisé comme molécule patron permettant la reconnaissance d'un certain nombre de composés de la même famille des triazines. De la même façon, le bromoclenbuterol peut être utilisé comme molécule patron, pour l'analyse du clenbuterol (voir notamment les publications déjà citées plus haut Blomgren et al. et C. Crescenzi et al.) ou encore un analogue de la sameridine pour détecter la sameridine (voir publication déjà citées plus haut L.I. Anderson et al.).

On note par ailleurs que, comme cela sera plus détaillé dans la description qui suit, l'empreinte moléculaire selon la présente invention peut être apte à reconnaître plusieurs molécules cibles pour autant que le polymère patron contient les unités monomères adéquates, à savoir intervenant dans la formation des sites de reconnaissance desdites molécules cibles. Les cas de figure détaillés ci-dessus lorsque la molécule cible est unique s'appliquent également en cas de pluralité de molécules cibles.

Au vu de ce qui précède, la présente invention est ainsi notamment relative à un procédé de préparation d'une empreinte moléculaire telle que définie plus haut, caractérisé en outre en ce qu'au moins 5 % en nombre des unités monomères constituent ou comprennent chacune au moins une molécule cible ou un de ses fragments utiles pour la reconnaissance.

Typiquement dans le cas précisé plus haut où c'est seulement un motif de l'unité monomère qui intervient dans la formation du site de reconnaissance, ce motif peut être lié dans l'unité monomère à la chaîne polymérisable par un linker adapté, et ainsi constituer une partie de la chaîne latérale du polymère patron.

Toujours dans ce cas mais selon une autre alternative, la molécule cible peut également être un dimère dont sont issues deux unités monomères voisines, un trimère, ou encore un de leurs analogues chimiquement proches. On précise alors que sont compris dans les 5 % définis plus haut les deux, voire les trois unités monomères destinées à la formation du site de reconnaissance de la molécule cible. Ainsi l'invention concerne

également un procédé de préparation d'une empreinte moléculaire telle que définie plus haut, caractérisée en outre en ce qu'au moins deux, trois voire plusieurs unités monomères, identiques ou différentes et consécutives reproduisent ensemble au moins une molécule cible ou un de ses fragments utiles pour la reconnaissance.

5

Dans le cas de molécules cibles multiples, par exemple de deux à quatre molécules cibles, les 5 % définis plus haut comprennent le nombre total des unités monomères destinées à la formation des sites de reconnaissance des molécules cibles.

On précise que suivant le cas d'espèce et notamment suivant la configuration
10 du polymère patron, l'empreinte sera plus ou moins sélective vis-à-vis de la reconnaissance d'un mélange de molécules apparentées à un monomère et/ou à un dimère et/ou à un trimère.

Selon un mode de réalisation préféré, le rapport entre la masse moléculaire du
15 polymère patron ou la masse moléculaire moyenne de l'ensemble des polymères patrons et la masse moléculaire de la molécule cible ou la masse moléculaire moyenne de l'ensemble des molécules cibles est compris entre 500 et 50 000. A titre illustratif, pour des polymères non dégradables, ce rapport peut varier de préférence entre 500 et 2 000 et pour des polymères dégradables, ce rapport peut avantageusement varier entre 500 et 10 000.

20

Le polymère patron doit être éliminable. L'élimination peut être effectuée par dégradation et/ou par lavage. Ainsi, les plus grosses molécules patrons devront être dégradables afin de produire une réduction en taille. Cette étape de dégradation est ensuite généralement suivie d'une étape de lavage. Les plus petites molécules patrons sont
25 généralement éliminables par lavage, sans que l'étape préalable de dégradation soit forcément nécessaire. Dans le cadre de la présente invention, un polymère est éliminable par lavage lorsqu'il peut être éliminé par exemple par un traitement simple de lavage ou trempage dans une solution aqueuse, éventuellement acidifiée et/ou chauffée ou organique. D'autres techniques d'élimination qui conduisent ou non à une dégradation suivant les
30 polymères considérés, qui font également partie de l'invention, peuvent également être employées, seules ou en combinaison, telles que ultrasons, dissolution chimique, extraction par un solvant, chauffage, effet mécanique, oxydations, dépolymérisation, liquide

supercritique, extraction micro-onde, pyrolyse, extraction accélérée par solvant (ASE), traitement enzymatique et osmose.

Dans tous les cas, il faut bien entendu veiller à ce que l'empreinte elle-même ne soit pas affectée par cette étape d'élimination. Par exemple, si l'oxydation est employée, il faut bien entendu qu'elle soit sélective envers le polymère patron et qu'elle ne dégrade pas également la matrice de l'empreinte.

Le polymère patron peut être d'origine naturelle.

En particulier, il peut être d'origine biologique. A ce titre, on peut par exemple citer les polypeptides, les oligopeptides, les protéines, les polysaccharides, les polynucléotides ou les polynucléosides.

Le polymère patron peut également être de synthèse. Il peut par exemple être obtenu par polymérisation par étapes telle que la polycondensation, par polymérisation en chaîne telle que la polymérisation radicalaire, anionique ou cationique ou bien par ouverture de cycle ou tout autre type de polymérisation. On peut citer à ce titre, de manière non limitative, les polymères ou copolymères de synthèse issus d'au moins l'une ou de plusieurs des familles de polymères choisis parmi les polysaccharides, les polyesters, les polyamides, les polyuréthanes et les polysiloxanes, éventuellement modifiés pour comprendre au moins 5 % d'unités monomères comprenant au moins un fragment de la ou des molécule(s) cible(s).

Les polymères précités ont la propriété d'être dégradables dans des conditions acceptables pour permettre leur élimination des empreintes moléculaires en cours de formation.

Parmi les homopolymères ou copolymères non dégradables, on peut citer ceux issus d'au moins une ou de plusieurs des familles de polymères choisies parmi polyacrylates, polyacrylamides, polyvinyliques, polyacroléine, polyacrylonitrile, poly(alcool vinylique), polyalkylvinylcétone, polybenzothiazole, poly carbonate de bis-phénol A, poly(chlorure de diallyl-diméthyl-ammonium), polychlorure de vinyle, polysiloxane, polyéther aromatique, polyéthersulfone, polyétherimide, polyéthylène imine, polyimide, polyimidazole, polyoxyméthylène, polyoxazole, polyoxyphénylène, polyoxytétraméthylène, polyvinylalkyléther, polyvinylpyrrolidone et

polyvinylméthylcétone. Ces homopolymères ou copolymères seront donc éliminés par lavage comme explicité plus haut.

Qu'il soit naturel ou de synthèse, le polymère patron peut être un
5 homopolymère ou un copolymère pouvant notamment être à blocs, greffés, séquencés, aléatoires, alternés, statistiques, en étoile, hyperbranchés, dendrimères, en peigne ou mixtes ou encore de type polymère ou copolymère comportant directement sur la chaîne polymérique principale, sur les greffons ou branches latérales au moins un fragment de la ou des molécule(s) cible(s). On désigne, dans le cadre de la présente invention, le polymère
10 patron comportant directement sur la chaîne polymérique principale au moins un fragment de la molécule cible par le terme "polymère patron coiffé".

Le polymère patron peut être réticulé. Dans ce cas, il est avantageusement dégradable.

Selon un mode de réalisation préféré, le polymère contient au moins 10 % en
15 nombre d'unités monomères intervenant dans la formation des sites de reconnaissance de la ou des molécule(s) cible(s).

Selon un autre mode de réalisation préféré, le polymère contient de 10 à 80 % en nombre d'unités monomères intervenant dans la formation des sites de reconnaissance de la ou des molécule(s) cible(s), de préférence de 15 à 60 % et de façon
20 encore plus préférée de réponse 20 à 55 %.

L'utilisation de ce polymère patron permet, entre autre, comme cela a été développé plus haut de stabiliser le complexe en équilibre entre le patron et la matrice de l'empreinte moléculaire en formation. Sans que cela lie l'invention à l'explication qui va suivre, les inventeurs ont émis l'hypothèse que cette stabilisation serait possible grâce à un
25 gain entropique, favorisant les interactions de type polymère-polymère en croissance puis polymère-polymère, et ce comparativement à l'approche consistant à utiliser des molécules patrons de faible masse, ou de façon plus générale, de masse proche des molécules cibles considérées selon l'invention. D'autre part la stabilisation est accrue par l'intégration de la molécule cible à une chaîne polymérique. En effet les mouvements de liaisons au sein
30 d'une chaîne polymère sont beaucoup plus complexes et plus lents que le mouvement brownien d'une petite molécule. Cela se traduit par des temps de relaxation beaucoup plus importants. La connectivité de la chaîne implique qu'aucune liaison ne peut être déplacée

indépendamment de ses voisines. Le fragment de molécule cible tel que défini précédemment lié à une chaîne latérale du polymère patron ou étant présent sur sa chaîne principale aura donc une dynamique de mouvement bien plus avantageuse pour stabiliser un complexe qu'une molécule patron isolée, c'est-à-dire non liée à une structure polymérique.

Un autre avantage du procédé de préparation d'empreintes moléculaires selon la présente invention réside aussi dans le fait que le polymère patron peut être conçu selon les applications visées, en fonction de chaque molécule cible.

Ainsi, le procédé selon la présente invention peut être mis en œuvre avec des polymères patrons dont les monomères sont existants ou encore peuvent être synthétisés à façon en fonction de la molécule cible visée. La molécule cible ou son fragment utile à la reconnaissance peut ainsi être intégrée dans un monomère par exemple grâce à un espaceur, selon des méthodes connues de l'homme de l'art ou encore être rendue polymérisable elle-même toujours par des techniques connues de l'homme de l'art

Ainsi, les liaisons entre la molécule cible ou son fragment utile à la reconnaissance et le squelette du polymère patron peuvent être basées sur la formation de liaisons covalentes. Parmi ces liaisons on peut citer les fonctions amide ou ester.

La molécule peut par ailleurs être liée au monomère par l'intermédiaire d'un espaceur. Dans le cas de l'utilisation d'un espaceur, le choix de l'espaceur dépend des groupements fonctionnels présents sur la molécule cible et sur le monomère du polymère patron. Nous pouvons citer par exemple le N-Succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate ou l'ester de N-(γ -maleimidobutyryloxy)succinimide qui permettent la connexion entre une molécule portant une fonction amine et une molécule portant un thiol. Nous pouvons aussi citer l'acide (4-N-maleimidophenyl) butyrique hydrazide qui permet la connexion entre une molécule portant une fonction aldéhyde et une molécule ayant une fonction thiol.

Les empreintes moléculaires selon la présente invention permettent d'augmenter la capacité de reconnaissance en comparaison avec des empreintes moléculaires formées à partir de molécules patrons identiques aux molécules cibles ou à partir de leurs analogues. Ainsi, non seulement la densité de sites de reconnaissance peut être augmentée, mais encore l'accessibilité desdits sites peut se trouver améliorée.

De plus, le polymère patron peut être aisément recyclé ce qui présente un avantage important de la présente invention. Ainsi, il est possible de récupérer les

polymères patrons par une technique très simple de précipitation par exemple par chauffage si la nature du polymère le permet ou encore dans un non-solvant, pour obtenir un produit réutilisable facilement, ou par tout autres techniques de purification ou d'extraction de polymères telles que le fractionnement, la dialyse, etc. En effet, à l'inverse, lorsque la molécule patron est la molécule cible ou un analogue, l'isolation est parfois rendue difficile, voire impossible après l'étape de formation de l'empreinte.

Selon une première variante de la présente invention, le polymère patron est un homopolymère et les unités monomères comprennent la molécule cible ou son fragment utile à la reconnaissance dans leur structure. Dans le cadre de cette variante, l'homopolymère est préférentiellement linéaire, branché ou en étoile.

Selon un mode de réalisation particulier de cette variante, l'empreinte moléculaire peut être destinée à reconnaître une molécule cible correspondant à deux, voire trois unités monomères.

Typiquement, comme cela est rapporté ultérieurement et plus particulièrement exemplifié, le polymère patron peut être un polysaccharide et l'empreinte ainsi formée, utile pour la reconnaissance d'un mono- ou d'un disaccharide. Ainsi, l'utilisation du dextrane comme polymère patron permet d'obtenir une empreinte moléculaire apte à retenir sélectivement le glucose.

Selon une deuxième variante de la présente invention décrite ci-après, et notamment exemplifiée, le polymère patron peut être un copolymère. Dans le cadre de cette deuxième variante, le polymère patron est préférentiellement de type linéaire à blocs, linéaire alterné, branché, en étoile ou en peigne.

Ainsi, l'utilisation d'un copolymère méthacrylate de méthyle/BOC-(L)-Tyrosine de *O*-méthacryloyle comme polymère patron permet d'obtenir une empreinte moléculaire apte à retenir en particulier la BOC-(L)-Tyrosine et la BOC-(L)-Phénylalanine.

Lorsque le polymère patron est un copolymère, la densité de sites de reconnaissances peut par exemple être modulée en faisant varier le ratio entre le nombre d'unités monomères correspondant à la ou aux molécule(s) cible(s) et le nombre total d'unité monomères.

L'utilisation d'un copolymère à titre de polymère patron peut présenter l'avantage de jouer sur les propriétés du polymère patron aisément. Ainsi, on peut par

exemple prévoir des unités monomères favorisant la solubilisation du polymère patron dans un solvant donné. On peut par conséquent également jouer sur la solubilité du fragment formant le site de reconnaissance. On peut encore faire varier sa flexibilité ou sa rigidité.

- 5 On peut également concevoir à titre de polymères patrons des copolymères en vue de préparer des empreintes multicibles.

A titre d'exemple de mise en œuvre de cette deuxième variante on peut également citer la préparation d'une empreinte de reconnaissance de naphthol à partir d'un copolymère patron de styrène/acrylate de naphthyle.

- 10 Selon un mode de réalisation particulier de cette deuxième variante, le polymère patron peut être un copolymère de type bloc -AAAAAABBBBBBCCCC ou alterné ABCABCABCA ou statistique AAABBBCCBABAACCCABBB linéaire, branché, en peigne, en étoile ou de tout autre type d'architecture de taille suffisamment importante pour qu'il comporte au moins trois unités de chaque type A, B, C. Les molécules cibles à
15 reconnaître sont de type A, B, C ou leur analogue ou AB, AC, BC, ABC ou autres combinaisons de petite masse ou de leurs analogues.

- Le nombre total moyen d'unités monomères compris dans l'homopolymère est de préférence d'au moins 6. De manière avantageuse, le nombre moyen d'unités
20 monomères compris dans l'homopolymère ou le copolymère est compris entre 6 et 1 000, de préférence entre 10 et 100 pour un polymère patron non dégradable, et de préférence entre 10 et 500 pour un polymère patron dégradable.

- A titre illustratif des différentes structures susceptibles d'être adoptées par le
25 polymère ou copolymère patron utilisé selon la présente invention, on peut tout particulièrement citer celles où tout ou partie du polymère ou copolymère se présente :

- sous forme de copolymères greffés dont les greffons comportent au moins un fragment de la ou des molécule(s) cible(s),
- sous forme de copolymères à blocs, par exemple di- ou tribloc,
30 comprenant enchaînés linéairement des blocs dont au moins l'un d'entre eux comporte au moins une unité monomère comprenant au moins un fragment de la ou des molécule(s) cible(s),

- sous forme d'un copolymère séquencé, statistique, aléatoire ou à gradient comprenant au moins une unité monomère comprenant au moins un fragment de la ou des molécule(s) cible(s),

5 - sous forme d'un copolymère comportant enchaînés linéairement des blocs et comportant à l'une ou à ses deux extrémités ou encore lié à la chaîne polymérique principale, sur les greffons ou les chaînes latérales, au moins un fragment de la ou des molécule(s) cible(s),

10 - sous forme d'un polymère comportant au moins un fragment de la ou des molécule(s) cible(s) à l'une ou à ses deux extrémités, ou encore lié à la chaîne polymérique principale, ou

 - sous forme d'un copolymère mixte, comportant au moins un fragment de la ou des molécule(s) cible(s).

15 Par "copolymère mixte", on entend un copolymère comportant des chaînes polymériques de nature différente, à savoir séquencées, statistiques, aléatoires, alternées, à blocs, greffées, en étoile, coiffées ou à gradient.

20 Bien entendu entrent également dans le cadre de la présente invention, les polymères et copolymères dans lesquels on combine entre eux plusieurs types de variantes listées ci-dessus et/ou détaillées ci-après, soit, comme cela a été décrit ci-dessus pour les copolymères mixtes, par association de chaînes ou de blocs de plus de deux types différents, soit sous forme d'un mélange de polymères ou copolymères différents.

25 Le polymère ou copolymère patron selon la présente invention présente de préférence une masse moléculaire en poids comprise entre 300 et 1 000 000, de préférence entre 500 et 100 000, et de préférence entre 1 000 et 20 000 pour les polymères non dégradables et de préférence entre 1 000 et 100 000 pour les polymères patrons dégradables.

30 En ce qui concerne la préparation des copolymères selon la présente invention, elle peut être effectuée par toute technique conventionnelle de polymérisation. Le choix de la méthode est généralement effectué en prenant en compte la structure désirée pour le copolymère, à savoir par exemple copolymère greffé ou copolymère séquencé et en fonction de la réactivité et du mode préférentiel de polymérisation des monomères en

présence. On peut par exemple citer la polymérisation radicalaire, contrôlée, anionique, cationique. La polymérisation peut être mise en œuvre par exemple en solution, en émulsion, en suspension, par précipitation, en microémulsion ou par polymérisation en phase dispersée.

5 Le polymère patron peut également, lorsqu'il est réticulé, prendre toute forme de structure. Ainsi la présente invention concerne en outre un procédé selon la présente invention, caractérisé en ce que le polymère patron est réticulé, branché, en réseau macroscopique ou est un microgel.

10 Les différents polymères patrons listés ci-après peuvent être mis en œuvre dans le cadre de la présente invention :

- les polysaccharides de type dextrane de petite masse, par exemple de 1000 à 10 000 ou de masse plus importante, utiles pour la reconnaissance du glucose, ou du dimère du glucose, tel qu'un disaccharide,

15 - les copolymères de polyacrylate de glucose et de polyméthacrylate de méthyle ou de tout autre acrylate ou méthacrylate, utiles pour la reconnaissance du glucose,

- tout autre polysaccharide ou autre oses, utiles pour la reconnaissance du glucose, ou du dimère du glucose, tel qu'un disaccharide,

20 - les polystyrènes, par exemple de masse 600 à 20 000 de sorte à conserver leurs caractères éliminables, utiles pour la reconnaissance du styrène, du toluène, du benzène ou tout autre analogue ou dimère,

- les copolymères du styrène avec tout autre monomère espaceur des groupements styréniques tels que le méthacrylate de méthyle afin de limiter les effets stériques non favorables, utiles pour la reconnaissance du styrène, du toluène, du benzène ou tout autre analogue ou dimère,

25 - les dérivés du sulfonate de styrène, utiles pour la reconnaissance du styrène, du toluène, du benzène ou tout autre analogue ou dimère,

- le poly(bisphénol A co-épichlorohydrin), utile pour la reconnaissance du bisphénol A,

30 - le poly(mélatamine-co-formaldéhyde), utile pour la reconnaissance de la mélatamine,

- l'ADN, utile pour la reconnaissance des bases,
- les polypeptides, utiles pour la reconnaissance de peptides,
- les copolymères, dont l'un des monomères est l'acrylate de naphthyle, utile pour la reconnaissance du naphthol,
- 5 - les copolymères, dont l'un des monomères est un dérivé d'un aminoacide, utile pour la reconnaissance d'aminoacides ou d'analogues.
- les copolymères, dont l'un des monomères est le BOC-(L)-Tyrosine de *O*-méthacryloyle, et par exemple le copolymère méthacrylate de méthyle/BOC-(L)-Tyrosine de *O*-méthacryloyle, utile pour la reconnaissance de la BOC-(L)-Tyrosine et de la
- 10 BOC-(L)-Phénylalanine,
- le dextrane, utile pour la reconnaissance du glucose,
- l'agar, l'agarose et l'agaropectine, utiles pour la reconnaissance d'unités (1→3)-β-D-galactopyranose-(1→4)-3,6-anhydro-α-L-galactopyranose,
- l'alginate, utile pour la reconnaissance d'acide D-mannuronique et
- 15 d'acide L-gulonique,
- l'arabinoxylane utile pour la reconnaissance de α-L-arabinofuranose et D-xylopyranose,
- la carraghénine, utile pour la reconnaissance de D-galactopyranose,
- la carboxyméthylcellulose (CMC), utile pour la reconnaissance de
- 20 carboxyméthyl D-glucopyranose
- la cellulose et le β-glucane, utiles pour la reconnaissance de D-glucopyranose,
- la gélatine, utile pour la reconnaissance de polypeptides,
- la gomme gellane, utile pour la reconnaissance de tétrasaccharide
- 25 linéaires→4)-L-rhamnopyranosyl-(α-1→3)-D-glucopyranosyl-(β-1→4)-D-glucuronopyranosyl-(β-1→4)-D-glucopyranosyl-(β-1→ avec des substituants O(2) L-glyceryl et O(6) acétyle ou des unités prises séparément,
- la gomme de guar, utile pour la reconnaissance de D-mannopyranose ou α-D-galactose,
- 30 - la pectine, utile pour la reconnaissance d'acide D-galacturonique partiellement méthylé, d'unités α-(1→2)-L-rhamnosyl-α -(1→4)-D-galacturonosyle, L-arabinose et D-galactose,

- l'amidon, l'amylose et l'amylopectine, utiles pour la reconnaissance d'unités D-glucose,
- la gomme xanthane, utile pour la reconnaissance de glucane D-glucopyranose, ainsi que le trisaccharide (3→1)- α -lié D-mannopyranose-(2→1)- β -D-acide glucuronique -(4→1)- β -D-mannopyranose,
- le chitosane, utile pour la reconnaissance de N-acétyl-D-galactosamine et D-galactosamine,
- les copolymères, dont l'un des monomères est modifié par un groupement prostaglandine, utile pour la reconnaissance des anti-ulcéreux,
- les copolymères, dont l'un des monomères est modifié par un groupement barbiturique, utile pour la reconnaissance des anti-épileptiques,
- les copolymères, dont l'un des monomères est modifié par un groupement benzodiazépine, utile pour la reconnaissance d'hypnotiques, anxiolytiques et myorelaxants,
- les copolymères, dont l'un des monomères est modifié par un groupement furosémidé, utile pour la reconnaissance de diurétiques,
- les copolymères, dont l'un des monomères est modifié par un groupement ranitidine et cimétidine, utile pour la reconnaissance d'anti-ulcéreux,
- les copolymères, dont l'un des monomères est modifié par un groupement sulfonamide, utile pour la reconnaissance d'antibiotiques,
- les copolymères, dont l'un des monomères est modifié par un groupement tétracycline, utile pour la reconnaissance d'antibiotiques,
- les copolymères, dont l'un des monomères est modifié par un groupement pénicilline, utile pour la reconnaissance d'antibiotiques,
- les copolymères, dont l'un des monomères est modifié par un groupement chloramphénicol, utile pour la reconnaissance d'antibiotiques,
- les copolymères, dont l'un des monomères est modifié par un groupement macrolide, utile pour la reconnaissance d'antibiotiques,
- les copolymères, dont l'un des monomères est modifié par un groupement aminoside, utile pour la reconnaissance d'antibiotiques,
- les copolymères, dont l'un des monomères est modifié par un groupement quinolone, utile pour la reconnaissance d'antibiotiques,

- les copolymères, dont l'un des monomères est modifié par un groupement triazine ou organophosphoré, utile pour la reconnaissance de pesticides,

- les copolymères, dont l'un des monomères est modifié par un groupement ayant des propriétés organoleptiques, utile pour la reconnaissance de parfums et d'arômes,

- les copolymères, dont l'un des monomères est modifié par un groupement riboflavine, caroténoïdes, tartrazine ou amarante, utile pour la reconnaissance de colorants alimentaires,

- les copolymères, dont l'un des monomères est modifié par un groupement polyphénol ou flavonoïde, utile pour la reconnaissance d'antioxydants,

- les copolymères, dont l'un des monomères est modifié par un groupement colorant azoïque, anthraquinonique, polyméthinique, phtalocyanine, utile pour la reconnaissance de colorants,

- les copolymères, dont l'un des monomères est modifié par un groupement tocophérols, stéroïdes ou stérols, utile pour la reconnaissance de molécules ayant des propriétés biologiques,

- les copolymères, dont l'un des monomères est modifié par une molécule toxique ou son analogue, utile pour la reconnaissance de molécules toxiques.

Le terme « copolymères, dont l'un des monomères est modifié par » comprend les copolymères pour lesquels le fragment utile à la reconnaissance est intégré dans un monomère par exemple grâce à un espaceur ou est rendu polymérisable comme cela est exposé ci-dessus.

La présente invention est en outre relative à l'utilisation de molécules patrons de nature polymérique, dites polymères patrons, éliminables par dégradations et/ou par lavage, pour la préparation d'empreintes moléculaires comprenant des sites de reconnaissance pour au moins une molécule cible caractérisée en ce qu'au moins 5 % en nombre des unités monomères le constituant interviennent dans la formation des sites de reconnaissance de la ou des molécule(s) cible(s).

PROCEDE DE PREPARATION ET NATURE DE L'EMPREINTE

L'étape de polymérisation de l'empreinte autour du polymère patron fait appel à des techniques en soi connues de l'homme de l'art. On peut ainsi se rapporter à l'article

Peter A.G. Cormack *et al.*, *Journal of Chromatography B*, 804 (2004) 173-182, qui présente une revue des techniques disponibles autour des aspects de la polymérisation d'empreintes moléculaires. Le contenu de cet article est incorporé ici par référence.

L'empreinte moléculaire ou plus précisément la matrice la constituant peut ainsi être formée par polymérisation radicalaire. Les monomères vinyliques, tels que l'éthylène, le styrène et le méthacrylate de méthyle, sont des monomères particulièrement adaptés pour cette technique. Tout initiateur peut être utilisé, tel que l'azobisisobutyronitrile (AIBN).

L'empreinte moléculaire peut aussi être formée par copolymérisation radicalaire, dans le but de faire varier les propriétés du polymère. On peut par exemple citer le copolymère de méthacrylate de méthyle/méthacrylate de butyle.

L'empreinte moléculaire peut être formée de polymères ou copolymères réticulés. Selon le degré de réticulation, on parle de polymère ou de copolymère branché, de réseaux macroscopiques ou de microgels. L'obtention de tels polymères est possible grâce à la présence d'agents de réticulation, qui sont des monomères multi-fonctionnels. Le divinylbenzène est un agent de réticulation classiquement employé. Les polymères de type gel sont obtenus en présence réduite d'agent de réticulation, par exemple < 5 % ou à des degrés de réticulation plus élevés en présence de petits volumes de solvants. A des degrés de réticulation plus élevés et/ou en présence de plus grands volumes de solvants, on peut obtenir des polymères macroporeux. Lorsqu'enfin le volume de solvant utilisé est augmenté au-delà de ceux normalement utilisés pour la préparation de polymères macroporeux, on peut obtenir des microgels. Ces microgels présentent un intérêt particulier lorsque l'on met en œuvre une polymérisation par précipitation, avantageuse pour obtenir des particules de polymères sphériques de la taille du micromètre.

A titre de monomères utiles pour la synthèse des empreintes, on peut citer :

- des monomères acides : acide méthacrylique (MAA), acide p-vinylbenzoïque, acide acrylique (AA), acide itaconique, acide 2-(trifluorométhyl)-acrylique (TFMAA), acide sulfonique d'acrylamido-(2-méthyl)-propane (AMPSA),

- des monomères basiques : 4-vinylpyridine (4-VP), 2-vinylpyridine (2-VP), 4-(5)-vinylimidazole, 1-vinylimidazole, allylamine, N,N'-diéthyl aminoéthyle méthacrylamide (DEAEM), N-(2-aminéthyl)-méthacrylamide, N,N'-diéthyl-4-

styrylamidine, aminoéthylméthacrylate de N,N,N-triméthyle, N-vinylpyrrolidone (NVP), ester d'éthyl urocanique,

- des monomères neutres : acrylamide, méthacrylamide, méthacrylate de 2-hydroxyéthyle (2-HEMA), acide trans-3-(3-pyridyl)-acrylique, acrylonitrile (AN),
5 méthacrylate de méthyle (MMA), styrène, éthylstyrène.

A titre d'agents de réticulation, on peut citer : p-divinylbenzène (DVB), 1,3 diisopropényl benzène (DIP), diméthacrylate d'éthylène glycol (EGDMA), diméthacrylate de tétraméthylène (TDMA), *N,O*-bisacryloyl-L-phénylalaninol, 2,6-bisacryloylamidopyridine, 1,4-phénylène diacrylamide, *N,N'*-1,3-phénylènebis(2-méthyl-
10 2-propénamide) (PDBMP), acide 3,5-bisacrylamido benzoïque, 1,4-diacryloyl pipérazine (DAP), *N,N'*-méthylène bisacrylamide (MDAA), *N,N'*-éthylène bisméthacrylamide, *N,N'*-tétraméthylène bisméthacrylamide, *N,N'*-hexaméthylène bisméthacrylamide, diméthacrylate d'anhydroerythritol, 1,4 ;3,6-dianhydro-D-sorbitol-2,5-diméthacrylate, isopropylènebis(1,4-phénylène) diméthacrylate, triméthylpropane triméthacrylate
15 (TRIM), pentaérythritol triacrylate (PETRA), pentaérythritol tétraacrylate (PETEA).

A titre d'initiateur, on peut citer : les initiateurs thermiques tels que l'azobisisobutyronitrile (AIBN), l'azobisdiméthylvaléronitrile (ABDV), le diméthylacétal de benzyle et peroxyde de benzoyl (BPO), l'acide 4,4'-azo(4-cyanovalérique) et les
20 initiateurs photochimiques tels que les dérivés de l'acétophénone, les dérivés de l'oxyde de phosphine, les dérivés de cétones aminées, les systèmes binaires du type benzophénone et N-méthyl diéthanolamine.

Les solvants peuvent être porogènes sans que cela soit nécessaire étant donné les avantages déjà évoqués du procédé de préparation selon la présente invention. A titre de solvant porogène communément employé on peut citer le toluène et l'acétonitrile. Un
25 solvant protique tel que l'eau, l'alcool ou leur mélange peut également être utilisé du fait de la stabilisation améliorée déjà évoquée précédemment du complexe entre l'empreinte et le polymère patron.

Il est également possible de jouer sur la nature du solvant de sorte que le polymère patron ait une conformation étendue lors de la formation de l'empreinte ou d'une
30 conformation pelote en utilisant par exemple dans ce dernier cas un solvant thêta.

Il est de plus possible de jouer directement sur la nature chimique du polymère patron pour obtenir la conformation souhaitée dans le milieu de formation de l'empreinte.

Les procédés de préparation des empreintes moléculaires selon la présente invention, du fait de la forte densité en sites de reconnaissance pouvant être obtenue, présentent un avantage considérable par rapport aux empreintes classiques lorsqu'un procédé par précipitation est utilisé pour leur préparation. Ainsi, selon les techniques connues de l'état de l'art, il est nécessaire d'accroître la quantité de molécules patrons pour augmenter les chances de créer des empreintes moléculaires dans les microsphères obtenues car la solution est très diluée.

De la même façon et pour les mêmes raisons, les empreintes moléculaires selon la présente invention sont particulièrement avantageuses lors de leur utilisation pour préparer des microgels.

Ainsi, grâce au procédé selon la présente invention, il n'est plus nécessaire d'utiliser une grande quantité de polymère patron. Autrement dit, la perte d'une quantité importante de molécules patrons, qui n'ont pas participé à la formation de l'empreinte, n'a plus à être déplorée, comme cela est le cas dans les deux techniques de l'art antérieur évoquées ci-dessus : procédé par précipitation et formation des microgels.

Par conséquent la présente invention s'étend également aux variantes de procédés de préparation selon la présente invention, selon lesquelles la synthèse de l'empreinte moléculaire se fait par polymérisation en solution, en émulsion, en suspension, par précipitation, en microémulsion ou par polymérisation en phase dispersée ou est effectuée dans des conditions de préparation de microgels.

Un procédé hybride inorganique-organique sol-gel peut être utilisé pour fabriquer l'empreinte moléculaire. Autrement dit, la matrice de l'empreinte comprend avantageusement un réseau à base d'organosilicium.

La solution d'oxyde de silicium peut par exemple consister en une solution hybride de précurseurs fonctionnalisés d'organo-silicium (phényltriméthoxysilane et méthyltriméthoxysilane par exemple) et polymère patron.

On peut se reporter aux deux articles suivants pour illustrer cette variante du procédé de préparation de l'empreinte selon la présente invention : A. Olwill et al. "The Use of Molecularly Imprinted sol-gels in Pharmaceutical Separations", *Biosensors and Bioelectronics* 20 (2004) 1045-1050 et R. Makote et al. "Template Recognition in Inorganic-organic Hybrid Films Prepared by the sol-gel Process", *Chem. Mater.*, 1998, 10, 2440-2445.

APPLICATIONS

Les empreintes moléculaires selon la présente invention sont plus particulièrement adaptées pour reconnaître les molécules cibles de "petite" taille. Ainsi, selon un mode de réalisation préféré de l'invention, les molécules cibles ont un poids moléculaire inférieur à 300 000 g/mol, de préférence à 10 000 g/mol et de façon encore plus préférée à 1 000 g/mol.

Les empreintes moléculaires selon la présente invention sont particulièrement adaptées à l'analyse de traces d'une ou de plusieurs molécules cibles. En effet, ces empreintes moléculaires, du fait de l'utilisation de polymères patrons, entités bien distinctes des molécules cibles, l'efficacité (en particulier de mesure) des empreintes n'est pas amoindrie lors de l'utilisation par le relargage de molécules cibles, ainsi que cela est à déplorer lorsqu'on utilise des empreintes classiques.

Les empreintes selon la présente invention trouvent aussi leur application d'une façon générale dans l'extraction, la séparation, la purification, la détection, l'absorption, l'adsorption, la rétention et la libération contrôlée.

Les empreintes selon l'invention trouvent ainsi notamment leur application dans le domaine de l'analyse dans le domaine de l'agroalimentaire, de la pharmacie, du biomédical, de l'alimentaire, de la défense ou de l'environnement.

Elles peuvent également trouver une application dans le domaine des capteurs, tels que biocapteurs, dans le criblage moléculaire, la synthèse chimique dirigée, le traitement d'échantillon, la chimie combinatoire, la séparation chirale, la protection de groupement, la catalyse, le déplacement d'équilibre, les médicaments polymériques, et l'encapsulation.

Les exemples ci-après sont donnés à titre illustratif et sans caractère limitatif de l'invention.

EXEMPLES

5 Exemple 1 : Synthèse d'une empreinte moléculaire avec le dextrane comme molécule patron pour la reconnaissance du glucose.

4 g de bisacrylamide de méthylène est dissous à 60 °C dans 8 ml de diméthylsulfoxyde. Une seconde solution est préparée en mélangeant 0,26 g de dextrane de masse molaire moyenne 90 000 et 0,46 g d'acrylamide dans 2 ml de diméthylsulfoxyde à 50 °C.

10 Les deux solutions sont mélangées à chaud. 91 mg d'azobisisobutyronitrile est ajoutée, la solution est claire et transparente. La solution est dégazée pendant 5 minutes par bullage d'argon.

La polymérisation s'effectue pendant 48 heures à 50 °C et entraîne la formation d'un monolithe blanc.

15 Un échantillon témoin est réalisé de la manière décrite ci dessus en absence de dextrane. Le polymère est un monolithe de couleur blanche.

Les monolithes sont broyés puis lavés en milieu aqueux pour éliminer les solvants et une partie du dextrane. Le reste du dextrane est éliminé par plusieurs dégradations successives en milieu acide à 60 °C. Pour parfaire le lavage, les échantillons
20 sont lavés en utilisant un soxhlet en milieu aqueux. Après tamisage, les particules de taille entre 25 et 45 µm sont utilisées pour la reconnaissance.

Le pourcentage en nombre des unités monomères constituant le polymère patron intervenant dans la formation des sites de reconnaissance de glucose est de 100 %.

25 Exemple 2 : Propriété de reconnaissance vis-à-vis du glucose en milieu aqueux.

100 mg de chaque échantillon de poudre sont placés dans un pilulier. Après addition de 1 mL d'une solution de glucose (1 mM soit 180 µg/mL), les piluliers sont agités pendant deux heures trente puis les solutions sont analysées par un dosage du glucose.

Dosage du glucose par la méthode du glucose oxydase :

Le glucose est dosé par une méthode classique utilisant le glucose oxydase et du peroxidase en présence de o-dianisidine.

- 5 La solution de glucose des échantillons du témoin et du MIP est diluée à moitié pour rentrer dans l'échelle de concentrations de glucose mesurables.

Solution	Absorbance	concentration glucose ($\mu\text{g/ml}$)
Etalon 0	0,0153	0
Etalon 10 $\mu\text{g/ml}$	0,1583	10
Etalon 25 $\mu\text{g/ml}$	0,4096	25
Etalon 50 $\mu\text{g/ml}$	0,7976	50
Etalon 90 $\mu\text{g/ml}$	1,3333	90
MIP	1,1052	74
Témoin	1,2743	86

- 10 Les concentrations des échantillons du témoin et du MIP sont donc respectivement de 172 $\mu\text{g/mL}$ et 148 $\mu\text{g/mL}$. Ces résultats sont reproductibles.

Le témoin permet de mesurer l'adsorption non spécifique du glucose sur le polymère. Le dosage montre une faible adsorption du glucose sur le témoin puisqu'il y avait initialement 180 μg de glucose en solution et qu'il en reste 172 μg .

- 15 Le MIP cumule l'adsorption du glucose produite de façon non spécifique (similaire au témoin) et liée à la reconnaissance par la matrice.

Dans le cas du MIP, 32 $\mu\text{g/mL}$ de glucose ont été adsorbés. 24 μg de glucose peuvent donc être associé à la reconnaissance spécifique du glucose.

- 20 Exemple 3 : Synthèse de la molécule patron copolymère styrène/acrylate de naphtol "PS-Naphtol", d'une empreinte de reconnaissance du naphtol à partir d'un polymère patron conforme à l'invention et d'une empreinte à partir du naphtol à titre de molécule patron (comparatif).

Dans un ballon, 5,2 g de styrène, 0,5 g de d'acrylate de naphtyle, 28,8 mg d'azobisisobutyronitrile et 3,49 mg de dodecyl thiol sont mélangés. La solution est complétée jusqu'à 20 ml avec du toluène. La solution est bullée pendant 5 min avec de l'argon et placée à 70°C pendant 15 heures. Le polymère (PS-Naphtol) est récupéré par précipitation dans l'éthanol.

Le divinylbenzène est lavé plusieurs fois par une solution basique saturée au KCl pour éliminer l'inhibiteur. Il est séché sur MgSO₄. L'amorceur azobisisobutyronitrile est recristallisé dans l'acétone.

Une solution mère contenant 2,8 ml d'acide méthacrylique préalablement distillé, 32 ml de divinyl benzène et 44 ml de toluène est préparée. Plusieurs échantillons sont préparés en utilisant 20 ml de la solution mère.

Matériau Témoin : 20 ml de la solution mère auxquels sont ajoutés 90 mg d'AIBN.

Empreinte PS-Naphtol : 20 ml de la solution mère dans laquelle sont dissous 2,15 g de PS-Naphtol décrit précédemment ainsi que 90 mg d'AIBN. Cette masse de PS-Naphtol correspond à une estimation de 2,24 mmol de naphtol.

Le pourcentage en nombre des unités monomères constituant le polymère patron intervenant dans la formation, dans l'empreinte PS-Naphtol, des sites de reconnaissance du naphtol est de 12 %. Ce pourcentage en nombre a été déterminé par RMN du ¹H.

Empreinte Naphtol (comparatif) : 20 ml de la solution mère dans laquelle sont dissous 0,392 g de naphtol (2,8 mmol) ainsi que 90 mg d'AIBN.

L'oxygène est chassé en bullant les solutions pendant cinq minutes avec de l'argon.

La polymérisation s'effectue à 50 °C pendant 48 heures pour former un monolithe blanc. Les polymères ainsi formés sont broyés, lavés dans une solution de tétrahydrofurane pendant plusieurs heures puis par extraction au soxhlet et tamisés. Les solutions de tétrahydrofurane sont ensuite évaporées pour les concentrer. En les versant dans l'éthanol, la solution utilisée avec l'échantillon PS-naphtol montre une précipitation ce

qui montre une récupération d'un polymère blanc qui constitue une grande partie des polymères patrons utilisés dans l'expérience (>70%).

Les échantillons dont la taille est située entre 25 et 45 μm sont utilisés pour l'étude de la reconnaissance du naphthol.

5

Exemple 4 : Propriété de reconnaissance vis-à-vis du naphthol à 1 mM.

100 mg de chaque empreinte synthétisée dans l'exemple 3 sont placés dans des flacons en présence d'1ml d'une solution naphthol 1 mM dans l'acétonitrile. La solution est analysée après 3 heures et 18 heures.

10

L'adsorption est négligeable sur l'échantillon témoin.

Le tableau exprime la quantité de naphthol (en mg) adsorbée par gramme de matériaux à empreinte moléculaire.

Tableau donnant la masse de naphthol adsorbée (mg) par gramme de matériaux à empreinte moléculaire.

15

Empreinte	3 heures	18 heures
PS-Naphtol	0,288	0,360
Naphtol (comparatif)	0,158	0,302

On observe une augmentation de la capacité de reconnaissance respectivement de 82 % à 3 heures et de 20 % à 18 heures.

20

Les deux empreintes adsorbent le naphthol et cela montre un effet d'empreinte. L'adsorption sur l'empreinte PS-Naphtol est beaucoup plus rapide que sur l'empreinte Naphtol, cela semble dénoter une plus grande accessibilité des sites de reconnaissance et une augmentation de la densité en sites de reconnaissance.

25

De plus on constate que l'adsorption sur l'empreinte PS-Naphtol est toujours significativement plus importante que sur l'empreinte Naphtol.

Exemple 5 : Comparaison des capacités de reconnaissance du naphthol à une concentration de 100 mM.

100 mg de chaque empreinte synthétisée dans l'exemple 3 sont placés dans des flacons en présence d'1ml d'une solution naphthol de 100 mM dans l'acétonitrile. La solution est analysée après 96 heures afin d'atteindre l'état d'équilibre. On s'est en effet placé dans des conditions de concentration en naphthol beaucoup plus importante que dans l'exemple 4, de sorte à déterminer la capacité de reconnaissance réelle en surconcentration.

Les quantités adsorbées sont déterminées par HPLC en analysant les concentrations des solutions surnageantes.

Le tableau exprime la quantité de naphthol (en mg) adsorbée par gramme de matériaux à empreinte moléculaire.

Tableau donnant la masse de naphthol adsorbée (mg) par gramme de matériaux à empreinte moléculaire.

Empreinte	96 heures
PS-Naphthol	13
Naphthol (comparatif)	7,4

Les deux empreintes adsorbent le naphthol. L'adsorption sur l'empreinte PS-Naphthol est beaucoup plus importante. On observe une augmentation de la capacité de reconnaissance de 74% par rapport à celle du matériau à empreinte Naphthol.

Exemple 6 : Synthèse de la molécule patron copolymère méthacrylate de méthyle/ BOC-(L)-Tyrosine de *O*-méthacryloyle, d'une empreinte de reconnaissance de la BOC-(L)-Phénylalanine notée "PMMA-BOC-(L)-Phénylalanine" à partir de la molécule patron copolymère conforme à l'invention et d'une empreinte à partir de la BOC-(L)-Phénylalanine à titre de molécule patron (comparatif).

Dans un ballon, 0,645 g de méthacrylate de méthyle distillé, 0,968 g de la BOC-(L)-Tyrosine de *O*-méthacryloyle, 5,3 mg d'azobisisobutyronitrile et 0,321 g de dodécyl thiol sont mélangés. La solution est complétée avec 4,5 mL de tétrahydrofurane. La solution est bullée pendant 10 min avec de l'azote et placée à 50°C pendant 70 heures. 1,02 g de molécule patron copolymère méthacrylate de méthyle/ BOC-(L)-Tyrosine de *O*-méthacryloyle sont récupérés par précipitation dans le cyclohexane. Le nombre d'unités

monomères déterminé par RMN sur le polyméthacrylate de méthyle (PMMA) synthétisé dans ces mêmes conditions est de l'ordre de 15.

Le diméthylacrylate de l'éthylène glycol est lavé plusieurs fois par une solution basique saturée au NaCl pour éliminer l'inhibiteur. Il est séché sur MgSO₄. L'amorceur azobisisobutyronitrile est recristallisé dans l'acétone.

Trois échantillons contenant chacun 295 mg d'acide méthacrylique préalablement distillé, 360 mg de 4-vinylpyridine, 6,12 g de diméthylacrylate de l'éthylène glycol et 11 ml d'acétonitrile sont préparés.

Au premier échantillon (matériau témoin) sont ajoutés 286 mg de PMMA synthétisés dans les mêmes conditions que la molécule patron copolymère. La solution obtenue est placée à 50 °C pendant une heure puis à 4 °C pendant 14 heures.

Au deuxième échantillon (empreinte PMMA-BOC-(L)-Phénylalanine) sont ajoutés 500 mg de molécule patron copolymère méthacrylate de méthyle/ BOC-(L)-Tyrosine de *O*-méthacryloyle décrit précédemment. La solution obtenue est placée à 50 °C pendant une heure puis à 4 °C pendant 14 heures.

Le pourcentage en nombre des unités monomères constituant le polymère patron intervenant dans la formation, dans l'empreinte "PMMA-BOC-(L)-Phénylalanine", des sites de reconnaissance de la BOC-(L)-Phénylalanine est de 30 %. Ce pourcentage en nombre a été déterminé par RMN du ¹H.

Au troisième échantillon (comparatif) (empreinte BOC-(L)-Phénylalanine) sont ajoutés 286 mg de PMMA synthétisés dans les mêmes conditions que la molécule patron copolymère et 227 mg de BOC-(L)-Phénylalanine. La solution obtenue est placée à 50 °C pendant une heure puis à 4 °C pendant 14 heures.

L'oxygène est chassé dans les trois échantillons en bullant les solutions pendant dix minutes avec de l'azote et 78 mg d'azobisisobutyronitrile sont ajoutés dans chaque échantillon.

La polymérisation s'effectue à 50 °C pendant 56 heures pour former un monolithe blanc. Les polymères ainsi formés sont broyés, lavés par une solution de tétrahydrofurane pendant quatre heures puis par une solution de tétrahydrofurane à 10 % en acide acétique pendant une nuit et tamisés. Les solutions de tétrahydrofurane sont ensuite évaporées pour les concentrer. En les versant dans le cyclohexane, la solution utilisée avec l'échantillon PMMA-BOC-(L)-Phénylalanine montre une précipitation qui

correspond à un polymère blanc qui constitue une grande partie de la molécule patron copolymère utilisé dans l'expérience (>75%).

Les particules dont la taille est située entre 25 et 45 μm sont introduites dans une colonne HPLC 150 x 4,6 mm puis tassées par pression et lavées avec de l'acétonitrile pour l'étude de la reconnaissance de la BOC-(L)-Tyrosine et de la BOC-(L)-Phénylalanine en HPLC.

Exemple 7 : Propriété de reconnaissance vis-à-vis de la BOC-(L)-Tyrosine et de la BOC-(L)-Phénylalanine par HPLC.

1 mM et 10 mM de BOC-(L)-Tyrosine dans l'acétonitrile ainsi que 10 mM de BOC-(L)-Phénylalanine sont injectées sur les trois colonnes remplies respectivement de l'empreinte « PMMA-BOC-(L)-Phénylalanine », de l'empreinte « BOC-(L)-Phénylalanine » et du « matériau témoin ».

L'éluant utilisé est une solution d'acétonitrile à 0,1 % d'acide acétique, à un débit de 1 mL/min. La détection de la BOC-(L)-Tyrosine est faite à 277 nm tandis que celle de la BOC-(L)-Phénylalanine est faite à 258 nm. A l'exception des 5 μL de solution d'acétone dans l'acétonitrile utilisés pour déterminer le volume mort de la colonne, les volumes d'injection sont de 20 μL .

Les temps de rétention mesurés pour chacune des 3 colonnes ainsi que les largeurs à mi-hauteur des pics obtenus sont reportés dans le tableau ci-dessous.

	Temps de rétention (min.) BOC-(L)-Tyrosine		Largeur du pic à mi-hauteur (min.) BOC-(L)-Tyrosine		Temps de rétention (min.) BOC-(L)-Phénylalanine	Largeur du pic à mi-hauteur (min.) BOC-(L)-Phénylalanine
	1 mM	10 mM	1mM	10 mM	10 mM	10 Mm
Empreinte PMMA-BOC(L)-Phénylalanine	12,65	7,967	4,05	1,82	5,58	1,08
Empreinte BOC-(L)-Phénylalanine (comparatif)	15,20	9,00	6	3,16	7,87	2,20
Matériau témoin	6,367	5,167	1,67	1,38	2,85	0,77

L'ensemble des solutions de la BOC-(L)-Tyrosine et de la BOC-(L)-Phénylalanine présentent des temps de rétention plus importants pour les deux empreintes que pour le matériau témoin (polymère non imprimé).

Cela illustre la reconnaissance desdites empreintes vis-à-vis de la BOC-(L)-Tyrosine et de la BOC-(L)-Phénylalanine.

La largeur des pics à mi-hauteur mesurée pour l'empreintes PMMA-BOC-(L)-Phénylalanine selon l'invention est par ailleurs plus faible que celle mesurée pour l'empreinte BOC-(L)Phénylalanine, ce qui traduit une plus grande homogénéité tant des sites de reconnaissance que dans leur accessibilité dans l'empreinte préparée à partir du polymère patron PMMA-BOC-(L)-Phénylalanine selon l'invention.

Exemple 8 : Comparaison des capacités de reconnaissance de la BOC-(L)-Tyrosine à une concentration de 20 mM.

100 mg de chacune des deux empreintes synthétisées dans l'exemple 6 (empreinte PMMA-BOC-(L)-Phénylalanine et empreinte BOC-(L)-Phénylalanine sont placés dans des flacons en présence d'1ml d'une solution de la BOC-(L)-Tyrosine de 20 mM dans l'acétonitrile contenant 0,1 % d'acide acétique. La solution est analysée après 3 heures et 5 heures.

Les quantités adsorbées sont déterminées par HPLC en analysant les concentrations des solutions surnageantes.

Le tableau exprime la quantité de BOC-(L)-Tyrosine (en mg) adsorbée par gramme de matériaux à empreinte moléculaire.

Tableau donnant la masse de BOC-(L)-Tyrosine adsorbée (en mg) par gramme de matériaux à empreinte moléculaire.

Empreinte	3 heures	5 heures
PMMA-BOC-(L)-Phénylalanine	12,1	12,0
BOC-(L)-Phénylalanine (comparatif)	8,9	8,4

Les deux empreintes adsorbent la BOC-(L)-Tyrosine. L'adsorption sur l'empreinte PMMA-BOC-(L)-Phénylalanine est plus importante. On observe une

augmentation de la capacité de reconnaissance de 35% par rapport à celle du matériau à empreinte BOC-(*L*)-Phénylalanine.

REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation d'une empreinte moléculaire comprenant des sites de reconnaissance pour au moins une molécule cible, ladite empreinte étant obtenue à partir d'au moins une molécule patron de nature polymérique, dite polymère patron, caractérisé en ce que ledit polymère patron est différent de la ou des molécule(s) cible(s), est éliminable par dégradation et/ou par lavage, et en ce qu'au moins 5 % en nombre des unités monomères le constituant interviennent dans la formation des sites de reconnaissance de la ou des molécule(s) cible(s).

2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que le polymère contient de 10 à 80 % en nombre d'unités monomères intervenant dans la formation des sites de reconnaissance de la ou des molécule(s) cible(s), de préférence de 15 à 60 % et de façon encore plus préférée de 20 à 55 %.

3. Procédé selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que les unités monomères intervenant dans la formation des sites de reconnaissances de la ou des molécule(s) cible(s) constituent ensemble ou isolément au moins un fragment de la ou des molécule(s) cible(s).

4. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'au moins 5 % en nombre des unités monomères constituent ou comprennent chacune au moins une molécule cible ou un de ses fragments utiles pour la reconnaissance.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'au moins deux, trois voire plusieurs unités monomères, identiques ou différentes et consécutives reproduisent ensemble au moins une molécule cible ou un de ses fragments utiles pour la reconnaissance.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le rapport entre la masse moléculaire du polymère patron ou la masse moléculaire moyenne de l'ensemble des polymères patrons et la masse moléculaire de la molécule cible ou la masse moléculaire moyenne de l'ensemble des molécules cibles est compris entre 500 et 50 000.

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le polymère est un homopolymère ou un copolymère choisi parmi les homopolymères ou copolymères à blocs, greffés, séquencés, aléatoires, alternés, statistiques, en étoile, hyperbranchés, dendrimères, en peigne ou mixtes ou encore de type polymère ou

copolymère comportant directement sur la chaîne polymérique principale, sur les greffons ou branches latérales au moins un fragment de la ou des molécule(s) cible(s).

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'homopolymère est linéaire, branché ou en étoile.

5 9. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le copolymère est de type linéaire à blocs, linéaire alterné, branché, en étoile ou en peigne.

10. Procédé selon la revendication 8 ou 9, caractérisé en ce que le nombre total moyen d'unités monomères compris dans le copolymère est d'au moins 6.

10 11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, caractérisé en ce que le nombre moyen d'unités monomères compris dans l'homopolymère ou le copolymère est de préférence d'au moins 6, de préférence compris dans l'homopolymère ou copolymère est compris entre 6 et 1 000, de préférence entre 10 et 100 pour un polymère patron non dégradable, et de préférence entre 10 et 500 pour un polymère patron dégradable.

15 12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que le polymère patron est d'origine biologique.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que le polymère patron est choisi parmi les polypeptides, les oligopeptides, les protéines, les polysaccharides, les polynucléotides et les polynucléosides.

20 14. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisé en ce que le polymère patron est obtenu par polymérisation par étapes telle que la polycondensation, par polymérisation en chaîne telle que la polymérisation radicalaire anionique ou cationique ou bien par ouverture de cycle.

25 15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que le polymère patron est un polymère ou un copolymère dégradable issu d'au moins une ou de plusieurs des familles de polymères choisies parmi les polysaccharides, les polyesters, les polyamides, les polyuréthanes et les polysiloxanes, éventuellement modifiés pour comprendre au moins 5 % d'unités monomères comprenant au moins un fragment de la ou des molécule(s) cible(s).

30 16. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que le polymère patron est un polymère ou un copolymère non dégradable issu d'au moins une ou de plusieurs des familles de polymères choisies parmi polyacrylates, polyacrylamides, polyvinyliques,

polyacryléine, polyacrylonitrile, poly(alcool vinylique), polyalkylvinylcétone, polybenzothiazole, poly carbonatede bis-phénol A, poly(chlorure de diallyl-diméthyl-ammonium), polychlorure de vinyle, polysiloxane, polyétheraromatique, polyéthersulfone, polyétherimide, polyéthylène imine, polyimide, polyimidazole, polyoxyméthylène, polyoxazole, polyoxyphénylène, polyoxytétraméthylène, polyvinylalkyléther, polyvinylpirrolidone et polyvinylméthylcétone.

17. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, caractérisé en ce que le polymère patron est réticulé, branché, en réseau macroscopique ou est un microgel.

18. Procédé de préparation d'une empreinte moléculaire destinée à reconnaître une molécule cible, caractérisé en ce qu'il comprend au moins :

- une étape de polymérisation de monomères destinée à former la matrice de l'empreinte moléculaire en présence d'un polymère patron tel que défini selon l'une quelconque des revendication 1 à 17, et
- une étape d'élimination du polymère patron par dégradation et/ou lavage.

19. Procédé de préparation selon l'une quelconque des revendications 1 à 18, caractérisé en ce que la synthèse de l'empreinte moléculaire se fait par polymérisation en solution, en émulsion, en suspension, par précipitation, en microémulsion ou par polymérisation en phase dispersée ou est effectuée dans des conditions de préparation de microgels.

20. Empreinte moléculaire susceptible d'être obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 19.

21. Utilisation de molécules patrons de nature polymérique, dites polymères patrons, éliminables par dégradations et/ou par lavage, pour la préparation d'empreintes moléculaires, comprenant des sites de reconnaissance pour au moins une molécule cible caractérisée en ce qu'au moins 5 % en nombre des unités monomères le constituant interviennent dans la formation des sites de reconnaissance de la ou des molécule(s) cible(s).

22. Utilisation de l'empreinte moléculaire selon la revendication 20 à des fins d'extraction, de détection, de séparation, de purification, d'absorption, d'adsorption, de rétention ou de libération contrôlée ou encore dans des applications choisies parmi les capteurs, la catalyse de réactions chimiques, le criblage de molécules, la synthèse chimique

dirigée, le traitement d'échantillon, la chimie combinatoire, la séparation chirale, la protection de groupement, le déplacement d'équilibre, les médicaments polymériques et l'encapsulation.

23. Utilisation de l'empreinte moléculaire selon la revendication 20 pour
- 5 l'analyse de traces d'une ou de plusieurs molécules cibles.