THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR
DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Ingénierie Biomoléculaire

École doctorale ED 459 Sciences Chimiques Balard

Unité de recherche UMR 5247 – Institut des Biomolécules Max Mousseron

Titre de la thèse

Synthèse d'inhibiteurs multivalents des anhydrases carboniques

Présentée par Nasreddine KANFAR
Le 20 Octobre 2017

Sous la direction du Pr. Jean-Yves WINUM
Et du Dr. Sébastien ULRICH

Devant le jury composé de

M. Pascal DUMY, Professeur, ENSCM	Président du jury
Mlle Marie LOPEZ, Chargé de Recherches, CNRS-ETaC (FRE3600), Toulouse	Membre du jury
M. Sébastien GOUIN, Chargé de Recherches, CNRS-Laboratoire CEISAM (UMR 6230), Nantes	Rapporteur
M. Sébastien THIBAUDEAU, Professeur, Université de Poitiers	Rapporteur
M. Sébastien ULRICH, Chargé de Recherches, CNRS-IBMM (UMR 5247)	Encadrant de thèse
M. Jean-Yves WINUM, Professeur, Université de Montpellier	Directeur de thèse

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Échouer ou réussir, au fond n'a pas d'importance. Moi je dis que plus le combat est grand, plus la victoire est immense.

Je me sens vivre que si utile à mes semblables je le suis…

Brav'

Remerciements

Ce mémoire est le résultat de trois ans de travail effectué au sein de l'équipe « Glycochimie et Reconnaissance Moléculaire» de l'Institut des Biomolécules Max Mousseron de l'Université de Montpellier.

Je tiens tout d'abord à remercier, le Professeur Pascal DUMY de m'avoir accueilli dans son groupe de recherche et de m'avoir donné la chance d'être le premier doctorant à soutenir dans la nouvelle école de chimie de Montpellier.

Je remercie également le Professeur Alberto MARRA pour avoir facilité mon intégration au sein de l'équipe. Merci pour toutes ces longues et riches conversations.

J'adresse mes remerciements au Docteur Sébastien GOUIN et au Professeur Sébastien THIBAUDEAU pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Je remercie également le Docteur Marie LOPEZ d'avoir accepté d'être examinateur lors de ma soutenance de thèse.

La réalisation de ce mémoire est issue de la collaboration de nombreuses personnes à qui je voudrais adresser ma reconnaissance et mes sincères remerciements.

Tout d'abord, un très un grand merci au Professeur Jean-Yves WINUM pour m'avoir confié ce sujet de thèse. Merci pour ton encadrement, tes conseils et pour ton exigence de chaque jour. Tant dans la vie professionnelle que personnelle, j'ai énormément appris de ton optimisme à toute épreuve et de ta perception à vouloir toujours tirer le meilleur, même lors d'un échec.

Je souhaite aussi remercier le Docteur Sébastien ULRICH pour m'avoir encouragé, encadré et conseillé durant ces trois années. Merci d'avoir pris le temps de me corriger et de me guider pour l'écriture de ce document.

Je veux adresser mes sincères remerciements au Professeur Ahmad MEHDI pour avoir guidé mes premiers pas dans le monde de la chimie des nanoparticules. Je remercie également le Docteur Vincent DARCOS pour son expertise et son investissement dans le projet : polymère.

Je remercie également le Professeur Claudiu SUPURAN de l'Université de Florence pour l'intérêt qu'il a porté à mes différents composés et à l'évaluation de leur activité biologique.

Je veux remercier également toutes les personnes qui ont égayés la vie au sein du laboratoire, en particulier Camille, Simona, Arnaud, Renaud, Stefano et Nanda.

Un remerciement spécial à Thomas pour m'avoir conseillé durant ces trois années mais aussi pour avoir pris le temps de m'aider pour l'élaboration de ce manuscrit. Cette thèse c'est aussi la tienne.

Enfin, je remercie vivement ma famille. Merci à mes parents, à mes frères et sœurs, et à Charlotte pour leur soutien inconditionnel durant toutes ces années.

Sommaire

Abréviations 13

Chapitre I : Étude Bibliographique. 17

I. La Multivalence 19

I.1 Principe de la multivalence 19

I.2 Effet de la multivalence 21

I.3 Modes d'interactions 22

I.4 Les systèmes multivalents 23

II. La bioconjugaison 28

II.1 La ligation alcyne-azoture 28

II.2 Les ligations à partir des thiols 30

II.3 Les ligations de condensation de carbonyles 30

III. La multivalence pour l'inhibition enzymatique 34

IV. Les Anhydrases Carboniques 35

IV.1 Les α-Anhydrases Carboniques 35

IV.2 Structures des α-CAs 37

IV.3 Mécanismes catalytiques 38

IV.4 Rôles physiologiques 39

IV.5 Les pathologies liées aux α-CAs 42

IV.6 Les inhibiteurs cliniques des α-CAs 44

V. La multivalence pour l'inhibition des α-CAs 47

V.1 Approche bivalente 47

V.2 Approche multivalente 52

VI. Objectif des travaux de recherches 55

Chapitre II : Synthèses et fonctionnalisations d'inhibiteurs des anhydrases carboniques en série oxyamine et hydrazide. 57

I. Introduction 59

II. La classe des sulfonamides 60

III. Coumarines, nouvelle classe d'inhibiteurs 63

IV. Stratégie 65

V. Synthèse de dérivés sulfonamides inhibiteurs de la CA 66

V.1 Synthèse de sulfonamides aromatiques en série hydrazide et oxyamine 66

V.2 Synthèse de sulfonamide aliphatique en série oxyamine 69
VI. Synthèse de dérivés coumarines inhibiteurs de la CA 71
VI.1 Synthèse de coumarine en série hydrazide 71
VI.2 Synthèse de coumarine en série oxyamine 73
VII. Conclusion 74
Chapitre III : Synthèses d'inhibiteurs multivalents des anhydrases carboniques basés sur des systèmes peptidiques. 75
I. Introduction 77
II. Le cyclopeptide RAFT 78
III. Travaux antérieurs 79
IV. Stratégie 82
V. Synthèse des plateformes peptidiques 83
V.1 Synthèse du dipeptide **26** 83
V.2 Synthèse des peptides sur SPPS 84
V.3 Synthèse du RAFT cyclique 85
V.4 Synthèse du RAFT linéaire 86
VI. Synthèse d'inhibiteurs multivalents peptidiques 87
VII. Synthèse d'inhibiteurs monovalents de référence 88
VIII. Tests enzymatiques 90
VIII.1 Spectrophotométrie *stop-flow.* 90
VIII.2 Résultats des tests enzymatiques. 91
IX. Conclusion 93
Chapitre IV : Développement de nanomatériaux de silice pour le ciblage des anhydrases carboniques. 95
I. Introduction 97
II. Formation de nanoparticule de silice 98
II.1 Hydrolyse et condensation 98
II.2 Utilisation des microémulsions inverses 99
II.3 Polycondensation 100
III. Synthèse des nanoparticules de silice hybrides sphériques bifonctionnelles 101
III.1 Préparation de nanoparticules de silice hybrides fluorescentes (NSHF) 101
III.2 Synthèse de la NSHF décorée par des inhibiteurs de l'anhydrase carbonique ...102

III.3 Caractérisation physicochimique des nanoparticules **45** et **48**. 103
III.4 Synthèses des références pour les tests d'inhibition 103
III.5 Tests enzymatiques.....104
III.6 Conclusion 105
IV. Les silsesquioxanes polyédriques 106
IV.1 Synthèse des POSS T_8.....109
IV.2 Fonctionnalisation des POSS T_8 110
IV.3 La bionconjugaison des POSS T_8.....111
V. Méthodologie de synthèse du POSS T_8 fonctionnalisé par des aldéhydes glyoxyliques 114
V.1 Synthèse du POSS-(Boc-*L*-Ser(O*t*Bu)-OH)$_8$ **52**. 115
V.2 Synthèse du POSS-(NH_2-*L*-Ser(OH)-OH)$_8$ **53**.....118
V.3 Synthèse du POSS(CHO)$_8$ **54**.....118
V.4 Purification du POSS(CHO)$_8$ **54**.....120
V.5 Analyse physico-chimique. 126
V.6 Ligation.....129
V.6 Conclusion 132
Chapitre V : Synthèses d'inhibiteurs hybrides, nouvelle stratégie pour le ciblage sélectif de la CA IX. 135
I. Introduction.....137
II. Structure de la CA IX 138
III. Reconnaissance spécifique de la CA IX 139
IV. Stratégie 140
V. Synthèse des inhibiteurs hybrides 141
V.1. Synthèse des peptides de reconnaissance. 141
V.2. Synthèse des inhibiteurs 142
V.3. Synthèse des inhibiteurs hybrides. 146
VI. Tests enzymatiques.....147
VII. Conclusion 148
Conclusion.....151
Références 157
Experimental Part.....177

Materials and methods 179
Carbonic Anhydrases assays.....180
Chapter II 181
Chapter III 189
Chapter IV.....197
Chapter V.....205
Annexes.....211

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ATG : Analyse Thermogravimétrique

BET : Brunauer-Emmett-Teller

Boc : *tert*-butoxycarbonyle

*t*Bu : *tert*-butyle

CA : Anhydrase carbonique

$CDCl_3$: Chloroforme deutéré

D_2O : Oxyde de deutérium

DCM : Dichlorométhane

DCC : *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide

DIEA : *N*, *N*-diisopropyléthylamine

DMF : Diméthylformamide

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DMSO-d_6 : Diméthylsulfoxide deutéré

EDC.HCl : Chlorhydrate de *N*-(3-diméthylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide

équiv. : équivalent

Et_2O : éther diéthylique

Fmoc : 9-fluorénylméthoxycarbonyle

HATU : Hexafluorophosphate de (diméthylamino)-*N,N*-diméthyl[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyridin-3-yloxy) méthaniminium

HBTU : Hexafluorophosphate de 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium

HIF : Facteur Induit sous Hypoxia

HMDS : Hexaméthyldisilazane

HPLC : Chromatrographie Liquide à Haute Pression

i-PrOH : Isopropanol

K_I : Constante d'inhibition

LC/MS : Chromatographie Liquide/Spectrométrie de Masse

MALDI-ToF : Désorption-Ionisation Laser Assistée par Matrice – Temps de Vol

MeOH : Méthanol

MET : Microscopie Électronique à Transmission

NMP : *N*-méthyl-2-pyrrolidone

NP : Nanoparticule

NSHF : Nanoparticule de Silice Hybride Fluorescente

PyBOP : Hexafluorophosphate de (benzotriazol-1-oxyloxy)tripyrrolidinophosphonium

POSS : Silsesquioxane Oligomèrique Polyèdre

pr : Puissance relative

pr/n : Puissance relative par ligand

RAFT : Regioselectively Adressable Fonctionalized Template

RMN : Résonnance Magnétique Nucléaire

SPPS : Solid phase peptide synthesis

TBAI : Iodure de tétrabutylammonium

TEA : Triéthylamine

TEAA : Acétate de triéthylammonium

TFA : Acide trifluoroacétique

THF : Tétrahydrofurane

TIS : Triisopropylsilane

TMS : Tétraméthoxysilane

ZBF : Fonction liant le zinc

Acides aminées :

Composé	Code trois lettres	Code une lettre
Acide Glutamique	Glu	E
Acide Aspartique	Asp	D
Alanine	Ala	A
Arginine	Arg	R
Asparagine	Asn	N
Cystéine	Cys	C
Glutamine	Glu	Q
Glycine	Gly	G
Histidine	His	H
Isoleucine	Ile	I
Leucine	Leu	L
Lysine	Lys	K
Méthionine	Met	M
Phénylalanine	Phe	F
Proline	Pro	P
Sérine	Ser	S
Thréonine	Thr	T
Tryptophane	Trp	W
Tyrosine	Tyr	Y
Valine	Val	V

Chapitre I : Étude Bibliographique.

I. La Multivalence

I.1 Principe de la multivalence

La multivalence est un principe clé que l'on retrouve dans de nombreux processus biologiques tels que la reconnaissance moléculaire, l'auto-organisation de la matière, mais aussi dans la transduction des signaux. Ce phénomène essentiel dans la nature permet d'établir des interactions chimiques fortes mais réversibles entre deux systèmes, comme par exemple entre un récepteur et un ligand, des virus et des cellules hôtes, des bactéries et des cellules ou entre deux cellules.[1–3] L'internalisation du virus de la grippe par les cellules épithéliales des bronches est un parfait exemple pour illustrer le fonctionnement de la reconnaissance multivalente (Figure 1).

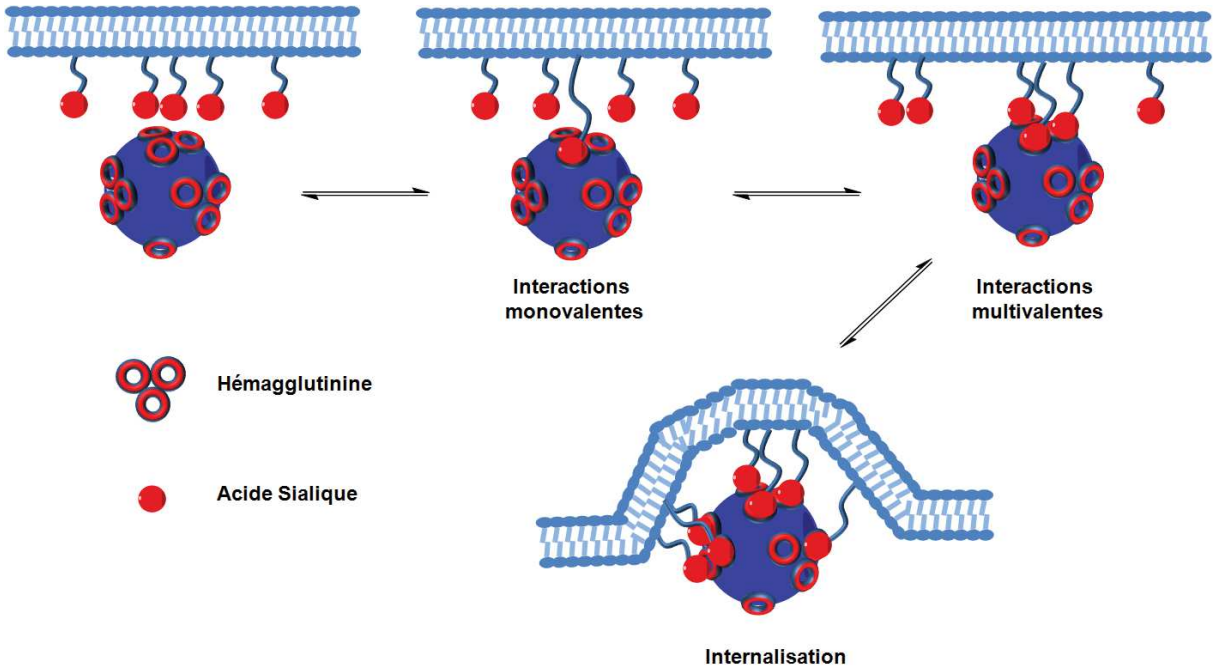


Figure 1 : Reconnaissance et internalisation du virus de la grippe sur les cellules épithéliales des bronches.

Le virus présente sur sa membrane une protéine de type trimérique appelée hémagglutinine. Regroupées de façon très dense à la surface du virus, ces protéines font partie de la famille des lectines qui sont capables de reconnaitre spécifiquement l'acide sialique présent sur les cellules épithéliales des bronches. La première étape de l'internalisation du virus se fait par la reconnaissance, dite monovalente, entre une hémagglutinine et un acide sialique. Cette liaison est faite d'interactions non covalentes réversibles présentant de faibles constantes d'affinité. Par la suite, le virus va se lier à d'autres résidus de l'acide sialique grâce aux multiples sites de reconnaissance présents sur sa surface et ainsi augmenter l'affinité avec la cible. Le virus pourra alors être internalisé par un processus appelé endocytose.

Une fois la cellule infectée, de nouveaux virions sont formés et libérés grâce à la présence de neuraminidases présentes à leurs surfaces. Ces glycoprotéines tétramérique vont jouer un rôle prépondérant en hydrolysant les liaisons hémagglutinine/acide sialique permettant aux virions de se détacher de la cellule hôte et d'infecter d'autres cellules.

Actuellement, des inhibiteurs monovalents tels que le zanamivir (Relenza®, GlaxoSmithKline) sont utilisés comme agents thérapeutiques pour combattre la grippe (Figure 2, A). Ces composés ont pour spécificités de bloquer l'action des neuraminidases ce qui permet d'éviter la prolifération et la contamination d'autres cellules. Cependant, ces inhibiteurs monovalents ne sont efficaces qu'à forte dose. En effet, comme il a été précédemment développé, la formation de multiples liaisons entre le virus et la membrane de la cellule hôte permet une plus grande affinité que la formation de liaisons monovalentes entre le virus et un inhibiteur.

Ainsi, une nouvelle stratégie tirant profit de ce processus biologique a permis de synthétiser des agents thérapeutiques multivalents contre le virus de la grippe. Par exemple, des composés dimériques[4,5], trimèriques et tétramèriques[6] utilisant le zanamivir comme inhibiteur ont été synthétisés (Figure 2, B et C). Ces molécules se sont avérées être 10 à 100 fois plus actives que le zanamivir dans les tests d'effets cytopathogènes de la grippe. De même, l'activité *in vivo* chez la souris des inhibiteurs tri- et tétravalents ont était largement supérieure à celle montrée par le composé de référence monovalent.

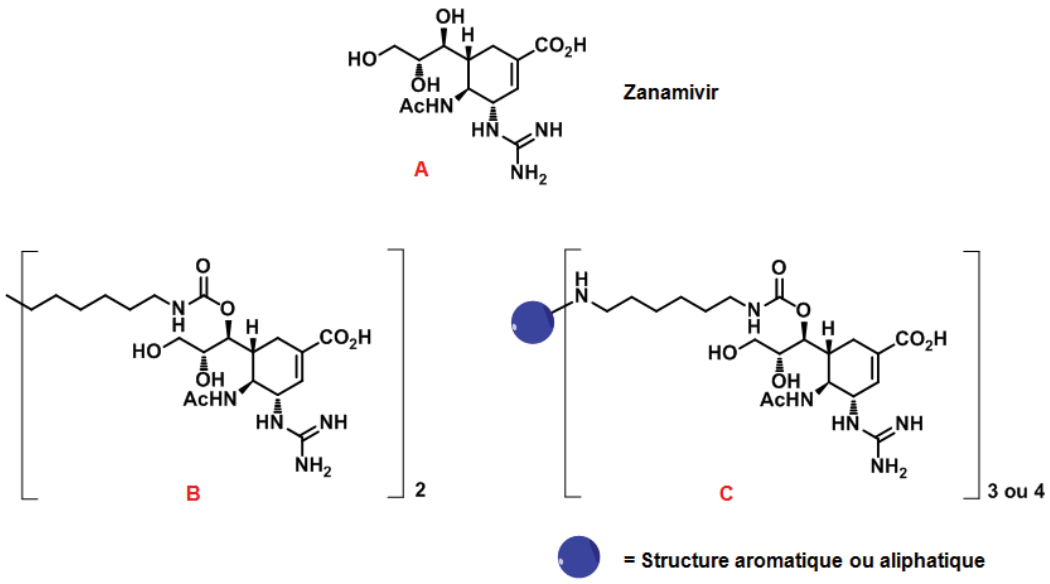


Figure 2 : Dérivés multivalents du Zanamivir utilisés comme inhibiteurs de neuraminidase.

I.2 Effet de la multivalence

La description de l'effet multivalent (ou effet de cluster glycosidique) donné par Lee, Y. C. et *coll*.[7] en 1983 a permis par la suite à un certain nombre de groupe de recherche à se concentrer sur l'étude et la synthése de systèmes multivalents. Ces systèmes peuvent être définis comme des charpentes moléculaire possédant de multiples ligands capables d'établir des interactions avec leur cible, afin d'obtenir une reconnaissance biomoléculaire efficace. En effet, de part la combinaison de plusieurs ligands, la possibilité d'obtenir de multiples interactions simultanées peut ainsi augmenter la puissance relative (pr) du système multivalent par rapport au ligand monovalent et donc accroitre l'affinité de la liaison ligand-récepteur. Ainsi, la puissance relative permet de mettre en évidence l'effet multivalent d'un ligand. Celle-ci est déterminée en faisant le rapport d'inhibition du ligand multivalent sur son homologue monovalent (Figure 3).

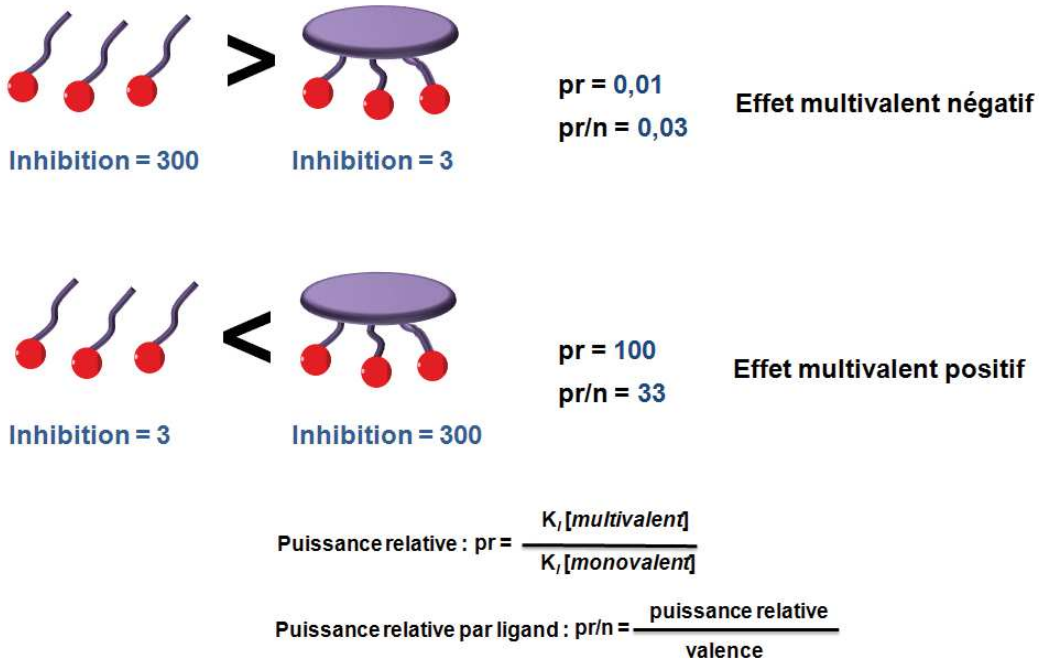


Figure 3 : Illustration d'exemples d'effets multivalents *via* l'utilisation d'un inhibiteur trivalent.

Dans le cas ou la puissance relative est supérieur à 1, alors un effet multivalent positif est mis en évidence avec une augmentation de l'affinité de la liaison ligand-récepteur. Si celle-ci est égale à 1, alors l'effet observé est considéré comme purement statistique. La puissance relative peut également être inférieur à 1, avec dans ce cas là un effet multivalent négatif qui ce traduit par une diminution de l'inhibition par rapport au ligand monovalent. Enfin, l'affinité relative d'un ligand (puissance relative par ligand, pr / n) peut aussi être augmentée, et peut devenir plus efficace sur un système multivalent que seul. [8]

L'augmentation de l'affinité va dépendre de plusieurs paramètres qui vont chacun apporter une contribution énergétique. On peut penser à première vue que cette augmentation est simplement la somme des contributions individuelles de chaque interaction. Cependant, elle va également dépendre de l'orientation et des distances entres les différents ligands positionnés sur le système multivalent mais aussi de la structure de ce dernier.

I.3 Modes d'interactions

L'augmentation de l'affinité ligand-récepteur par l'utilisation de systèmes multivalents peut provenir de différents mécanismes d'association.[9] Composés de plusieurs unités actives, les associations ligands-récepteurs peuvent mener à la formation d'un grand nombre de complexes différents. Ils peuvent être expliqués par plusieurs modes de liaisons qui permettent de rationnaliser les phénomènes observés lors d'une interaction multivalente. Ainsi, d'un point de vue global, deux types d'associations peuvent avoir lieu. La première, qui est la plus étudiée, résulte de l'association intramoléculaire entre un ou plusieurs ligands d'un même système sur un récepteur. La seconde, quant à elle, permet l'association intermoléculaire (ou l'agrégation) entre des ligands d'un même système et différents récepteurs. Quatre modes de liaisons entre un ligand et un récepteur sont ainsi décrits (Figure 4) :

1. **l'effet de glissement** est basé sur une grande probabilité de recapture rapide généré par une forte concentration locale de ligand autour du site de liaison. En effet, si les sites de liaisons d'un même récepteur sont assez proches alors, par simple glissement le ligand va pouvoir passer d'un site à un autre.
2. **l'effet de chélation** est possible lorsque plusieurs sites identiques de liaison présents sur la même cible (homomultimérique) interagissent simultanément avec plusieurs ligands d'un même système multivalent. Ce mode d'interaction est le plus étudié du fait qu'il engendre de forte augmentation de l'affinité.
3. **l'effet d'association par site complémentaire** est une variante de l'effet de chélation. Dans ce cas la cible est multimérique, c'est à dire qu'elle possède au moins deux sites de liaison différents qui vont interagir avec un système multivalent composé lui aussi de différents ligands.
4. **l'effet d'agrégation ou de clustering**, contrairement aux modes d'interactions cités précédemment, qui agissent de façon intramoléculaire, se fait de manière intermoléculaire puisqu'il consiste en l'association de plusieurs cibles différentes, favorisée par des interactions d'agrégations, qui interagissent sur le même système multivalent. Ce phénomène est favorisé par des interactions d'agrégations entres les cibles.

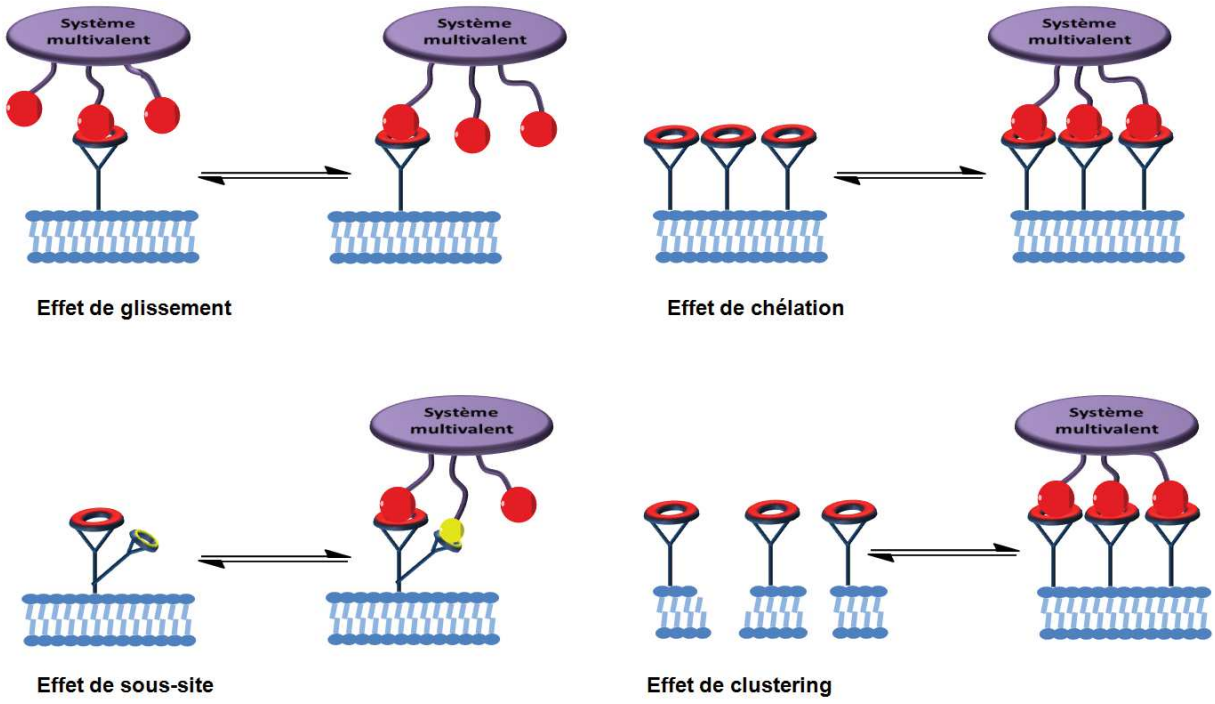


Figure 4 : Différents mécanismes d'interaction entre un système multivalent et sa cible.

Ces mécanismes ne sont pas exclusifs et plusieurs peuvent avoir lieu de façon concomitante rendant la rationalisation des effets observés lors d'interactions multivalentes encore plus complexe. Cependant, ils peuvent être complémentaires et donc jouer sur l'augmentation de l'affinité et/ou de la sélectivité du ligand envers le récepteur. Ainsi, si les effets de concentration locale et de chélation affectent uniquement l'affinité de la liaison ligand-récepteur, les effets de clustering et d'association par un site complémentaire contribuent à accroitre la sélectivité du ligand multivalent envers sa cible.

Par conséquent, le passage d'un système monovalent à un système multivalent peut être exploité pour améliorer l'affinité et la sélectivité de la liaison ligand-récepteur et ainsi transformer des ligands à faible affinité et faiblement sélectifs en ligands puissants et sélectifs.

I.4 Les systèmes multivalents

Les mécanismes d'interactions des systèmes multivalents vont dépendre de plusieurs paramètres. Ainsi, la nature de la cible (nombre de sites de liaison, tendance à multimériser, encombrement stérique) va jouer un rôle prépondérant dans le mode d'action. La cible n'est pas la seule à influencer le mécanisme d'interaction : la structure et la composition du système multivalent tel que la conformation, la valence, la taille mais aussi l'organisation spatiale entrent en jeu. La nature du mécanisme de reconnaissance est donc fonction de la nature de la cible mais également du système multivalent. Dans plusieurs cas, il a été montré que des changements structuraux au niveau des systèmes utilisés peuvent avoir des effets importants sur le processus de reconnaissance.[10,11]

Au cours de ces dernières années, la multivalence a inspiré de nombreux groupes de recherches dans l'élaboration et la conception de nouveaux systèmes capables d'apporter de la valence de différentes manières. Des systèmes dits de petites tailles ont été synthétisés tels que les aromatiques [12] *a contrario* de systèmes beaucoup plus grands avec en général des valences beaucoup plus importantes tels que les dendrimères,[13–16] les nanoparticules,[17] les peptides et les polymères.[18,19] Enfin, des plateformes moins flexibles, dites organisées tels que les peptides cycliques,[20,21] les calixarènes,[22,23] les cyclodextrines, les foldamères[24,25] ou encore les oligonucléotides,[26,27] sont très intéressantes au niveau structural puisqu'elles permettent d'arborer des ligands de façon contrôlés dans l'espace et de donner des informations non négligeables sur la relation structure-activité.

I.4.1 Les systèmes de haute valence

Les systèmes de haute valence regroupent toutes les structures capables d'offrir une valence supérieure à 10. Ces systèmes ont en général des structures dans les trois dimensions de l'espace et n'ont pas d'organisation spatiale (Figure 5). Leur avantage réside tout simplement dans la capacité d'arborer un nombre important de positions fonctionnalisables sur leur surface. On retrouve parmi ces systèmes les polymères et les dendrimères. Ces macromolécules peuvent être de tailles variables selon la valence désirée. Ils ont fait l'objet d'application dans différents domaines tel que dans la reconnaissance multivalente supramoléculaire[14,28–30] ou dans le transport de composés actifs.[31]

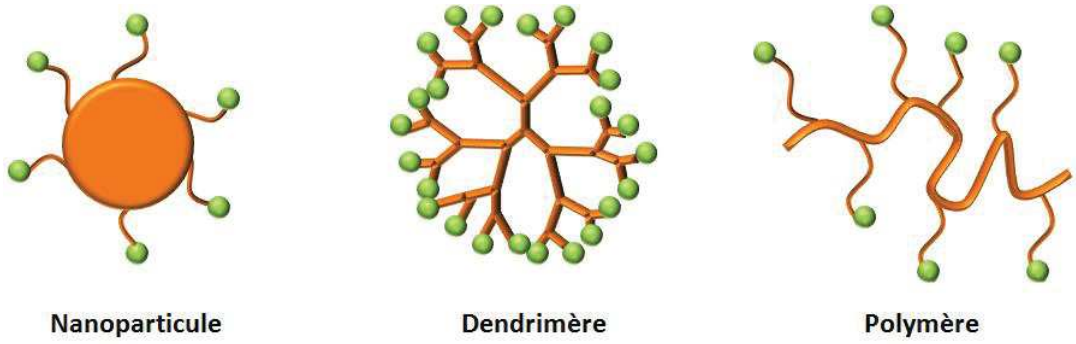


Figure 5 : Exemples de systèmes de haute valence.

D'autres systèmes peuvent offrir bien plus qu'un nombre élevé de valence. C'est le cas des nanoparticules qui, de part leur composition (or[32–34], silice[35], oxyde de fer[36] ou cadmium[37]), peuvent avoir diverses propriétés (magnétisme, fluorescence…). Par exemple, les nanoparticules d'or modifiées par un agent de ciblage sont particulièrement intéressantes car elles présentent des propriétés thérapeutiques (hyperthermie) et peuvent être localisées par imagerie.[15] Les nanoparticules de silice poreuses peuvent également être engagées dans le domaine de l'imagerie mais aussi impliquées dans la vectorisation de composés actifs.[37]

Enfin, de nombreuses recherches se sont tournées autour des macro-systèmes riches en carbones tel que les fullerènes. Constitués de 60 atomes de carbone, cette famille de

composés se caractérise par des propriétés électroniques spécifiques qui ont permis d'accéder à de nouveaux matériaux mais aussi qui ont contribué aux développements de composés biologiquement actifs.[38–42]

Bien que ces systèmes aient l'avantage d'avoir de hautes valences leur utilisation présente néanmoins quelques limites. Certains paramètres tels que l'homogénéité et le nombre de ligands greffés sont difficiles à contrôler. On retrouve notamment ce cas de figure pour la préparation des polymères où la polydispersité pose problèmes. Généralement de hauts poids moléculaire et de grandes tailles, ces systèmes rencontrent aussi des problèmes lors de leur utilisation en milieu biologique. En effet, sur certaines de ces macromolécules, une toxicité a été relevée et qui peut être expliquée par la difficulté des cellules à les éliminer.[43] Enfin, il est aussi compliqué de structurer ces systèmes afin de donner une orientation bien définie aux ligands greffés à leur surface.

I.4.2 Les systèmes à faible valence

Les systèmes à faible valence englobent, en général, les molécules de petites tailles et à faibles poids moléculaires. Ces systèmes ont l'avantage d'être plus facilement modulables et permettent ainsi un contrôle du nombre de ligands greffés. De nombreuses molécules ont été synthétisées avec diverses configurations structurales telles que les systèmes flexibles, les systèmes plans ou les systèmes tridimensionnels.
Parmi les systèmes flexibles on retrouve les dendrimères de petites tailles, de génération 0 (G0), qui peuvent arborer une valence égale à trois ou quatre en fonctions du noyau choisit. Ces systèmes facilement modulables permettent de fonctionnaliser de manière régiosélective les différentes positions (Figure 6).

Des systèmes plus rigides, basés sur des noyaux aromatiques ou polyaromatiques, génèrent des structures planes sans présenter une réelle organisation spatiale. Parmi ces systèmes, on retrouve les dérivés du benzène et les porphyrines. Les porphyrines sont des systèmes qui présentent quatre sites fonctionnalisables capables d'accueillir des ligands qui permettent des applications liées à la reconnaissance multivalente.[44] Des applications thérapeutiques peuvent également être envisagées avec ce type de molécules puisqu'elles sont capables de chélater des métaux et, selon leurs natures, il est possible de faire de la photothérapie par irradiation ou même de l'imagerie médicale.[45] Enfin les porphyrines possèdent l'avantage de ne pas être toxiques et sont largement connues du fait de leur présence dans les systèmes biologiques.

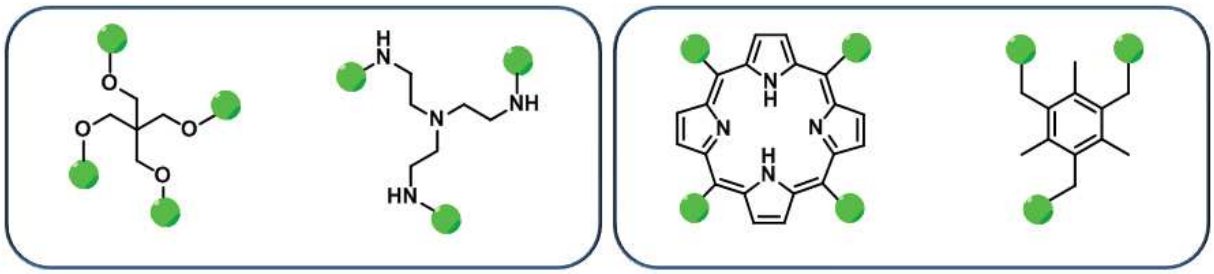


Figure 6 : Exemples de systèmes de faible valence flexibles et rigides.

Les systèmes flexibles ou plans ne présentent pas d'organisation spatiale définie ce qui peut être un inconvénient non négligeable notamment pour la reconnaissance multivalente. Des structures pré-organisées capables d'arborer des ligands de façon contrôlées dans l'espace sont envisageables avec l'utilisation de systèmes tels que les cyclodextrines, les calixarènes ou bien les peptides cycliques (Figure 7).

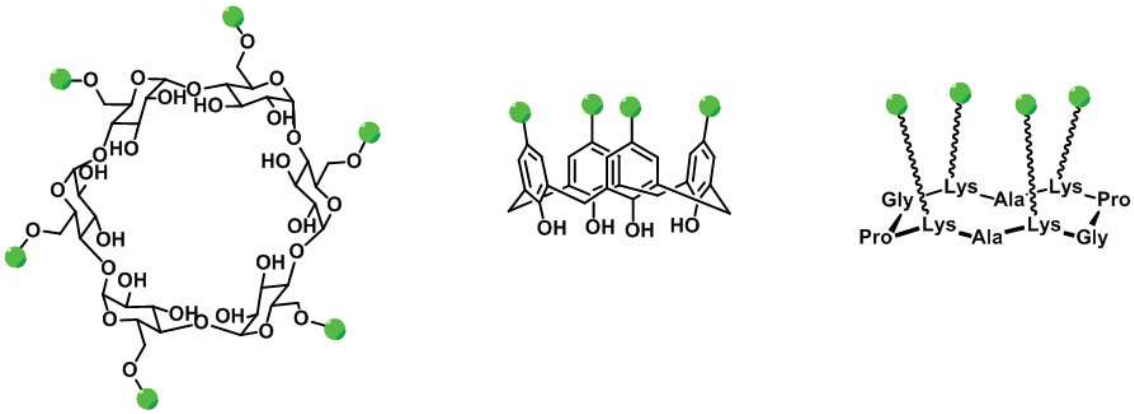


Figure 7 : Exemples de systèmes de faibles valences pré-organisées.

Les calixarènes sont largement utilisés comme support multivalent de ligands et offrent plusieurs avantages. Ces systèmes sont issus de la réaction entre un phénol et un aldéhyde qui génèrent des composés cyclique de 4 à 8 unités de cycles aromatiques reliés par des ponts méthylènes. Ils présentent deux faces distinctes, fonctionnalisables de manière régiosélective. Généralement fonctionnalisée par des groupements de reconnaissance sur sa face large qui est hydrophobe, la seconde face est, quant à elle, fonctionnalisée par des groupements hydrophiles afin d'accentuer la rigidité de la structure sous forme de cône. Cette configuration structurale permet donc d'orienter les ligands dans la même direction.

La possibilité de contrôler la position, le nombre mais aussi l'orientation des différents substituants ont permis l'utilisation des calixarènes comme systèmes multivalents dans diverses approches telles que la reconnaissance de surface ou l'inhibition de récepteur

membranaire.[46,47] Cependant, leurs caractères hydrophobes limitent encore, à ce jour, leurs utilisations.

Contrairement aux calixarènes, les cyclodextrines présentent une bonne solubilité dans l'eau. Ces macromolécules cycliques composées de 6 à 8 unités de glucoses sont extraites de l'amidon. La particularité de cette molécule repose sur sa cavité hydrophobe modulable en taille capable d'interagir avec de petites molécules organiques.
Dans le domaine thérapeutique, cette molécule est généralement utilisée pour encapsuler des principes actifs et permet de les vectoriser.[48]

Les peptides cycliques peuvent aussi être utilisés comme support multivalent de ligands. La cyclisation de peptides permet de bloquer leur conformation et offre ainsi des propriétés structurales intéressantes.[50,51] Selon les cas, cette rigidité est favorisée par la formation de liaisons hydrogènes intramoléculaires ou par les interactions hydrophobes entre les différentes chaînes latérales. Certains cyclopeptides peuvent adopter une conformation contrainte comme les feuillets β.[52] Cette structure est favorisée par l'introduction, dans le macrocycle, d'un coude pouvant être induit par différents motifs (hétéroaromatique, dicétopipérazine, dipeptides *L*-Pro-*D*-Pro).[53] Cette structure secondaire rigide influence l'orientation des chaînes latérales des différents résidus. Certains macrocycles montrent une orientation alternée des chaînes latérales par rapport au plan moyen du squelette peptidique. Enfin, ces cyclopeptides sont facilement modulables et rendent possible l'accroche de différents composés pour la présentation multivalente de ligands. La modularité de ce genre de composé permet de contrôler l'orientation, la position et le nombre de ligands.[54]

Pour conclure, il existe une multitude de supports pour la présentation multivalente de ligands. Ces différents systèmes offrent des caractéristiques et des propriétés très différentes. Le choix de ces composés doit donc tenir compte de plusieurs paramètres comme la flexibilité, la modularité, le contrôle de l'orientation et la biocompatibilité. Le choix de ces paramètres va se faire en fonction de l'application, de la cible mais aussi des modes d'interactions que l'on veut obtenir.

II. La bioconjugaison

La préparation de ligands multivalents reste, à ce jour, un défi dû à la difficulté à lier de manière covalente plusieurs motifs bioactifs sur une plateforme. Les réactions simultanées, réalisées en un seul pot, génèrent souvent des produits secondaires qui sont difficiles à éliminer. De plus, la succession des réactions nécessite d'avoir des rendements élevés à chaque étapes afin de conserver un rendement global suffisamment haut pour pouvoir isoler le produit souhaité. Pour répondre à ces problématiques, des progrès récents dans les techniques de bioconjugaison par chimie "click" ont permis de faciliter la préparation et l'accès à de nombreux composés multivalents. L'utilisation de ces outils de synthèses permet de suivre une stratégie qui consiste à assembler des motifs bioactifs à un système multivalent en une seule réaction *via* la bioconjugaison par chimie "click" (Figure 8).

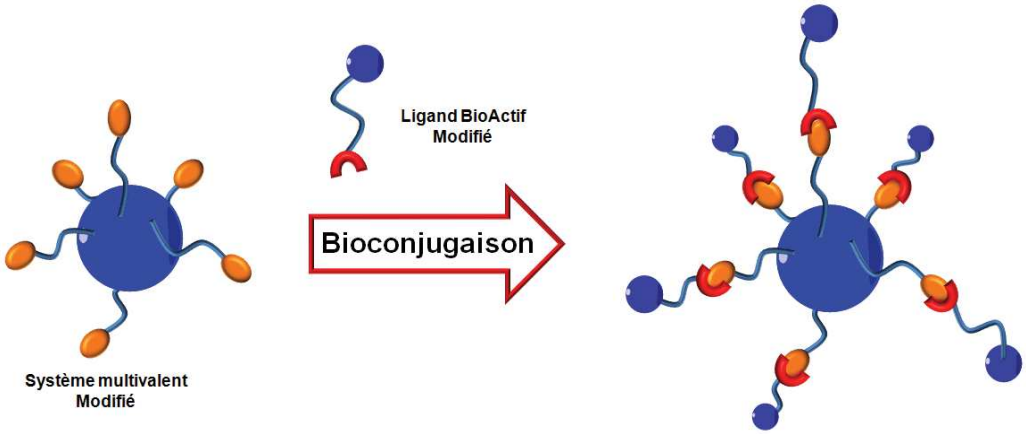


Figure 8 : Stratégie d'assemblage par bioconjugaison de type "click".

Introduit par Sharpless en 2001, le terme chimie "click" (*click chemistry*) désigne toutes réactions chimiques stéréospécifiques ayant un très haut rendement, étant compatible avec un grand nombre de fonctionnalités et ne créant que des produits secondaires pouvant être éliminés sans avoir recours à la chromatographie.[55] De plus, elle doit avoir lieu dans des solvants non toxiques tels que l'eau et, si possible, dans des conditions douces. Il est difficile qu'une réaction puisse respecter tous ces critères mais l'objectif est qu'elle s'en rapproche le plus. La chimie "click" s'applique souvent à la préparation de biomolécules et peut même se faire dans un milieu biologique. Ainsi la réaction et les liaisons formées doivent être biocompatibles, c'est-à-dire qu'elles sont inertes vis-à-vis des systèmes biologiques environnants. Dans ce cadre précis, on peut parler de bioconjugation.[56–58]

II.1 La ligation alcyne-azoture

La première réaction qui est à l' origine du concept de la chimie "click" est la réaction de cycloaddition 1,3-dipolaire entre un groupement alcyne et azoture. Bien connus depuis la

fin du 19ème siècle, elle a été remise au goût du jour au 20ème siècle par Huisgen.[59] Cependant, les conditions développées par ce dernier ne permettaient pas encore de considérer cette réaction de chimie "click". En effet, d'une part pour former le triazole correspondant il était nécessaire de chauffer le milieu réactionnel à 100˚C et d'autre part la réaction générait un mélange de deux régioisomères (Schéma 1).[60]

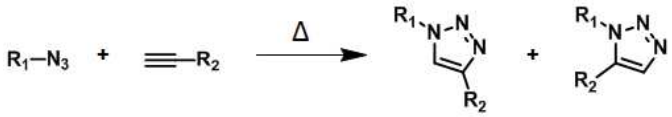


Schéma 1 : Réaction de cycloaddition azoture-alcyne.

Grâce aux progrès en catalyse au début du 21ème siècle, Sharpless et Meldal ont eu l'idée d'utiliser le cuivre comme catalyseur afin d'accélérer la réaction et de passer outre la chauffe du milieu.[61,62] De plus, l'utilisation du cuivre permet de former qu'un seul régioisomère : le triazole 1,4-substitué. En 2005, Sharpless propose un mécanisme de la réaction par un cycle catalytique à six étapes avec du cuivre au degré d'oxydation III (Figure 9A).[63] Cependant, en 2013, Fokin et *coll.* ont contesté ce mécanisme en démontrant l'intervention d'un second atome de cuivre dans la catalyse en suivant en temps réel le processus de cycloaddition (Figure 9B).[64]

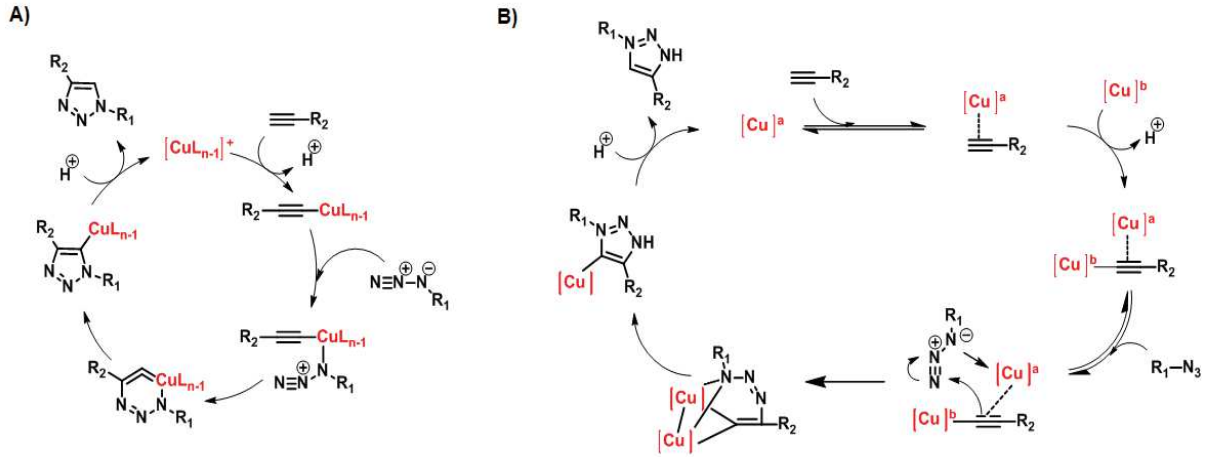


Figure 9 : Cycle catalytique de la réaction de cycloaddition azoture-alcyne catalysée au cuivre.

Cette ligation "click" a largement été utilisée dans la construction de systèmes multivalents mais aussi dans la fonctionnalisation de protéine et la modification de surfaces virales.[65] Utilisant des réactifs inertes envers un grand nombre de fonctions et avec la possibilité d'effectuer la réaction dans l'eau à des pH physiologiques; la formation du triazole est possible au sein d'un milieu biologique. Malgré cela, le cuivre reste un métal toxique pour les cellules et il est difficile de le supprimer complètement après réaction.[66–68]

II.2 Les ligations à partir des thiols

D'autres réactions n'utilisant pas de métaux entrent dans le cadre de la bioconjugaison par chimie "click". Par exemple, la formation des thioéthers a fait l'objet de nombreuses utilisations pour la préparation de systèmes multivalents. Dans un milieu au pH adéquat, cette liaison peut être formée par addition de type Michael sur un maléimide ou encore par substitution nucléophile sur un dérivé halogéné (Figure 10).[69] Récemment, le couplage thiol-ène résultant de la réaction radicalaire entre un thiol et un alcène, a connu un grand succès dans le domaine des polymères et des matériaux.[70,71] Au sein de l'équipe, cette méthode de couplage a été utilisée afin de synthétiser de nombreux glycoconjugués à partir de différents systèmes multivalents tels que les dendrimères, les calixarènes ou même encore les silsesquioxane.[72] Avec une économie d'atome totale et une cinétique rapide, cette réaction se fait simplement par irradiation du milieu avec un photoinitiateur. Enfin, une autre méthode de liaison est possible par condensation de deux thiols à pH basique pour former un pont disulfure. Les propriétés réactionnelles des thiols donnent la possibilité de former différentes liaisons chimiosélectives et peuvent supporter un grand nombre de groupes fonctionnels.

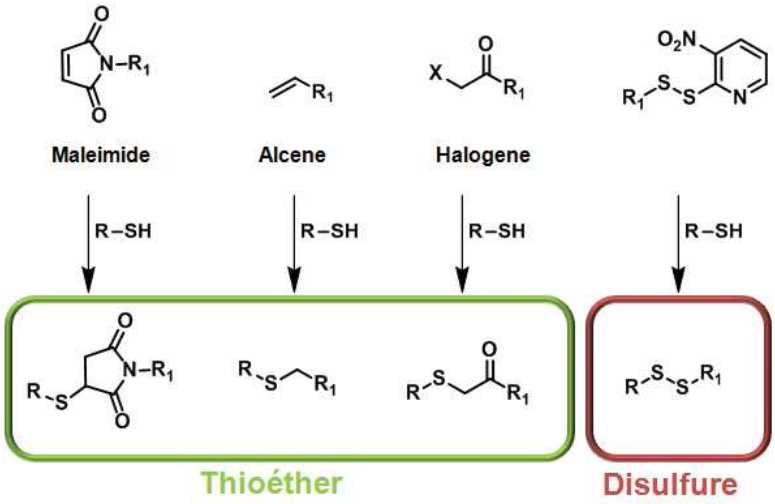


Figure 10 : Formation des liens thioéthers et du pont disulfure.

II.3 Les ligations de condensation de carbonyles

Parmi les réactions de bioconjugaison par chimie "click" n'utilisant pas de métaux, on retrouve les réactions de condensation sur des carbonyles à partir d'amines primaires. Plusieurs liaisons sont possibles, ainsi un lien imine peut être formé à partir d'une amine, un lien oxime à partir d'une oxyamine, un lien hydrazone à partir d'une hydrazine et enfin un lien acylhydrazone à partir d'un hydrazide (Figure 11).

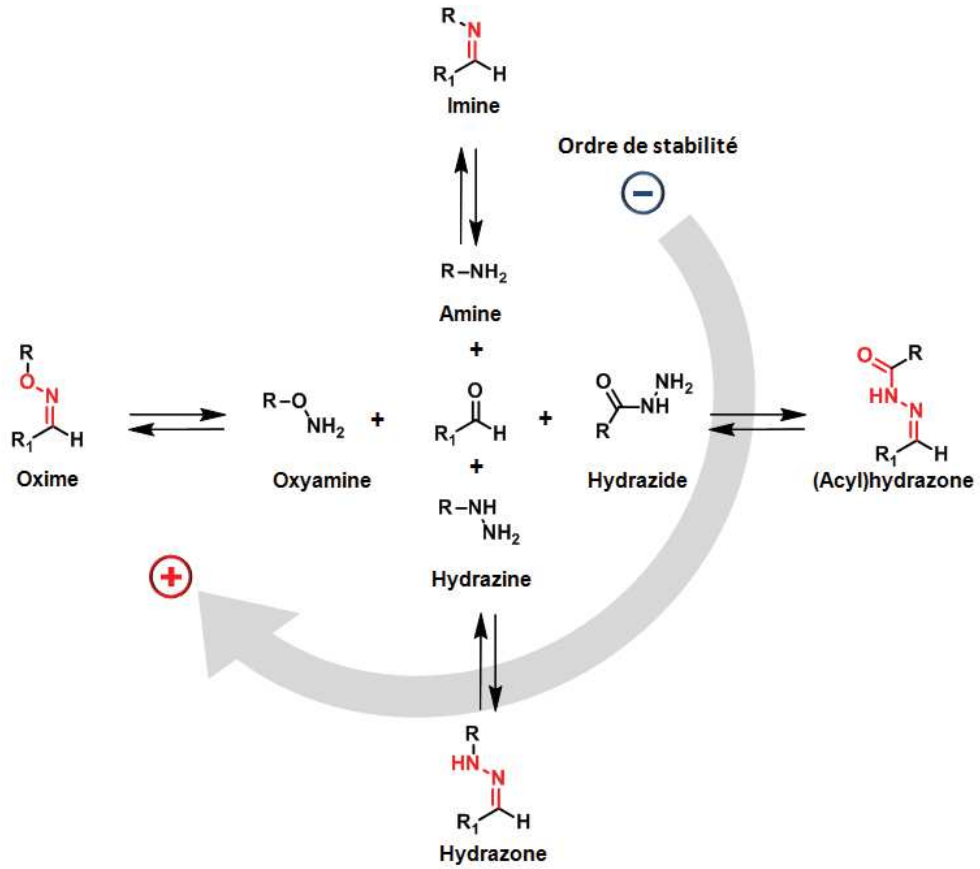


Figure 11 : Réactions de condensation sur des carbonyles.

Ces liaisons sont formées généralement en milieu aqueux légèrement acide et sont toutes plus ou moins réversibles en fonction de leurs stabilités. La réaction d'une amine primaire sur un carbonyle, comme dans le cas d'une cétone ou un aldéhyde, permet de former un lien imine réversible en ne générant qu'une molécule d'eau comme produit secondaire. Cette liaison présente des limitations pour être considérée comme une ligation de type "click" puisqu'elle est très instable vis-à-vis de l'hydrolyse. Ainsi, pour fixer l'équilibre vers le produit formé une réaction de réduction enzymatique ou chimique est nécessaire et permet de créer un lien non-hydrolysable.[73–75]

Les liens oxime et hydrazone présentent quant à eux une plus grande stabilité à pH physiologique et sont utilisés pour la ligation de biomolécules.[76] La stabilité de la liaison est générée par le substituant de l'azote sp^2 impliqué dans la condensation. Ainsi selon la nature de l'atome, l'oxygène dans le cas de l'oxyamine et l'azote dans le cas de l'hydrazide, rend le carbone sp^2 beaucoup moins électrophile par un déplacement électronique comparé à celui de l'imine. Ce phénomène est appelé "l'effet α".[77] La liaison directe en alpha d'un atome qui porte une ou plusieurs paires d'électrons libre augmente la nucléophilie de l'amine. Ceci est notamment du à la déstabilisation de l'état fondamental du nucléophile par les répulsions des paires libre d'électrons. Ces même électrons vont par la suite permettre de combler le déficit de charge sur le centre nucléophile lors de l'état de transition et vont stabiliser le produit thermodynamique. En effet, l'effet inductif attracteur de ces hétéroatomes diminue

la basicité de l'azote hybride sp^2 et rend la liaison moins vulnérable à l'hydrolyse. Enfin, l'effet α va dépendre de plusieurs paramètres avec notamment la solvatation qui va jouer un rôle majeure.

Dans le cas du lien acylhydrazone, le carbonyle présent va induire un déplacement électronique déstabilisant la liaison beaucoup plus que le lien hydrazone. Ce lien reste quand même suffisamment stable pour être réalisé en milieu aqueux. Des travaux ont même été réalisés en mettant à profit la réversibilité accrue de cette liaison pour faire de la chimie combinatoire dynamique.[75,78]

Les réactions de condensation sur des carbonyles précédemment citées sont de bons outils pour la synthèse de bioconjugués puisqu'elles sont chimiosélectives, réalisables en milieux aqueux et ne génèrent que de l'eau comme sous produit. De plus, leurs réversibilités peuvent être mises à profit. Malgré tous ces aspects attractifs, elles sont restées en retrait pendant un certain temps. En effet, les difficultés liées à la synthèse, la manipulation et au stockage des molécules modifiées contenant des fonctions aldéhyde, oxyamine ou (acyl)hydrazide ont été un frein. Les aldéhydes ont tendance à s'hydrater spontanément ainsi qu'à réagir avec d'autres nucléophiles. Les groupements oxyamine et (acyl)hydrazide peuvent réagir avec des esters activés comme par exemple lors d'une synthèse peptidique[79], mais aussi avec des solvants (acétone) ou des traces de produits carbonylés. Ainsi, ces groupements sont généralement introduits en fin de synthèse ou protégés à l'aide de groupements protecteurs.

Il est à noter que la nature du composé carbonylé a un effet important sur la stabilité du produit de ligation. Concernant les oximes, une étude a été effectuée pour des ligations entre l'hydroxylamine et différents aldéhydes et cétones afin de démontrer la stabilité thermodynamique des produits obtenus. L'ordre de stabilité suivant a alors pu être formulé : acétone < cyclohexanone, furfural, benzaldéhyde < pyruvate.[80] Les aldéhydes glyoxyliques sont alors devenus naturellement les premiers choix pour effectuer des ligations.[81]

Afin d'obtenir facilement ces aldéhydes, le clivage par oxydation d'un 1,2-diol ou d'un 1,2-aminoalcool comme rencontré dans la structure de la sérine ou la thréonine en présence de périodate de sodium est une méthode de choix (Schéma 2). La fonction aldéhyde glyoxylique est très réactive et parfois instable alors elle peut être masquée sous ces deux formes tout au long de la synthèse et réapparaitre grâce a cette méthode efficace dans l'eau.[82]

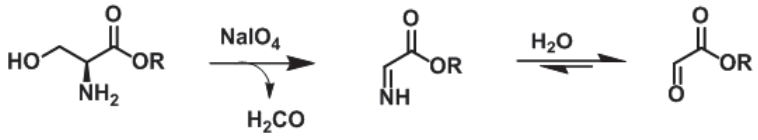


Schéma 2 : Clivage par oxydation de la Sérine en présence de périodate de sodium.

Les ligations de type chimie "click" présentées précédemment sont toutes chimiosélectives et permettent ainsi de les utiliser les unes après les autres ou de façon simultanées dans un même milieu afin de créer différents liens. On dit de ces ligations qu'elles sont orthogonales puisqu'elles n'interférent pas entre elles. Ce type de stratégie a

pour avantage d'éviter l'utilisation de groupements protecteurs et donc les étapes de déprotection et de purification. Ainsi, de manière efficace et rapide l'assemblage de plusieurs motifs différents sur un même système multivalent peut être envisagé par le biais de différentes liaisons orthogonales. On trouve dans la littérature de nombreux travaux basés sur l'assemblage de composés à l'aide de ligation "click" orthogonales. Parmi eux, Renaudet et son équipe ont étudié la possibilité d'utiliser jusqu'à cinq liens différents sur un même système multivalent afin de synthétiser un système hétéromultifonctionnel. En utilisant un cyclo-decapeptide comme plateforme ils ont su fonctionnaliser différemment quatre bras afin de permettre des ligations simultanées en "one pot" de type oxime, azoture-alcyne et thioéther (thiol-ène et thiol-halogène) (Figure 12).[83]

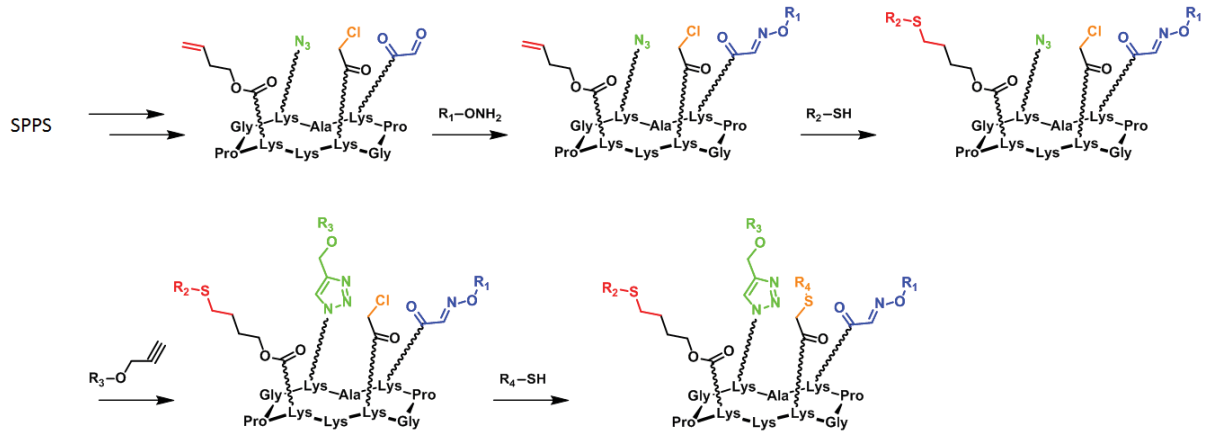


Figure 12 : Cyclopeptide hétéromultifonctionnel assemblé par bioconjugaison de type "click".

Cette stratégie ouvre le champ des possibilités d'assemblage et permet d'incorporer d'autres motifs pour différentes applications. Ainsi, dans le cas précédemment cité, des composés tels qu'un fluorophore, une biotine ou un peptide ont été greffés sur le cinquième bras à l'aide de liaison amide, disulfure, ou thiourée (Figure 13).

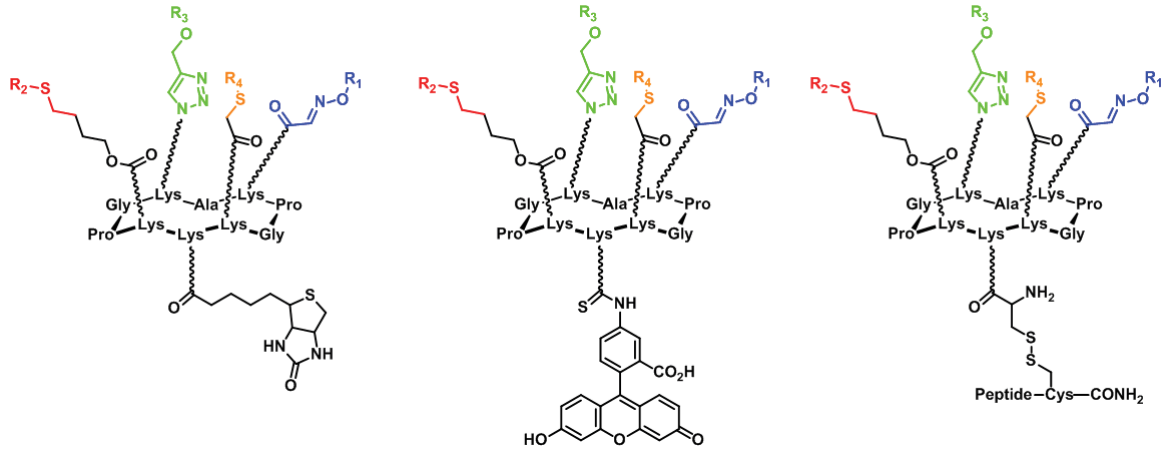


Figure 13 : Cyclopeptide fonctionnalisé avec des différents motifs sur sa face inférieure.

III. La multivalence pour l'inhibition enzymatique

L'application des systèmes multivalents a fait l'œuvre de nombreuses études pour la reconnaissance de biomolécules. En effet, l'une des premières approches d'utilisation de la multivalence consiste à préparer des systèmes avec de fortes valences afin de mimer des processus de reconnaissance biologique sur des cibles d'intérêt telles que les lectines.[84] Ces cibles sont propices à la multivalence puisque la reconnaissance se fait sur plusieurs points d'accroches disponibles à la surface des cellules. Cependant, depuis quelques années, l'utilisation des systèmes multivalents s'est étendue à d'autres domaines et plus particulièrement à l'inhibition enzymatique.[3,8] Pour beaucoup d'entres elles, les enzymes entrent en jeu dans des processus physiologiques cruciaux. Dès lors qu'elles subissent un dysfonctionnement, c'est tout le processus qui est déréglé ce qui peut aboutir à des pathologies. L'apport d'une nouvelle stratégie d'inhibition enzymatique par la multivalence permet donc d'ouvrir de nouvelles opportunités à la chimie medicinale. Différentes enzymes ont déjà fait l'objet d'études d'inhibition par des systèmes multivalents et l'attention s'est plus particulièrement posée sur les glycosidases.

Ces enzymes sont ubiquitaires et nécessitent alors des inhibiteurs efficaces mais surtout sélectifs. La plupart des travaux[4–6,85–92] montrent que l'utilisation d'inhibiteurs multivalents permet d'augmenter, en générale, le pouvoir d'inhibition des ligands mais aussi de moduler la sélectivité. Pourtant à premiere vue, il est surprenant que ces systèmes, qui sont de grandes tailles par rapport aux inhibiteurs usuels, puissent intéragir avec le site actif d'une enzyme qui est parfois difficile d'accès. Afin de comprendre au mieux comment ces systèmes peuvent avoir un impact sur l'inhibition enzymatique d'un point de vue conceptuel mais aussi sur le mode d'action employé, il est nécessaire de développer des composés proposant différentes propriétés au niveau structural mais aussi différents sur l'apport du nombre de ligands.

Depuis peu, l'inhibition enzymatique par des systèmes multivalents s'est étendue à d'autres enzymes comme les protéases ou bien les anhydrases carboniques.

IV. Les Anhydrases Carboniques

Dans le cadre de ces travaux, les anhydrases carboniques furent un choix naturel comme cibles biologiques puisque celles-ci ont fait l'objet de nombreuses études depuis quelques années au sein de l'équipe. Elles constituent également un enjeu important au sein de la chimie médicinale puisqu'elles interviennent dans de nombreux processus pathologiques plus ou moins sévères tels que l'obésité, le glaucome, dans certain cas de dysfonctionnements neurologiques et également dans le processus métastatique dans le cadre du cancer.

L'anhydrase carbonique (CA ; EC. 4.2.1.1) a été isolée pour la premières fois en 1933 à partir de globules rouges bovins par N.U. Meldrum et F.J.W Roughton.[93] Suite à des recherches contribuant à identifier la présence d'un catalyseur qui permet le transit rapide du bicarbonate entre les érythrocytes vers les capillaires pulmonaires, ils ont pu mettre en évidence le rôle des anhydrases carboniques. En effet, cette métallo-enzyme ubiquitaire catalyse, de façon très efficace, la réaction réversible d'hydratation du dioxyde de carbone en bicarbonate et en générant un proton (Figure 14).[94]

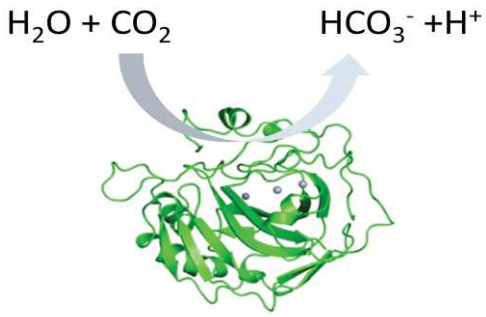


Figure 14 : Catalyse de l'hydratation du CO_2 par l'anhydrase carbonique.

Ces enzymes sont codées par sept familles de gènes qui ne sont pas reliées au point de vue de l'évolution.[94,95] Ainsi, on retrouve les α-CAs chez les vertébrés, les bactéries (Gram positive), les algues et dans le cytoplasme des plantes vertes.[96,97] Les β-CAs sont également présentes chez les bactéries (Gram positive et négative) mais aussi chez les champignons, les archées (*Archea*) et les plantes (mono et dicotylédons).[96,98] Les γ-CAs ont principalement été isolées à partir de bactéries, de cyanobactéries et d'archées.[94,98] Enfin, les δ-, ζ- et θ-CAs sont présentes dans les diatomées marines[99] et les η-CAs chez les protozoaires du plasmodium.[100]

IV.1 Les α-Anhydrases Carboniques

Chez les mammifères la famille des α-CAs regroupent 15 isoformes qui diffèrent de part leurs localisations tissulaires, leurs activités catalytiques et leurs rôles physiologiques. Il est à noter qu'à ce jour 12 isoformes ont été recensées comme catalytiquement actives et parmi les plus étudiées on retrouve les isoformes CA I, CA II, CA III, CA IV, CA IX et la CA XII.

Ainsi les α-CAs peuvent être classées en fonction de leurs distributions cellulaires[96,101,102] (Figure 15) :

1. Les **α-CAs cytosoliques** présentes au sein des cellules regroupent les isoformes CA I, CA II, CA III, CA VII et CA XIII. La CA II est l'un des isoformes les plus répandues d'un point de vue distribution cellulaire. Avec la CA VII, elle fait partie des isoformes ayant une forte activité catalytique. *A contrario*, les isoformes I, III et XIII, ont une distribution beaucoup plus restreinte avec une faible activité catalytique. Au sein du cytosol on retrouve aussi trois protéines liées à l'anhydrase carbonique CARP VIII, CARP X et CARP XI qui sont catalytiquement inactives.
2. Les **α-CAs liées à la membrane** dont les isoformes CA IV et CA IX ont une activité catalytique élevée. Les CA XII et CA XIV avec une faible activité catalytique et enfin l'isoforme CA XV avec une activité catalytique non définie à ce jour.
3. Les **α-CAs mitonchondriales** regroupent deux isoformes l'CA VA et l'CA VB avec une activité catalytique moyennement élevée.
4. Les **α-CAs secrétées** où seule l'isoforme CA VI a été mise en évidence avec une activité catalytique faible.

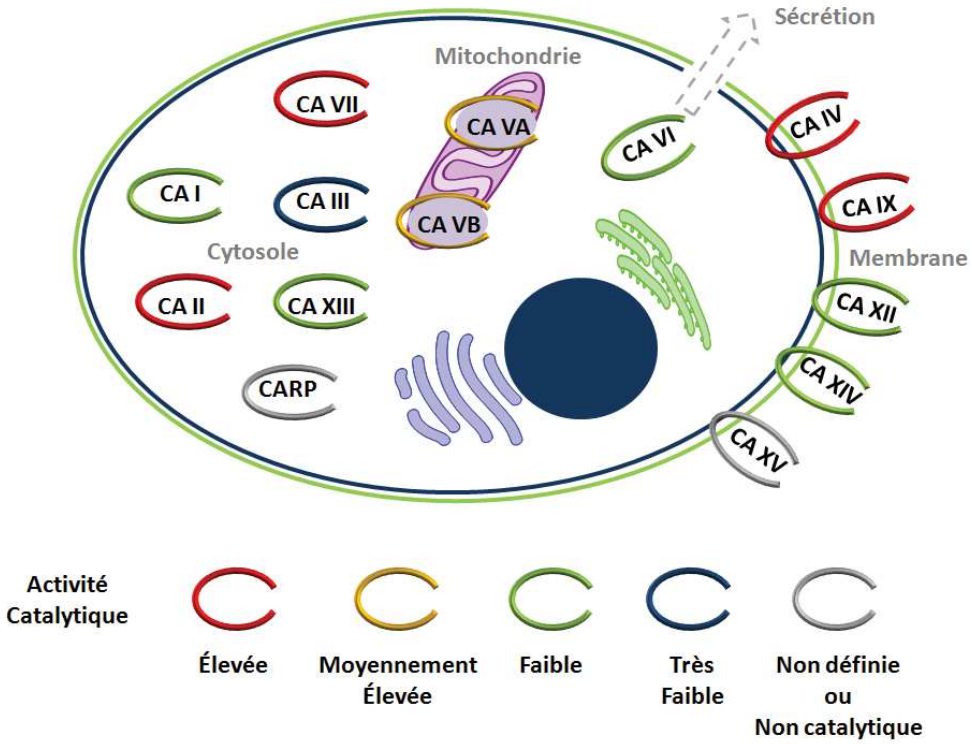


Figure 15 : Activité catalytique et distribution cellulaire des différents isoformes des α-CAs.

IV.2 Structures des α-CAs

Plusieurs données cristallographiques ont permis d'établir une similitude au niveau structural mais aussi au niveau du site actif entre les différentes isoformes des α-CAs. Ces données montrent que ces métallo-enzymes à zinc d'un poids moléculaire allant de 28 kDa à 58 kDa ont une structure ovoïdale qui permet de les considérer comme un seul domaine protéique (Figure 16).[103–105]

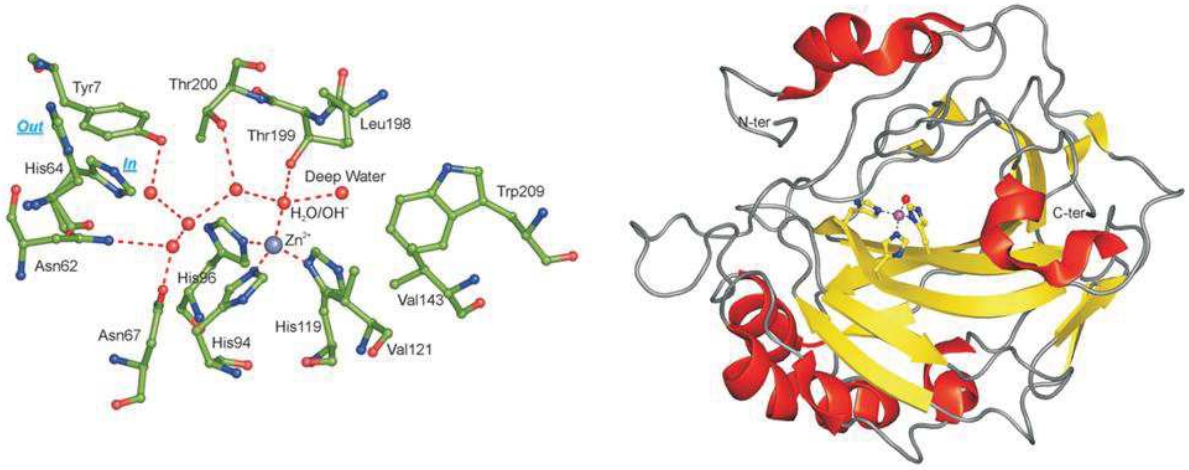


Figure 16 : Structure RX du site actif de l'isoforme α-CA II.[106]

Si la plupart des CAs existent sous forme de monomère, quelques unes d'entre elles peuvent s'agréger et ainsi former des oligomères. C'est le cas par exemple de la CA IX que l'on retrouve sous forme de dimère qui est induit par la formation intermoléculaire d'un pont disulfide entre deux entités monomériques (Figure 17).[107]

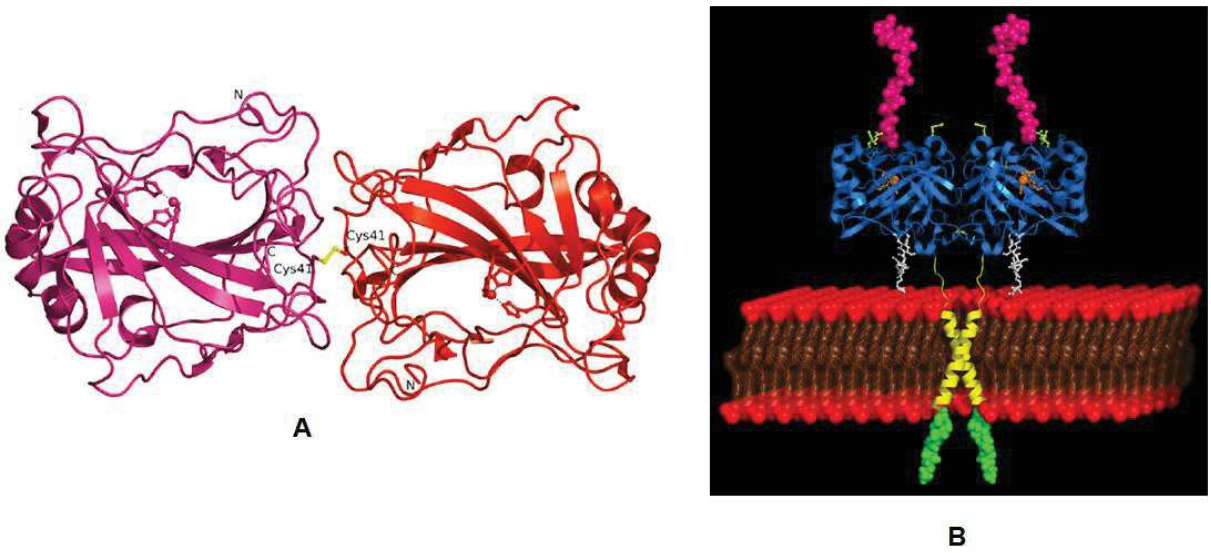


Figure 17 : (A) Structure dimérique de la CA IX. (B) Modèle proposé montrant l'agencement structurel du dimère CA IX sur la membrane cellulaire.

Au niveau du site actif, quatre caractéristiques structurales importantes sont essentielles à l'activité catalytique de l'enzyme. Tout d'abord, l'atome de zinc Zn(II) ; essentiel à la catalyse ; est situé au fond de la cavité conique du site actif à une profondeur de 15 Å. Le site de liaison a une géométrie pseudo tétraédrique de part la coordination du zinc avec trois résidus histidines (His 94, His 96 et His 119), qui jouent un rôle structural et fonctionnel important, et avec un ion hydroxyle ou une molécule d'eau. La coordination entre l'atome de zinc et la molécule d'eau induit des interactions par liaisons hydrogènes avec des résidus thréonine (Thr 199) et acide glutamique (Glu 106) ce qui rend la liaison zinc-eau beaucoup plus nucléophile et surtout permet d'orienter le dioxyde de carbone de telle manière à rendre l'attaque nucléophile plus favorable.[106]

IV.3 Mécanismes catalytiques

La forme activée de l'enzyme est sous forme basique. En effet, l'ion hydroxyle (HO^-) est lié à l'atome de zinc Zn(II) qui lui est maintenu et stabilisé grâce à la coordination des trois résidus histidines. (Schéma 3A) L'ion hydroxyle, qui est un nucléophile fort, va attaquer le dioxyde de carbone (CO_2) situé à proximité d'une poche hydrophobe voisine du site actif (Schéma 3B). Dans le cas de l'isoforme humaine (*h*) CA II ; qui est la plus étudiée ; cette poche est composée de résidus valines (Val 121 et Val 143) et d'un résidu leucine (Leu 198). L'attaque nucléophile conduit à la formation de l'ion hydrogénocarbonate (Schéma 3C) qui est ensuite déplacé par une molécule d'eau et libéré en solution. La coordination de l'eau avec l'atome de zinc Zn(II) constitue la forme acide de l'enzyme et la rend catalytiquement inactive (Schéma 3D).

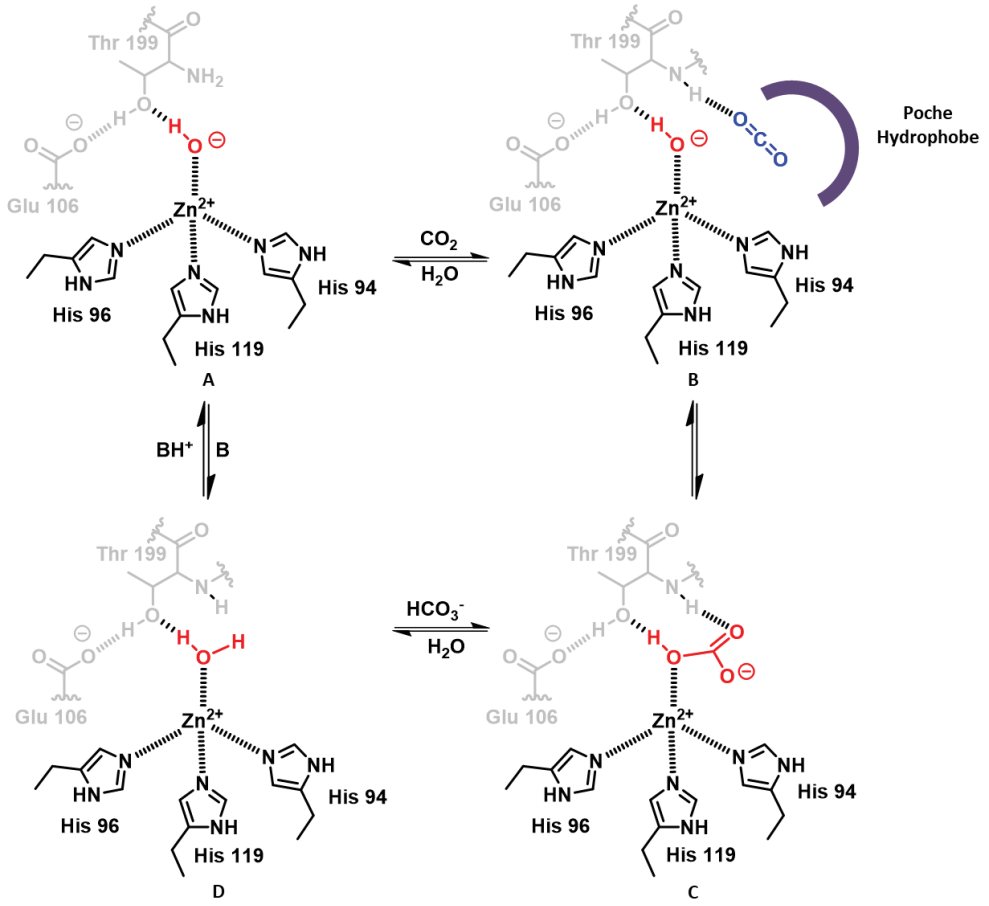


Schéma 3 : Représentation simplifiée du mécanisme catalytique des α-CAs.

Pour régénérer la forme activée, une réaction de transfert de proton est nécessaire entre le site actif et le milieu environnant. Ce transfert est rendu possible par certains résidus du site actif ou par la présence de tampons dans le milieu. Ce dernier processus est considéré comme l'étape limitante du cycle catalytique. Ainsi, on retrouve chez les isoformes qui ont une activité catalytique élevée, un résidu His 64 (ex : CA I, CA II, CA IX) situé à l'entrée du site actif qui permet le transfert rapide d'un proton. Ceci pourrait expliquer pourquoi ces isoformes sont plus actives que d'autres.

IV.4 Rôles physiologiques

Le rôle physiologique fondamental le plus connu des anhydrases carboniques est la régulation de la balance acide/base entre les différents tissus de part leur capacité à catalyser l'hydratation réversible du CO_2. De ce fait, elles font parties intégrantes de plusieurs processus physiologiques importants dans différents organes (Tableau 1).[102,106,108] Ainsi elles peuvent être impliquées dans des processus liés à la respiration (transport du CO_2 et du HCO_3^- entre les différents tissus), à la régulation du pH, à la sécrétion d'électrolytes, à des réactions biosynthétiques, à la résorption osseuse, à la calcification ou bien encore à la prolifération cellulaire. Le rôle physiologique des différentes isoformes des α-CAs est en relation directe avec leurs localisations tissulaires. Par exemple, les isoformes CA I, CA II et

l'isoforme membranaire CA IV qui sont ubiquitaires et très présentes chez l'homme vont être engagées dans de nombreux processus tels que la respiration, le transport d'ions, la régulation du pH, l'homéostasie tissulaire mais encore la secrétions d'électrolytes ou de fluides. D'autres isoformes, avec une distribution moins large, vont avoir un rôle essentiel dans un processus donné. C'est le cas des isoformes mitochondriales CA VA et CA VB qui participent à des réactions biosynthétiques telles que la lipogenèse, l'uréogenèse ou bien la glycogenèse.

Isoformes Humaines	**Tissus et organes d'expression**	**Rôle biologique**
CA I	Érythrocytes	Échanges gazeux
	Muqueuse gastro-intestinale	Transport d'ions
	Épithélium œsophagien et laryngé	Défense antireflux
CA II	Muqueuse nasale	Chimiosensitivité nasale au CO_2
	Œil	Production d'humeurs aqueuses
	Cerveaux	Sécrétion des fluides céphalo-rachidiens
	Épithélium œsophagien et laryngé	Défense antireflux
	Ostéoclastes osseux	Résorption osseuse
	Testicules	Mobilité des spermatozoïdes
	Épithélium tubulaire rénal	Acidification de l'urine
	Cerveau	Sécrétion du liquide cérébro-spinal
	Poumons, Érythrocytes	Échange gazeux
	Épithélium gastro-intestinale	Sécrétion de H^+ et HCO_3^-
CA III	Épithélium œsophagien et laryngé	Défense antireflux
	Muscles squelettiques, adipocytes	Métabolisme d'acide gras
	Œil	Transport de fluide oculaire et homéostasie

CA IV	Muqueuse nasale	Chimiosensitivité nasale au CO_2
	Épithélium œsophagien	Défense antireflux
	Rein	Réabsorption de HCO_3^-, résorption NH_4^+
	Pancréas, glandes salivaires, muscle du cœur, colon	Régulation du pH
	Œil	Transport de fluide oculaire
	Poumons	Échange gazeux
	Capillaires du cerveau	Flux sanguin cérébral
CA VA	Foie	Réactions biosynthétiques
CA VB	Muscles squelettiques et du cœur, pancréas, rein	Réactions biosynthétiques
CA VI	Glandes salivaires et mammaires	Régulation du pH, défense antireflux, protection contre la cariogenèse
CA VII	Système nerveux central	Sécrétion du liquide cérébro-spinal
CA IX	Diverses tumeurs	Régulation du pH, adhésion cellulaire
	Muqueuse gastro-intestinale	Prolifération cellulaire, transport d'ions
	Conduits artériels masculins	Acidification des fluides testiculaires
CA XII	Muqueuse nasale	Chimiosensitivité nasale au CO_2
	Conduits artériels masculins	Acidification des fluides testiculaires
	Cancer du rein, sein, colon et poumon	Régulation du pH
	Épithélium rénal, intestinal et reproductif	Absorption rénale de HCO_3^- et sécrétion de H^+

CA XIII	Glandes salivaires, reins, cerveau, poumons, testicules, utérus et intestin	Régulation du pH
CA XIV	Reins	Réabsorption de HCO_3^-
	Neurones et axones	Modulation de la transmission neuronale

Tableau 1 : Distributions et fonctions physiologiques des α-CAs catalytiquement actives.

IV.5 Les pathologies liées aux α-CAs

Leurs larges distributions et la diversité des processus physiologiques dans lesquels elles sont impliquées, parfois essentiels, font des anhydrases carboniques des enzymes fondamentales pour le bon fonctionnement des organes et des tissus. Lorsque ces enzymes subissent des dysfonctionnements ou une surexpression, irrémédiablement elles créent un désordre au sein du processus physiologique dans lequel elles sont engagées, conduisant à l'apparition de diverses pathologies plus ou moins sévères (Tableau 2). [106,108]

Pathologies	Cibles d'isoformes potentielles
Glaucome	CA II, CA IV et CA XII
Œdème maculaire cystoïde, la rétinopathie diabétique	CA II, CA IV, et CA XIV
Épilepsie	CA IV et CA XIV
Désordre neurologique et neuromusculaire (hémiplégie, migraine, ataxie, paralysie périodique)	CA II, CA IV, CA V, CA VII et CA XIV
Œdème (insuffisance cardiaque, maladie rénale et hépatique, diabète)	CA II, CA IV, CA V, CA XII et CA XIV
Obstruction pulmonaire et apnée du sommeil	CA II et CA IV
Ostéoporose	CA II
Cancer	CA IX, CA XII, CA II et CA V
Obésité	CA V et CA II

Tableau 2 : Pathologies liées aux α-CAs et les cibles d'isoformes potentielles

De la même manière que les processus physiologiques, les pathologies générées par le dysfonctionnement des anhydrases carboniques vont dépendre de la localisation et du processus physiologique des différentes isoformes affectées. Par exemple, il peut exister plusieurs isoformes responsables d'une même pathologie. Pour traiter le glaucome, la CA II, la CA IV et la CA XII ont été mises en évidence comme des cibles potentielles. Le dysfonctionnement de ces isoformes entraine une surproduction d'humeurs aqueuses chez

l'homme conduisant à une augmentation de la pression intraoculaire qui endommage les nerfs optiques.

A l'inverse, les isoformes ubiquitaires, comme la CA II, peuvent être responsables de plusieurs pathologies. La CA II, qui est l'isoforme la plus représentée, est une cible potentielle pour des pathologies liées à des désordres neurologiques, à l'épilepsie ou même à l'ostéoporose.

Les isoformes mitochondriales CA VA et CA VB qui ont une localisation bien précise et un processus biosynthétique permettant, entre autre, la lipogenèse sont mises en cause dans le cadre de l'obésité. Le dérèglement des réactions liées directement à la lipogenèse peut induire une surproduction d'amas adipeux.

Enfin, la découverte récente de certaines isoformes surexprimées dans les tissus tumoraux a permis de mettre à jour de nouvelles cibles thérapeutiques dans le cadre du traitement de certains cancers. La surexpression des deux isoformes, CA IX et CA XII, transmembranaires induit logiquement une acidification du milieu extracellulaire ce qui crée un milieu favorable à la survie et à la prolifération de métastases.

IV.6 Les inhibiteurs cliniques des α-CAs

Les nombreuses pathologies induites par le mauvais fonctionnement ou la surexpression des α-CAs ont fait l'objet de nombreuses recherches dans le domaine de la chimie médicinale afin de développer des composés capables d'inhiber ou d'activer efficacement les différentes isoformes. De nombreux composés ont été synthétisés et certains d'entres eux sont en phase préclinique. D'autres sont utilisés en clinique comme anti-glaucome, anti-diurétique ou anti-épileptique. On recense prêt d'une trentaine d'inhibiteurs en clinique tels que l'Acetazolamide, la Methazolamide, l'Ethoxzolamide et bien d'autres encore (Figure 18).[106]

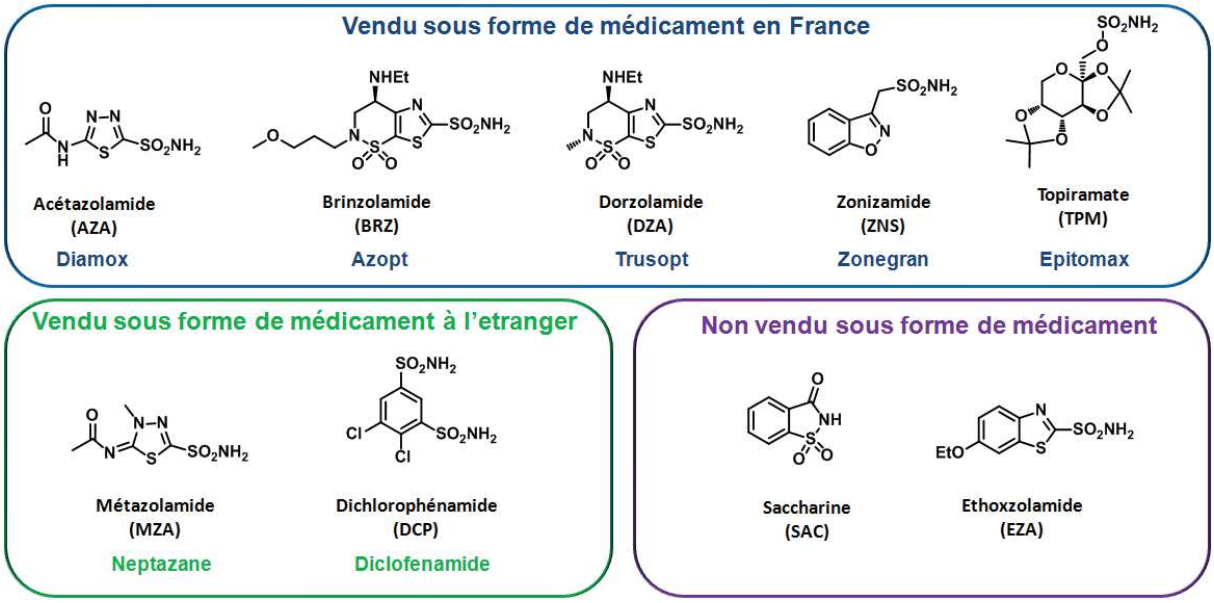


Figure 18 : Exemples d'inhibiteurs cliniques de l'anhydrase carbonique.

Ces agents pharmacologiques sont principalement de petites molécules composées d'un hétérocycle portant une fonction sulfonamide, ou un de ses isostères (sulfamate et sulfamide), reconnu pour avoir une forte affinité pour la plupart des isoformes de l'anhydrase carbonique (Tableau 3).[102]

	*K*i (nM)								
Isoforme	**AZA**	**MZA**	**EZA**	**BRZ**	**DZA**	**TPM**	**DCP**	**ZNS**	**SAC**
*h*CA I	250	50	25	4500	50000	250	1200	56	18540
*h*CA II	12	14	8	3	9	10	38	35	5950
*h*CA III	2.105	7.105	1.106	1.1.105	7.7.105	7.8.105	6.8.105	2.2.106	1.106
*h*CA IV	74	6200	93	3950	8500	4900	1500	8590	7920
*h*CA VA	63	65	25	50	42	63	630	20	10060
*h*CA VB	54	62	19	30	33	30	21	6033	7210
*h*CA VI	11	10	43	0.9	10	45	79	89	935
*h*CA VII	2.5	2.1	0.8	2.8	3.5	0.9	26	117	10
*h*CA IX	25	27	34	37	52	58	50	5.1	103
*h*CA XII	5.7	3.4	22	3	3.5	3.8	50	11	633
*h*CA XIV	41	43	2.5	24	27	1460	345	5250	773

Tableau 3 : Constante d'inhibition des agents utilisés en clinique sur les différentes isoformes humaines (*h*) de l'anhydrase carbonique.

Ils restent à ce jour les seuls inhibiteurs utilisés en clinique contre l'anhydrase carbonique bien qu'ils génèrent des effets secondaires principalement dû à un manque de sélectivité. En effet, comme détaillé précédemment, les isoformes de l'anhydrase carbonique sont impliquées dans des processus fondamentaux au bon fonctionnement des tissus et des organes ainsi il est nécessaire d'inhiber efficacement et sélectivement l'isoforme liée à la pathologie afin de conserver l'intégrité des autres isoformes.

V. La multivalence pour l'inhibition des α-CAs

Diverses approches ont été rapportées dans la littérature afin d'augmenter la sélectivité et l'affinité des inhibiteurs envers les différentes isoformes des α-CAs. La plupart de ces études sont basées sur la conception d'inhibiteurs monovalents. Très peu employée sur ces enzymes, la multivalence a néanmoins fait l'objet de quelques travaux très encourageant tant sur l'augmentation de la sélectivité et de l'affinité mais aussi sur les modes d'interactions possibles.

V.1 Approche bivalente

Les anhydrases carboniques possèdent un site catalytique remarquablement conservé. Cependant, chacune d'entre elles ont une distribution de résidus d'acides aminés autour du site catalytique mais aussi en surface différente. Cette différence peut alors permettre une approche bivalente : l'emploi de ligands puissants capables d'une part d'inhiber efficacement l'activité de l'enzyme en se liant au site actif et, d'autre part, permettre la reconnaissance d'autres sites secondaires.

En 2003, Supuran et *coll*. se demandent si deux inhibiteurs valent mieux qu'un.[109] En partant d'un bis-benzosulfonamide connu pour avoir de fortes propriétés d'inhibition vis-à-vis de la hCA II (K_I = 5 nM), ils mettent en évidence le mode d'interaction de cet inhibiteur bivalent à l'aide de la structure cristalline du complexe hCA II/bis-benzosulfonamide (Figure 19).

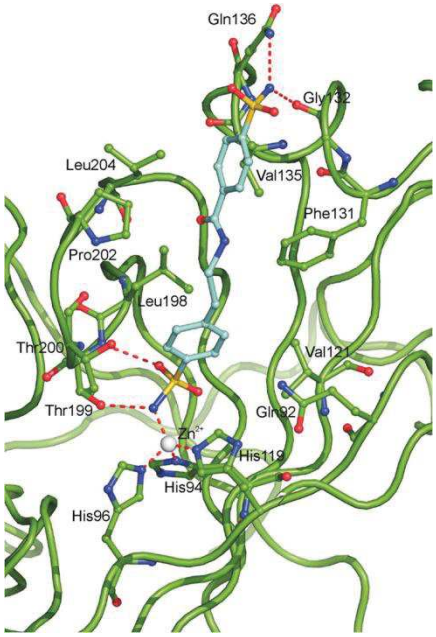


Figure 19 : Région du site actif du complexe hCA II/bis-benzosulfonamide.

L'analyse structurelle montre que l'un des fragments benzosulfonamides se lie directement à l'ion Zn^{2+} du site actif et crée des interactions avec la poche hydrophobe qui est à proximité. Le second motif va participer à des liaisons hydrogènes fortes avec des résidus situés à l'entrée de la cavité du site actif. Ainsi, l'utilisation de deux inhibiteurs permet d'augmenter l'interaction avec l'enzyme et d'orienter l'inhibiteur bivalent dans le site actif. Ces résultats mettent en évidences l'importance des interactions entre l'inhibiteur avec les différents résidus d'acides aminés à l'extérieur du site actif. Ces interactions permettent, d'une part, d'augmenter le pouvoir d'inhibition et, d'autre part, constituent une stratégie intéressante pour la conception d'inhibiteurs sélectifs des différentes isoformes de la CA.

D. K. Srivastava et *coll*. ont démontré l'importance que peut avoir ces sites secondaires en synthétisant des ligands bivalents. Dans une première étude effectuée sur l'isoforme *h*CA II, ils ont pu obtenir, à l'aide d'un composé bivalent, des inhibitions 40 fois supérieur comparé à l'inhibiteur monovalent. Ces composés sont constitués d'un motif benzosulfonamide capable de se lier au site actif et d'un groupement acide imidodiacétique conjugué au Cu^{2+} qui interagit avec un site secondaire.[110] L'hypothèse formulée est que le second groupement va venir se lier à un résidu histidine présent à la surface de l'enzyme et donc permettre d'augmenter l'affinité de l'inhibiteur avec la cible.[111] Dans une seconde étude effectuée sur la hCA I, ils démontrent l'importance de la distance entre ces deux fonctions qui sont liées par un bras espaceur dans l'augmentation de la sélectivité pour cette isoforme.[112] Après analyse de la structure de hCA I, deux inhibiteurs composés des deux même motifs que l'étude précédente mais avec des bras espaceurs de différentes tailles ont été synthétisés (Figure 20). L'utilisation d'espaceurs spécifiques permet de maitriser l'éloignement des deux ligands avec une distance de 22 Å pour le bras le plus court et de 29Å pour le bras le plus long. Les tests d'inhibition ont permis de déterminer une inhibition 444 fois supérieure de l'inhibiteur présentant un bras court comparé à l'autre. La distance optimale entre les deux ligands de cet inhibiteur permet de les lier idéalement à la fois au site actif mais aussi à un résidu histidine proche de la poche enzymatique.

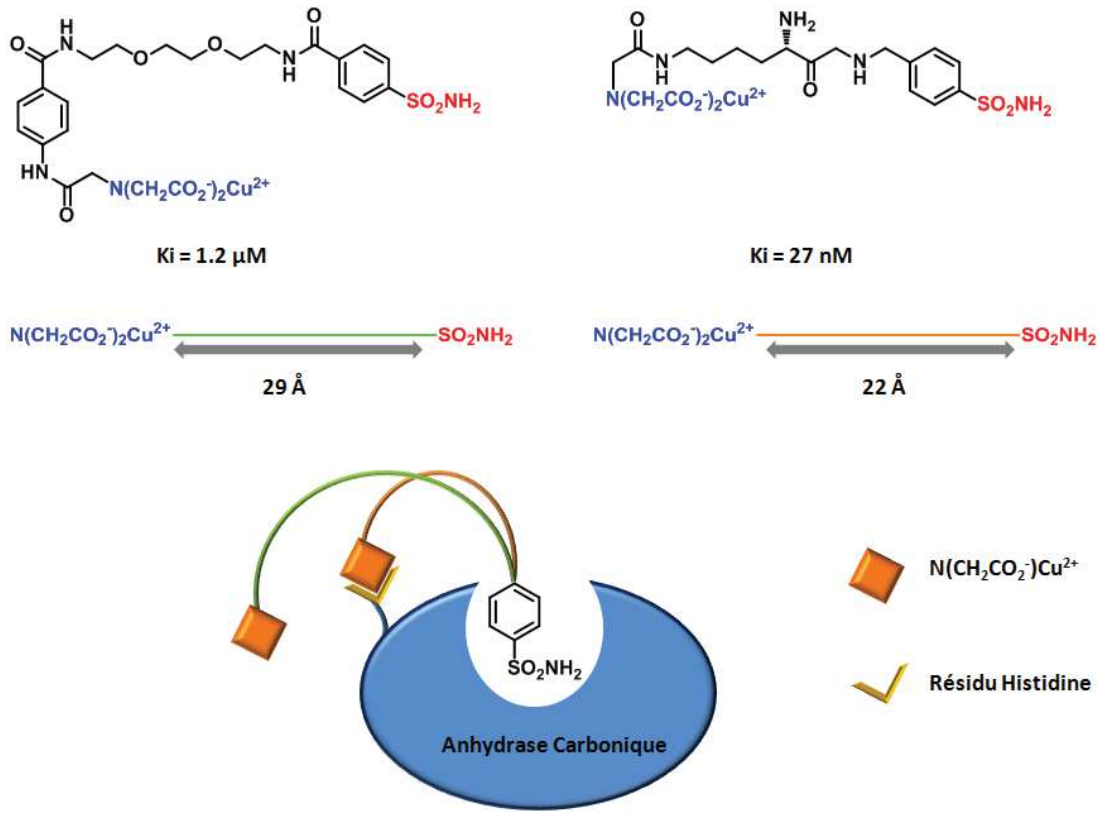


Figure 20 : Inhibiteurs bivalents de l'anhydrase carbonique avec la reconnaissance de site secondaire.

En 2009, les travaux effectués au sein de l'équipe par Winum en collaboration avec Supuran ont permis de mettre en évidence, à l'aide d'études cristallographiques et de modélisations moléculaires, un site regroupant 7 acides aminés (130-136) sur l'isoforme CA IX permettant des interactions supplémentaires avec l'inhibiteur. Pour cela, des inhibiteurs de type bisulfamates aliphatiques et leurs contreparties monovalentes ont été synthétisés et testés sur les différentes isoformes de la *h*CA (Figure 21).[113] Une modulation de l'affinité et de la sélectivité envers les différentes isoformes a été observée avec l'utilisation des inhibiteurs bivalents. En effet, les composés monovalents ont une plus grande affinité pour l'isoforme cytosolique *h*CA II comparés aux composés bivalents qui ont une plus grande affinité pour l'isoforme transmembranaire *h*CA IX.

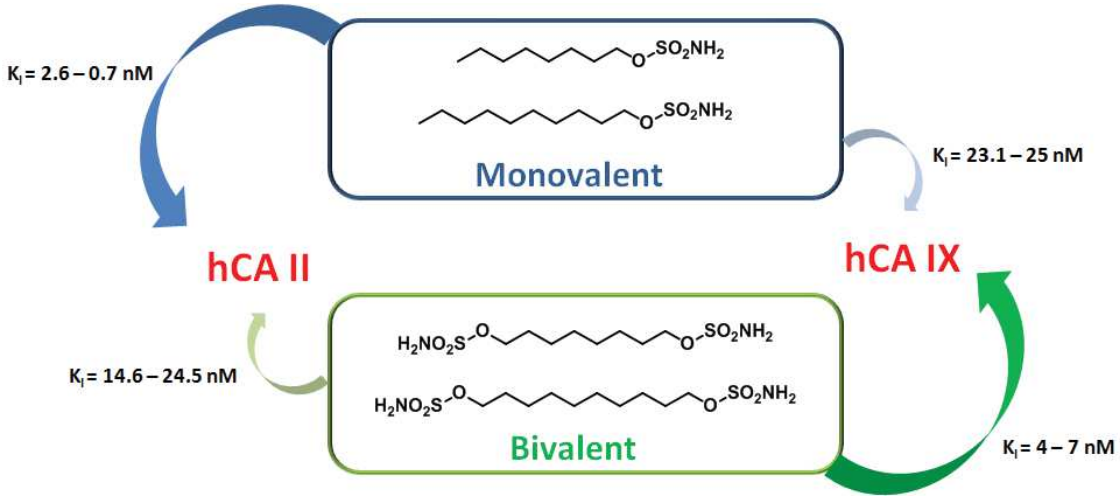


Figure 21 : Inhibiteurs sulfamates bivalents et monovalents de l'anhydrase carbonique.

Plus tard, en 2012, Winum et *coll*. confirment avec une nouvelle série d'inhibiteurs bivalents que le bras espaceur entre les deux ligands joue un rôle prépondérant dans l'augmentation de l'affinité avec la cible.[114] Plusieurs inhibiteurs bivalents ont été synthétisés avec des bras espaceurs de différentes tailles et de différentes natures. Il a été mis en évidence que plus la longueur de la chaine est longue et plus l'inhibition augmente. De plus, la présence d'un phényle au sein du bras permet d'une part d'augmenter les interactions avec les résidus situés dans le site actif et d'autre part de donner une conformation structurelle à l'inhibiteur (Figure 22).

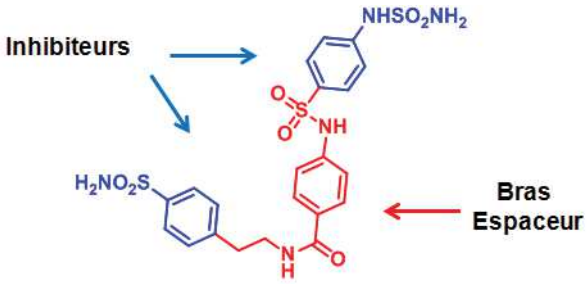


Figure 22 : Inhibiteur bivalent développé par Winum et *coll*. en 2012.

Ainsi, l'optimisation de la nature et de la longueur du bras espaceur a conduit à une amélioration jusqu' à 10 fois supérieure de la capacité inhibitrice de ces composés bivalents sur les isoformes hCA II, IX et XII.

La même année, Whitesides et *coll*. ont démontré et rationnalisé les avantages de l'approche bivalente pour l'inhibition des anhydrases carboniques. Pour ces travaux, des ligands bivalents ont été liés à des dimères synthétiques de l'anhydrases carboniques.[115] Les effets constatés montrent que les systèmes monovalents inhibent les CAs avec une constante d'inhibition atteignant le nanomolaire et les ligands bivalents inhibent à des concentrations de l'ordre du picomolaire. Ici l'effet chélate a clairement été mis en évidence et permet d'augmenter considérablement l'affinité des liaisons ligand-récepteur. Mais

encore une fois ils démontrent que l'effet chélate n'est possible que si la longueur entre les deux ligands est optimale (Figure 23).

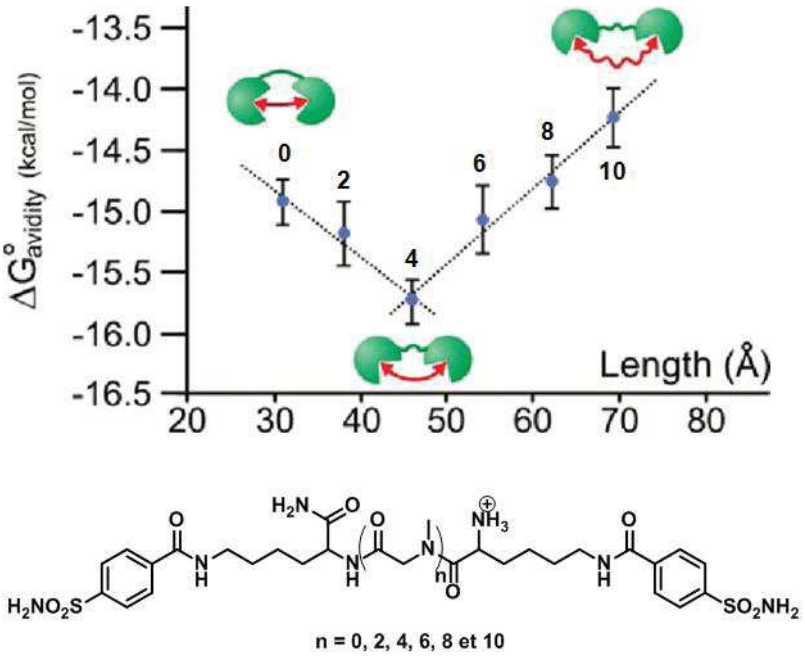


Figure 23 : Inhibiteurs bivalents développés par Whitesides et *coll*. en 2012.

En 2014, Neri et *coll*. développent des inhibiteurs bivalents puissants de la CA IX. L'inhibition sélective de cette isoforme, qui est surexprimée dans certains cancers, a permis *via* des tests *in vivo* la régression tumorale complète chez la souris. Ces inhibiteurs bivalents comportent deux motifs sulfonamides liés entre eux par un bras espaceur peptidique et un groupement cytotoxique (DM1) (Figure 24). Les expériences faites sur la liaison ligand-récepteur, réalisées par résonance de plasmon de surface, montrent que l'inhibiteur bivalent ne se dissocie pas de l'enzyme contrairement à la référence monovalente.[116,117]

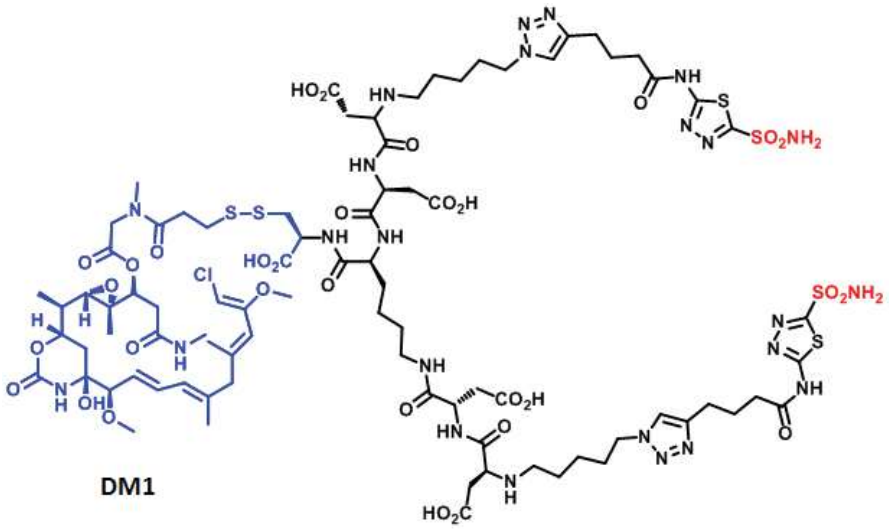


Figure 24 : Inhibiteur cytotoxique bivalent de l'anhydrase carbonique sélectif de la CA IX.

Enfin en 2016, Ilies et *coll*. ont synthétisé des inhibiteurs bivalents de l'anhydrase carbonique espacés par une chaine polyéthylène glycol.[118] Ces différents inhibiteurs ont été testés sur les isoformes de la CA et une sélectivité a été constatée sur les isoformes transmembranaires CA IX et CA XII. Par la suite, des tests *in vitro* ont été engagés sur des modèles cellulaires de tumeur exprimant ces isoformes membranaires. Il a été ainsi constaté, avec l'inhibiteur bivalent ayant la chaine polyéthylène glycol la plus longue (45 unités de répétitions), une inhibition de l'ordre du nanomolaire sur les isoformes purifiées et une mort cellulaire significative des cellules tumorales à des concentrations de 10 à 100 µM d'inhibiteurs.

V.2 Approche multivalente

Une approche multivalente de valence supérieure à 2, grâce à la fonctionnalisation de châssis a également fait l'objet de travaux au sein de l'équipe. En 2008, le premier système multivalent dédié à l'inhibition de l'anhydrase carbonique a été développé par Winum, Supuran et *coll.* Pour cela, des nanoparticules d'or ont été fonctionnalisées avec des benzosulfonamides (Figure 25).[33] Le pouvoir d'inhibition de ces molécules greffées sur la nanoparticule n'a pas été augmenté. Cependant une amélioration de la sélectivité a clairement été mise en évidence sur l'isoforme hCA IX.

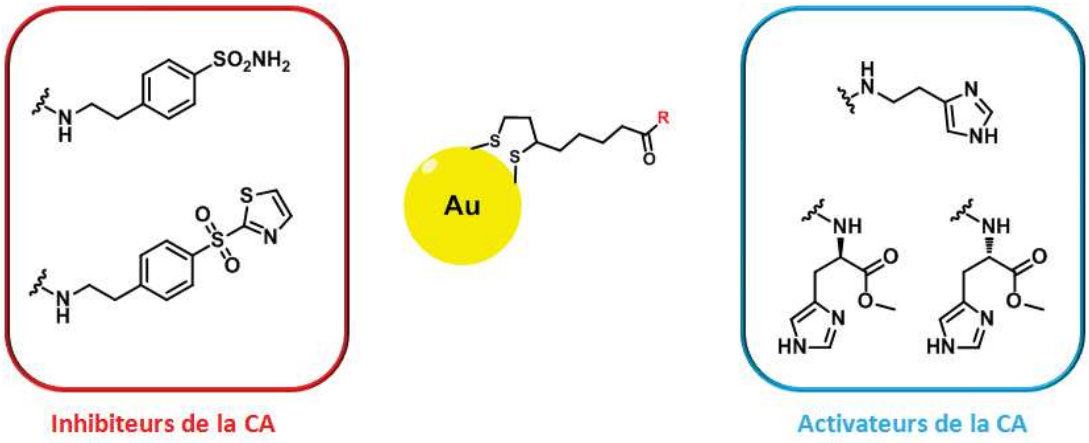


Figure 25 : Nanoparticules d'or comme supports multivalents pour l'inhibition ou l'activation de l'anhydrase carbonique.

Forts de ces résultats, en 2011 des activateurs de l'anhydrase carbonique ont été couplés à ces nanoparticules d'or. Les études effectuées démontrent une nette amélioration de la capacité d'activation de ces ligands greffés sur la nanoparticule comparée au ligand seul. Des expériences *in vivo* ont confirmé les premiers résultats avec une augmentation de 200 à 280 % de l'activité des anhydrases carboniques en présence de l'activateur multivalent.[119]

Des effets inhibiteurs multivalents sur les différentes isoformes de l'anhydrase carbonique ont été signalés en 2015 par Supuran et *coll*..[120] Une série de dendrimères de poly(amidoamine) (PAMAM) de génération 0 à 3 a été utilisé comme plateforme multivalente. Sur ces PAMAM, des inhibiteurs de l'anhydrase carbonique de type benzosulfonamide ont été greffés. L'augmentation du nombre d'inhibiteurs présent sur les différents dendrimères a conduit à une amélioration de la puissance inhibitrice et à de forts effets multivalents contre les isoformes hCA II, V, VII, IX, XII et XIV. Par exemple, la génération 3 qui comporte 32 motifs benzosulfonamides a permis d'obtenir une puissance d'inhibition 2285 fois supérieure sur la hCA II par rapport au composé monovalent et avec un pouvoir d'inhibition par unité de ligand amélioré de 71 fois. Malgré ces effets multivalents très intéressants, aucune sélectivité n'a pu être mise en évidence vis-à-vis des différentes isoformes de la CA.

La même année un fullerène (C_{60}) fonctionnalisé par des alcynes a également servi de plateforme multivalente (Figure 26).[121] Par ligation alcyne-azoture, douze inhibiteurs de type coumarine ont été greffés. Même si de meilleures inhibitions ont pu être constatées avec l'utilisation de ces inhibiteurs multivalents sur les isoformes *h*CA I, II, IX et XII comparés aux inhibiteurs monovalents, aucun effet multivalent n'a pu être clairement mis en évidence.

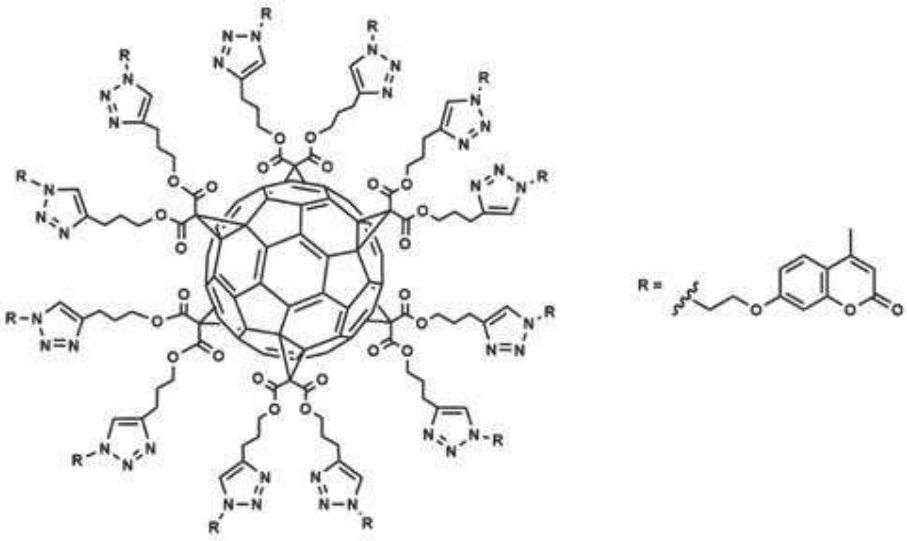


Figure 26 : Inhibiteur multivalent de la CA basé sur un système fullerène (C_{60}) décoré par des coumarines.

Enfin, en 2016 les groupes de Supuran et de Vincent développent des inhibiteurs multivalents de l'anhydrase carbonique composés de trois, quatre et six motifs de xanthates par couplage alcyne-azoture (Figure 27).[122] Ces inhibiteurs ont été testés sur quatre isoformes de la CA (*h*CA I, *h*CA II, *h*CA IX et *h*CA XII). Les composés de valence six se sont avérés être efficaces (1.80 – 0.53 µM) et sélectifs envers l'isoforme *h*CA I. De plus, des effets multivalents positifs ont été mis en évidence avec une augmentation de la puissance relative par rapport au nombre de ligand (pr/n) de 2.3 à 4.8 fois supérieure par rapport aux composés monovalents.

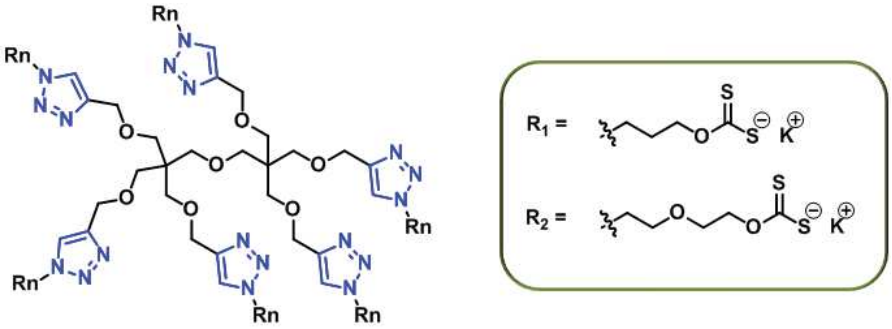


Figure 27 : Inhibiteurs multivalents de la CA formés à partir de xanthates.

VI. Objectif des travaux de recherches

Les anhydrases carboniques font partie intégrantes de plusieurs processus physiologiques importants dans différents organes. Lorsque ces enzymes subissent un dysfonctionnement ou une surexpression des pathologies telles que l'obésité, le glaucome, l'épilepsie ou même la prolifération de métastases peuvent apparaitre. Ainsi, l'inhibition des anhydrases carbonique est un enjeu important au sein de la chimie médicinale. A ce jour, de nombreux composés capables d'inhiber efficacement les CAs sont connus. Cependant, ces inhibiteurs, qui sont en général de petites molécules, manquent cruellement de sélectivité envers les différentes isoformes de la CA ce qui peut induire des effets secondaires lors de leurs utilisations comme traitements.

Différentes approches ont été employées afin de concevoir de nouveaux composés capables d'inhiber efficacement mais aussi sélectivement les différentes isoformes de la CA. La plus récente d'entre elles, tire parti des interactions multivalentes et a déjà fait l'objet de quelques travaux ayant obtenus des résultats intéressant. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs multivalents peut permettre d'augmenter l'inhibition notamment grâce à des effets de chélation ou de statistique. De plus, il a été démontré que même si le site actif des CAs est bien conservé, les résidus à proximité et en dehors de la cavité du site actif sont différents. Il est alors possible d'augmenter la sélectivité envers les différentes isoformes de la CA par interaction du système multivalent avec un sous site de liaison. Enfin, la sélectivité peut être aussi induite par un effet d'agrégation (clustering) qui sera favorisé pour les isoformes sous forme de monomère contrairement aux isoformes sous forme d'oligomères qui seront eux désavantagées par des problèmes liés à l'encombrement stérique.

L'objectif de ces travaux de recherches est donc d'étudier l'effet de la multivalence sur l'inhibition de l'anhydrase carbonique. Pour cela, des systèmes multivalents de différentes nature, valence mais aussi de structure variable sont développés. Ces différences permettent, par la suite, de donner des indications sur la relation structure activité lors de l'inhibition. Les systèmes multivalents sont fonctionnalisés de telle sorte qu'il soit possible de greffer par bioconjugaison, de type chimie click, des inhibiteurs déjà connus de l'anhydrase carbonique (Figure 28). La bioconjugaison permet ainsi de faciliter la synthèse en un seul pot des inhibiteurs multivalent en s'affranchissant des nombreuses étapes de synthèse, de purification mais aussi de la formation de sous-produits. Le choix de la méthode de bioconjugaison s'est porté sur la formation de liaison oxime et (acyl)hydrazide qui sont de bons outils pour la synthèse de bioconjugués puisqu'elles sont chimiosélectives, n'utilisent pas de métaux, sont réalisables en milieux aqueux et ne génèrent que de l'eau comme sous produit.

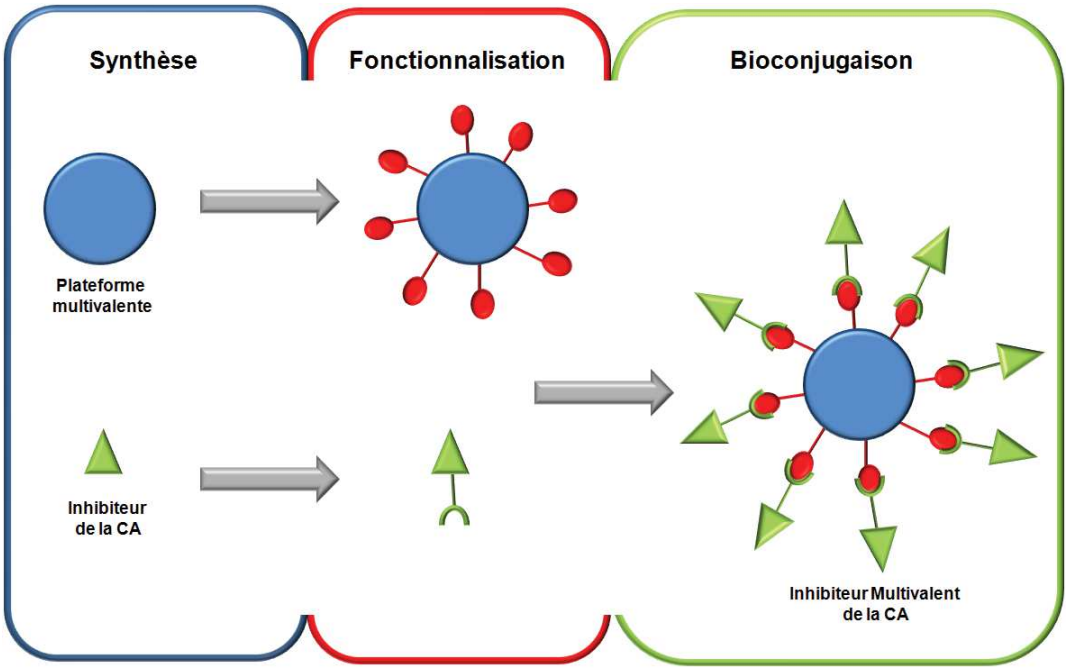


Figure 28 : Approche pour la conception d'inhibiteur multivalent de la CA.

Le Chapitre II de cette thèse est consacré à la synthèse et à la fonctionnalisation de différents inhibiteurs de l'anhydrase carbonique dédiés à la bioconjugaison.

Basé sur les travaux antérieurs effectués au sein du laboratoire, des inhibiteurs multivalents peptidiques, pré-organisés ou non, sont développés au cours du chapitre III. Ces inhibiteurs de valence 4 avec des structures différentes sont testés sur les isoformes de la CA et permettent de donner des informations sur la relation structure-activité.

L'avancée récente des nanomatériaux dans le domaine biomédicale a permis d'ouvrir le champ sur la conception de nouveaux composés bioactifs. Ici, des nanomatériaux à base de silice sont utilisés comme systèmes multivalents. Ainsi, dans la première partie du Chapitre IV, est décrite la synthèse de nanoparticules sphériques bifonctionnelles, fluorescente et inhibitrice. La deuxième partie fait l'objet d'une méthodologie de synthèse nouvelle qui permet d'obtenir des nanoparticules de type cubique fonctionnalisées pour la bioconjugaison.

Enfin, le Chapitre V entrouvre une perspective d'élaboration de nouveaux inhibiteurs hybrides sélectifs de l'isoformes CA IX en tirant profit de sa structure. Ces composés bivalents sont conçus à partir d'une approche dite *dual-target* (double cibles). Ils arborent un motif de reconnaissance couplés à un inhibiteur.

Chapitre II : Synthèses et fonctionnalisations d'inhibiteurs des anhydrases carboniques en série oxyamine et hydrazide.

I. Introduction

Depuis plus de 50 ans, les principaux inhibiteurs de l'anhydrase carbonique ont été exclusivement synthétisés autour de deux grandes familles capables de complexer les métaux: les sulfonamides et les anions organiques.[123] Ces fonctions sont connues pour se coordiner à l'ion métallique divalent (Zn^{2+}) présent dans le site actif et ainsi empêcher l'hydratation du dioxyde de carbone. Cet ion métallique peut avoir une géométrie bipyramidale tétraédrique ou parfois trigonale, selon que l'inhibiteur soit mono- ou bidenté, ou si une molécule d'eau supplémentaire est coordonnée (Figure 29).[94] Les inhibiteurs appartenant à cette classe sont les sulfonamides et ses bioisostères (les sulfamates et les sulfamides), les anions inorganiques, les dithio- et monothio-carbamates, les xanthates, les carboxylates, les hydroxamates, les acides boroniques et les diols, etc.[124]

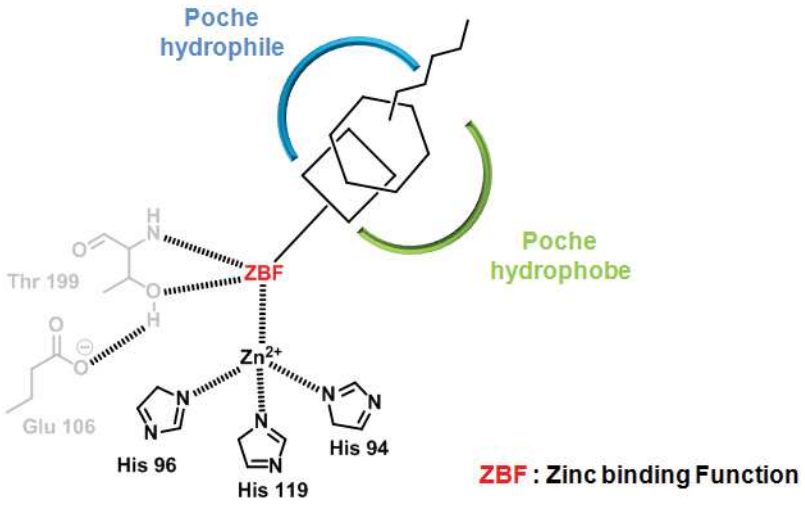


Figure 29 : Mécanisme d'inhibition par liaison à l'ion métallique Zn^{2+}.

Cependant, les avancées récentes ont permis d'identifier d'autres chimiotype de molécules capables d'inhiber la CA avec des mécanismes d'inhibitions différents.

On retrouve les inhibiteurs dits d'ancrage, qui vont se lier au ligand présent dans le site actif (H_2O ou HO^-) et non pas à l'ion métallique (Figure 30A). Parmi eux les phénols,[125,126] les polyamines,[127] les sulfocoumarines hydrolysées,[128] certains carboxylates et les 2-thioxocoumarines[129] se sont avérés être de très bons inhibiteurs.

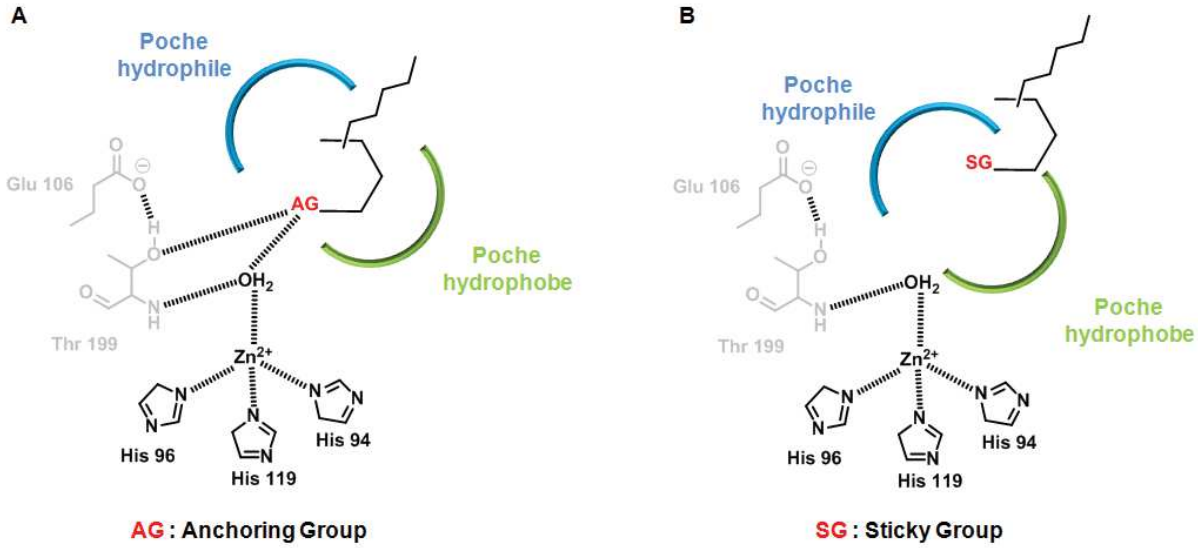


Figure 30 : A) Mécanisme d'inhibition par ancrage. B) Mécanisme d'inhibition par occlusion du site actif.

Une autre catégorie d'inhibiteurs a été recensée avec un mécanisme d'inhibition dit d'occlusion du site actif. Les coumarines ont été à l' origine de cette découvertes et depuis de nombreux composés ayant une structures apparentées ont été synthétisés (Figure 30B). On retrouve par exemple les thiocoumarines ou les dérivés de type lactones.[130–134]

Enfin, un seul exemple d'inhibiteur ayant un mécanisme d'inhibition hors du site actif a été découvert. Celui-ci est un dérivé d'acide carboxylique aromatique.[135]

II. La classe des sulfonamides

Dès la première preuve de leurs propriétés inhibitrices envers l'anhydrase carbonique en 1940 par Mann et Keilin,[136] la classe des sulfonamides et de ses bioisostères a conduit au développement de nombreux inhibiteurs qui se trouvent aujourd'hui à l'origine de la quasi-totalité des agents utilisés en clinique. Ces inhibiteurs ont fait l'objet de plusieurs études cinétiques, physiologiques et pharmacologiques.[137] De nombreuses structures cristallographiques de complexation entre des inhibiteurs de type sulfonamide et le site actif de différentes isoformes de la CA sont également disponibles.[107,138] Ces données permettent de mettre en évidence la coordination de l'azote du sulfonamide déprotoné avec l'atome Zn^{2+} du site actif. Cette liaison a pour conséquence la substitution de la molécule d'eau liée au zinc, stabilisée par deux liaisons hydrogène entre la fonction sulfonamide et le résidu thréonine (Thr199) présent à proximité du site actif. Il en résulte ainsi la formation d'un adduit tétraédrique (Figure 31).

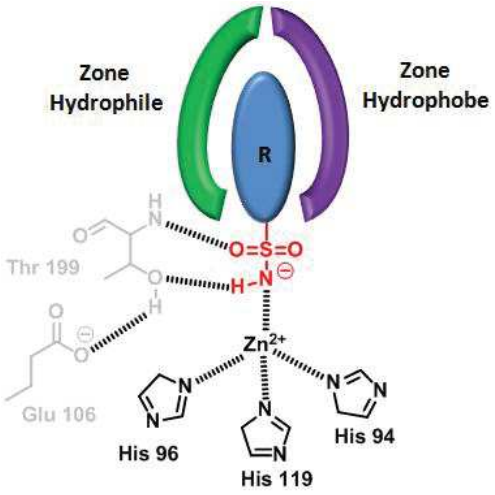


Figure 31 : Complexation de la fonction sulfonamide au site actif de la CA.

Le fait de combiner la charge négative de l'azote déprotoné avec l'atome de zinc chargé positivement, et la présence d'un proton sur l'azote coordiné avec le résidu thréonine (Thr199) font de la fonction sulfonamide un inhibiteur idéal du site actif de la CA. Enfin, selon la nature du substituant de la fonction sulfonamide (R), des interactions supplémentaires avec la région hydrophile et/ou hydrophobe aux abords du site actif peuvent permettre d'augmenter l'affinité du ligand envers l'enzyme.

La fonction sulfonamide est connue, à ce jour, pour être la fonction par excellence permettant d'avoir le plus d'affinité pour l'anhydrase carbonique. Cependant, elle manque cruellement de sélectivité pour les différentes isoformes de la CA en raison de la conservation des résidus présent au fond du site actif. Les résidus qui distinguent les isoformes sont situés à l'écart de l'ion métallique (Zn^{2+}) et principalement à l'entrée du site actif.[106,139,140] Certaines de ces différences de résidus permettent de moduler l'hydrophobicité et la charge tandis que d'autres modifient le volume et la forme de la cavité du site actif.

A l'aide de ces données, de nombreux groupes se sont penchés sur le développement d'inhibiteurs plus sélectifs. Une grande stratégie ressort de la plupart des travaux décrits et se base sur les interactions possibles que l'inhibiteur peut créer avec les différents résidus non conservés du site actif. Ainsi un modèle général a pu être établi pour la conception d'inhibiteur (Figure 32).

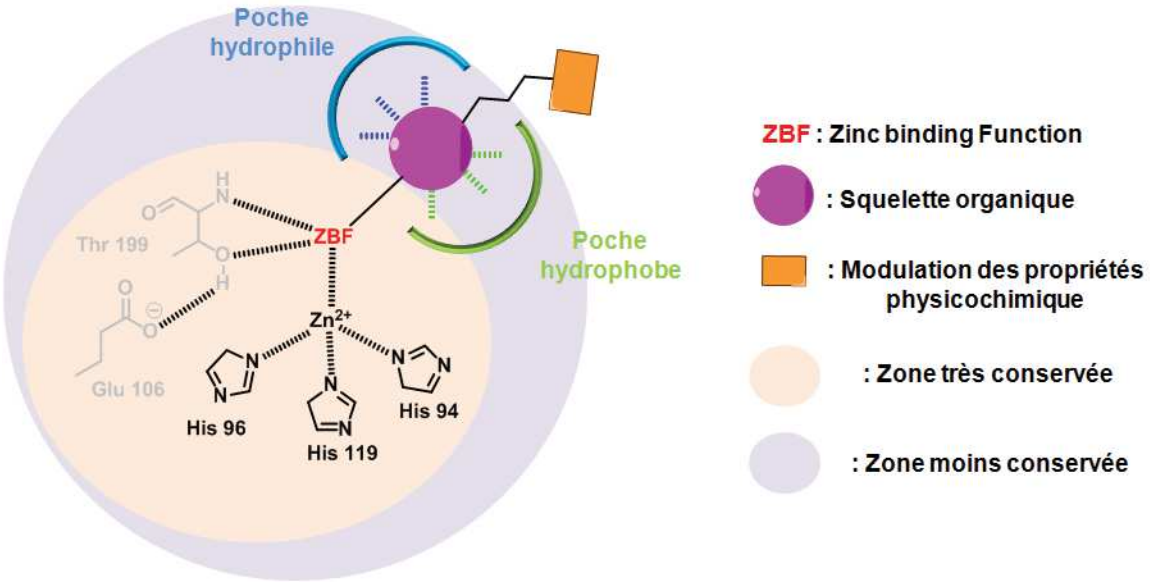


Figure 32 : Stratégie pour la conception d'inhibiteurs plus sélectifs des différentes isoformes de la CA.

La structure d'un inhibiteur modèle peut être divisée en trois parties. La première comporte la fonction qui se lie à l'atome de zinc (ZBF : Zinc Binding Function) et qui va aussi interagir avec le résidu aminé Thr 199 voisine du site actif de l'enzyme. Le choix de cette fonction est important puisque la coordination avec le métal conduit à l'inhibition de l'enzyme et apporte une énergie de liaison significative *via* des interactions supplémentaires avec les résidus aminés du site actif de l'enzyme. La modification de la nature de la fonction liant l'atome de zinc a fait l'objet de plusieurs études. Parmi elles, l'utilisation des bioisostères du sulfonamide comme les sulfamides ($NHSO_2NH_2$) et les sulfamates (OSO_2NH_2), a permis d'obtenir des résultats intéressants. En effet, la substitution du carbone du sulfonamide par un atome d'azote ou d'oxygène conduit à des modes de liaisons différents au sein du site actif. Ces atomes sont capables, en comparaison avec l'atome de carbone, de participer à des liaisons hydrogènes ce qui permet d'augmenter la stabilité et l'affinité de l'inhibiteur à l'intérieur du site actif (Figure 33).

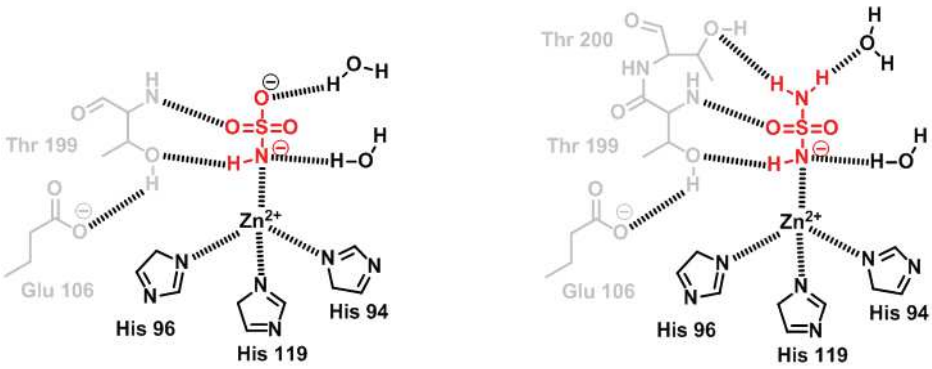


Figure 33 : Coordination des fonctions sulfamate et sulfamide dans le site actif de la CA.

La seconde partie de l'inhibiteur est composée d'un squelette organique qui peut être de différente nature et permet des interactions par liaisons hydrogènes avec les résidus d'acides aminés situés dans la poche hydrophile et hydrophobe du site actif. Les premiers inhibiteurs qui ont démontré de grosse affinité avec les CAs et qui ont été largement développé, sont de nature aromatique ou hétérocyclique. Cependant, des squelettes organiques de nature aliphatique ont été aussi utilisés. Winum et *coll*. ont développé, sur deux projets, des séries d'inhibiteurs sulfamate[141] et bis-sulfamate[142] aliphatique. Ces types de composés peuvent être très affins pour la CA avec des constantes d'inhibition atteignant le nanomolaire. De plus, la longueur de la chaine peut moduler la sélectivité envers un des isoformes.

Enfin la dernière partie permet d'utiliser certains motifs afin d'améliorer les propriétés physicochimique de l'inhibiteur. Par exemple, l'utilisation de dérivés cationiques tels que des sels de pyridiniums[143] ou bien l'utilisation de sucre[144], rend plus difficile le passage de la membrane cellulaire aux inhibiteurs. Grâce à cette approche, il est possible de moduler la sélectivité des inhibiteurs vers les isoformes transmembranaires.

Pour conclure, un grand nombre de molécules ont pu être synthétisées autour de cette stratégie. Néanmoins, il reste à ce jour très difficile de développer un composé actif avec une très forte sélectivité sur l'une des isoformes de la CA. D'autres stratégies ont été employées pour essayer de répondre à cette problématique. Ainsi, l'une d'entre elle a permis de mettre en évidence des structures de types polyamines[127], dithiocarbamates[145] ou coumarines capables d'inhiber efficacement la CA avec des sélectivités intéressantes.

III. Coumarines, nouvelle classe d'inhibiteurs

D'autres structures se comportant comme des inhibiteurs de l'anhydrase carbonique et ne présentant pas de fonction se liant à l'atome de zinc (ZBF) ont été étudiées. En 2008, Vu et *coll.* ont identifié un produit naturel faisant partie de la classe des coumarines comme inhibiteur potentiel de la CA en testant un grand nombre d'extrait de produits naturelles sur la β-CA.[146] Le résultat de cette étude a suscité un grand intérêt puisque les coumarines ont une structure chimique complètement différente de tous les autres inhibiteurs de la CA. En effet, n'ayant pas de fonction capable se lier à l'atome de zinc l'inhibition de ce type de composé peut être, à première vue, surprenante. En 2009, Supuran et *coll.* mettent évidence le mécanisme d'inhibition des coumarines en les co-cristallisants avec l'isoforme *h*CA II.[147,148] Ce ne sont pas les coumarines qui sont observées lors de l'analyse mais leurs produits d'hydrolyse. L'hypothèse est que l'anion hydroxyle lié au zinc, responsables de diverses activités (effet estérasique de la CA), viendrait hydrolyser la lactone conduisant à l'ouverture du cycle. Le produit d'hydrolyse est stabilisé par des interactions hydrophobes et polaires à l'entrée de la cavité du site actif bloquant ainsi l'activité catalytique de l'enzyme (Figure 34).

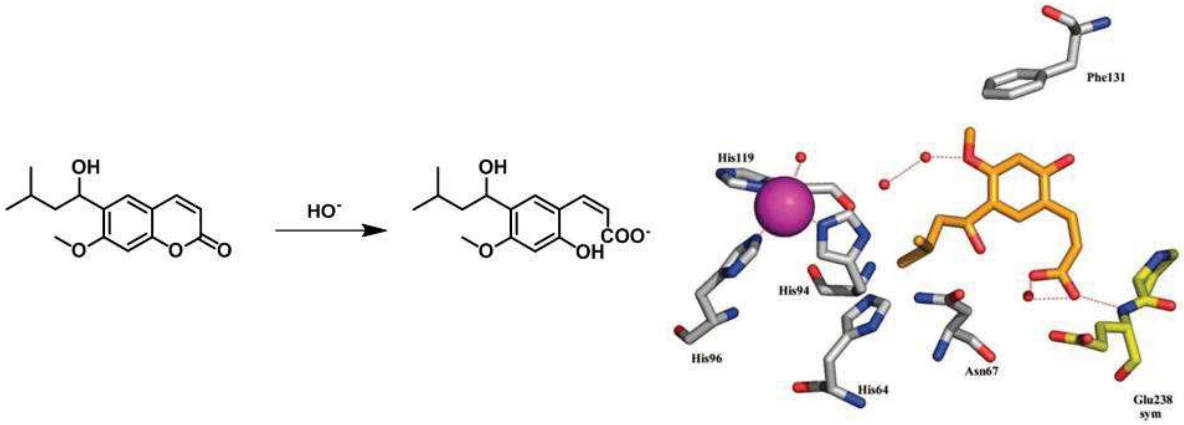


Figure 34 : Hydrolyse de la 6-(1*S*-hydroxy-3-méthylbutyl)-7-méthoxy-2H-chromen-2-one par la CA.

Ces données ont montré que les coumarines constituent une classe d'inhibiteurs totalement nouvelle avec un nouveau mécanisme d'inhibition.

Le mode de liaison inhabituel à l'entrée de la cavité du site actif, qui est la région la moins conservée parmi les différentes isoformes de la CA, offre la possibilité de concevoir des inhibiteurs avec une sélectivité améliorée par rapport aux inhibiteurs déjà existants. Plusieurs études ont mis en évidence un nombre assez important de dérivés de coumarine possédant une sélectivité envers les isoformes de la CA parmi lesquelles les thiocoumarines, 2-thioxo-coumarines, coumarines oximes, les sulfocoumarines et les lactones (Figure 35).[134,149,150]

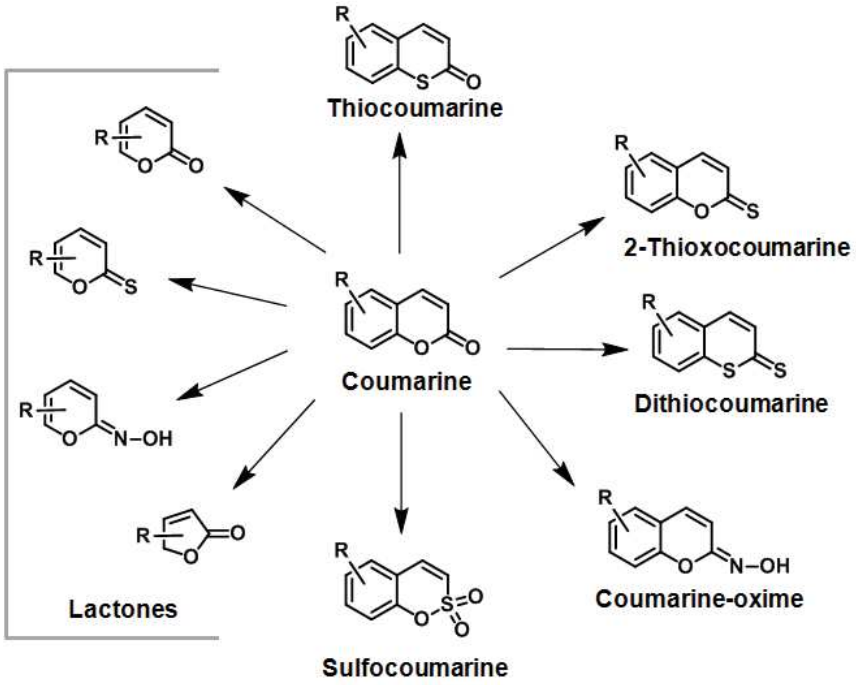


Figure 35 : Différents dérivés de la coumarine inhibiteurs de la CA.

Les divers dérivés de la coumarine peuvent influencer, de part leur structure, la sélectivité envers les différentes isoformes de la CA. Mais lors de différents travaux, il a été montré que la position des substituants qui composent la coumarine joue aussi un rôle pour la modulation de la sélectivité. En 2010, Supuran et *coll* synthétisent des coumarines substituées en position 7 et 8 permettant d'obtenir une sélectivité accrue sur les isoformes liées à la membrane CA IX et CA XII sans influencer de manière significative l'activité de l'isoforme CA II qui est le plus répandu.[151]

De la même manière, les sulfocoumarines ont récemment fait l'objet d'études et ont permis d'avoir des résultats très intéressants.[128] En effet, selon la position du substituant en position 6 ou 7 la sélectivité envers les différentes isoformes de la CA a pu être modulée. Ainsi, des sulfocoumarines substituées par un groupement triazole en position 6 ont permis d'inhiber sélectivement les isoformes membranaires CA IX et CA XII.[152] *A contrario*, en 2014 des sulfocoumarines substituées en position 7 ont montré une forte affinité et sélectivité envers l'isoforme CA II.[153]

Enfin la nature du substituant joue aussi un rôle prépondérant pour moduler la sélectivité. Par exemple, en 2011, une coumarine substituée par un sucre a montré d'excellents effets antitumoraux et antimétastatiques sur un modèle animal du cancer du sein et qui est à ce jour étudié en préclinique.[154]

IV. Stratégie

L'objectif de ces travaux consiste à synthétiser des inhibiteurs de la CA et à les fonctionnaliser de tel sorte à pouvoir les lier par bionconjugation de type chimie "click" aux différents systèmes multivalents qui seront préparées par la suite. Ici, le but n'est pas de développer de nouveaux types d'inhibiteurs capables d'inhiber la CA mais bien de partir sur des inhibiteurs modèles déjà bien connus. Ainsi deux classes d'inhibiteurs modèles ont été choisies. La première classe d'inhibiteurs sont des dérivés de sulfonamide bien connus pour avoir une grande affinité pour les CAs. La seconde classe d'inhibiteurs regroupe les dérivés de la coumarine qui ont montré plus de sélectivité envers les différentes isoformes de la CA.

Ces inhibiteurs ont été fonctionnalisés avec des motifs oxyamine et hydrazide afin de permettre de les greffer plus tard sur les systèmes multivalents en formant des liaisons oxime ou (acyl)hydrazone. Ces deux fonctions ont été choisies puisqu'elles sont en général plus simples à introduire que d'autres. Mais surtout, elles ont pour avantage d'être chimiosélectives, n'utilisent pas de métaux, d'être réalisables en milieux aqueux et ne génèrent que de l'eau comme sous produit lors de la formation des liaisons correspondantes, oxime et (acyl)hydrazone, avec des aldéhydes.

V. Synthèse de dérivés sulfonamides inhibiteurs de la CA

V.1 Synthèse de sulfonamides aromatiques en série hydrazide et oxyamine

Le motif benzosulfonamide a été très largement utilisé dans le développement d'inhibiteurs pour la CA. Ainsi, on recense de nombreuses molécules construites à partir de ce motif. Malgré cela, une seule portant une fonction hydrazide a pu être identifiée dans la littérature.[155] De plus, le benzosulfonamide portant la fonction hydrazide en *para* du sulfonamide n'a jamais fait l'œuvre de ligation permettant de former la liaison (acyl)hydrazone. Partant de ce constat, une série d'inhibiteur aromatique a été synthétisée (Figure 36).

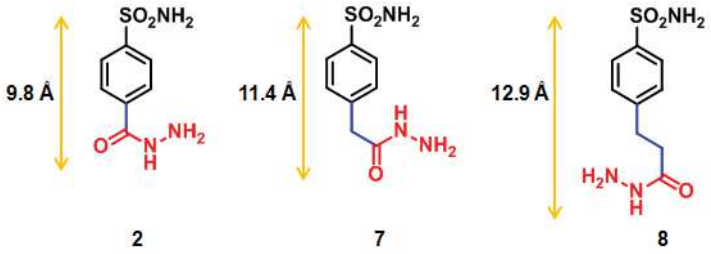


Figure 36 : Inhibiteurs de type benzosulfonamide en série hydrazide.

Ces analogues ne différent que part le nombre de carbone (0, 1 ou 2) situé entre le cycle aromatique et la fonction hydrazide. Le choix de faire varier la longueur de cette chaine n'est pas anodin. En effet, comme dit précédemment des changements minimes sur un inhibiteur peuvent moduler l'affinité pour l'enzyme. Ainsi, l'augmentation de la chaine peut potentiellement permettre à la fonction hydrazide de créer des liaisons hydrogènes avec les poches hydrophile et hydrophobe proches du site actif de la CA qui est situé à 15 Å de profondeur. Enfin, augmenter la longueur de la chaine peut éventuellement permettre d'éviter l'encombrement stérique lors de l'inhibition enzymatique par ces inhibiteurs greffés sur des systèmes multivalent.

L'inhibiteur 2 a été synthétisé selon la voie de synthèse proposé par Tavares et *coll.*[156] Cette synthèse se fait en deux étapes à partir de l'acide 4-sulfamoylbenzoique (Schéma 4).

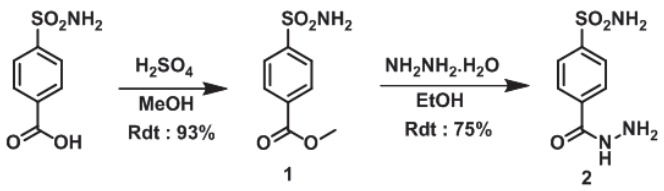


Schéma 4 : Synthèse de l'inhibiteur benzosulfonamide hydrazide **2**.

Le composé **1** est obtenu par une estérification de Fischer au cours de laquelle l'acide carboxylique est mis en solution dans du méthanol et en présence d'acide sulfurique. Après

évaporation du solvant, le solide obtenu est trituré dans l'éther diéthylique (Et_2O) puis filtré pour obtenir l'intermédiaire **1** avec un rendement de 93%. La dernière étape permet d'introduire la fonction hydrazide en faisant réagir l'ester **1** avec l'hydrazine. Les conditions employées par Tavares et *coll*.[156] ont été optimisées et permettent d'isoler plus facilement le composé **2**. En effet, l'utilisation de l'hydrazine en large excès (33 équivalent) à la fois en tant que réactif et solvant rend le composé final plus difficile à isoler. Ainsi, l'ester en solution dans le méthanol est mis à réagir avec seulement 1,1 équivalent d'hydrazine monohydrate. Après 7 heures à reflux du méthanol, le composé **2** précipite à température ambiante. Il est alors filtré puis recristallisé dans de l'éthanol. Le benzosulfonamide **2** est isolé avec un rendement de 75% sous forme de fines aiguilles.

Les composés **7** et **8** avec respectivement un et deux carbones entre le cycle aromatique et la fonction hydrazide ont été préparés selon le schéma réactionnel suivant (Schéma 5).

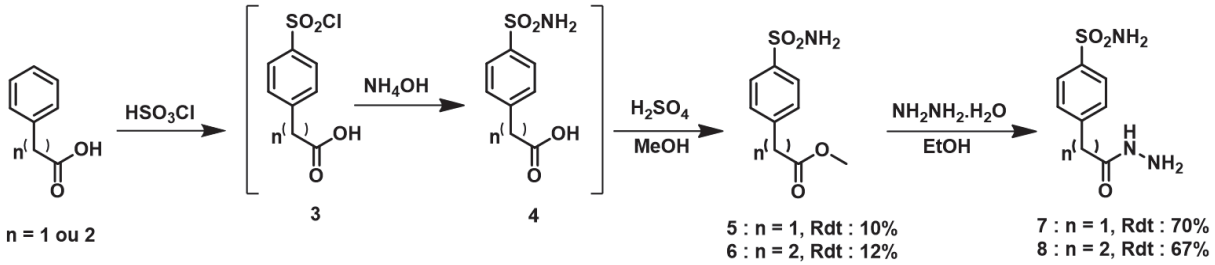


Schéma 5 : Synthèse des inhibiteurs benzosulfonamides hydrazides **7** et **8**.

La première étape consiste à introduire la fonction sulfonamide en *para* sur les acides benzoïques correspondants. Plusieurs stratégies peuvent être envisagées afin d'introduire cette fonction.[157] Celle qui a été retenue pour la synthèse des deux composés permet la sulfonylation direct du cycle aromatique en passant par l'intermédiaire chlorure de sulfonyle **3** qui est ensuite converti en sulfonamide afin d'obtenir le composé sulfonamide **4**. Pour cela, l'acide phénylacétique et l'acide phénylpropionique sont mis en solution dans l'acide chlorosulfonique à 0°C pendant 3 heures. Par la suite, le milieu réactionnel est déversé dans de la glace formant un précipité blanc. Après analyse par RMN du proton, le solide obtenu s'est révélé être un mélange de produit de départ et du chlorure de sulfonyle formé en très faible quantité. La faible conversion peut être expliquée par la faible réactivité des acides carboxyliques utilisés au départ qui ne sont pas activés pour subir une substitution électrophile. Cependant, la réaction à quand même pu être optimisée en se basant sur les travaux de Huntress et Carten.[158] Ainsi, l'ajout des différents dérivés aromatiques se fait part ajout de petites portions sur un temps relativement long : 30min à 0°C. Après solubilisation totale dans l'acide chlorosulfonique, le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante pendant 3 heures. Malgré cela, la conversion n'est pas encore totale. Une optimisation de la réaction peut être envisagée en faisant varier la température. Aucun

rendement de l'intermédiaire formé n'a pu être calculé car celui-ci est très réactif et doit être engagé directement dans l'étape suivante.

Cette étape se fait en solubilisant l'intermédiaire **3** précédemment obtenu dans de l'ammoniaque (NH_4OH). Très peu soluble à température ambiante, le milieu réactionnel est chauffé à 60°C pendant une nuit pour avoir la conversion totale de l'intermédiaire chlorure de sulfonyle en sulfonamide. Cette conversion est suivie par CCM et avant d'arriver à ces conditions expérimentales plusieurs tests à différentes températures ont été réalisés. D'autres essais moins concluants ont également été conduits en utilisant l'ammoniac en solution dans le dioxane (Tableau 4).

Réactif	Température	Conversion
NH_4OH	25°C	Non totale
	60°C	Totale
	90°C	Dégradation
NH_3 dans dioxane	25°C	Non totale
	60°C	Non totale
	90°C	Non totale

Tableau 4 : Influence de la température et du réactif sur la conversion du chlorure de sulfonyle en sulfonamide.

Une fois que la conversion est totale, de l'acide chlorhydrique (HCl 2N) est ajouté au milieu jusqu'à atteindre une valeur du pH égale à 2 afin de protoner à nouveau la fonction acide. Le composé **4** formé étant trop polaire, il n'a pu être purifié sur colonne de silice. De plus, afin d'éliminer le maximum de sels formés lors de la première et de la deuxième étape des extractions avec différents solvants ont été fait. Le solvant organique ayant donné les meilleurs résultats est l'acétate d'éthyle. Malgré les gros volumes utilisés seule une petite quantité du sulfonamide a pu être extraite. Le milieu réactionnel a alors été concentré et engagé directement vers l'étape d'estérification.

L'estérification se fait en solution dans le méthanol à reflux et en présence d'acide sulfurique. Après 3 heures de réaction, le méthanol est évaporé et le résidu obtenu est trituré, rincé à l'éther diéthylique puis filtré. Ainsi les composés **5** et **6** sont obtenus purs sous forme de solides avec respectivement des rendements globales 10 et 12% sur les trois étapes.

Enfin, l'introduction de la fonction hydrazide se fait en suivant les mêmes conditions opératoires que pour l'inhibiteur **2** et permet d'obtenir les inhibiteurs **7** et **8** avec des rendements de 70% et 67%.

Trois inhibiteurs de type benzosulfonamide en série hydrazide ont pu être synthétisés. Cependant, il a été constaté qu'il était difficile d'introduire une fonction sulfonamide sur un cycle aromatique non activé ce qui a conduit à des rendements globaux de synthèse très faible.

Un inhibiteur du même type en série oxyamine a été synthétisé. Afin de ne pas rencontrer les mêmes problèmes que pour les précédents inhibiteurs, la stratégie a été de partir d'un benzosulfonamide commercial. Ainsi, à partir du 4-aminoethylbenzosulfonamide et en deux étapes l'inhibiteur oxyamine **10** a pu être synthétisé (Schéma 6).

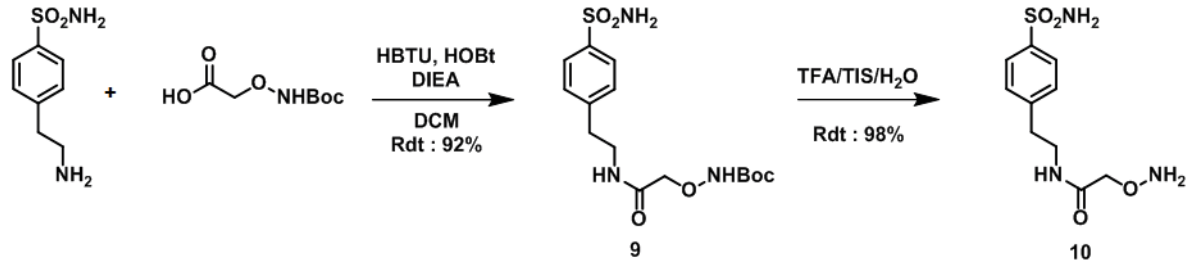


Schéma 6 : Synthèse de l'inhibiteur benzosulfonamide oxyamine **10**.

Pour cela, la fonction oxyamine est introduite sous forme protégée par un *tert*-butyloxycarbonyle (Boc) en couplant l'amine du benzosulfonamide avec l'acide (Boc-aminooxy) acétique. Cette réaction se fait en solution dans le dichlorométhane et en présence d'un agent de couplage : le HBTU. A la fin de la réaction, l'intermédiaire **9** est isolé avec un rendement de 69% après lavage à l'acide chlorhydrique (HCl 1N), puis avec une solution saturée de carbonate de sodium (Na_2CO_3). La dernière étape permet de déprotéger la fonction oxyamine et se fait dans une solution d'acide trifluoroacétique (TFA), d'eau et de triisopropylsilane (TIS) (95/2.5/2.5). Après 3 heures à température ambiante, le milieu réactionnel est concentré puis précipité dans de l'Et_2O à froid. Enfin, après filtration le composé **10** est isolé avec un rendement de 97% sous forme de solide.

V.2 Synthèse de sulfonamide aliphatique en série oxyamine

Dans cette partie la première approche a été de synthétiser un inhibiteur de type sulfamate aliphatique en série oxyamine logiquement inspiré par les précédents travaux effectués au sein du laboratoire par Winum et *coll.*[142] Ainsi, l'inhibiteur **13** a été pensé sans voir le jour suite a des problèmes rencontrés lors de la dernière étape de synthèse (Schéma 7).

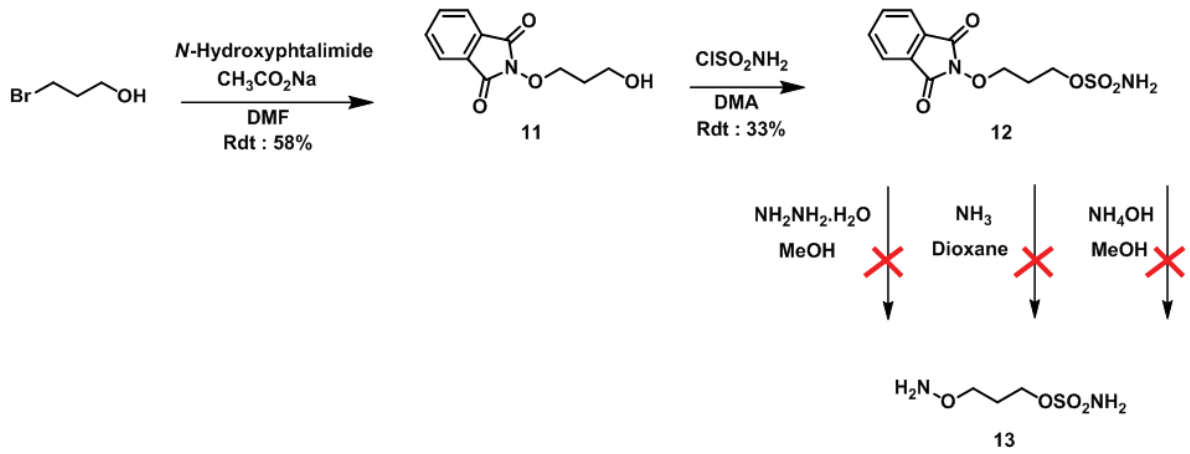


Schéma 7 : Synthèse de l'inhibiteur sulfamate aliphatique oxyamine **13**.

La première étape consiste à *O*-alkyler le *N*-hydroxyphtalimide avec le bromopropanol. Cette réaction est faite en solution dans la DMF en présence d'acétate de sodium.[159] Après passage sur colonne de silice, l'alcool **11** est isolé avec un rendement de 58%. La fonction sulfamate est introduite en faisant réagir l'alcool **11** précédemment obtenu avec le chlorure de sulfamoyle. Le chlorure de sulfamoyle est préalablement préparé à partir de l'isocyanate de chlorosulfonyle et de l'acide formique.[160] Le sulfamate **12** est isolé avec un rendement de 33% après purification sur colonne de silice. Enfin, la dernière étape a pour but de démasquer la fonction oxyamine en faisant réagir le motif phtalimide avec une amine primaire. Le réactif le plus utilisé pour ce type de déprotection est l'hydrazine. Cependant, le produit formé suite à cette réaction n'est pas le sulfamate **13** attendu. En effet, les analyses par RMN du proton ne montrent pas le signal des hydrogènes de l'amine (NH_2) de la fonction sulfamate qui devrait être à 7,3 ppm. Celle-ci a pu potentiellement être substituée par l'hydrazine qui est un bon nucléophile. Malgré les différents essais effectués avec des variations de températures mais aussi en choisissant d'autres réactifs permettant la déprotection, tel que l'ammoniaque, les résultats n'ont malheureusement pas été concluants.

Force est de constater qu'il est impossible de conserver la fonction sulfamate, qui est un bon nucléofuge, lors de la déprotection du motif phtalimide, un nouvel analogue a alors été envisagé. Pour cela, le choix s'est tourné vers la synthèse d'un inhibiteur quasiment identique portant une fonction sulfonamide qui est beaucoup plus stable que la fonction sulfamate (Schéma 8).

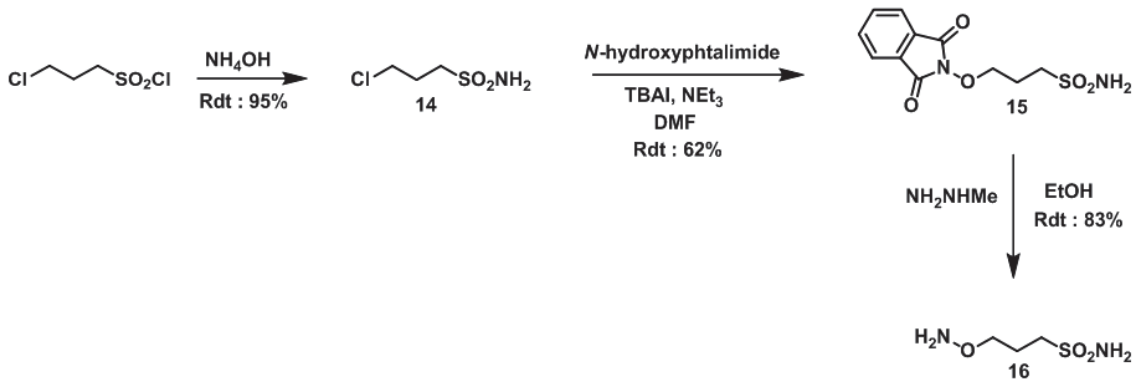


Schéma 8 : Synthèse de l'inhibiteur sulfonamide aliphatique oxyamine **16**.

La synthèse de l'inhibiteur oxyamine **16** se fait en trois étapes suivant le schéma réactionnel 8. En partant du chlorure de 3-chloropropylsulfonyle commercial, la première étape a pour but de former le sulfonamide correspondant **14**. Pour cela le produit de départ est solubilisé dans du dichlorométhane (DCM) à 0°C en présence d'ammoniaque.[161] Après 3 heures de réaction les solvants sont évaporés. Le solide obtenu est trituré, filtré et rincé au DCM. Le filtrat est récupéré et évaporé afin d'obtenir le composé **14** sous forme d'huile incolore avec un rendement de 95%. L'introduction de la fonction oxyamine se fait par substitution du chlore du composé **14** par le *N*-hydroxyphtalimide. Dans un premier temps, la réaction s'est faite en solution dans la DMF en présence de triéthylamine. Même à reflux, la cinétique de la réaction est très lente (48 heures). L'ajout de l'iodure de tétrabutylammonium (TBAI) permet d'accélérer la réaction. Le milieu réactionnel est ensuite filtré. Le filtrat est récupéré, concentré et lavé deux fois avec une solution saturée de $NaHCO_3$. Après évaporation du solvant, le composé **15** est isolé après recristallisation dans l'éthanol avec un rendement de 62%. Enfin, l'inhibiteur oxyamine **16** est obtenu après avoir fait réagir la méthylhydrazine sur le composé **15**. Après purification sur colonne de silice l'inhibiteur **16** est isolé avec un rendement de 83%.

VI. Synthèse de dérivés coumarines inhibiteurs de la CA

VI.1 Synthèse de coumarine en série hydrazide

Comme détaillé précédemment, les coumarines peuvent être des inhibiteurs puissants et sélectifs des isoformes de la CA. La sélectivité de ces inhibiteurs va dépendre des différents substituant qui composent la coumarine sur les positions 4, 6 et 7. A ce jour, aucun dérivé de la coumarine portant un groupement hydrazide n'a été recensé dans la littérature. Par conséquent, la synthèse d'une série de coumarine substituée ou non en position 4 par un méthyle et en position 6 ou 7 par une fonction hydrazide a été envisagée.
L'introduction de la fonction hydrazide nécessite la présence d'un acide carboxylique sur la coumarine. Malheureusement aucun n'est commercial, c'est pourquoi il a été nécessaire de synthétiser au préalable les coumarines **17a**, **17b**, **18a**, et **18b** (Schéma 9).

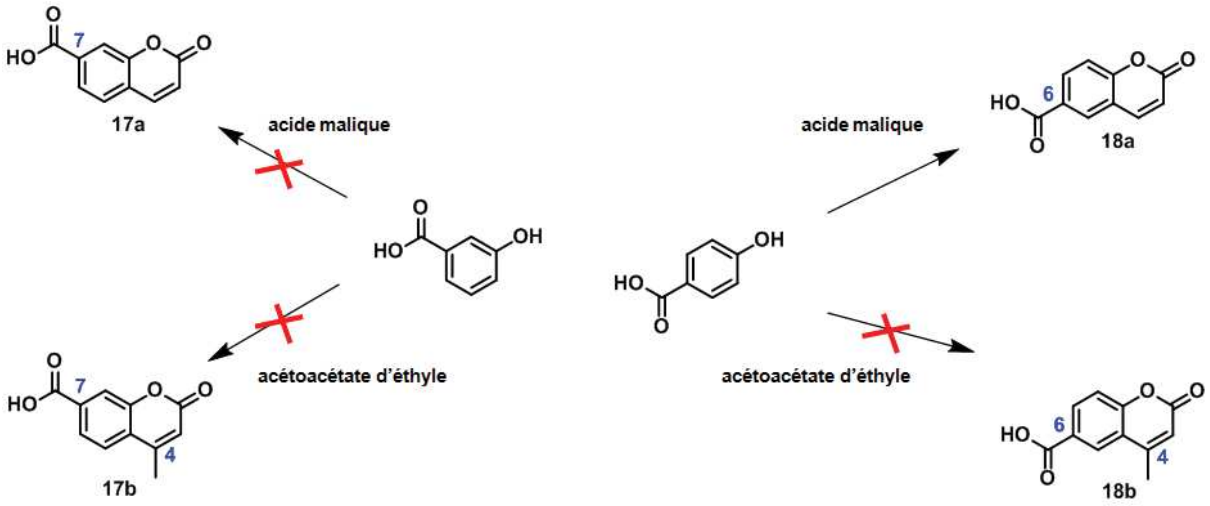


Schéma 9 : Synthèse des inhibiteurs coumarines **17a**, **17b**, **18a**, et **18b**.

La condensation de Pechmann décrite en 1883 permet la formation de coumarine qui résulte de la réaction entre un phénol et un acide carboxylique ou un ester.[162] Cette réaction est effectuée en présence d'un acide organique fort ou d'un acide de Lewis.

Ici, les phénols **17** et **18** respectivement substitués par un acide carboxylique en position *meta* ou *para* ont été mis en réaction avec l'acide malique ou l'acétoacétate d'éthyle afin d'obtenir les coumarines correspondantes méthylées ou non en position 4. Ces réactions sont faites dans de l'acide sulfurique. Différents essais faisant varier la température ont été faits et seul le composé **18a** a pu être isolé à une température de 70°C avec un rendement de 29%. La formation des autres composés n'a pu être observée malgré des températures élevées allant jusqu' à 220°C. La difficulté à former ces coumarines peut s'expliquer par la présence de l'acide carboxylique qui désactive fortement le cycle aromatique empêchant la condensation de se faire. D'autres conditions de réaction peuvent être envisagées avec l'utilisation des micro-ondes qui permettront d'atteindre des températures et des pressions beaucoup plus élevées ce qui peut potentiellement forcer la condensation. Par manque de temps les composés **17a**, **17b**, et **18b** ont été abandonnés et seul le composé **18a** a été utilisé pour la suite.

La première approche pour l'introduction de la fonction hydrazide a été de passer par l'ester afin de le substituer par l'hydrazine (Schéma 10). L'estérification de la coumarine **18a** est faite en solution dans du méthanol et en présence d'acide sulfurique. Après 3 heures de réaction à reflux l'intermédiaire **19** est isolé avec un rendement de 62% par simple trituration dans l'Et_2O. Par la suite, la substitution de l'ester est faite en solution dans le méthanol en présence d'un équivalent d'hydrazine à température ambiante. La formation du composé **21** est bien observé cependant il y a aussi une forte dégradation du produit de départ avec la formation de plusieurs sous-produits. En effet, l'hydrazine qui est un bon nucléophile peut potentiellement attaquer la coumarine et ouvrir ainsi la lactone.

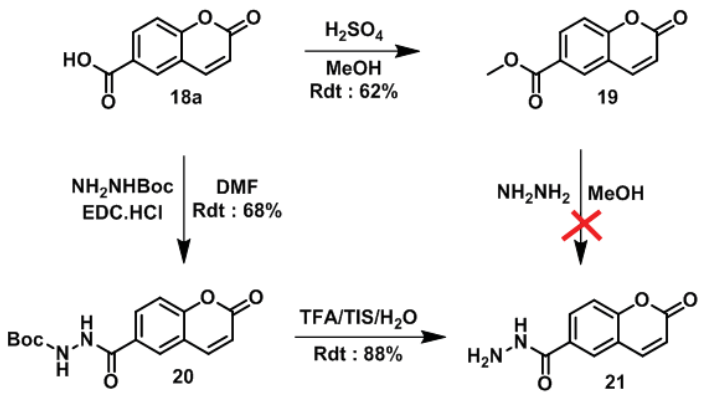


Schéma 10 : Synthèse de l'inhibiteur coumarine hydrazide **18a**.

Une nouvelle stratégie de synthèse a été pensée afin de pallier au problème rencontré précédemment. Pour cela, l'acide **18a** est couplé à l'amine libre du *tert*-butyl carbazate *via* la formation d'une liaison amide. Cette réaction est possible en présence d'un agent de couplage, ici le chlorhydrate de *N*-(3-diméthylaminopropyl)-*N*'-ethylcarbodiimide (EDC.HCl), qui permet de former l'hydrazide protégé **20**. Enfin, la protection *tert*-butoxy carbonyle (Boc) est éliminée en solution acide, permettant d'isoler le composé hydrazide **21** avec un rendement de 88% après précipitation dans l'éther diéthylique.

VI.2 Synthèse de coumarine en série oxyamine

Dans cette partie, deux inhibiteurs coumarine et sulfocoumarine ont été synthétisés en série oxyamine (Schéma 11). Pour cela, la synthèse s'est inspirée des travaux de Reymond et *coll*. qui ont synthétisés la coumarine **23**.[163] A partir des phénols correspondant, l'*O*-amination direct est possible en utilisant l'*O*-(mesitylènesulfonyl)-hydroxylamine. L'amination des composés **23** et **24** a été réalisées en formant préalablement les phénolates en solution dans du méthanol et en présence de *tert*-butanolate de potassium. En parallèle, le composé **22** hautement réactif est fraichement préparé à partir d'un clivage acide de l'hydroxamate.[164] Par la suite, il est directement mis à réagir avec les phénolates de potassium à 0°C dans du DMF. Les oxyamines **23** et **24** ont été facilement isolées par simple lavage basique qui permet d'éliminer les alcools n'ayant pas réagi.

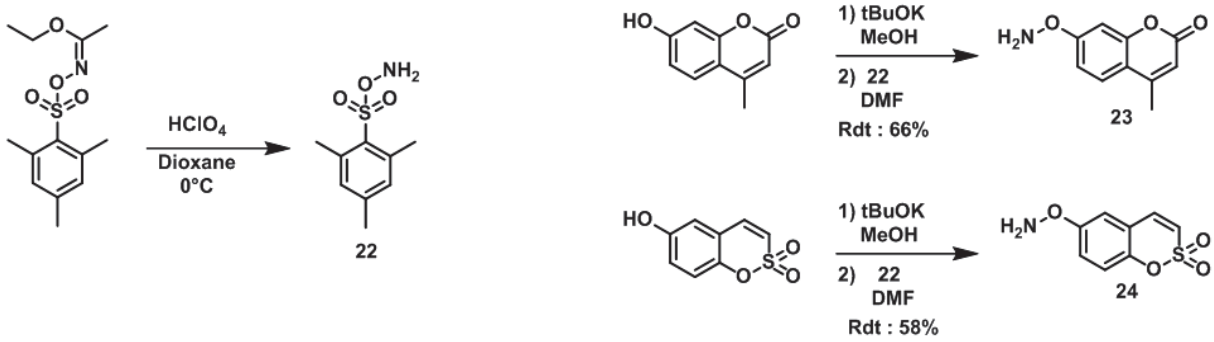


Schéma 11 : Synthèse des inhibiteurs coumarine **23** et sulfocoumarine **24** en série oxyamine.

VII. Conclusion

Dans ce chapitre, 8 inhibiteurs de l'anhydrase carbonique ont été synthétisés et fonctionnalisés avec des fonctions oxyamine ou hydrazide de telle sorte à pouvoir par la suite les greffer à des systèmes multivalents par ligation (Figure 37). Deux types d'inhibiteurs intéressants, du point de vue de leurs mécanismes d'inhibition ont été choisis. Ainsi, 5 inhibiteurs portant une fonction sulfonamide, connue pour inhiber efficacement les différentes isoformes de la CA avec un mécanisme de coordination de l'ion métallique Zn^{2+}, ont été synthétisés. De plus, 3 inhibiteurs de type coumarine, connue pour leur sélectivité lors de l'inhibition avec un mécanisme, dit d'occlusion, ont été formés.

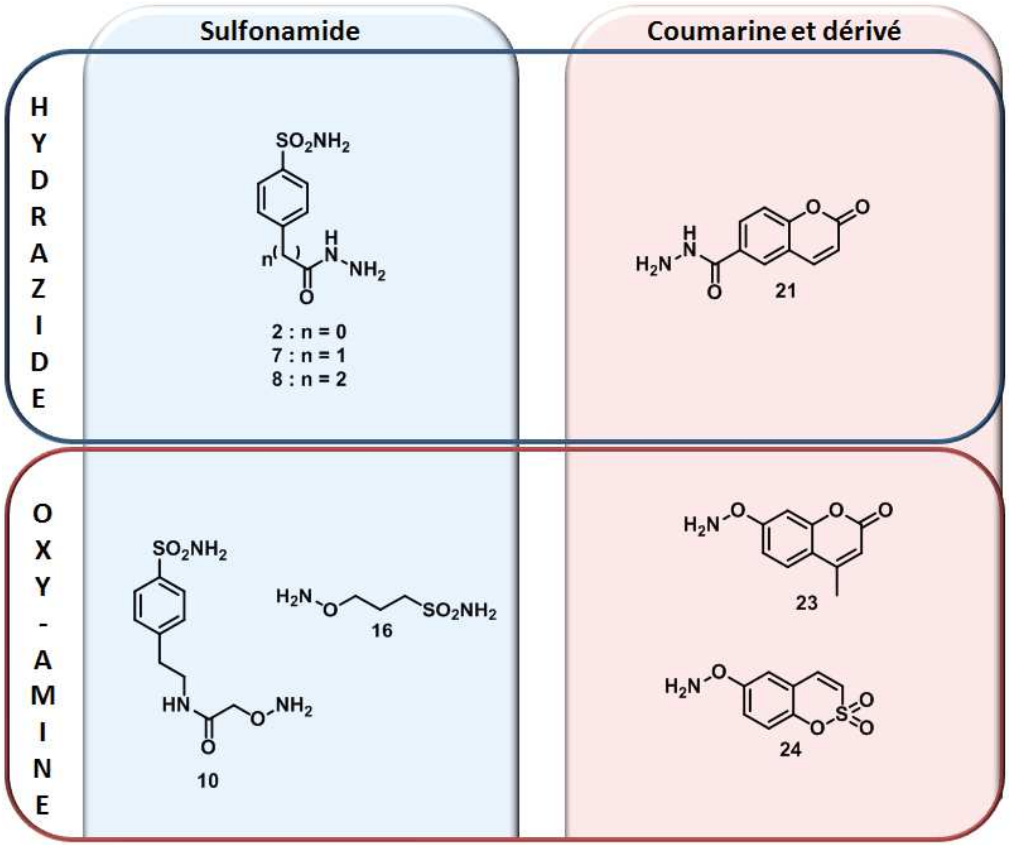


Figure 37 : Récapitulatif des inhibiteurs synthétisés en série oxyamine et hydrazide.

Chapitre III : Synthèses d'inhibiteurs multivalents des anhydrases carboniques basés sur des systèmes peptidiques.

I. Introduction

La première approche à la conception d'inhibiteurs multivalents de l'anhydrase carbonique a été d'utiliser les peptides comme plateforme multivalente. Connus pour être généralement biocompatibles et hydrosolubles, les peptides permettent d'obtenir des structures diverses et variées par la simple succession d'assemblage d'acides aminés facilitée par la synthèse sur support solide. De plus, les chaines latérales des acides aminés qui composent le peptide peuvent être fonctionnalisées de telles manières à rendre possible la bioconjugaison des inhibiteurs. Ainsi, la modularité de ce genre de système permet d'avoir un contrôle sur la position et la valence des ligands.[165] L'orientation des inhibiteurs est également possible par le biais des peptides. En effet, le choix d'un peptide linéaire apportera de la flexibilité à la plateforme tandis que la cyclisation d'un peptide permettra de bloquer sa conformation, d'apporter une pré-organisation et d'offrir des propriétés structurales intéressantes (Figure 38).[166,167] La cyclisation de ces peptides est rendu possible par l'introduction de coude (généralement par des dipeptides *L*-Pro-Gly ou *L*-Pro-*D*-Pro mais aussi par des groupements hétéroaromatiques ou des dicétopiperazines) obligeant le peptide à adopter une structure secondaire, comme les feuillets β, et ainsi influencer l'orientation des chaines latérales des différents résidus.[53]

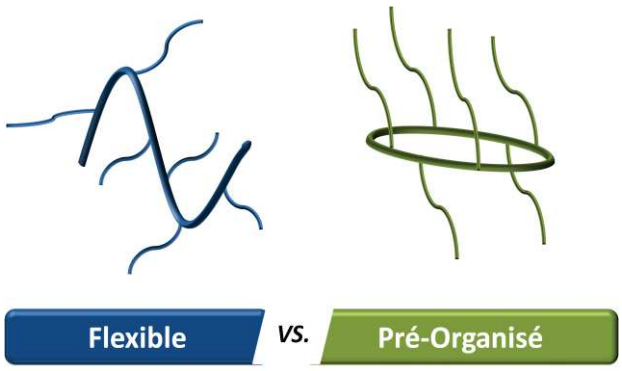


Figure 38 : Structure générale d'un peptide linéaire et d'un peptide cyclique.

Dans le cadre de l'inhibition enzymatique à l'aide de plateformes multivalentes, synthétiser les deux contreparties linéaire et cyclique, identiques en termes de composition, est très intéressant pour l'obtention d'informations sur l'interaction ligand-récepteur.

II. Le cyclopeptide RAFT

Le peptide choisit dans le cadre de ce projet est un décapeptide cyclique, appelé RAFT pour Regioselectively Adressable Fonctionalized Template, et permet de contrôler la position et l'orientation des motifs ajoutés (Figure 39). Ce RAFT a déjà été synthétisé au sein du laboratoire et a été développé par l'équipe du Pr. Mutter.[168,169]

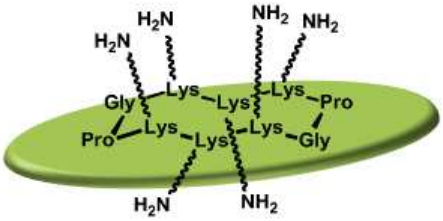


Figure 39 : Structure de la plateforme RAFT.

Composé de dix acides aminés, la cyclisation du peptide est rendu possible par l'enchainement des résidus Pro-Gly qui induit une contrainte de la conformation du squelette. De nombreuses analyses, tels que des études par RMN, des modélisations moléculaires dynamiques mais également la cristallographie, ont permis de mettre en évidence la configuration *trans* des liaisons peptidiques. Stabilisé par des liaisons hydrogènes intramoléculaires, le repliement du peptide se fait sous forme de feuillet β antiparallèle (Figure 40).[52,170,171] De ce fait, les chaines latérales des deux tri-peptides situées entre les deux coudes Pro-Gly se trouvent orientées de part et d'autre du plan moyen du cyclopeptide. Les chaines latérales des deux acides aminés centraux pointent vers une face du cycle tandis que les chaines des quatre autres acides aminés les plus à l'extérieur pointent vers l'autre face.

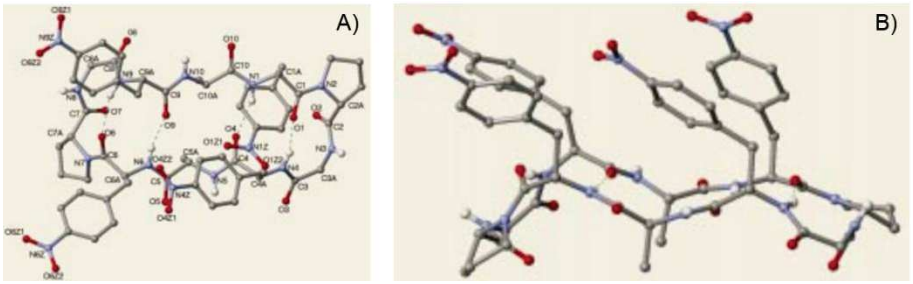


Figure 40 : Structure RX du cristal du RAFT cyclique stabilisé par quatre résidus *p*-nitrophénylalanine.

Enfin, l'utilisation d'acides aminés, tels que des Lysines, permet la fonctionnalisation mais aussi l'introduction de différents motifs sur les chaines latérales sans affecter la structure du peptide. Ainsi à l'aide de groupements protecteurs orthogonaux, une fonctionnalisation régiosélective de la plateforme est possible.[54]

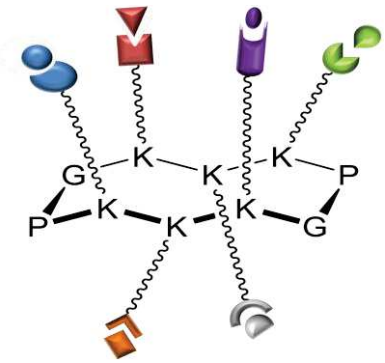


Figure 41 : Fonctionnalisation régiosélective du RAFT.

III. Travaux antérieurs

Une des premières approches à l'utilisation du cyclopeptide a été de tirer avantage de ces caractéristiques structurales afin de synthétiser des mimes de peptides ou des protéines de *novo*.[172–175] Plus tard, il sera utilisé comme plateforme multivalente capable d'accueillir plusieurs ligands, différents ou non, et avec une orientation spatiale bien définie.[20]

La reconnaissance moléculaire a été une des approches les plus convoités ces dernières années à partir du système peptidique cyclique. Des travaux ont été faits sur le ciblage d'intégrines qui sont surexprimées dans de nombreuses tumeurs.[176] Ainsi, en 2004 Dumy et *coll.* greffent par liaisons oxime, sur la plateforme peptidique, quatre motifs RGD capables de reconnaitre les récepteurs liés aux intégrines (Figure 42).[177,178] Il a été démontré que le composé tétravalent avait une affinité dix fois supérieure au composé monovalent. Les mécanismes d'interaction hypothétiques, responsables de cette augmentation de l'affinité ligand-récepteur, est sans doute dû à un effet de concentration locale de résidus RGD autour de la cible et/ou d'agrégation des récepteurs de l'intégrines sur la plateforme. La face inférieure du peptide a également fait l'objet d'une fonctionnalisation soit dans un cas, par un groupement cytotoxique pour faire de la thérapie, soit dans l'autre cas, par un fluorophore pour faire de l'imagerie.[179] Ce type de composé est un parfait candidat pour à la fois faire du ciblage, de l'imagerie et de la thérapie sur des cellules cancéreuses.

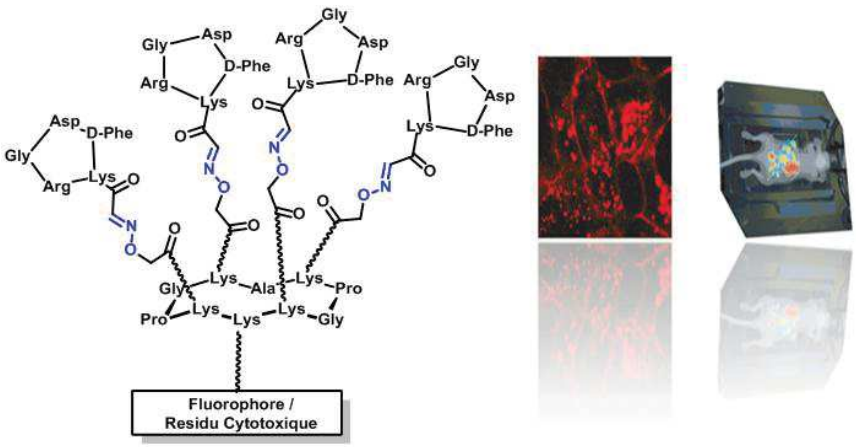


Figure 42 : RAFT fonctionnalisé par des motifs RGD pour la reconnaissance d'intégrines.

Dans le même concept, un cyclopeptide tétravalent arborant des motifs α-GalNAc a été synthétisé en 2011 par Delangle et *coll*. afin de pénétrer dans les hépatocytes *via* les récepteurs asialoglycoprotéines (Figure 43).[180] Cette plateforme substituée, par un fluorophore, permet de complexer le cuivre (I) par deux résidus de Cystéine incorporés dans la séquence du peptide. Une baisse de la concentration intracellulaire du Cu(I) a été mise en évidence.

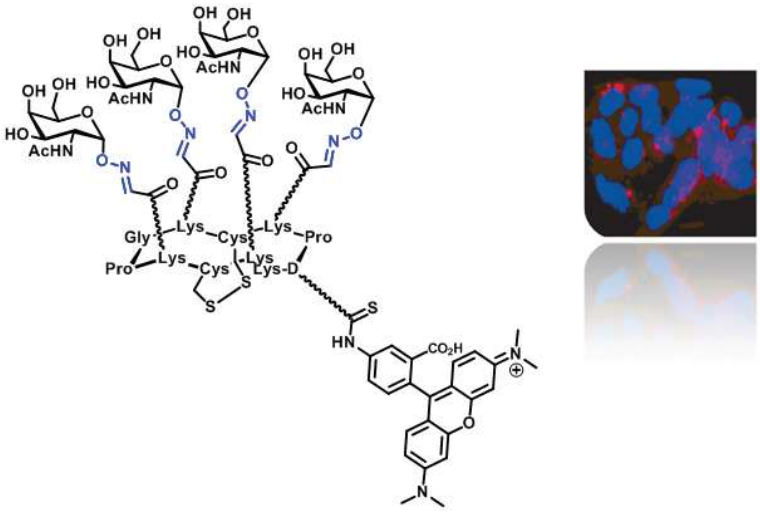


Figure 43 : RAFT fonctionnalisé par des motifs α-GalNAc pour l'internalisation dans les hépatocytes.

Les lectines ont également fait l'objet de travaux de recherches. Elles sont des cibles intéressantes puisqu'elles interviennent dans de nombreux processus biologiques, tel que la communication cellulaire, la reconnaissance hôte-pathogène ou encore les métastases cancéreuses mais aussi du fait qu'elles répondent efficacement aux systèmes multivalents. Plusieurs clusters tétravalents substitués de carbohydrates ont été synthétisés *via* la ligation oxime.[10,181,182] Grace à la pré-organisation et la multivalence apportée par la plateforme, une augmentation générale de l'affinité pour les lectines a été recensée par rapport aux carbohydrates seuls. Fort de ces travaux, des glycoclusters de seconde génération arborant

de 16 jusqu'à 84 motifs ont été synthétisés, en 2013 par Renaudet et *coll.*, à partir de l'assemblage de plusieurs cyclopeptides ou de dendrimères de Lysine (Figure 44).[183] Ainsi, de fortes activités inhibitrices ont pu être constatée sur différentes lectines tel que la *Canavalia ensiformis* (ConA), les galectines et sur les lectines des bactéries (LecB) *Pseudomonas aeruginosa*.[184–186]

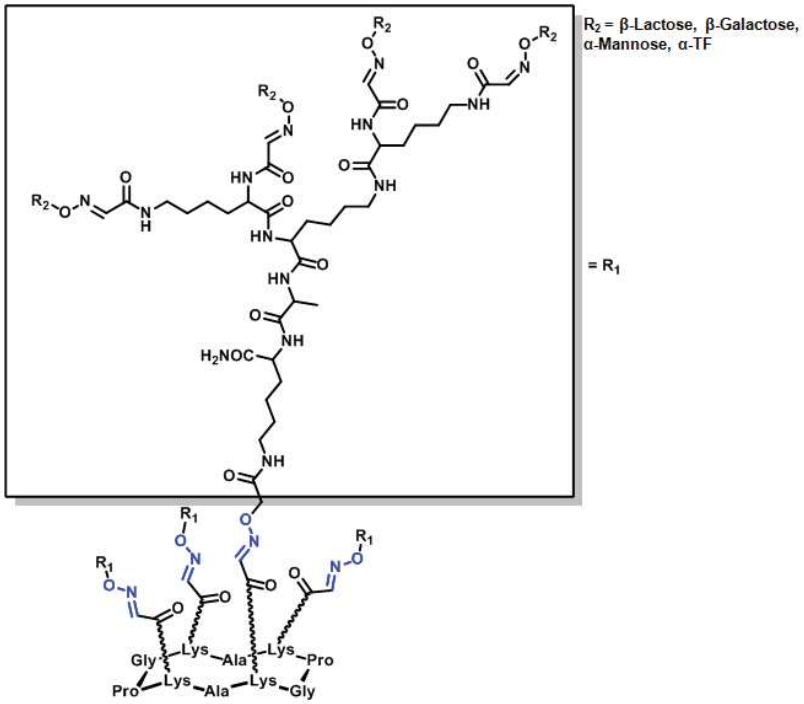


Figure 44 : Raft-dendrimère fonctionnalisé par 16 unités de sucres pour la reconnaissance de lectines.

Enfin, au sein du laboratoire, des résultats très intéressant ont été obtenus par des conjugués d'iminosucre sur l'inhibition d'une glycosidase : l'α-mannosidase de *Canavalia ensiformis*.[11] Quatre iminosucres ont été greffés par ligation oxime au peptide cyclique en faisant varier la taille des bras qui séparent la plateforme des inhibiteurs (Figure 45). Les contreparties linéaires du cyclopeptide ont également été testées. Dans les deux cas des effets multivalents positifs ont été observés. Cependant, les meilleurs résultats ont été obtenus à partir des plateformes linéaires. Cette conséquence est peut-être due à l'existence d'un autre site de liaison non catalytique sur l'α-mannosidase de *Canavalia ensiformis*. La flexibilité de la plateforme linéaire permet au ligand d'atteindre ce second site et donc d'augmenter l'affinité de la liaison ligand récepteur. Le cyclopeptide est, quant à lui, limité de par sa rigidité. Ces travaux confirment l'importance de la relation structure activité lors de l'utilisation de systèmes multivalents et restent, à ce jour, le seul exemple d'inhibition enzymatique effectué à partir du cyclopeptide.

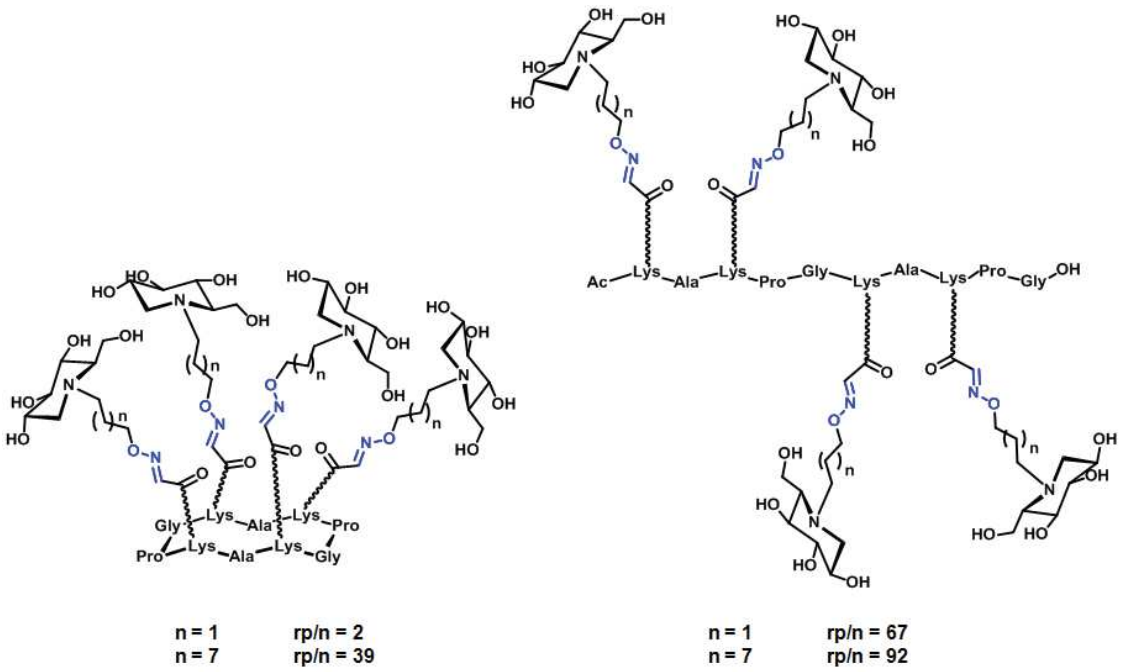


Figure 45 : Inhibiteurs tétravalents peptidique cyclique et linéaire de l'α-mannosidase de *Canavalia ensiformis*.

IV. Stratégie

Dans le cadre de ce projet, le RAFT cyclique est utilisé pour la synthèse d'inhibiteurs multivalents des anhydrases carboniques. Ce type de plateforme est intéressant pour plusieurs raisons. En effet, d'un point de vue de la multivalence cette structure peut être modulée pour apporter plusieurs sites potentiels de liaison avec différents motifs. Par le biais de ligations chimiosélectives la valence du composé formé peut être contrôlée et ainsi permettre de calculer les effets multivalents lors des tests enzymatiques. Ici, le cyclopeptide tétravalent **cyRAFT(CHO)$_4$** a été synthétisé (Schéma 12). Ce RAFT, hydrosoluble, arbore quatre fonctions aldéhydes glyoxyliques qui permettent l'introduction des inhibiteurs *via* des liaisons oxime ou (acyl)hydrazone.

Enfin, au niveau structural, la plateforme cyclique a une orientation spatiale bien définie de par sa préorganisation en pointant les quatre inhibiteurs dans la même direction. Ainsi, en synthétisant sa contrepartie linéaire **liRAFT(CHO)$_4$**, moins organisée, des informations intéressantes pourront alors être tirées sur les mécanismes d'inhibition de ces composés vis-à-vis de l'enzyme.

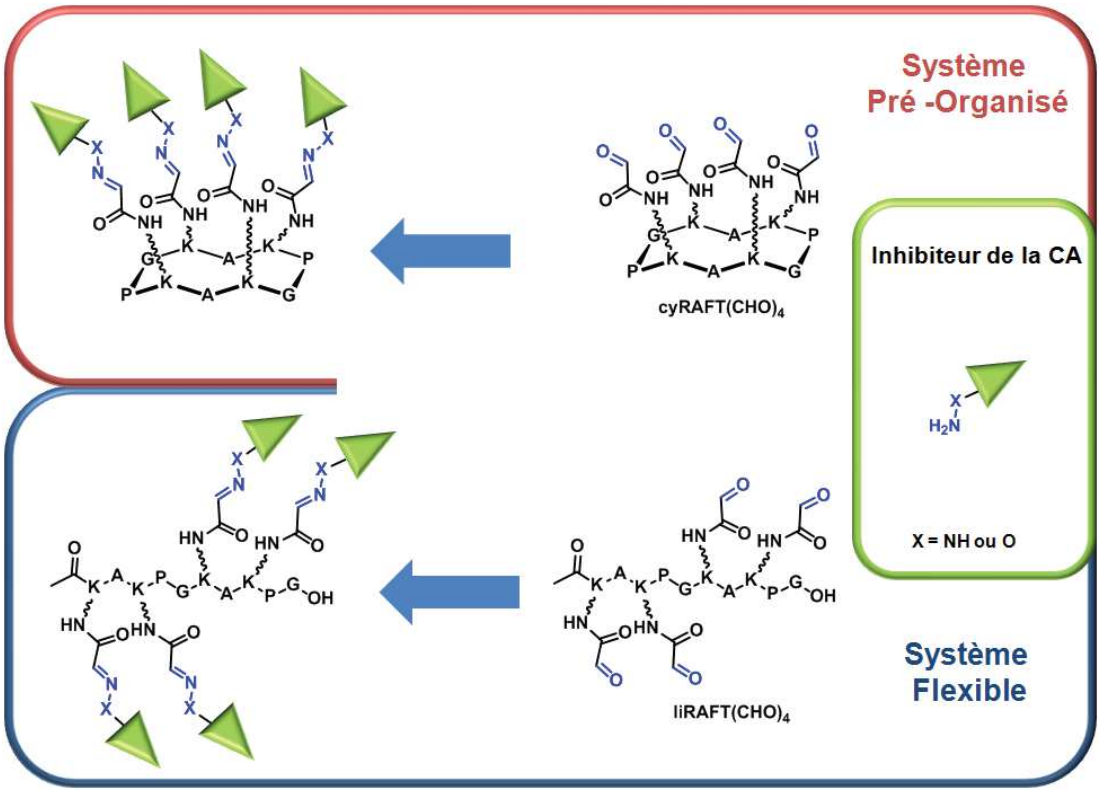


Schéma 12 : Retrosynthèses des inhibiteurs peptidiques des anhydrases carboniques.

V. Synthèse des plateformes peptidiques

Le décapeptide cyclique **cyRAFT(CHO)$_4$ 32** et son analogue linéaire **liRAFT(CHO)$_4$ 34** ont été synthétisés sur support solide (Figure 46). Ces deux peptides arborent quatre fonctions aldéhydes glyoxyliques obtenues par coupure oxydante de quatre résidus de Sérine incorporés sous la forme d'un dipeptide Lysine-Sérine dans la séquence peptidique. (cf. III.5.1)

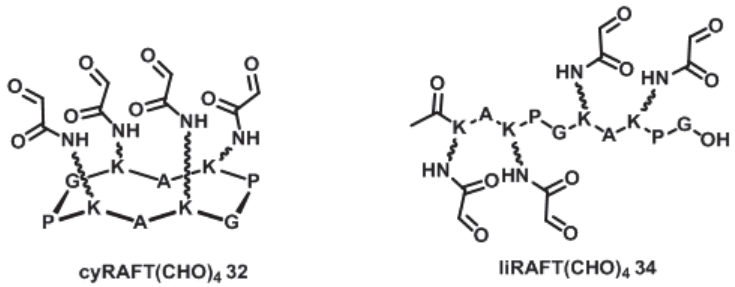


Figure 46 : RAFT cyclique **cyRAFT(CHO)$_4$ 32**et RAFT linéaire **liRAFT(CHO)$_4$ 34**.

V.1 Synthèse du dipeptide **26**

Dans un premier temps le dipeptide **26** est synthétisé, celui-ci permettra d'obtenir les ramifications du peptide cyclique avec, en bout de chaine, les fonctions aldéhydes glyoxyliques (Schéma 13). Cependant, comme dit précédemment, cette fonction est très

réactive et, pour ne pas l'altérer, il est nécessaire quelle soit masquée jusqu' à la fin de la synthèse des RAFTs. Pour cela, la *L*-Sérine protégée par un groupement *tert*-butoxy carbonyle sur la position *N*-terminale et un groupement *tert*-butyl sur l'alcool de la chaine latérale est utilisée. La synthèse du dipeptide **26** se fait en deux étapes. La première consiste à activer la position *C*-terminale de la sérine à l'aide du *N*-hydroxysuccinimide (NHS) en présence du dicyclohexylcarbodiimide (DCC) afin de former l'ester activé correspondant **25**. Il est alors couplé à la chaine latérale de la Fmoc-*L*-Lys-OH en présence de diisipropyléthylamine (DIEA) afin d'obtenir le composé **26** avec un rendement de 98%.

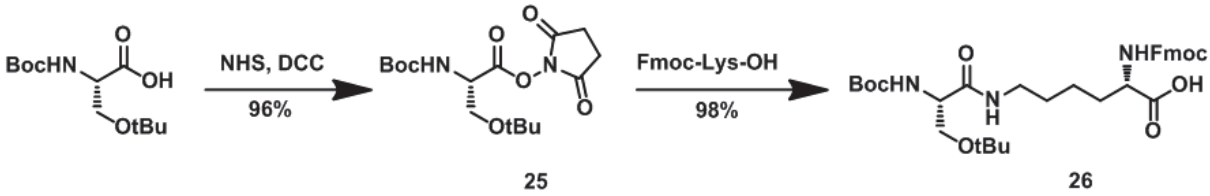


Schéma 13 : Synthèse du dipeptide **26** Fmoc-Lys-(Ser(Otbu)-Boc).

V.2 Synthèse des peptides sur SPPS

Le dipeptide **26** a été incorporé dans la synthèse sur support solide du décapeptide qui se fait de manière automatisée. De par la stratégie de synthèse choisie (Fmoc/*t*Bu), la résine 2-chlorotrityl (bille de polystyrène fonctionnalisée par des groupements 2-chlorotrityl) est utilisée comme support solide. Cette résine permet de cliver le peptide en fin de synthèse à l'aide d'une solution d'acide trifluoroacétique à 1% (TFA) et donc de conserver les groupements protecteurs acido-sensibles sur les chaines latérales. De plus, l'encombrement stérique généré par les groupements trityles réduit les risques de formation de dicétopipérazine au cours de la synthèse (Schéma 14). Le premier acide aminé greffé est le Fmoc-Gly-OH afin d'éviter la racémisation du fait de l'absence de chaine latérale. Il est couplé manuellement à la résine pour augmenter le rendement car une mauvaise incorporation de celui-ci a été observée lors de la synthèse automatisée.

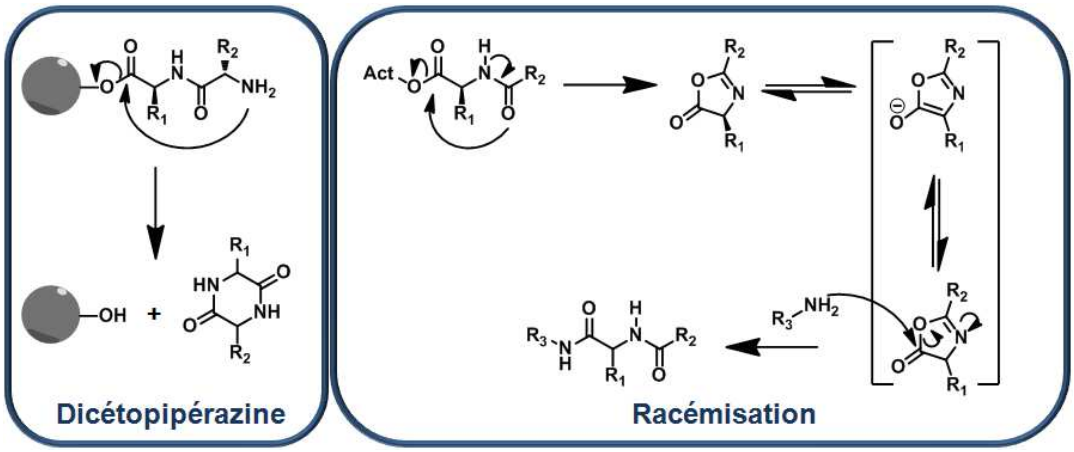


Schéma 14 : Mécanismes réactionnels de formation de dicétopipérazine et de racémisation.

Le greffage se fait donc en présence d'un agent de couplage, l'hexafluorophosphate de 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium (HBTU) et d'une base, la *N*, *N*-diisopropyléthylamine (DIEA) dans le DMF (Schéma 15). La résine **27** est alors obtenue avec une charge de 0.31 mmol/g de résine. Par la suite, l'incorporation des neufs autres acides aminés se fait de façon automatisée, de l'extrémité *C*-terminale vers l'extrémité *N*-terminale, par une succession de cycle de déprotection et de couplage. Chaque couplage peptidique est effectué en 5 min à 70°C assisté par micro-ondes en présence de 3 équivalents de HBTU et 5 équivalents de DIEA. Cependant, le deuxième et le troisième acide aminé sont couplés à température ambiante toujours pour éviter la formation de dicétopipérazine. L'élimination des groupements Fmoc des positions *N*-terminale est effectuée par traitement de la résine avec une solution de pipéridine à 20% dans le DMF. Lors de cette déprotection, l'adduit dibenzofulvènepipéridine est généré et permet par une mesure de l'absorbance en UV à 299 nm, d'évaluer le taux d'incorporation des acides aminés au cours de la synthèse. En fin de synthèse le décapeptide **28** greffé à la résine est obtenu.

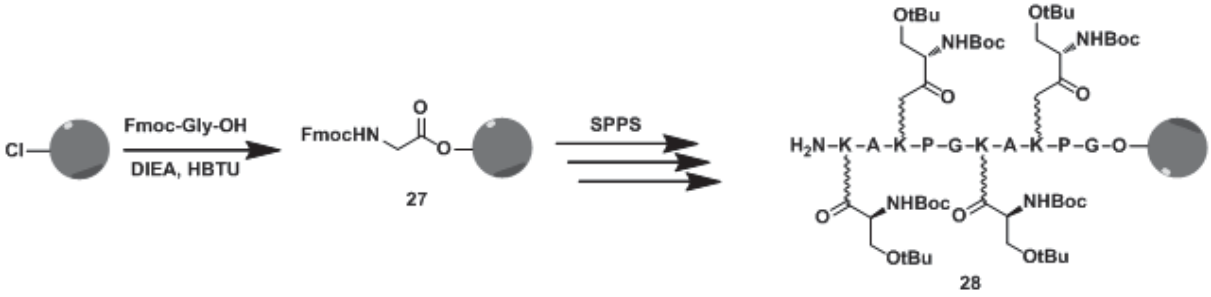


Schéma 15 : Synthèse sur support solide automatisée du décapeptide **4**.

V.3 Synthèse du RAFT cyclique

Le décapeptide **28** est ensuite clivé de la résine en présence de TFA à faible concentration (0,1% de TFA dans le dichlorométhane) afin de conserver les groupements protecteurs *tert*-butyl carbonyle et *tert*-butyl sur les amines et les alcools des résidus de Sérine en bout de chaine. Le peptide linéaire **29** est obtenu par précipitation dans l'éther diéthylique et après purification par HPLC en phase inverse avec un rendement global de 43 % (Schéma 16).

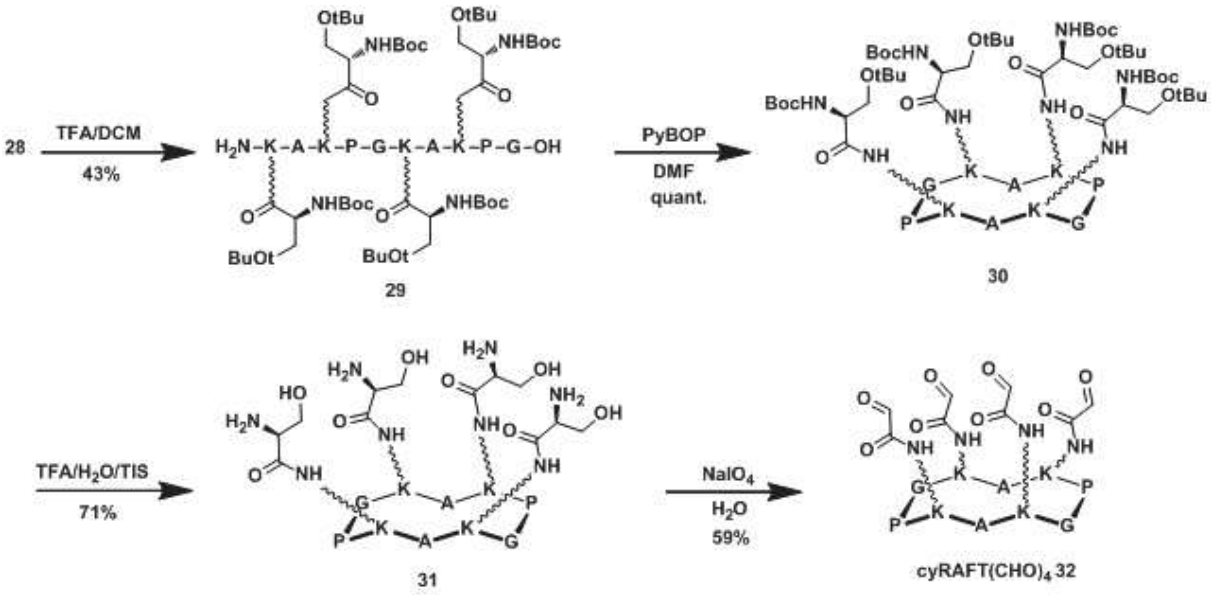


Schéma 16 : Synthèse du RAFT cyclique **cyRAFT(CHO)$_4$ 32**.

Par la suite, une étape de cyclisation a lieu en condition très diluée, à 0.5mM du composé **29**, afin de favoriser la cyclisation intramoléculaire. Le peptide cyclique **30** est de nouveau obtenu après précipitation dans Et_2O avec un rendement quantitatif et ceci est certainement du à la pré-organisation du peptide **29** en solution qui permet de faciliter la cyclisation. La déprotection des groupements *tert*-butylcarbonyle et *tert*-butyl se fait par acidolyse dans une solution de TFA à 95% dans l'eau et en présence d'un piégeur, le triisopropylsilane (TIS). Le peptide cyclique **31** totalement déprotégé est isolé avec un rendement 71%. Enfin, le raft cyclique **cyRAFT(CHO)$_4$ 32** est obtenu par oxydation des résidus de Sérine en bout de chaine en présence de $NaIO_4$.

V.4 Synthèse du RAFT linéaire

Le peptide linéaire **liRAFT(CHO)$_4$ 34** est lui aussi obtenu à partir de l'intermédiaire de synthèse **28**. Avant d'être clivé de la résine, celui-ci est acétylé sur la position *N*-terminale en présence d'anhydride acétique (Schéma 17). Ensuite, à l'aide d'une solution de TFA/TIS/H_2O (95/2.5/2.5) il est à la fois clivé de la résine et déprotégé sur ces chaines latérales afin d'obtenir le composé **33** avec un rendement de 56%. Enfin, de la même manière que pour le peptide cyclique, en présence de $NaIO_4$ les résidus de Sérine en bout de chaine sont oxydées pour obtenir les fonctions aldéhydes glyoxyliques présentes sur la plateforme peptidique linéaire **liRAFT(CHO)$_4$ 34** avec un rendement de 47 %.

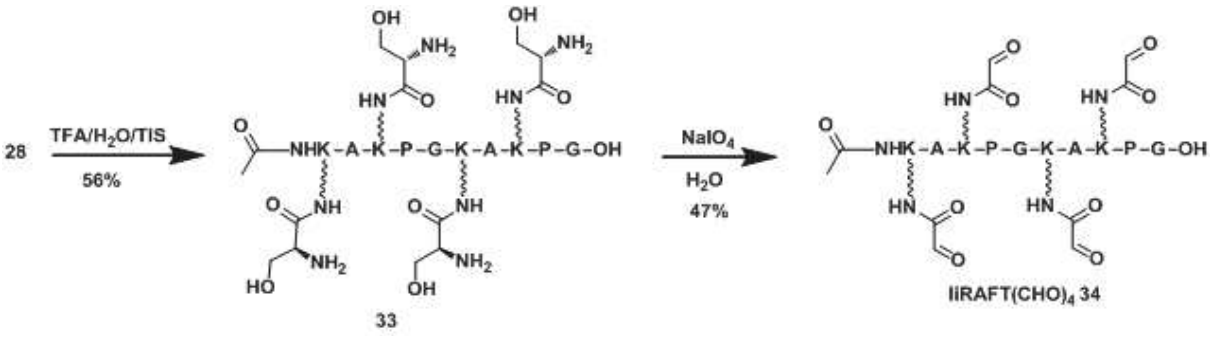


Schéma 17 : Synthèse du RAFT linéaire **liRAFT(CHO)$_4$ 34**.

VI. Synthèse d'inhibiteurs multivalents peptidiques

Une fois les RAFTs fonctionnalisés **cyRAFT(CHO)$_4$ 32** et **liRAFT(CHO)$_4$ 34** obtenus, deux séries d'inhibiteurs multivalents de l'anhydrase carbonique sont synthetisés. La première est préparée par ligation oxime à partir de l'inhibiteur enzymatique **16** (Schéma 18) et la seconde par ligation acylhydrazone à partir des inhibiteurs enzymatiques **2**, **7** et **8** (Schéma 19). La ligation effectuée à partir du composé **9** oxyamine a été réalisée dans un milieu acide à pH = 2 (H_2O/TFA 99,9/0,1). Les inhibiteurs multivalents peptidiques cyclique **35** et linéaire **36** ont pu être isolés après purification sur HPLC semi-préparative en phase inverse avec des rendements respectifs de 31% et 75%.

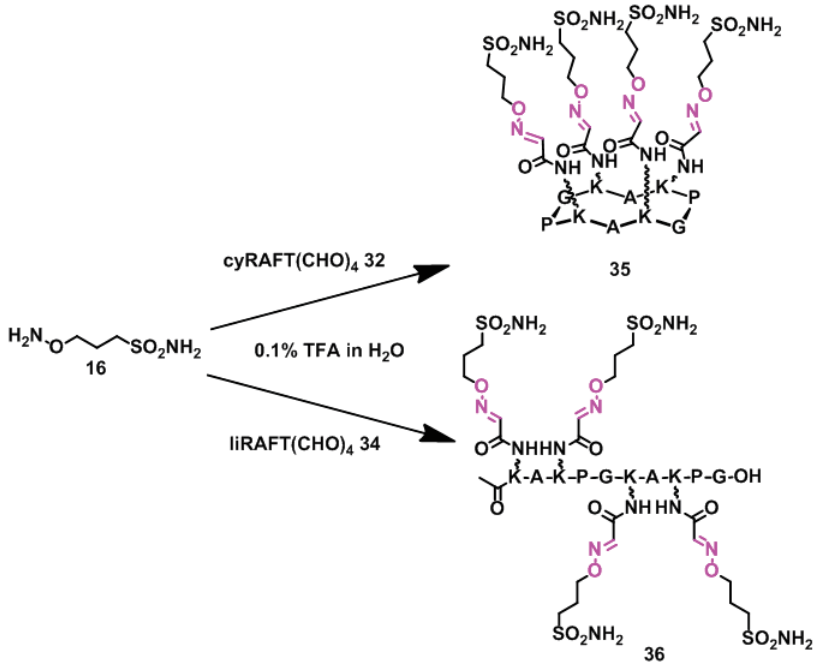


Schéma 18 : Synthèse des inhibiteurs multivalents cyclique **35** et linéaire **36** en série oxime.

Concernant la ligation effectuée à partir des composés **2**, **7** et **8** acylhydrazide, un tampon acétate de sodium à pH 5,0 est nécessaire afin de former la liaison acylhydrazone. Cependant seul les conjugués tétravalents cyclique **37** et linéaire **38** ont été isolés avec un

rendement respectif de 35 à 61%. En effet pour les composés **2** et **7**, les ligations sur le cylopeptide **cyRAFT(CHO)$_4$ 32** ont été faites mais, malheureusement, les conjugués correspondant n'ont pu être purifié sur HPLC semi-préparative par manque de solubilité malgré l'ajout de DMSO. Cela est surement dû au fait de la proximité des cycles aromatiques sur la plateforme ce qui engendre de forte interaction π-π entre eux. De ce fait, la synthèse de ces conjugués ainsi que leurs correspondants linéaires a été abandonnée.

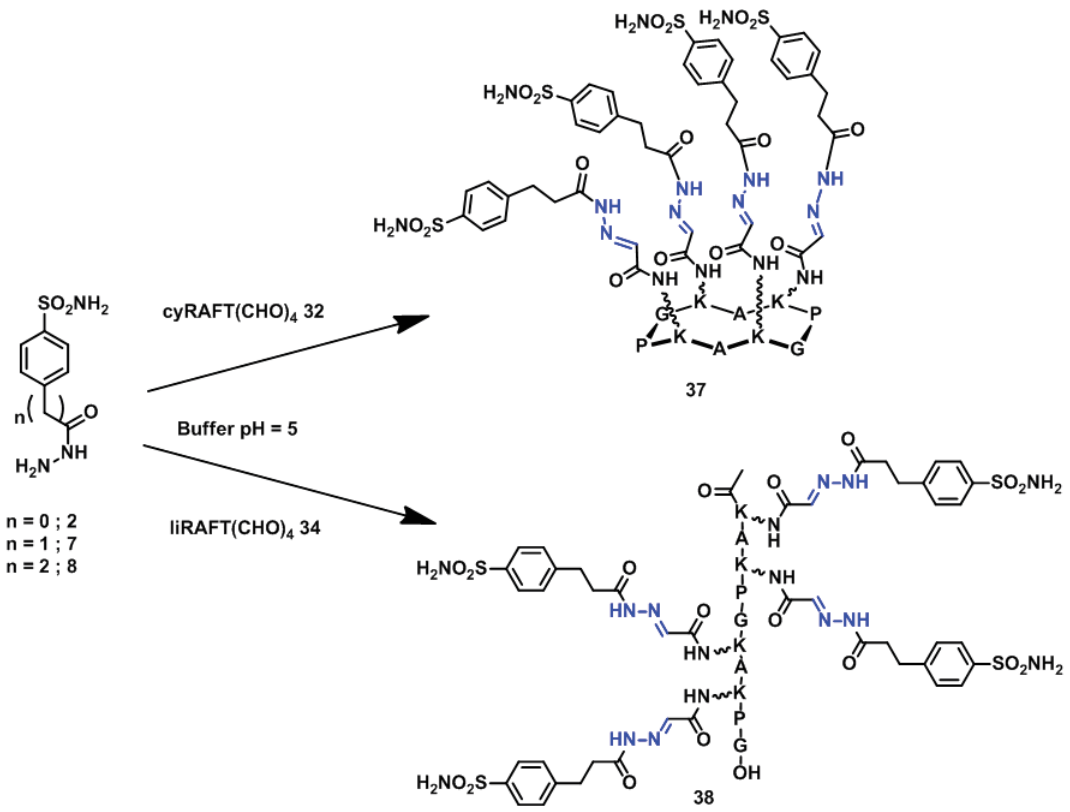


Schéma 19 : Synthèse des inhibiteurs multivalents cyclique **37** et linéaire **38** en série acylhydrazone.

VII. Synthèse d'inhibiteurs monovalents de référence

Les inhibiteurs multivalents peptidiques ont été précédemment synthétisés, cependant les effets multivalents, lors des tests d'inhibition enzymatique, ne peuvent être mis en évidence que par comparaison avec un composé de référence. Ici, les inhibiteurs seuls correspondants aux inhibiteurs multivalents sont modifiés de telle sorte à se rapprocher au mieux de la structure de chaque inhibiteur positionné sur les plateformes pour avoir des outils de comparaison fiable. Ainsi, les inhibiteurs **8** et **16** ont été conjugués avec un aldéhyde glyoxylique qui imite les chaines latérales des plateformes peptidiques. La chaine latérale de la Lysine, qui est composée d'une chaine de quatre carbones, doit être imitée sur les structures monovalentes (Figure 47).

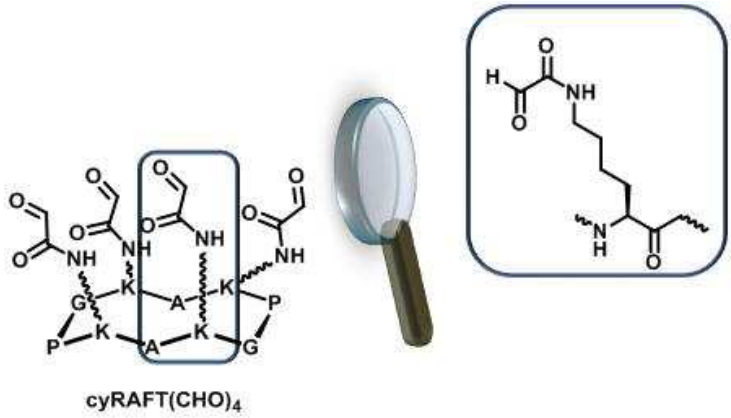


Figure 47 : Zoom sur les chaines latérales des résidus Lysines fonctionnalisées par des aldéhydes glyoxylique.

Pour cela, l'ester activé succinimide de la *L*-Sérine protégée **25** a été couplé à la *n*-butylamine en présence de DIEA pour former le composé **39** (Schéma 20). Par la suite, les groupes protecteurs Boc et *tert*-butyl sont éliminés dans les mêmes conditions utilisées pour les peptides c'est à dire avec une solution de TFA/TIS/H_2O pour donner l'intermédiaire non protégé **40**. Le clivage oxydatif de l'amino-alcool **40** se fait en présence de périodate de sodium ($NaIO_4$) pour donner le composé **41** qui a été identifié par RMN^{1}H mais qui n'as pu être isolé à cause d'une forte instabilité. Pour pallier à ce problème, la réaction d'oxydation et de ligation, qui permet d'obtenir les composés **42** et **43,** sont faite en un seul pot. Ainsi, l'oxydation du composé **41** est faite dans un tampon adéquat à la ligation qui s'ensuit, dans un tampon acétate de sodium pH 5,0 pour la ligation acylhydrazone et dans un mélange H_2O/TFA (99,9 /0,1) pour la ligation oxime. Après 3 heures de réaction à température ambiante, l'excès de $NaIO_4$ est neutralisé avec du bisulfite de sodium ($NaHSO_3$). Enfin, les composés **8** et **16** sont ajoutés pour former respectivement les inhibiteurs monovalents de référence **42** et **43** isolés avec des rendements de 12% et de 27%.

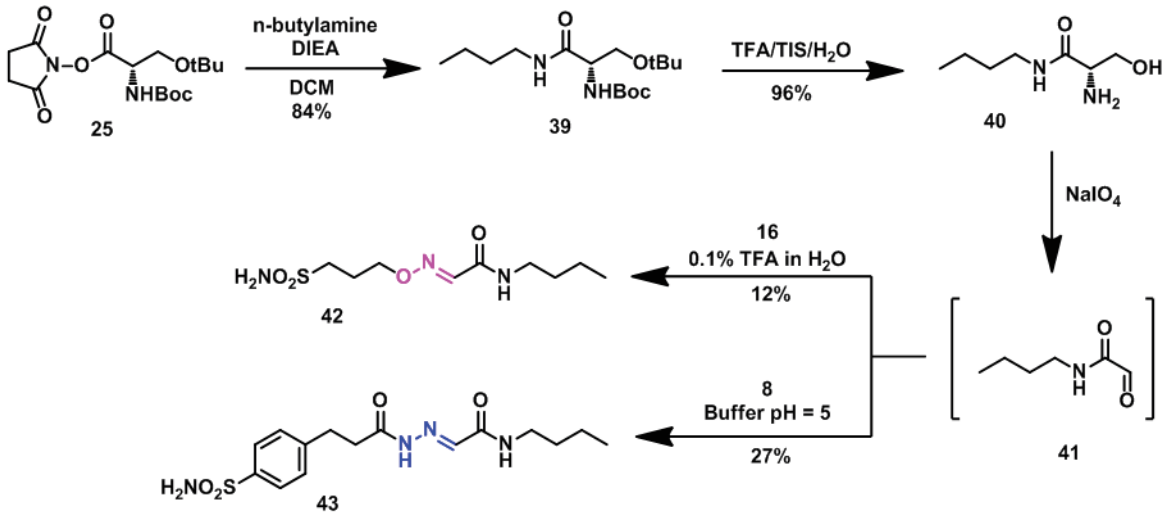


Schéma 20 : Synthèse des inhibiteurs monovalents **42** et **43** de référence.

VIII. Tests enzymatiques

VIII.1 Spectrophotométrie *stop-flow.*

Plusieurs techniques permettent de mesurer l'activité enzymatique de la CA. La plus ancienne consiste à évaluer son activité estérasique.[187] L'utilisation d'un substrat, tel que l'acétate de *p*-nitrophényle, permet par spectrophotométrie de suivre son hydrolyse et par conséquent l'activité de la CA.

Pour ces travaux de thèse, il a été utilisé une méthode par spectrophotométrie dite *stop-flow*. Celle-ci permet de déterminer indirectement l'activité enzymatique de la CA par l'étude de variation du pH *via* l'utilisation d'indicateur coloré. En effet, les CAs catalysent la réaction d'hydratation du dioxyde de carbone en générant du bicarbonate et un proton qui va acidifier le milieu. Cependant, lors de l'addition d'un inhibiteur potentielle, cette catalyse est compromise tout comme la libération du proton.

La technique *stop-flow* permet de mélanger rapidement deux solutions (Figure 48). La première est composée de l'indicateur coloré et de l'enzyme avec ou non la présence de l'inhibiteur. La seconde est une solution saturée de dioxyde de carbone. Par la suite, le pH du mélange est suivi par mesure de l'absorbance à l'aide d'une cellule photosensible UV-visible.

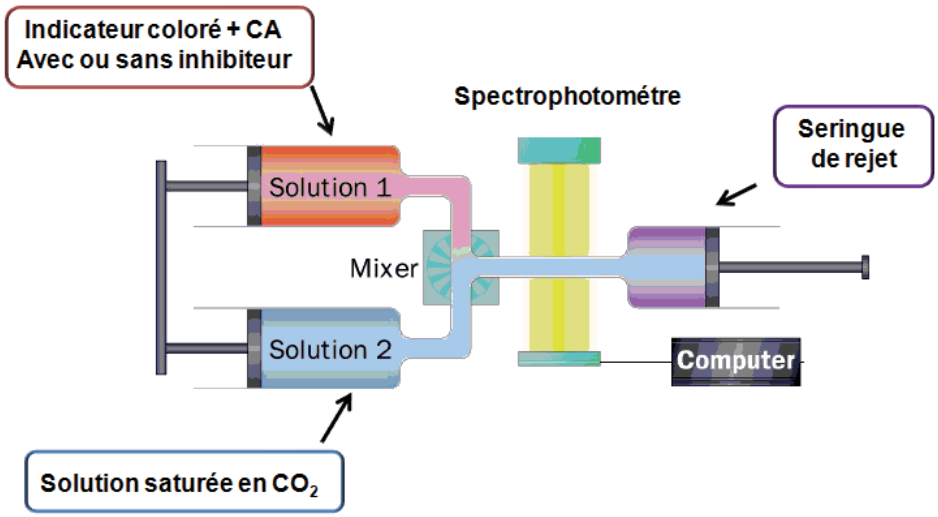


Figure 48 : Spectrophotométrie *stop-flow.*

Ces mesures, à différentes concentrations, permettent de calculer en pourcentage l'activité de la CA en faisant le rapport de l'activité en présence de l'inhibiteur sur celle en l'absence de l'inhibiteur. Enfin, à l'aide de l'équation de Cha,[188] la constante d'inhibition (K_I) est déterminée à partir de IC_{50} (concentration qui permet d'inhiber de moitié l'activité enzymatique) préalablement calculée.

Tous les tests d'inhibition ont été effectués par l'équipe du Pr. Claudiu T. Supuran de l'Université de Florence.

VIII.2 Résultats des tests enzymatiques.

Des tests d'inhibition enzymatique *in vitro* ont été faits pour comparer la puissance inhibitrice des composés monovalents et multivalents précédemment synthétisés. Pour cela, différents types d'isoformes de l'anhydrase carbonique sont choisis en fonction de leurs pertinences d'un point de vue physiologique et pathologique:

- 2 isoformes cytosoliques, la *h*CA I et la *h*CA II
- 4 isoformes transmembranaires et/ou associées à des tumeurs, la *h*CA VII, *h*CA IX et la *h*CA XII.
- 1 isoforme secrétée, la *h*CA IV

Les résultats de ces tests sont rapportés dans le tableau 5 pour les composés obtenus en série oxime.

	***K*i [nM][a]**					
Composé	***h*CA I**	***h*CA II**	***h*CA IV**	***h*CA VII**	***h*CA IX**	***h*CA XII**
cyRAFT$(CHO)_4$ 32	> 10000	> 10000	> 10000	> 10000	> 10000	> 10000
liRAFT$(CHO)_4$ 34	> 10000	> 10000	> 10000	> 10000	> 10000	> 10000
42	63	250	392	> 10000	36	652
35	89	19	81	> 10000	421	> 10000
Pr	0.7	13.2	4.8	n/a	0.1	n/a
Pr/n	0.18	3.3	1.2	n/a	0.02	n/a
36	55	51	608	> 10000	481	-
Pr	1.2	4.9	0.6	n/a	0.1	-
Pr/n	0.3	1.2	0.15	n/a	0.02	-

Tableau 5 : Résultats des tests d'inhibition enzymatique sur la CA des plateformes **cyRAFT$(CHO)_4$ 32**, **liRAFT$(CHO)_4$ 34**, du composé monovalent oxime **42** et des conjugués multivalents oxime **35** et **36**.

6 mesures ont été prises sur chaque composé. [a] Marge d'erreurs de ±10% sur les valeurs rapportées.

Tout d'abord, les peptides **cyRAFT(CHO)$_4$ 32** et **liRAFT(CHO)$_4$ 34** seuls ont été testés et aucun impact sur l'inhibition n'a été observé. Ce premier test met en évidence la neutralité de la composition de ces systèmes peptidiques sur l'inhibition. Par la suite, on remarque que le composé monovalent **42** inhibe fortement et avec une sélectivité assez marqué l'isoforme *h*CA IX avec une constante d'inhibition (K_I) égale à 36 nM.

Concernant les conjugués multivalents **35** et **36**, une inhibition plus faible a été constatée sur les isoformes IX et XII de l'anhydrase carbonique comparée à l'inhibiteur monovalent. Cependant, une amélioration de la puissance d'inhibition du système multivalent cyclique **35** est observée sur la *h*CA II et IV (Tableau 1). Dans ce cas, la puissance relative (Pr) augmente et elle est respectivement de 13 à 5 fois supérieures. De plus, si on se focalise seulement sur la *h*CA II, un effet multivalent positif est mis en évidence en calculant la puissance relative par inhibiteur de sulfonamide (Pr/n) avec une augmentation jusqu'à 3,3 fois supérieure pour le conjugué cyclique **35** toujours comparé à l'inhibiteur **42**.

D'un point de vue structural, si l'on compare les deux types de systèmes multivalents utilisés, ici le conjugué cyclique **35** et le linéaire **36**, une baisse de la puissance inhibitrice sur toutes les isoformes, exceptée la *h*CA I, est mise en évidence avec le système **36** qui est le plus flexible en terme d'organisation structurale.

Pour la série acylhydrazone les résultats des tests d'inhibition enzymatique sont recensés dans le tableau 6.

	***K*i [nM][a]**					
Composé	***h*CA I**	***h*CA II**	***h*CA IV**	***h*CA VII**	***h*CA IX**	***h*CA XII**
43	48	618	811	97	9	817
37	329	53	80	34	100	103
Pr	0.1	11.7	10.1	2.8	0.1	7.9
Pr/n	0.02	2.9	2.5	0.7	0.02	1.9
38	460	89	428	75	10	938
Pr	0.1	6.9	1.9	1.3	0.9	0.9
Pr/n	0.02	1.7	0.5	0.3	0.2	0.2

Tableau 6 : Résultats des tests d'inhibition enzymatique sur la CA du composé monovalent acylhydrazone **43** et des conjugués multivalents acylhydrazone **37** et **38**.
6 mesures ont été prises sur chaque composé. [a] Marge d'erreurs de ±10% sur les valeurs rapportées.

Les résultats obtenus sur cette série sont sensiblement similaires à ceux de la série oxime précédemment testée. Comme pour le composé monovalent **42**, une excellente inhibition est remarquée pour le conjugué monovalent **43** sur la *h*CA IX avec une constante d'inhibition égale à 9 nM et avec une bonne sélectivité parmi les isoformes testées. De la même façon, des effets multivalents positifs sont observés avec le conjugué cyclique **37** sur les isoformes *h*CA II, IV mais également sur la *h*CA XII avec une puissance relative par inhibiteur supérieure à 1. Enfin, le conjugué multivalent constitué du peptide cyclique (composé **37**) montre aussi ici une puissance améliorée par rapport au conjugué multivalent linéaire **38**.

Les inhibitions obtenues avec les composés monovalents, en série oxime et (acyl)hydrazone, mettent en évidence la spécificité et la forte affinité de ces petites molécules à inhiber l'isoforme IX de l'anhydrase carbonique. Au contraire, l'utilisation de ces mêmes composés sur des plateformes multivalentes permet de moduler l'affinité et la sélectivité de ces inhibiteurs avec des effets multivalents positifs sur les isoformes II et IV de l'anhydrase carbonique. L'existence d'un site de liaison secondaire sur ces isoformes, déjà rencontré lors de précédents travaux, pourrait expliquer ce phénomène.[189] Cependant, il n'est pas impossible qu'un effet d'agrégation entre en jeux, ce qui pourrait favoriser certaines isoformes qui ont la capacité de se regrouper favorablement sur le système multivalent.

Ces résultats montrent également des différences structurelles liées à la nature de la plateforme (cyclique ou linéaire) ayant un effet intéressant sur la puissance de ces inhibiteurs de la CA. Le fait que les conjugués pré-organisés **35** et **37** montrent une meilleure puissance d'inhibition par rapport aux conjugués **36** et **38** semble indiquer que l'ajustement structurel entre les différentes isoformes de la CA et l'inhibiteur multivalent joue un rôle important. Ainsi, il est possible que les effets statistiques soient à l'origine des effets multivalents observés ici et opèrent grâce à une augmentation de la concentration locale des inhibiteurs de la CA. En effet, la structure cyclique permet d'arborer dans la même direction les quatre inhibiteurs de quoi favoriser la concentration locale d'inhibiteurs à proximité du site actif.

IX. Conclusion

Dans cette partie, quatre inhibiteurs multivalents de l'anhydrase carbonique ont été synthétisés avec leurs analogues monovalents. Les systèmes utilisés pour apporter cette multivalence sont des châssis peptidiques sous deux formes. Le premier est cyclique et permet d'avoir une préorganisation structurale au niveau des inhibiteurs et le second est un peptide linéaire beaucoup plus flexible. Ces systèmes peptidiques ont été fonctionnalisés avec des aldéhydes glyoxyliques de telle sorte à faciliter l'insertion des inhibiteurs sur les plateformes par simple ligation oxime ou acylhydrazone.

Les essais d'inhibition enzymatique ont révélé des effets multivalents positifs intéressants se produisant spécifiquement sur un couple d'isoforme (*h*CA II et *h*CA IV). Des effets structuraux ont également été démontrés sur l'inhibition des isoformes de la CA avec une amélioration de la puissance d'inhibition *via* l'utilisation du système cyclique qui est le plus organisé.

Cette étude a permis de mettre en évidence l'intérêt de l'utilisation de systèmes multivalents organisés. En effet, dans ces travaux le peptide cyclique, composé de quatre inhibiteurs de l'anhydrase carbonique, a permis de moduler l'inhibition et la sélectivité sur les différents isoformes. Cependant, les effets obtenus peuvent être encore augmenté par d'autres travaux. Ici seulement deux inhibiteurs de type sulfonamide ont été utilisés, ainsi il serait donc judicieux d'en synthétiser un plus large panel. Par exemple, l'utilisation de coumarines, qui sont très sélectives vis-à-vis des isoformes transmembranaires *h*CA IX et XII serait, une voie intéressante à explorer afin d'augmenter la modulation de la sélectivité. Des problèmes de solubilité ont également été rencontrés lors de la ligation, là aussi des travaux sur les chaines latérales du peptide pourraient, à la fois, être une solution pour augmenter la solubilité des inhibiteurs multivalents formés, mais aussi des éléments d'informations supplémentaires sur la relation structure-activité en modifiant leurs longueurs. Enfin, seule la face dite "inhibitrice" a été utilisée dans ce projet, il serait intéressant à l'avenir de mettre à profit l'autre face dite "effectrice" du cyclopeptide afin d'incorporer un fluorophore pour faire de l'imagerie et/ou un radiosensibilisateur à but thérapeutique (Figure 49).

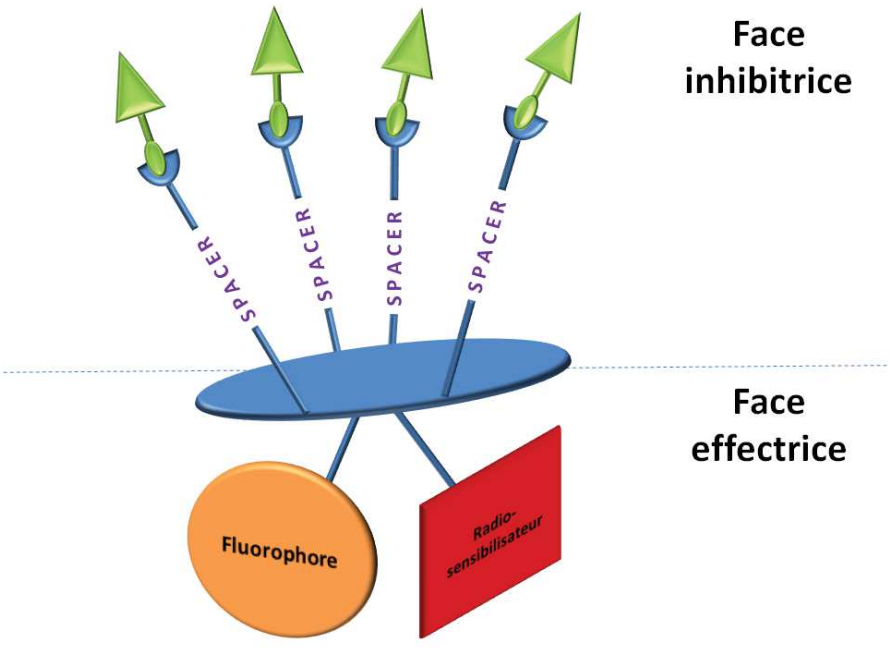


Figure 49 : Conception de RAFT cyclique pour l'inhibition de la CA, l'imagerie et la thérapie.

Chapitre IV : Développement de nanomatériaux de silice pour le ciblage des anhydrases carboniques.

I. Introduction

La nanotechnologie est une branche multidisciplinaire qui regroupe de nombreux domaines de la science et de la technologie. Depuis une vingtaine d'années, les matériaux de moins de 100 nm ont trouvés des applications dans le domaine biomédical en tant qu'agents d'imagerie, outils de diagnostic, ou même dans le transport et la vectorisation de médicaments.[17,190–193]

Cet engouement porté sur les nanoparticules (NPs) est intrinsèquement lié à leurs propriétés physico-chimiques. En effet, les nanoparticules ont pour caractéristiques majeures d'être de faibles tailles avec un rapport surface/volume élevé, ce qui est intéressant pour les applications citées précédemment. De plus, des procédés permettent à ce jour de contrôler la taille (de 1 à 100nm) mais aussi la structure (sphère, cube, etc…) de ces nanomatériaux.

Les nanoparticules peuvent être façonnées en fonctions des propriétés voulues ou des applications pour lesquelles elles sont destinées. Leurs propriétés peuvent provenir de leurs compositions chimiques qui peuvent être de type organique (polymères, dendrimères, nanotubes de carbone, etc…) ou de type inorganique (métaux ou silice). Par exemple, l'utilisation de métaux tels que l'oxyde de fer permet d'obtenir des nanoparticules aux propriétés magnétiques largement utilisées pour l'imagerie. Les NPs à base de polymères peuvent permettre de transporter des agents actifs puis de les relarguer par diffusion ou érosion contrôlée.

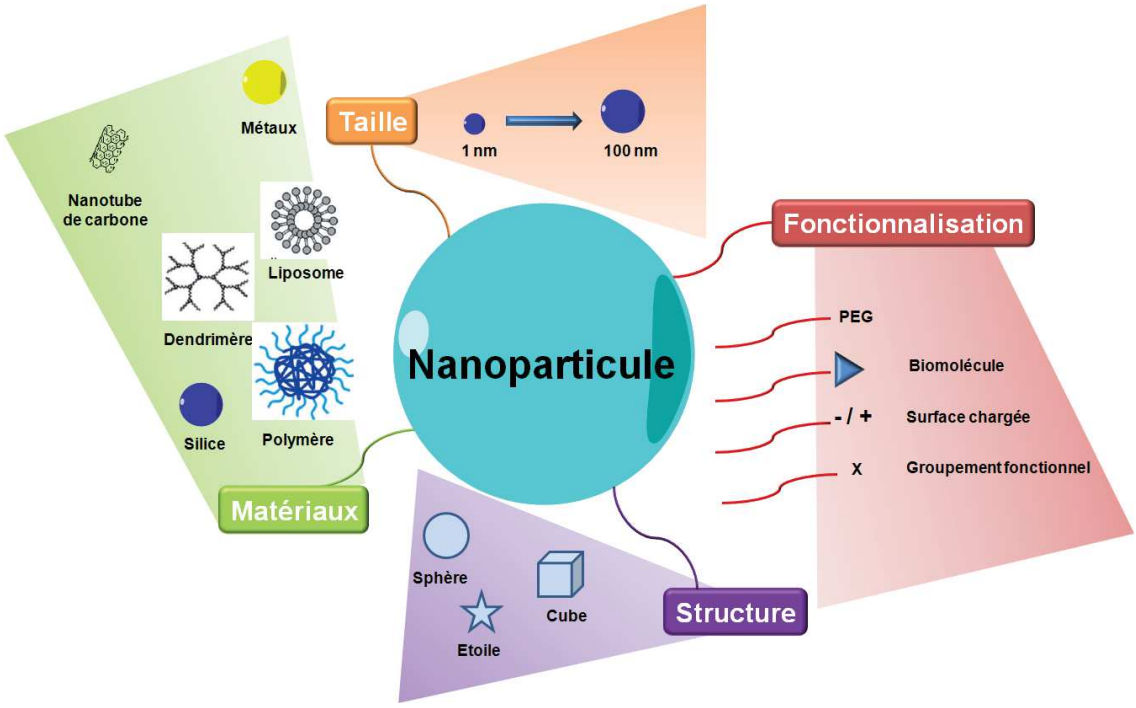


Figure 50 : Compositions, structures et propriétés des nanoparticules.

Les propriétés physico-chimiques de ces nanoparticules peuvent également être modulées par fonctionnalisation de leurs surfaces. Par exemple, les surfaces fonctionnalisées avec des résidus chargées (positivement et/ou négativement) induiront des propriétés électrostatiques. Les NPs peuvent être aussi fonctionnalisées par des biomolécules à des fins thérapeutiques.

Enfin, les différentes propriétés peuvent être combinées afin de former des nanoparticules multifonctionnelles très appréciées dans le domaine biomédical.

Parmi les diverses nanoparticules existantes, les nanoparticules de silice ont faits l'objet de nombreux travaux.[193–196] Celles-ci ont été très utilisées notamment pour leurs propriétés physico-chimiques intéressantes. En effet, les NPs à base de silice possèdent une grande stabilité, elles sont facilement fonctionnalisables mais aussi biocompatibles et non toxiques.

Pour ces différentes raisons, dans le cadre de ces travaux de recherche, les NPs à base de silice ont été choisies comme support pour la conception de nouveaux systèmes multivalents.

II. Formation de nanoparticule de silice

La synthèse de nanoparticules de silice (NPs) sphériques en phase liquide est basée sur le procédé sol-gel décrit par Stöber et *coll*.[197] Ce procédé permet de former des gels (ici des polymères de silice) à partir de précurseurs en solution. La réaction sol-gel repose sur une succession de réactions d'hydrolyse et de condensation des précurseurs. Les précurseurs utilisés sont principalement des alkoxysilane de formule $Si(OR)_n$. Les réactions, d'hydrolyse et de condensation de ces alkoxysilanes, entrainent la formation d'espèces de plus en plus condensées qui conduisent à des particules de silice colloïdales.

II.1 Hydrolyse et condensation

L'hydrolyse des précurseurs alkoxysilanes est une étape clé puisqu'elle permet d'amorcer la formation des nanoparticules de silice. Cette réaction se fait généralement dans l'eau en présence d'un catalyseur acide ou basique pour accélérer le processus et permet d'obtenir les fonctions silanols Si-OH (Schéma 21).

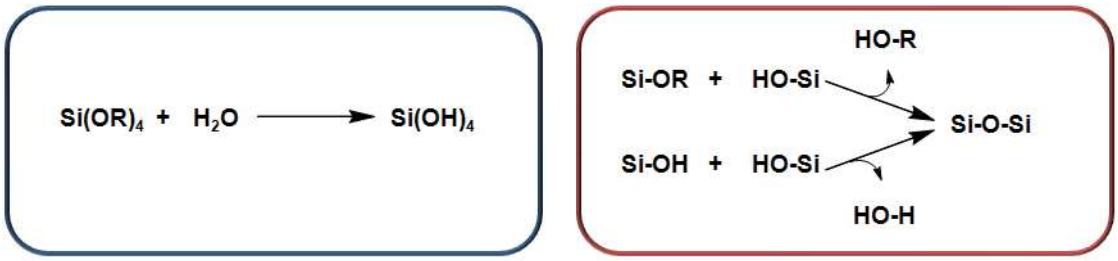


Schéma 21 : Mécanismes des réactions d'hydrolyse et de condensation.

La libération de ces groupements hydroxylés entraine leurs condensations en formant des ponts Si-O-Si. Ce processus peut se produire de façon simultanée à l'hydrolyse, dès l'apparition du premier groupement hydroxylé, et ainsi générer deux réactions concurrentes.

II.2 Utilisation des microémulsions inverses

Lors de la formation des nanoparticules de silice plusieurs paramètres, comme la taille, la dispersité ou encore la porosité, sont importants et doivent être maitrisés. Pour cela, la microémulsion est une technique qui permet la formation, de façons contrôlées, de nanoparticules de silice régulières, de faible taille (inférieur à 100 nm) et monodisperses.
Ceci est possible en créant des micelles inverses au sein du milieu réactionnel qui vont jouer le rôle de nanoréacteur (Figure 51).

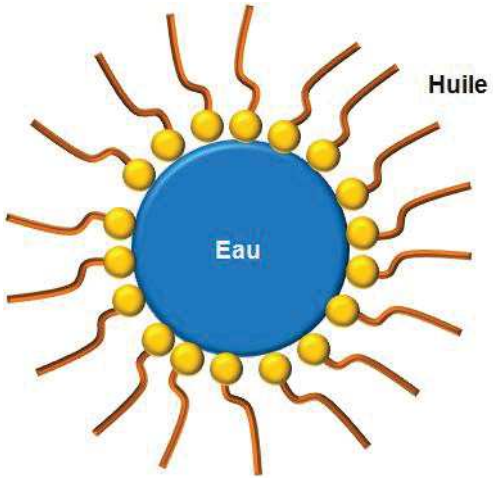


Figure 51 : Coupe transversale d'une micelle inverse.

Les micelles inverses sont composées d'un cœur hydrophile (eau) et d'un corps hydrophobe (huile). Elles sont formées à partir d'un tensio-actif qui permet d'abaisser la tension superficielle entre les deux milieux et de favoriser et de stabiliser la formation de micro-gouttes. Cela est possible grâce au caractère amphiphile du tensio-actif qui présente deux parties de polarité différentes : l'une hydrophile et polaire, l'autre lipophile et apolaire.

Ainsi les précurseurs alkoxysilanes qui sont de nature hydrophobe vont dans un premier temps s'hydrolyser à l'interface huile/eau des micelles inverses. Dans un deuxième temps, les silanols hydrophiles formés, vont pénétrer dans le cœur du nanoréacteur. Enfin, la condensation peut être amorcée donnant ainsi des germes qui vont croître jusqu'à former les nanoparticules de silice. La croissance de ces nanoparticules de silice va être limitée par les dimensions internes des micelles inverses ce qui va permettre d'obtenir une faible distribution en tailles.[198]

II.3 Polycondensation

Lors de la synthèse des NPs de silice il est possible de former des particules hybrides qui permettront d'obtenir différentes propriétés. Ce processus est possible par co-hydrolyse, puis polycondensation d'un mélange de deux précurseurs alkoxysilanes différents[199,200] (Figure 52).

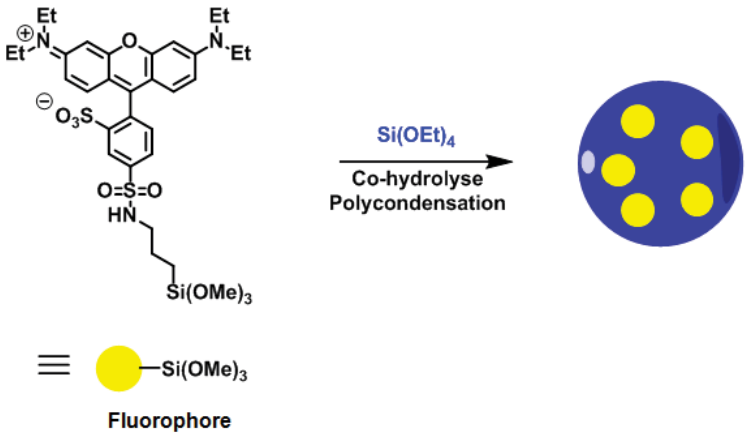


Figure 52 : Formation de NPs de silice fluorescente par polycondensation.

Par exemple, en 2004 Xu et *coll*. ont décrit des NPs hybrides contenant de la Lissamine Rhodamine B.[201] D'une part, ces NPs hybrides ont des propriétés de fluorescence intéressantes car elles présentent un signal de luminescence élevé du à la quantité de fluorophores qu'elles contiennent ce qui permet d'améliorer la sensibilité de la détection. D'autre part, elles présentent aussi une photostabilité élevée puisque les fluorophores sont protégés du milieu environnant par la matrice de silice et permet ainsi de lutter contre le photoblanchiment lors d'une exposition prolongée de certains fluorophores.[202]

Ces nanoparticules hybrides aux propriétés nouvelles sont utilisées dans des dispositifs optiques par exemple en bio-imagerie où il existe une demande importante en matériaux luminescents ultrasensibles, biocompatibles et photostables.[203]

III. Synthèse des nanoparticules de silice hybrides sphériques bifonctionnelles

Cette partie a pour objectif l'élaboration de nanoparticules de silice hybrides bifonctionnelles destinées à l'inhibition multivalente des anhydrases carboniques. Dans un premier temps, la formation par microémulsion inverse de NPs à base de fluorescéine permettra de les doter de propriétés de fluorescence intéressantes. Par la suite, les NPs hybrides formées seront modifiées sur leur surface par polycondensation d'inhibiteurs de l'anhydrase carbonique (Figure 53).

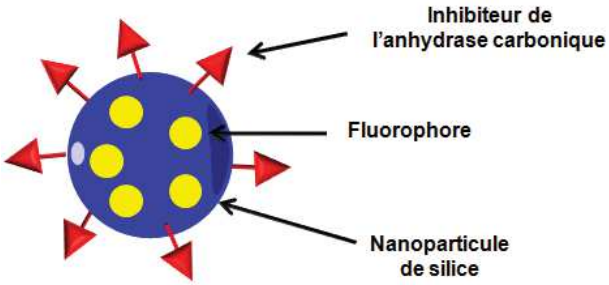


Figure 53 : NPs sphérique hybrides bifonctionnelles inhibitrice de des anhydrases carboniques.

III.1 Préparation de nanoparticules de silice hybrides fluorescentes (NSHF)

Les nanoparticules de silice hybrides fluorescentes (NSHF) **45** ont été préparées par polycondensation d'un dérivé silylé de la fluorescéine **44** (Schéma 22). Inspiré par les travaux de Xu et *coll.*,[201,204] la stratégie de synthèse a été, tout d'abord, de préparer le précurseur organosilylé **44** de la fluorescéine. Pour cela, la fluorescéine isothiocyanate est couplée avec le 3-aminopropyltriisopropoxylsilane. Après une nuit sous agitation dans l'acétonitrile, le solide formé est filtré, puis lavé à l'éther diéthylique (Et_2O). Le précurseur thiourée **44** est isolé avec un rendement de 77%.

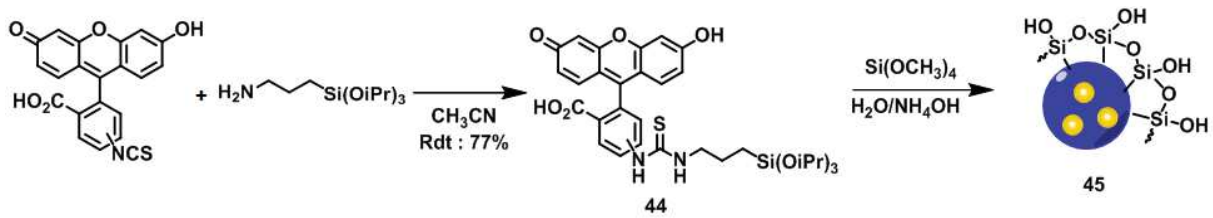


Schéma 22 : Synthèse de la NSHF **45**.

La préparation de la NSHF **45** a été réalisée selon une méthode d'hydrolyse et de polycondensation contrôlée en utilisant la microémulsion dans un mélange eau-huile. Le précurseur fluorescent silylé **44** est co-hydrolysé et polycondensé avec le tétraméthoxysilane (TMS). Pour cela, la réaction se fait dans l'eau et en présence d'ammoniaque comme base.

Afin d'homogénéiser la réaction, le milieu réactionnel est mis dans un bain à ultrason à température ambiante. Après 30 minutes, un mélange d'eau et d'un agent tensio-actif non ionique (cyclohexane/hexanol/triton X-100) sont ajoutés au milieu pour créer le système micellaire inverse. Enfin, après une nuit le milieu est centrifugé puis la NHFS **45** obtenue est lavée à l'éthanol et avec une solution d'eau/éthanol.

III.2 Synthèse de la NSHF décorée par des inhibiteurs de l'anhydrase carbonique

Ici, l'inhibiteur choisi pour décorer la nanoparticule de silice **45** possède un motif benzosulfonamide qui est connu pour inhiber efficacement l'anhydrase carbonique. Ainsi, le précurseur **47** a été synthétisé afin d'être par la suite hydrolysé puis polycondensé à la surface de la NSHF **45**. Pour cela, le 4-aminoéthyl-benzène sulfonamide est mis en réaction avec du dicyclohexylcarbodiimide (DCC) et du disulfure de carbone (CS_2) afin de former l'isothiocyanate **46** (Schéma 23). Celui-ci est, par la suite, couplé au 3-aminopropyltriisopropoxylsilane pour former le précurseur **47** qui est isolé, de la même manière que l'organosilylé fluorescéine **44**, avec un rendement de 71%.

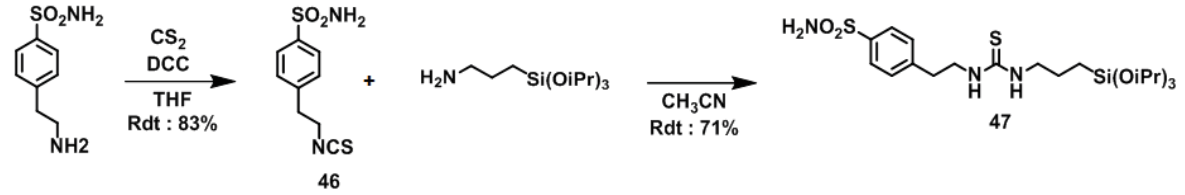


Schéma 23 : Synthèse du précurseur benzosulfonamide **47**.

Enfin la nanoparticule de silice **48,** fonctionnalisée par l'inhibiteur, est formée à partir de la polycondensation du précurseur **47** à la surface de la NSHF **45** en solution dans le méthanol et à reflux. (Schéma 24) Après une nuit, le milieu réactionnel est centrifugé, puis le précipité obtenu est lavé au méthanol. Les fonctions silanols restantes sur la nanoparticule sont capées à l'aide du bis(triméthylsilyl)amine en solution dans le toluène pour obtenir la nanoparticule de silice **48**.

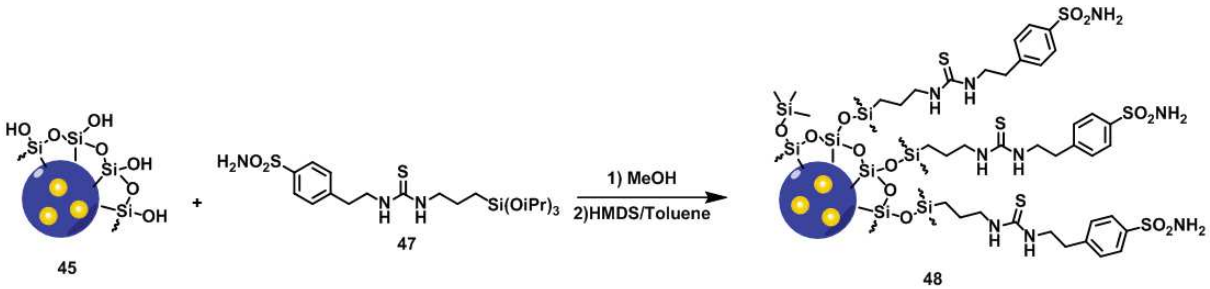


Schéma 24 : Synthèse de la nanoparticule hybride bifonctionnelle **48**.

III.3 Caractérisation physicochimique des nanoparticules **45** et **48**.

La taille et la polydispersité des nanoparticules hybrides **45** et **48** ont été étudiées par microscopie électronique à transmission (MET).

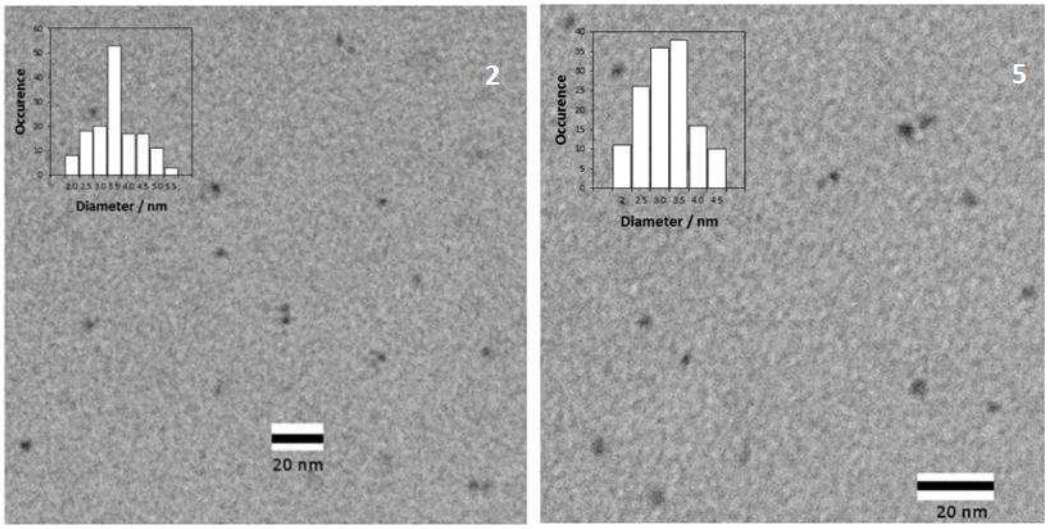


Figure 54 : Photos des images du MET des nanoparticules **45** et **48**.

En faisant la moyenne de la mesure du diamètre de 150 particules, les résultats montrent que les particules **45** et **48** sont monodispersées avec un diamètre d'environ 3,5 ± 0,8 nm (Figure 54).

Les analyses d'absorption d'azote ont montré que les particules de NFHS **45** et **48** ne sont pas poreuses et ont respectivement des surfaces spécifiques de Brunauer-Emmett-Teller (BET) égale à 330 m^2g^{-1} et 260 m^2g^{-1}. Cette diminution montre clairement la modification de surface de la nanoparticule **48** par le ligand **47**.

Enfin, à l'aide des analyses élémentaires, le nombre de ligands accroché à la surface des nanoparticules **48** a été estimé. Le rapport molaire obtenu, entre les atomes de silice et le ligand, est de 250. Sur la base de la taille des particules **48** et du rapport précédemment calculé, il a été estimé que le nombre de ligands sulfonamides disponibles à la surface de la nanoparticule était d'environs 12 à 14.

III.4 Synthèses des références pour les tests d'inhibition

En 2000, Carlsson et *coll*. montrent que les NPs de silice peuvent interagir avec les anhydrases carboniques ce qui induit une perte d'activité.[205] Afin de limiter ce phénomène, les groupements silanols de la NHFS **45** ont été capés pour former la nanoparticule **49**. Pour cela, la NHFS **45** a été mise en solution dans le méthanol à reflux durant une nuit. (Schéma 25) Par la suite, le milieu réactionnel a été centrifugé et le précipité lavé au méthanol. Enfin, le solide obtenu est mis à réagir avec du bis(triméthylsilyl)amine en solution dans le toluène.

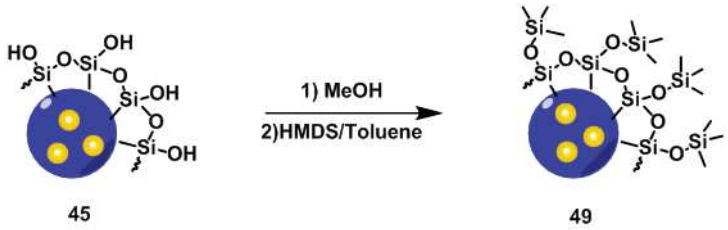


Schéma 25 : Synthèse de la nanoparticule de référence **49**.

Pour pouvoir déterminer l'effet multivalent, les résultats d'inhibition de la nanoparticule **48** ont été comparés à ceux d'un inhibiteur monovalent de référence. Ainsi, l'inhibiteur **50** a été synthétisé à partir de l'isothiocyanate **46** qui est couplé à la *n*-butylamine dans l'acétone. (Schéma 26) Après une nuit, le solvant est évaporé jusqu'à obtenir une huile. L'inhibiteur monovalent **50** est précipité, filtré et lavé à l'éther diéthylique. Il est isolé sous forme de solide avec un rendement de 71%.

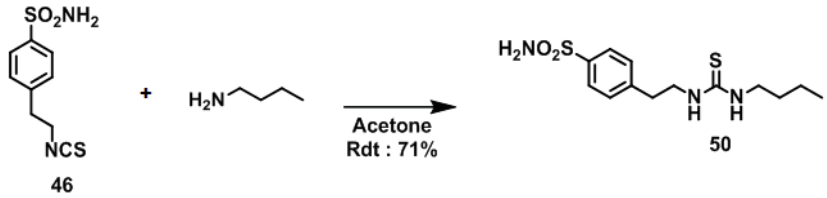


Schéma 26 : Synthèse de l'inhibiteur monovalent de référence **50**.

III.5 Tests enzymatiques

Les nanoparticules **48** et **49** et l'inhibiteur monovalent **50** ont été testés sur les isoformes cytosoliques hCA I et II, ainsi que sur les isoformes transmembranaires hCA IX et XII associés aux tumeurs.[206] Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 7.

	***K*i [nM][a]**			
Composé	***h*CA I**	***h*CA II**	***h*CA IX**	***h*CA XII**
50	142	48.1	38.3	29.8
49	38800	268	560	92650
48	4.4	0.67	2.7	6.2
pr	32.3	71.8	14.2	4.8
pr/n	2.7	6	1	0.4

[a] Marge d'erreurs de ±10% sur les valeurs rapportées.

Tableau 7 : Résultats des tests d'inhibition enzymatique sur la CA des NPs **48**, **49** et de l'inhibiteur monovalent **50**.

Premièrement, on peut observer que la nanoparticule de silice **49** n'a aucun effet sur l'activité enzymatique des isoformes hCA I et hCA XII. Cependant, une faible inhibition peut

être observée sur les isoformes hCA II et hCA IX qui pourrait s'expliquer par des phénomènes d'adsorption des nanoparticules de silice sur la cavité du site actif.[205]

En ce qui concerne la nanoparticule **48**, il est observé d'excellents effets inhibiteurs de l'ordre du nanomolaire avec des valeurs des constantes d'inhibitions comprises entre 6,2 -0,67 nm et qui sont meilleures que celles obtenues avec le composé **50**.

De plus, les effets multivalents de cette particule ont pu être mis en évidence en comparant les résultats d'inhibition avec ceux obtenus avec l'inhibiteur monovalent **50**.

Ainsi, on peut observer une diminution de la constante d'inhibition sur les isoformes hCA I et II, de 142 à 4,4 nm sur l'hCA I et de 48,1 nm à 670 pM pour l'hCA II, ce qui correspond à une amélioration de la puissance inhibitrice de, respectivement, 32 et 72 fois comparé à l'inhibiteur monovalent. Des effets multivalents positifs sont alors mis en évidence avec des puissances relatives par rapport au nombre de ligands (pr/n) égale à 2.7 pour la hCA I et égale à 6 pour la hCA II.

A contrario, aucun effet multivalent n'a été caractérisé dans le cas de hCA IX, avec une puissance relative par rapport au nombre de ligand (pr/n) égale a 1. Pour l'isoforme XII, une augmentation de la puissance inhibitrice globale de 29,8 à 6,2 nM a été observée entre le composé monovalent **50** et le système multivalent **48**. Cependant, cette faible augmentation équivaut à un effet multivalent négatif, puisque la puissance relative d'un inhibiteur de sulfonamide étant plus faible sur la nanoplatforme que seul.

Ces résultats permettent aussi de mettre en évidence la modulation de la sélectivité lors de l'utilisation de la nanoparticule **48**. En effet, l'inhibiteur seul **50** à une plus grande sélectivité envers l'isoforme hCA IX (KI (hCA II) / KI (hCA IX) = 1,25). Alors que quand celui-ci est greffé à la nanoparticule, la sélectivité est modifiée au profit de l'isoforme hCA II (KI (hCA II) / KI (hCA IX) = 0,24).

III.6 Conclusion

Dans cette partie, des nanoparticules de silice hybrides bifonctionnelles, fluorescentes et inhibitrices des anhydrases carboniques, ont été préparées en incorporant des fragments de fluorescéine et de benzènesulfonamide par un procédé sol-gel utilisant les micelles inverses.

L'effet de la multivalence de ces nanoparticules a été mis en évidence sur l'inhibition des isoformes de la CA telles que les *h*CA I et II cytosolique largement distribuées[206] et les *h*CA IX et XII transmembranaire qui sont associées à la tumeur CA IX et XII.[207]

A titre comparatif, des travaux antérieurs faits au sein de l'équipe sur la préparation de nanoparticules d'or fonctionnalisées avec un benzènesulfonamide ont montré d'excellents effets inhibiteurs (K_I = 32 nM sur la *h*CA IX). De plus, des effets multivalents et une sélectivité non négligeable a été démontrée sur la hCA IX associée aux tumeurs.[33]

Pour les nanoparticules de silices synthétisées ici, de meilleures constantes d'inhibition ont été obtenues sur les différentes isoformes de 6,2 à 0,67 nM. Des effets multivalents ont été aussi mis en évidence avec par exemple pour les isoformes cytosoliques

hCA I et II, les constantes d'inhibition ont diminué de 142 à 4,4 nM, pour la *h*CA I, et de 48 à 0,67 nM, pour *h*CA II, ce qui correspond à une amélioration de la puissance inhibitrice de 32 et 72 fois, respectivement, par rapport au système monovalent. Toutefois, des effets multivalents nuls ou négatifs ont été observés sur les isoformes transmembranaires *h*CA IX et XII.

Enfin, la sélectivité s'est inversée aux profits des isoformes cytosoliques (*h*CA I et II) comparés aux nanoparticules d'or qui étaient plus sélectives envers la *h*CA IX.

Cette différence de sélectivité peut provenir du fait que les isoformes cytosoliques *h*CA I et II ont une structure monomérique et que les isoformes transmembranaires *h*CA IX et XII sont dimériques.[208] En effet, le fait que les isoformes transmembranaires soient sous forme de dimères peut nuire à l'accès de l'inhibiteur greffé sur la NPs aux sites actifs dû à des problèmes d'encombrements stérique. *A contrario*, la structure monomérique des isoformes cytosoliques peut faciliter l'accès aux inhibiteurs de la NPs et ainsi favoriser les effets multivalents tel que le clustering.[209]

Enfin, la nanoparticule de silice hybride bifonctionnelle, fluorescent et inhibitrice, peut avoir une application biomédicale intéressante en théranostique, en combinant la thérapie par inhibition de l'anhydrase carbonique et l'imagerie par fluorescence.

IV. Les silsesquioxanes polyédriques

Les oligosilsesquioxanes polyédriques, connus sous l'abréviation POSS pour **P**olyhedral **O**ligomeric **S**il**S**esquioxane, sont constitués d'un cœur inorganique tridimensionnel parfaitement défini composé de silicium et d'oxygène et de groupements organiques en périphéries. Ces composés sont ainsi définis par la formule empirique $(RSiO_{1,5})n$, où R est un hydrogène ou un groupement carboné. Les oligosilsesquioxanes peuvent se présenter sous la forme de structures aléatoires, bidimensionnelles dites « échelle », ou « cage » totalement condensées (Figure 55). [210,211]

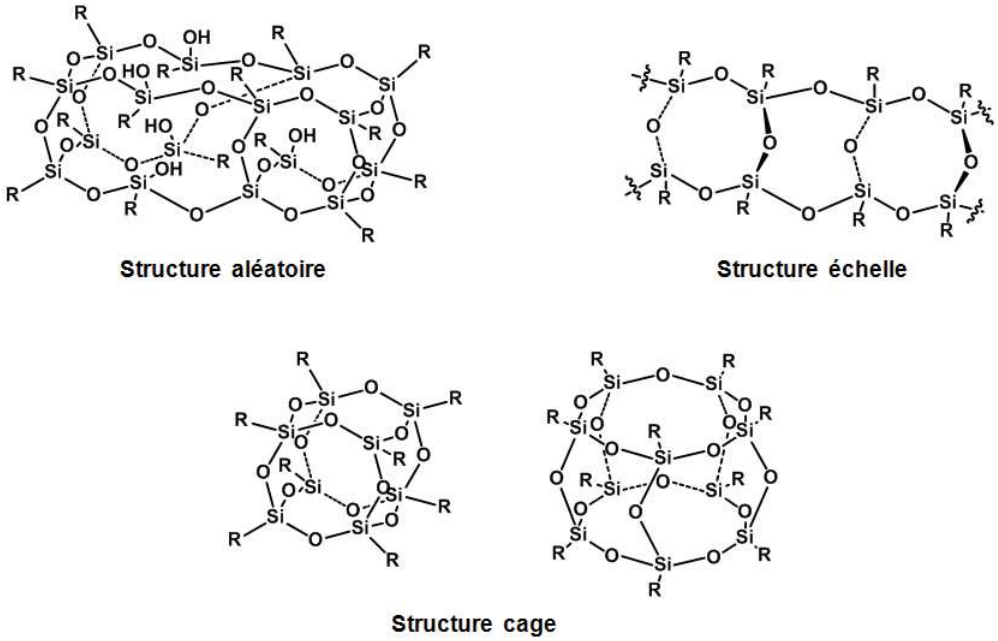


Figure 55 : Différentes structures d'oligosilsesquioxane.

A contrario, des POSS aux structures aléatoires ou en échelles, les POSS possédant l'architecture "cage" ont une structure organisée qui est intéressante pour leurs utilisations pour la multivalence. Avec des répétitions du motifs $(RSiO_{1,5})n$ variables, ou *n* peut être égale à 6, 8, 10, 12, 14, 16 et même 18, ils sont constitués d'atomes de silicium qui occupent les sommets du polyèdre, tandis que les atomes d'oxygène se trouvent au milieu de chaque arête.[210]

Ces cages sont désignées en précisant le type (M, D, T ou Q pour un Si lié à un, deux, trois ou quatre atomes d'oxygène) et le nombre d'atome de silicium de la cage centrale. Ainsi, un POSS constitué de *n* atomes de silicium de type T est désigné T*n*. Par exemple, les POSS dont les huit atomes de silicium sont liés à des atomes d'hydrogène T_8 H (Figure 56).

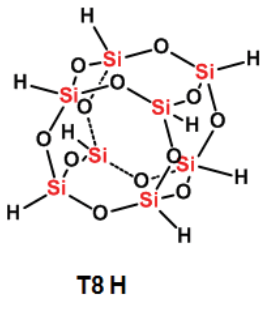


Figure 56 : POSS T_8H.

Les POSS dérivés des cages T_8 sont actuellement les plus étudiés car ils sont les plus faciles à synthétiser contrairement aux autres cages. Leur structures et leurs compositions de type organique-inorganique, leurs confèrent des caractéristiques avantageuses telles qu'une symétrie parfaite, une haute stabilité thermique et une taille nanométrique

d'environ 1 à 3 nm.[212] De plus, ils sont facilement fonctionnalisables et comparé aux nanoparticules de silice sphériques, la valence peut être contrôlée. Enfin, des tests ont permis de mettre en évidence la faible toxicité *in vitro* et *in vivo* du noyau inorganique qui forme la cage.[213]

Pour ces différentes raisons, depuis plus d'une vingtaine d'années les POSS T_8 ont connus un essor dans le développement de nouveaux matériaux poreux, de matériaux à base de polymères ou bien dans le développement de nouveaux électrolytes, ou de liquides ioniques. Plus récemment, les POSS T_8 ont trouvé une application biochimique, avec le développement d'une large gamme de systèmes hybrides utilisés pour le support et la vectorisation de biomolécules mais aussi pour le diagnostic (Figure 57).[214–216]

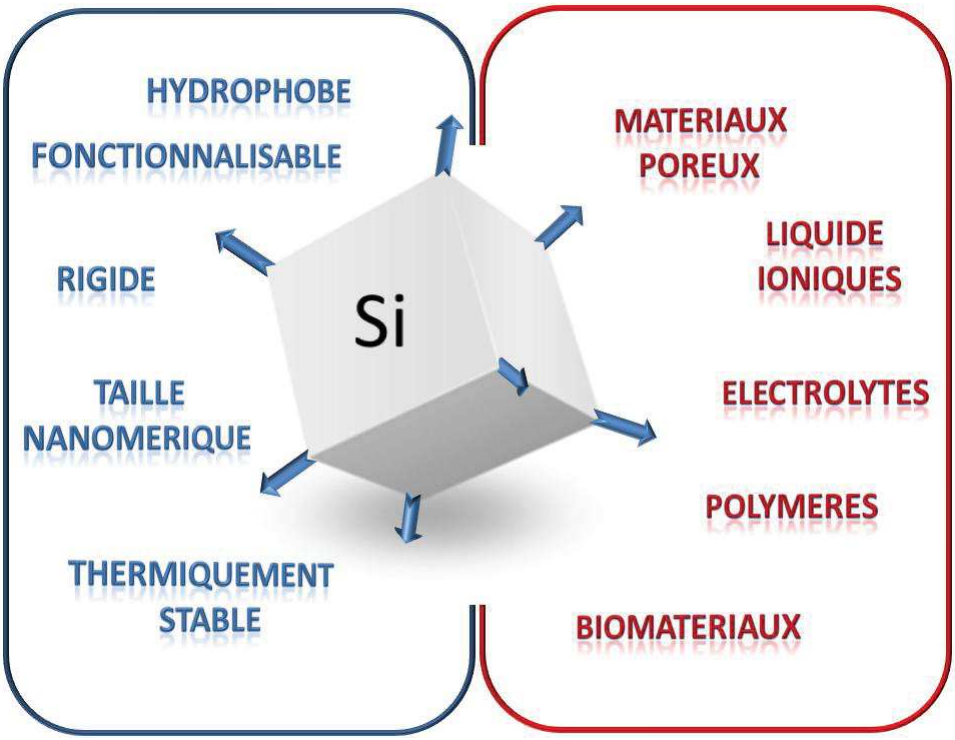


Figure 57 : Diverses propriétés et applications des POSS T_8.

IV.1 Synthèse des POSS T_8

Décrits pour la première fois en 1955 par Sprung et Guenther, [217] la synthèse des POSS T_8 se fait directement par une réaction d'hydrolyse suivie par une condensation de précurseurs de type RSiY3. Ici, Y est un substituant réactif capable d'être hydrolysé puis d'être condensé en milieu acide tel que les halogènes ou bien, le plus souvent, les esters. R peut être est un hydrogène, ou un groupement organique stable, qui n'interfère pas dans les réactions précédemment cités (Schéma 27). Pour la plupart déjà utilisés, R se décline en groupement non réactif tels que les alcanes et les phényles.[218] Il est possible aussi d'utiliser des précurseurs réactifs de type chlorure, amine ou vinyle pour former des cages T_8 permettant, par la suite, de les fonctionnaliser. Cette voie de synthèse permet d'obtenir des POSS T_8 avec huit substituants identiques.

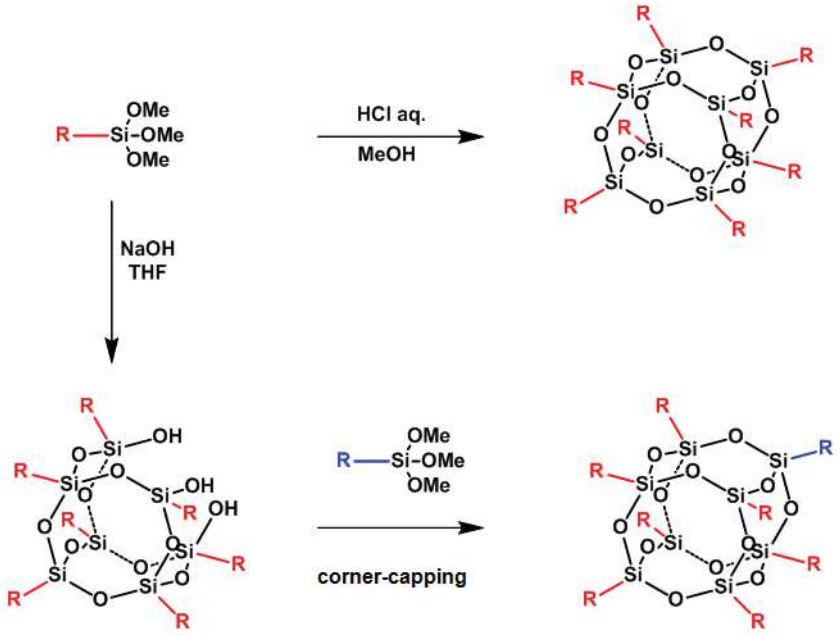


Schéma 27 : Synthèse de POSS T_8 homofonctionnel et hétérofonctionnel.

Plus difficilement, il est possible de former des cages hétérofonctionnelles, par co-hydrolyse et polycondensation de précurseurs possédant des groupements organiques différents.[219] Cependant, cette méthode conduit souvent à un mélange de produits de différentes fonctionnalités qu'il est difficile de purifier.

Enfin, la synthèse de cages monofonctionnalisables a été envisagée et développée pour la première fois par Feher et *coll.*. La stratégie utilisée, nommée *corner-capping*, consiste à fermer le sommet d'une cage T_8 non totalement condensées avec un précurseur portant un groupement organique différent de celui utilisé en début de réaction. Cette approche permet d'obtenir sélectivement des POSS T_8 dotés d'un sommet potentiellement fonctionnalisable. Le *corner-capping* reste, à ce jour, encore très limité car la synthèse de silsesquioxanes non totalement condensés est très longue et n'est possible qu'avec un

nombre restreint de substituants organiques (cyclopentyle, cyclohexyle, iso-butyle et phényle) [218]

IV.2 Fonctionnalisation des POSS T_8

Plusieurs approches existent à ce jour pour la fonctionnalisation de POSS.[218] La plus efficace et la plus simple consiste à fonctionnaliser les groupements organiques réactifs sur une cage T_8 totalement condensés. Pour cela, deux cages commerciales sont généralement utilisées. La première est formée à partir d'un précurseur chloropropyl alkoxysilane et permet de disposer de 8 atomes de chlore, en bout de chaine, potentiellement substituables. Ainsi, à partir du POSS octachloropropyl, il est possible d'introduire par substitution nucléophile des fonctions azides,[220–222] nitriles,[223] thiocyanates,[224] bromures[221] ou bien iodures[224] qui peuvent être modifiées, à leur tour, en alcools ou en acide carboxyliques (Schéma 28).[223]

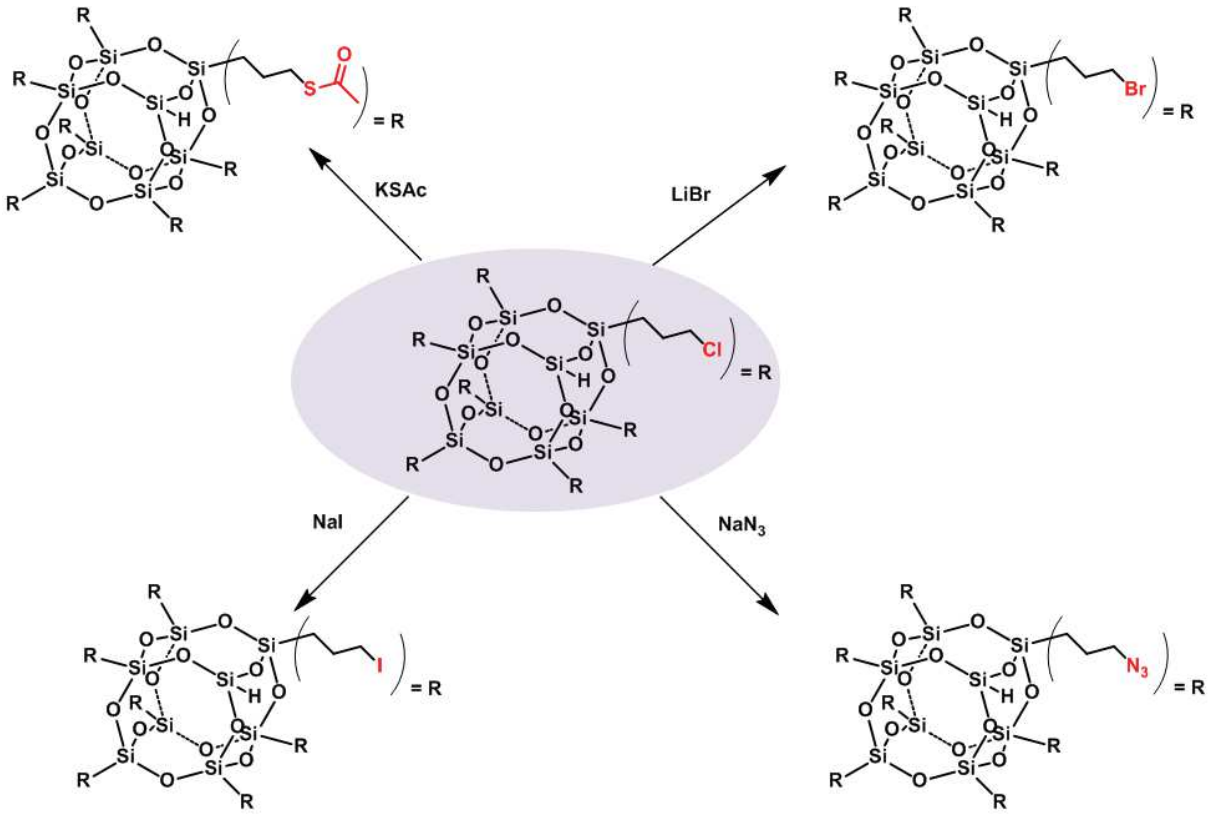


Schéma 28 : Fonctionnalisation du POSS octachloropropyl par substitution nucléophile.

La seconde cage est un POSS octaaminopropyl formé à partir du précurseur aminopropyl alkoxysilane. L'amine en bout de chaine permet, par conversion directe, la fonctionnalisation de la cage en groupements azides,[225,226] carboxylate ou alcène.[211] De plus, la fonction amine donne la possibilité d'exploiter d'autres réactions avec notamment la formation de liaison amides[227] souvent employée dans la chimie des biomolécules (Schéma 29).

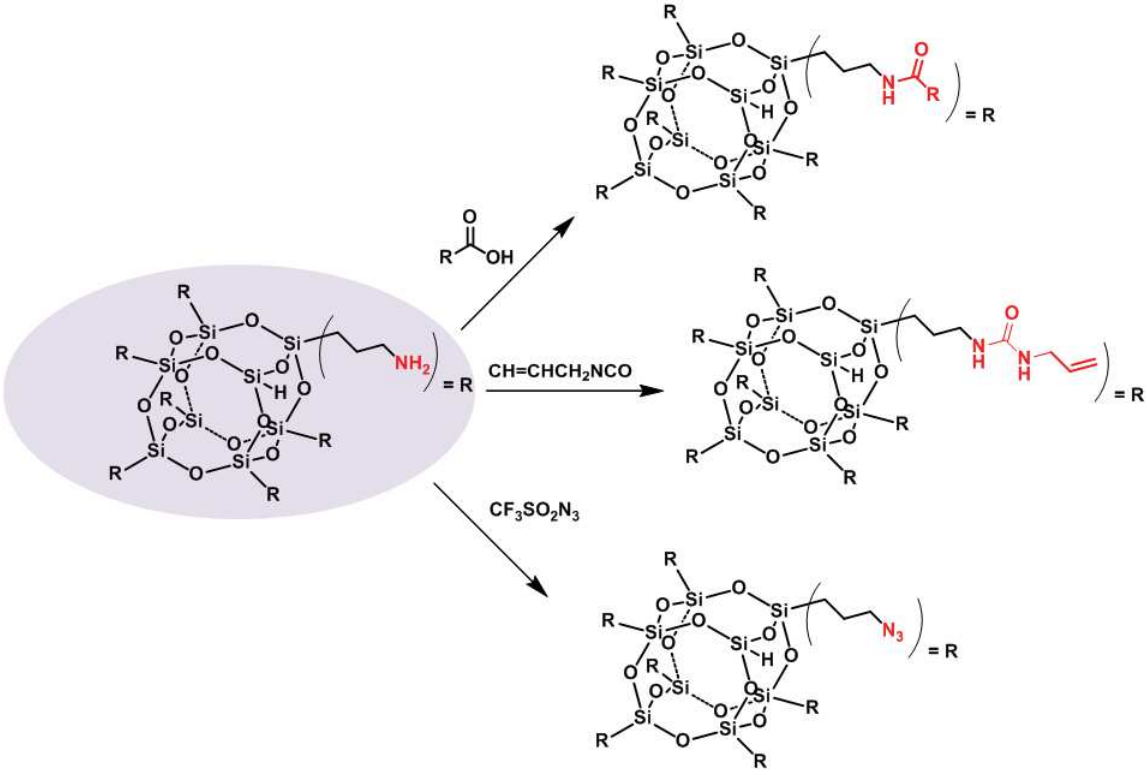


Schéma 29 : Différentes fonctionnalisations du POSS octaaminopropyl.

Enfin, il existe d'autres cages T_8 accessibles qui peuvent être fonctionnalisées mais qui sont encore très peu utilisées. C'est le cas des POSS formés à partir de précurseurs aminophényles qui peuvent être, par la suite, modifiés en azidophényles,[228] carboxyphényles[229] ou en maleimidophényles;[230] mais qui ont l'inconvénient d'être très peu solubles.

IV.3 La bionconjugaison des POSS T_8

Dans le tableau 8 sont référencés les différents travaux de bioconjugaison décrits à partir de POSS T_8.

Type de Bioconjugaison	Fonctionnalisation des POSS utilisés	Rendement	Nombre de substituant	Année	Référence
CuAAC	Octaazidopropyl	76-80%	8	2010	[222,225]
		91%	8		[221]
		100%	1		[221]
	Monoazidophényl	78%	8	2012	[231]
		-	1	2011	[232]
		-	-	2012	[233]
Couplage Thiol-ène	Octavinyl	94-93%	8	2012	[234]
	PEG octallyl	50-79%	8	2012	[234]
Ligation oxime	Octa Boc-aminooxy	90%	8	2012	[227]
		99%	6		
		-	3		
		-	2		

Tableau 8 : Listes des POSS T_8 ayant fait l'œuvre de bioconjugaisons.

Ainsi on retrouve les POSS fonctionnalisés avec un groupement azoture donnant la possibilité de former un lien triazole par cycloaddition azote-alcyne catalysée par le cuivre (CuAAC) ou bien par des dérivés de cyclooctyne.[235] En 2010, Fessner et *coll*. greffent 8 glycosides portant une fonction alcyne avec de hauts rendements de réactions.[222] De la même manière en 2012, Chiara et *coll*. fonctionnalisent par CuAAC un POSS octaazidopropyl avec des α-D-mannopyranoside séparés par un bras polyéthylène glycol (Figure 58).[231]

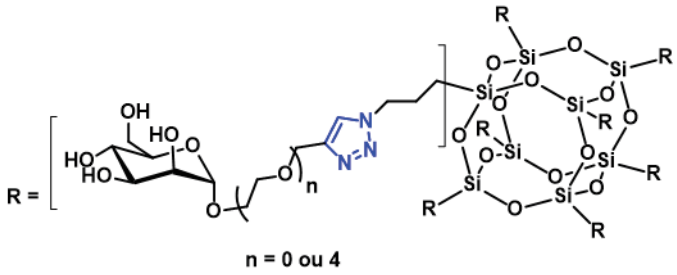


Figure 58 : POSS octaazidopropyl fonctionnalisés par des α-D-mannopyranoside *via* CuAAc.

Ce glycocluster octavalent a été utilisé sur un model de lectine, la *Concanavalin A* (*Con A*) et a permis d'obtenir des affinités 50 fois supérieur comparé à l'utilisation du α-D-mannopyranoside seul.

Au sein du laboratoire, Marra et *coll*. ont lié, cette fois ci par couplage thiol-ène, des résidus *N*-acétyl-glucosamine portant une fonction thiol sur des POSS pegylé portant des alcènes terminaux (Figure 59).[234] Les résultats des tests d'affinité effectués sur la *Con A* ont mis en évidence l'effet multivalent apporté par ce type de composé avec une puissance relative, calculée par nombres d'unités de résidus (pr/n), 10^6 fois supérieures comparées au glycoside seul.

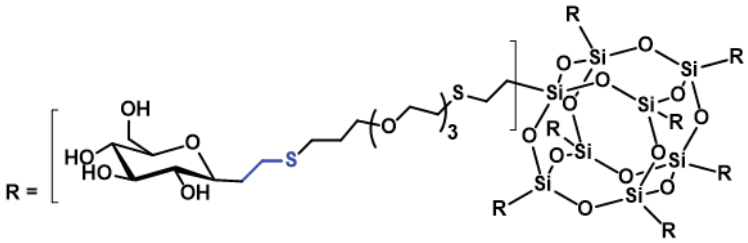


Figure 59 : POSS octavinyl fonctionnalisés par des *N*-acétyl-glucosamine par couplage thiol-ène.

Enfin, la ligation oxime à également fait l'œuvre de travaux rapportés par Kolmar et *coll.* en 2012.[227] Ici, des oligomères peptidiques ayant une fonction glyoxaldéhyde ont été liés à des POSS aminooxy, préalablement préparés à partir du POSS aminopropyl (Figure 60).

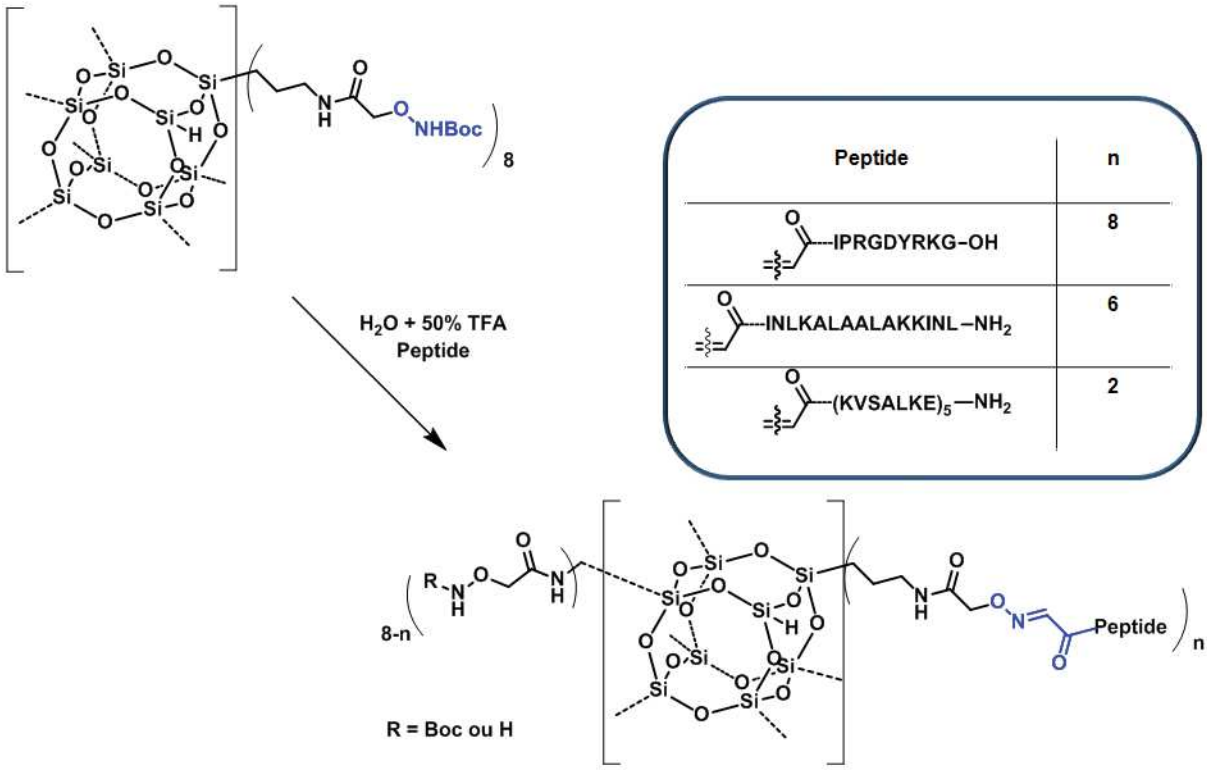


Figure 60 : POSS octaaminooxy fonctionnalisés par des peptides *via* ligation oxime.

L'étude de cette ligation a mis en évidence des problèmes d'encombrement stérique et de répulsion électrostatique. En effet, plus les peptides utilisés sont longs et chargés, plus ils conduisent à des problèmes de fonctionnalisations sur toutes les positions disponibles du POSS aminooxy.

V. Méthodologie de synthèse du POSS T_8 fonctionnalisé par des aldéhydes glyoxyliques

Dans cette partie, l'objectif est de développer un POSS T_8 hautement fonctionnalisable par bioconjugation qui, par la suite, sera utilisé pour lier les inhibiteurs de l'anhydrase carbonique.

Inspiré par les précédents travaux effectués sur les plateformes peptidiques, le choix s'est naturellement porté sur la synthèse de POSS T_8 substitué en bout de chaine, par une fonction aldéhyde glyoxylique afin de pouvoir supporter une ligation oxime ou (acyl)hydrazone.

Dans la littérature, deux POSS T_8 portant des fonctions aldéhydes ont été décrits à ce jour (Figure 61).[236,237]

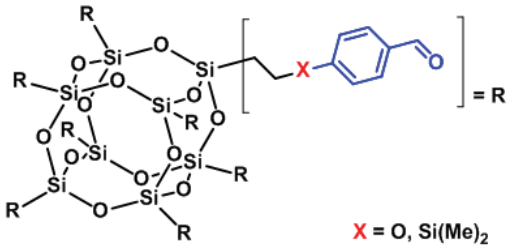


Figure 61 : POSS octabenzaldéhyde.

Malgré des voies de synthèses rapides et efficaces, ces composés présentent l'inconvénient de ne pas être solubles dans l'eau ce qui est un frein pour l'étape de bioconjugaison. De plus, la formation de conjugués hydrazone ou oxime à partir d'aldéhydes de types aromatiques conduit à des composés très peu stables.[80]

Pour répondre à cette problématique, un POSS T_8 est développé pour répondre aux critères permettant la bioconjugaison. Pour cela, une méthodologie de synthèse est mise en place à partir des expériences acquises lors des derniers travaux sur les peptides. Ainsi, un POSS T_8 inédit fonctionnalisé par des aldéhydes glyoxyliques a été synthétisé à partir du POSS T_8 octaamino et d'un dérivé de la *L*-Sérine (Schéma 30).

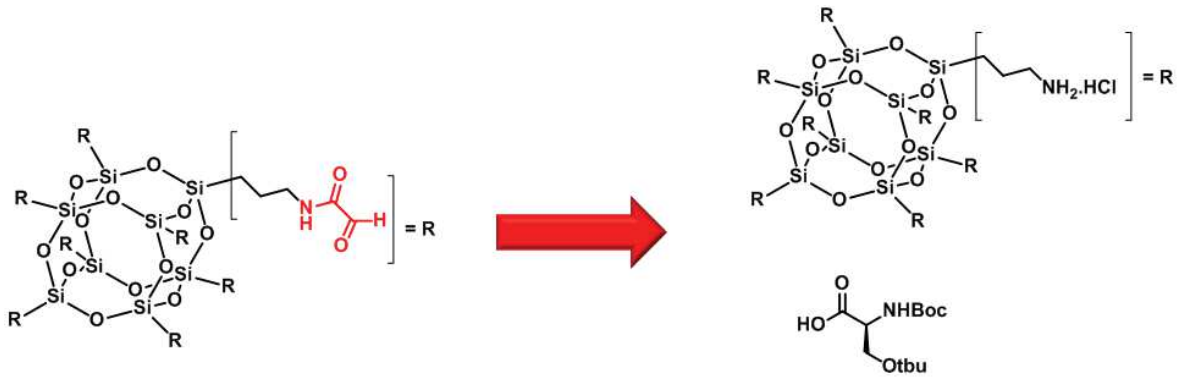


Schéma 30 : Schéma retrosynthétique du POSS T8 portant des fonctions aldéhydes glyoxylique.

V.1 Synthèse du POSS-(Boc-*L*-Ser(O*t*Bu)-OH)$_8$ **52**.

La synthèse du POSS-(Boc-*L*-Ser(O*t*Bu)-OH)$_8$ **52** est realisée en créant un lien amide entre la *L*-Sérine protégée et l'octa(3-aminopropyl)silsesquioxane **51,** qui est commercialisé sous sa forme chlorohydrate. Ce dernier est formé par condensation du précurseurs 3-(aminopropyl)triéthoxysilane en solution dans le méthanol et en présence d'acide chlorhydrique qui joue le rôle de catalyseur (Schéma 31).[238]

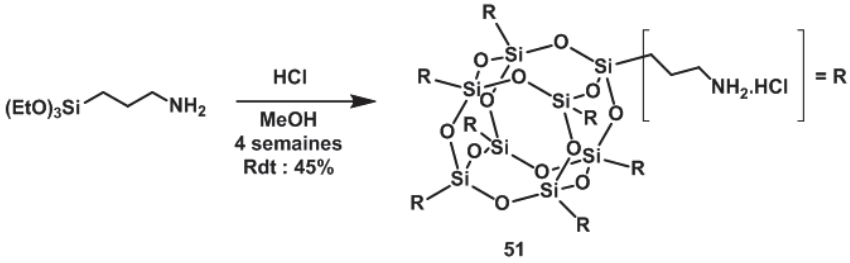


Schéma 31 : Synthèse du POSS octaamino chlorohydrate **51**.

Le POSS octaamino est conservé sous forme de sel car celui-ci est très sensible à l'eau et aux bases. En effet, la formation de l'amine libre, en bout de chaine, peut contribuer à l'ouverture de la cage par une attaque nucléophile, intra ou intermoléculaire, du doublet d'électron libre de l'azote sur l'atome de silicium (Schéma 32).[239]

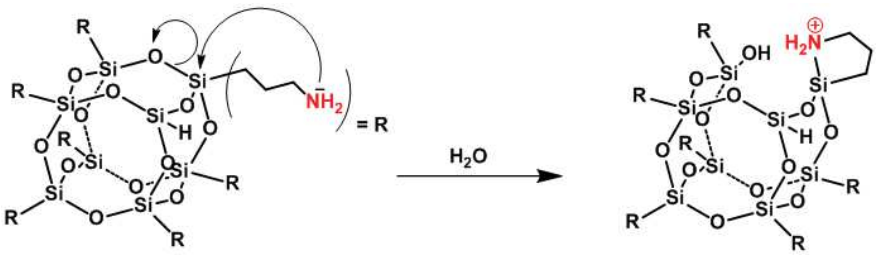
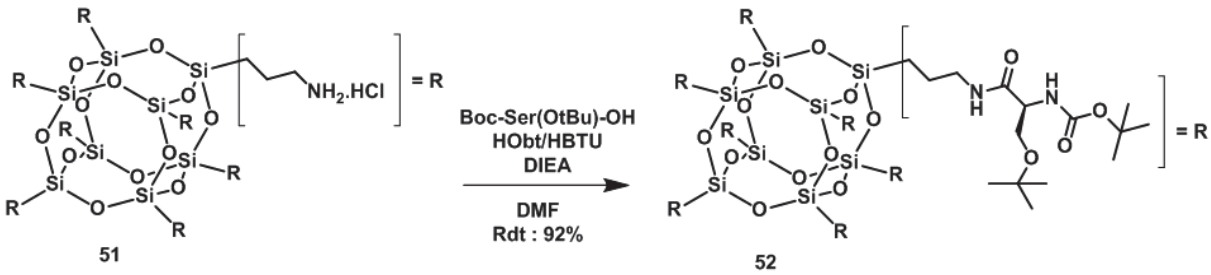


Schéma 32 : Hydrolyse du POSS octaaminopropyl par réaction intramoléculaire.

Le POSS-(Boc-*L*-Ser(O*t*Bu)-OH)$_8$ **52** est formé en couplant la fonction acide carboxylique de la *L*-Sérine protégée à l'amine du POSS **51** (Schéma 33).



51 52

Schéma 33 : Synthèse du POSS-(Boc-*L*-Ser(O*t*Bu)-OH)$_8$ **52**.

La réaction est faite en présence d'agent de couplage dans le DMF anhydre et maintenue sous argon. Afin d'amorcer le couplage, les amines sont libérées par l'ajout d'une base non nucléophile, la diisopropyléthylamine (DIEA). Pour minimiser le risque d'hydrolyse, la base est ajoutée goutte à goutte à 0°C. Enfin, après une heure le milieu réactionnel est laissé sous agitation à température ambiante.

Après une nuit, le solvant est évaporé et l'huile obtenue est solubilisée dans du chloroforme. La solution organique est lavée rapidement avec une solution saturée de bicarbonate de sodium, puis avec une solution d'acide chlorhydrique à 1N et avec une solution saturée de chlorure de sodium. Par la suite, elle est séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée puis concentrée sous vide. Enfin, le POSS-(Boc-*L*-Ser(O*t*Bu)-OH)$_8$ **52** est recristallisé dans l'acétonitrile ce qui permet de l'isoler pur sous forme de solide blanc avec un rendement de 92%.

Le couplage des huit amines avec la *L*-Sérine a été confirmé par RMN du proton (RMN^{1}H) et par analyse de la masse (MALDI-ToF). L'intégrité de la cage est, quant à elle, confirmée par RMN du silicium (RMN^{29}Si) avec un signal à -66,9 ppm. Cet unique signal montre que tous les atomes de silicium ont le même environnement et que le POSS est totalement condensé (Figure 62 et 63).

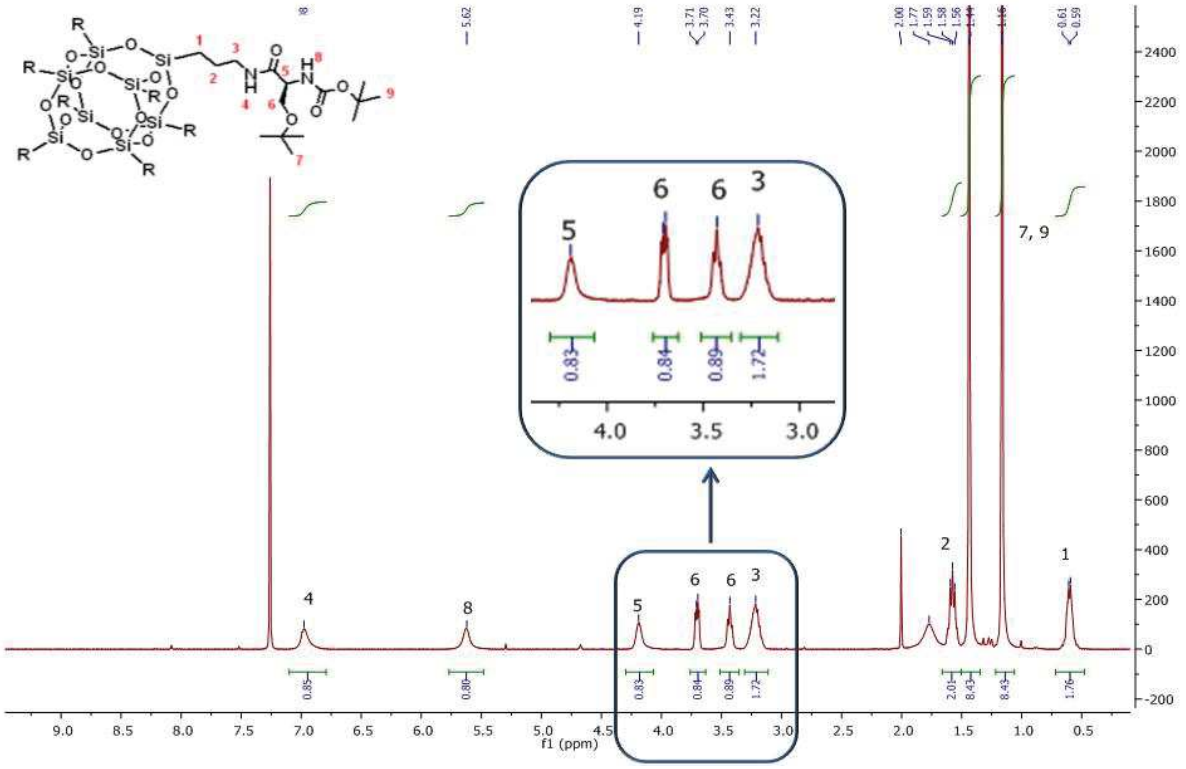


Figure 62 : RMN^{1}H du composé POSS-(Boc-*L*-Ser(O*t*Bu)-OH)$_8$ **52**.

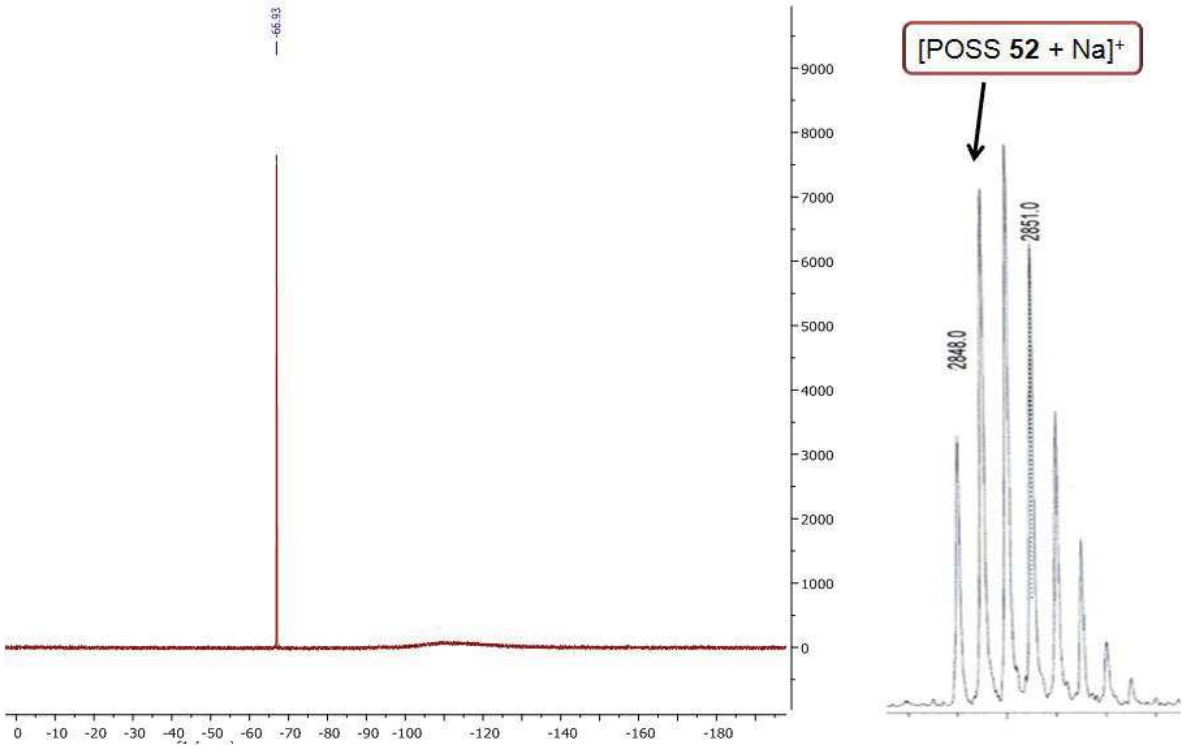


Figure 63 : RMN^{29}Si et MALDI-ToF du composé POSS-(Boc-*L*-Ser(O*t*Bu)-OH)$_8$ **52**.

V.2 Synthèse du POSS-(NH_2-*L*-Ser(OH)-OH)$_8$ **53**

La formation du POSS-(NH_2-*L*-Ser(OH)-OH)$_8$ **53** est issue de la déprotection des groupements *tert*-butyle et *tert*-butyloxycarbonyle des sérines présentes sur le POSS **52** (Schéma 34).

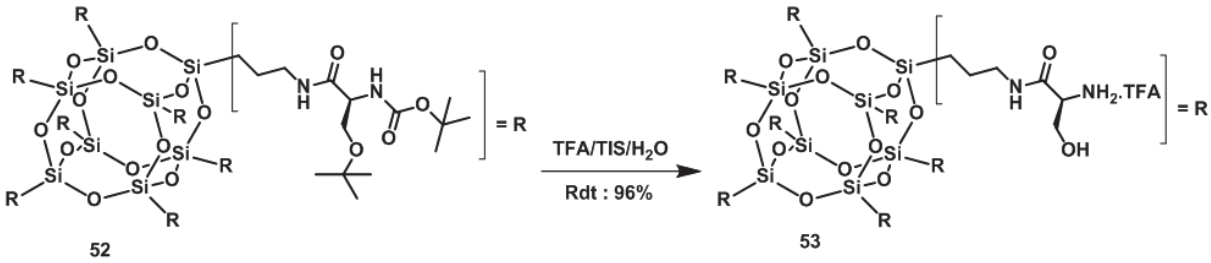


Schéma 34 : Synthèse du POSS-(NH_2-*L*-Ser(OH)-OH)$_8$ **53**.

La réaction se fait dans une solution à 95% d'acide trifluoroacétique, 2,5% d'eau et 2,5% de triisopropylsilane (TFA/TIS/H_2O). Après 4 heures de réaction à température ambiante, le solvant est concentré. Par la suite, l'huile obtenue est aliquotée dans des falcons et le composé est précipité dans de l'éther diéthylique. Enfin, les solutions sont centrifugées et les surnageants sont retirés. Ainsi, le POSS-(NH_2-*L*-Ser(OH)-OH)$_8$ **53** est obtenu sous forme de solide blanc avec un rendement de 96%.

Comme précédemment, la déprotection des huit résidus sérines en bout de chaine est confirmée par analyse par RMN du proton et de la masse. L'intégrité de la cage est aussi vérifiée par RMN du silicium. Le POSS-(NH_2-*L*-Ser(OH)-OH)$_8$ **53** étant très hygroscopique, il est conservé sous argon au congélateur pour éviter toute dégradation de la cage.

V.3 Synthèse du POSS(CHO)$_8$ **54**

L'oxydation des aminoalcools en bout de chaine du POSS-(NH_2-*L*-Ser(OH)-OH)$_8$ **53** est effectuée par le périodate de sodium ($NaIO_4$). Afin de mettre en évidence la neutralité de cet agent oxydant vis-à-vis de la cage, un test préliminaire a été effectué. Pour cela, le POSS octaaminopropyl **51** est mis en solution dans l'oxyde de deutérium (D_2O) en présence de $NaIO_4$, ce qui nous permet de suivre la réaction par RMN. Après analyse par RMN du silicium aucune dégradation du POSS **51** n'a été constatée même après 3 jours.

Par la suite, il a été fait de même avec le POSS-(NH_2-*L*-Ser(OH)-OH)$_8$ **53**. Le POSS(CHO)$_8$ **54** totalement oxydé a été identifié par RMN du proton sous forme d'hydrate. En effet, les analyses montrent bien la disparition des protons correspondants aux aminoalcools du POSS **53** (CH-CH_2), mais aussi l'apparition d'un singulet à 5,2 ppm qui correspond à la formation de l'hydrate (Figure 64).

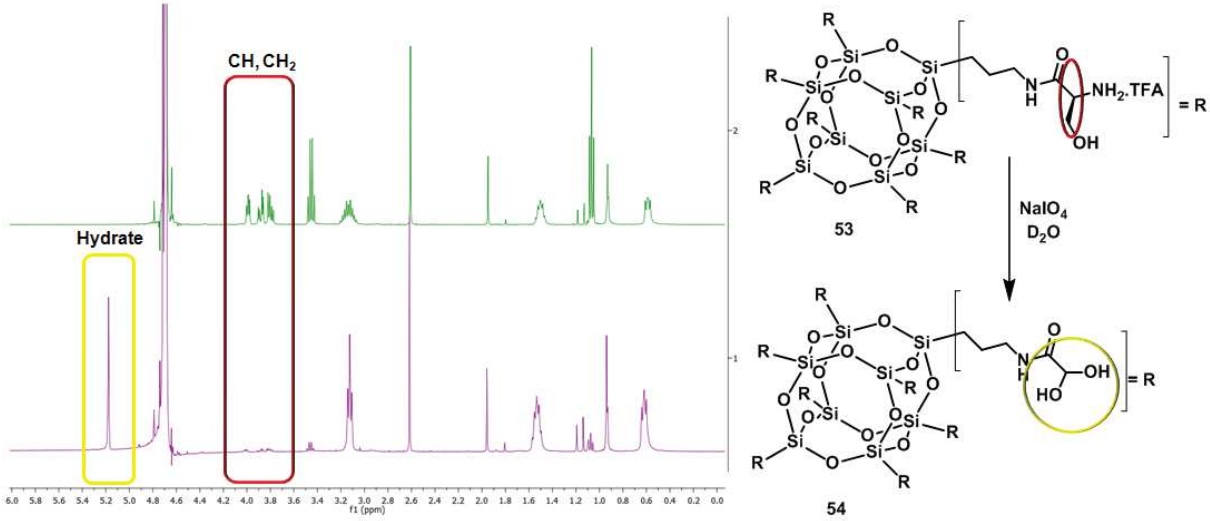


Figure 64 : Suivi par RMN^{1}H de la formation du POSS(CHO)$_8$ **54.**

Encouragé par ces résultats, un test cinétique suivi par RMN du proton, a été engagé afin de déterminer les meilleures conditions expérimentales pour la réaction d'oxydation. Différents tests ont été effectués en faisant varier la concentration de la réaction mais aussi le nombre d'équivalent de $NaIO_4$ (Tableau 9).

Concentration (mM)	Nombre équivalent de $NaIO_4$	Temps de réaction	Observation
	8	-	Non totale
1	8,8	>48 heures	Totale
	12	>48 heures	Totale
	8	-	Non totale
10	8,8	3 heures	Totale
	12	3 heures	Totale
	8	-	Non totale
50	8,8	<1 heure	Apparition d'un précipité
	12	<1 heure	Apparition d'un précipité

Tableau 9 : Influence de la concentration et de la quantité de $NaIO_4$ sur l'oxydation du POSS-(NH_2-Ser(OH)-OH)$_8$ **53**.

Les meilleurs résultats ont été observés à une concentration de 10 mM du POSS-(NH_2-*L*-Ser(OH)-OH)$_8$ **53** en solution dans le D_2O. En effet, l'oxydation est réalisée en seulement 3 heures à partir 8,8 et 12 équivalents de $NaIO_4$ (ce qui correspond à 1,1 et 1,5 équivalents par position). A 1 mM, les réactions d'oxydation sont très lentes et à 50 mM l'apparition d'un précipité non identifié est observée. Ainsi, pour la suite les conditions expérimentales utilisées seront de 10 mM de POSS-(NH_2-*L*-Ser(OH)-OH)$_8$ **53** dans l'eau en présence de 8,8 équivalents de $NaIO_4$.

Il est à noter que, les différents échantillons ont également été analysés en RMN^{29}Si toujours pour confirmer l'intégrité de la cage. Seul un faible signal correspondant aux cages non hydrolysées a été obtenus ce qui ne permet pas à ce stade de confirmer s'il y a présence d'une partie hydrolysée. La mauvaise qualité des signaux peut être due aux faibles concentrations ou même à la présence des sels, au sein du milieu réactionnel, qui empêchent une relaxation optimale de l'atome de silicium.

V.4 Purification du POSS(CHO)$_8$ **54**

- Purification sur colonne liquide en phase inverse

Souvent très polaires, les systèmes hautement fonctionnalisés avec des aldéhydes glyoxyliques sont généralement purifiés par chromatographie liquide en phase inverse afin d'éliminer l'excédant de $NaIO_4$. Le premier objectif est donc d'analyser, d'identifier et de déterminer le temps de rétention du composé formé. Pour cela, un échantillon du milieu réactionnel est injecté en LC/MS (Figure 65).

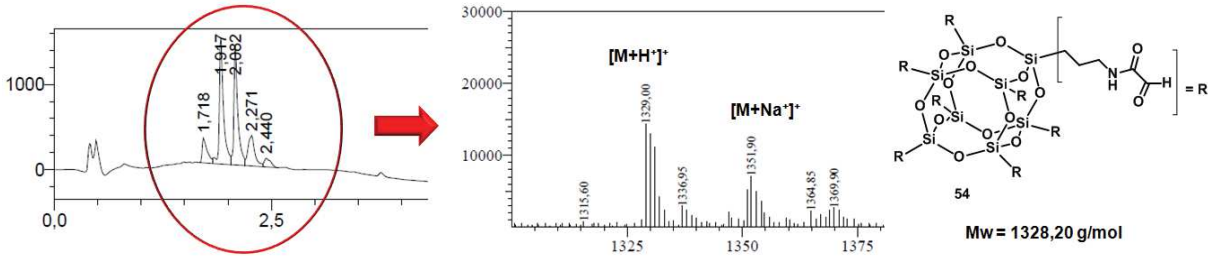


Figure 65 : Analyse LC/MS du milieu réactionnel après oxydation.

Le POSS(CHO)$_8$ **54** est faiblement observable en UV-visible, cependant à une longueur d'onde égale à 194 nm, on peut observer 5 signaux très proches entre 1,7 et 2,4 minutes sur un temps d'élution de 10 minutes. Le spectre de masse correspondant à ces temps de rétention a été intégré et a permis de détecter les adduits [POSS **54** +H]$^+$ et le [POSS **54** +Na]$^+$ correspondant au POSS(CHO)$_8$ **54**.

Le massif identifié a été isolé par chromatographie en phase inverse dans les mêmes conditions utilisées pour l'injection en LC/MS (éluant A : H_2O + 0.1% TFA, éluant B : acétonitrile). Les fractions récoltées sont alors rassemblées puis lyophilisées. Il est alors obtenu un solide blanc qui est analysé par RMN du ^{1}H et du ^{29}Si.

La RMN^{1}H, qui est identique à celles obtenues précédemment lors des différents tests d'oxydation, permet de confirmer que les chaines organiques du POSS **54** sont toujours présentes. L'analyse RMN^{29}Si montre aussi que la cage POSS **54** est présente ce qui confirme les analyses de masses faites au préalable. Cependant, on observe aussi beaucoup d'hydrolyse partielle voir totale de la cage (Figure 66).

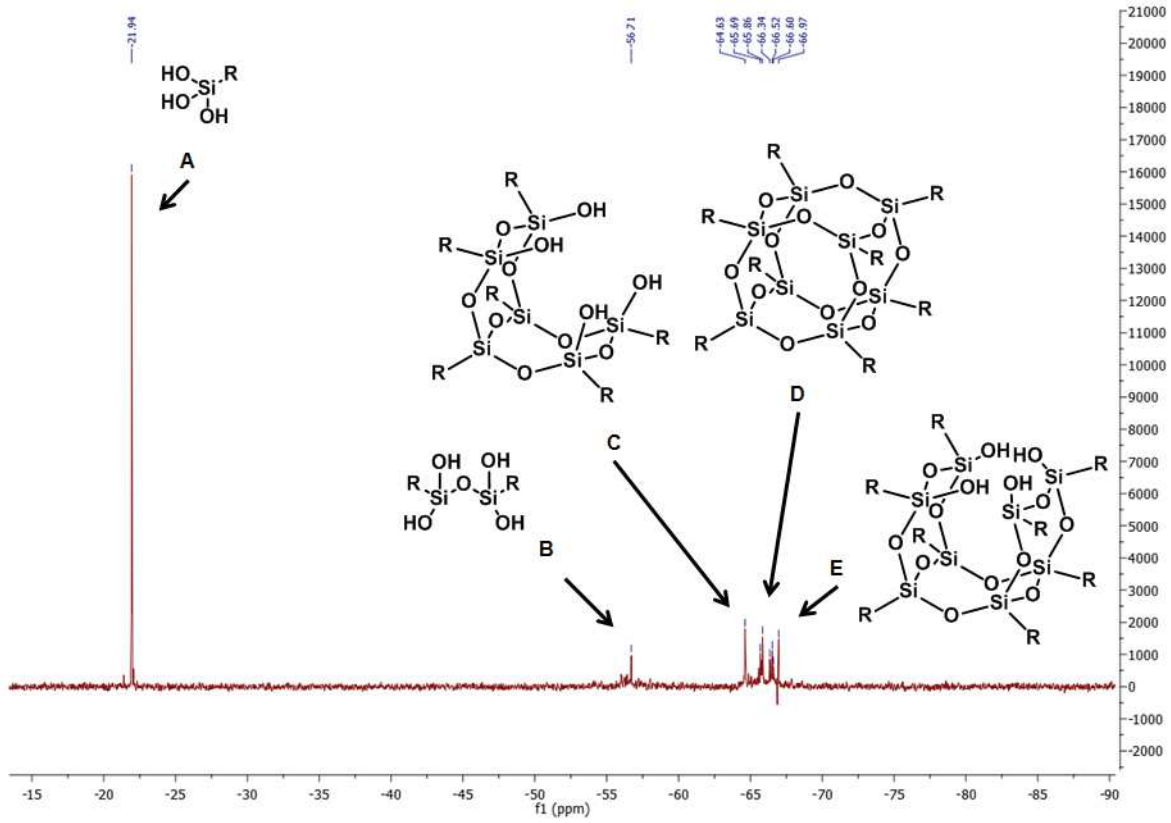


Figure 66 : Analyse RMN^{29}Si du POSS(CHO)$_8$ **54** après purification par chromatographie liquide en phase inverse.

L'hydrolyse de la cage a pu potentiellement avoir eu lieu lors de l'élution du composé sur la colonne chromatographique, malgré les conditions acides utilisées, ou lors de la lyophilisation.

Pour retirer le doute sur la dernière hypothèse formulée, après oxydation du POSS-(NH$_2$-Ser(OH)-OH)$_8$ **53**, le milieu réactionnel est directement lyophilisé et le brut obtenu est repris dans le D$_2$O et analysé en RMN^{29}Si (Figure 67).

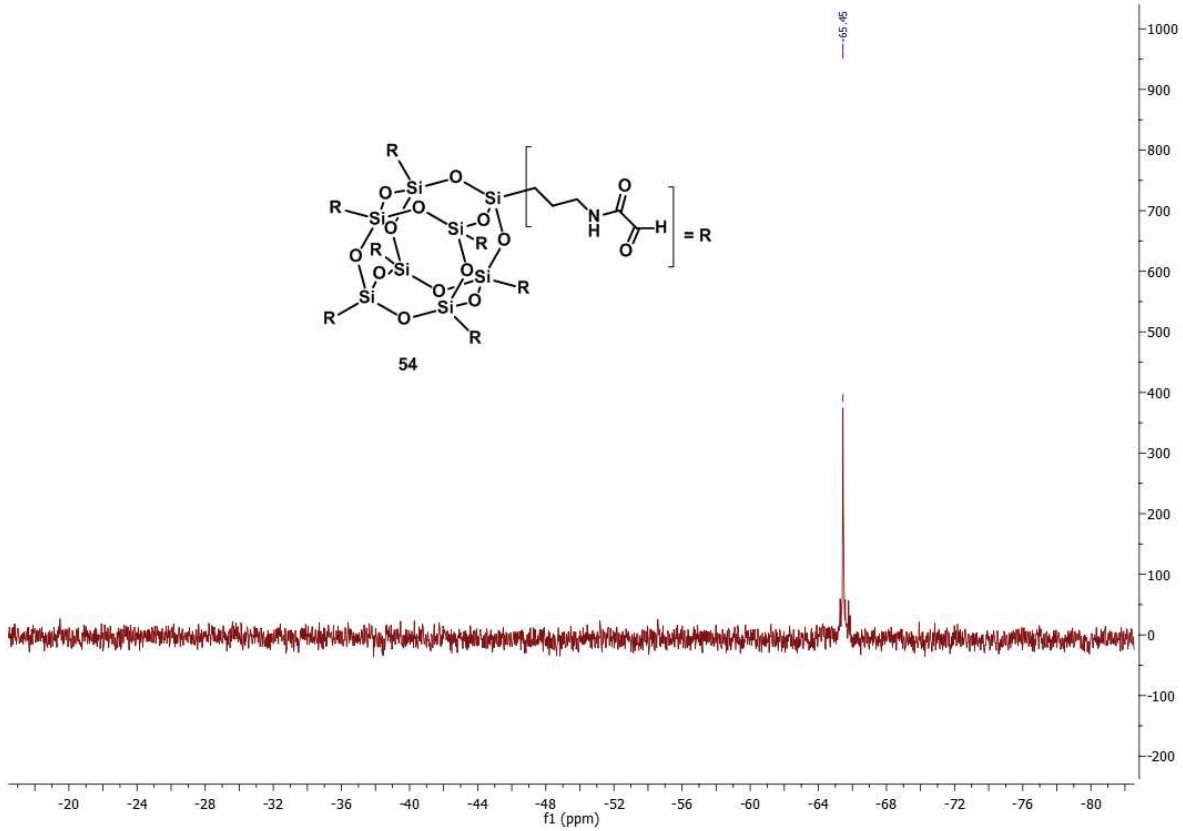


Figure 67 : Analyse RMN^{29}Si du milieu réactionnel après oxydation et lyophilisation.

L'analyse montre clairement un seul signal à -65,45 ppm qui met en évidence la présence du POSS(CHO)$_8$ **54** totalement condensé et aucun produit d'hydrolyse n'est observé. L'hydrolyse proviendrait alors de l'élution du composé sur la colonne chromatographique. Pour mettre en évidence ce phénomène des échantillons de cages totalement condensées précédemment obtenues, le POSS-(Boc-*L*-Ser(O*t*Bu)-OH)$_8$ **52** et le POSS-(NH$_2$-*L*-Ser(OH)-OH)$_8$ **53**, ont été injectées en HPLC dans les mêmes conditions utilisées en LC/MS (Figure 68).

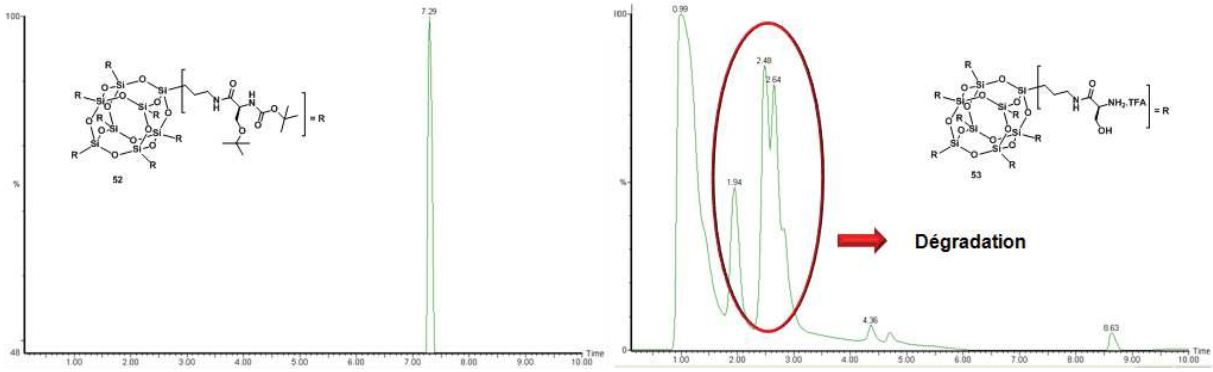


Figure 68 : Chromatogrammes UV des POSS-(Boc-*L*-Ser(O*t*Bu)-OH)$_8$ **52** et POSS-(NH$_2$-*L*-Ser(OH)-OH)$_8$ **53** injectés en HPLC.

Les chromatogrammes UV montrent un seul pic bien défini pour l'injection du POSS **52** *a contrario* du POSS **53** ou plusieurs pics apparaissent dans un même massif. Ayant le même profil UV que le POSS **54**, cela laisserait penser que le POSS **53** s'hydrolyse aussi sur la colonne chromatographique. Ainsi le POSS-(Boc-*L*-Ser(O*t*Bu)-OH)$_8$ **52,** qui ne comporte aucune fonction potentiellement réactive, ne s'hydrolyse pas lors de l'élution contrairement au POSS-(NH_2-*L*-Ser(OH)-OH)$_8$ **53** et au POSS(CHO)$_8$ **54** qui s'hydrolysent, sans doute, à cause de leurs fonctions réactives. Cette réactivité peut être augmentée lors des nombreuses interactions faites sur la colonne.

- Extraction solide-liquide

L'extraction solide-liquide consiste à extraire un composé présent dans un solide à partir d'un liquide. Cette technique est utilisée ici pour essayer d'isoler le POSS(CHO)$_8$ **54**. L'objectif est donc de trouver un solvant capable de solubiliser le POSS **54** et non le $NaIO_4$ et les sous produits issus de la réduction ($NaIO_3$). L'inverse ne peut être envisagé puisque le $NaIO_4$ est un sel qui est soluble seulement dans l'eau et certain alcool. En effet, le POSS **54** est soluble dans l'eau et les alcools ne peuvent être utilisés puisqu'en contact des aldéhydes glyoxylique il y a formation des acétals correspondants ce qui peut, par la suite, empêcher les ligations.

Après la réaction d'oxydation, le milieu réactionnel est lyophilisé afin d'obtenir un solide. Par la suite, l'extraction solide-liquide a été faite sur le brut obtenu avec de nombreux solvants organiques (acétate d'éthyle, acétone, acétonitrile, benzène chloroforme, dichlorométhane, cyclohexane, éther diéthylique, diméthylformamide, diméthylsulfoxide, dioxane, tétrahydrofurane, toluène, etc…). Même à reflux, aucun des solvants utilisés n'a été capable de solubiliser le POSS **54**. Des acides, tels que le TFA, l'acide acétique et formique, ont également été utilisés sans donner satisfaction.

Ainsi, par élimination le POSS(CHO)$_8$ **54** ne peut être soluble que dans l'eau. Ceci est un très bon point pour son utilisation comme plateforme multivalente dédiée à la bioconjugaison. Cependant, ce fort caractère hydrophile ne permet pas d'utiliser l'extraction solide-liquide pour l'isoler.

- Dessalage

Le dessalage est souvent utilisé dans le domaine de la biologie et permet d'éliminer les sels contenus dans une solution.

1. Les résines échangeuses d'ions.

La première méthode consiste à utiliser des billes de résines échangeuses d'ions afin d'éliminer les sels de $NaIO_4$. Le principe consiste à éliminer les ions contenus dans une solution par absorption sur une résine. Les ions absorbés vont remplacer d'autres ions qui

étaient présents sur la résine et qui vont être libérés dans la solution. Le choix de la résine s'est fait sur un mélange (*Mixed beads resins*) de résines échangeuses de cations (sous forme H^+) afin de capter le sodium (Na^+) et de résines échangeuses d'anions (sous forme HO^-) pour piéger les anions IO_4^-. Ces ions vont donc être éliminés et remplacés par de l'eau (Figure 69).

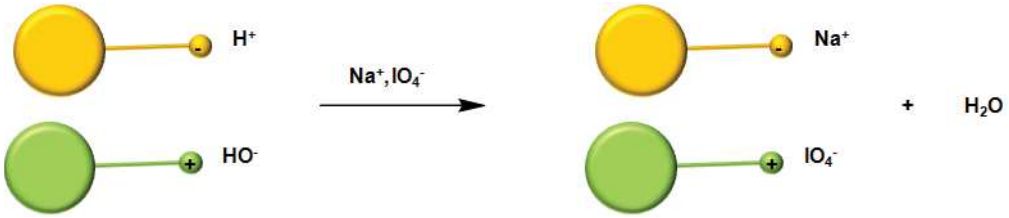


Figure 69 : Principe des résines échangeuses d'ions.

Après oxydation, les billes de résines sont directement introduites dans le milieu réactionnel par ajout successif jusqu'à ce que la solution atteigne un pH égal à 5. Par la suite, la solution est simplement filtrée puis lyophilisée. L'analyse du solide obtenu par RMN^{29}Si montre une hydrolyse partielle de la cage du $POSS(CHO)_8$ **54**. L'hydrolyse peut potentiellement provenir lors de la libération des ions hydroxyles qui peuvent par la suite attaquer la cage.

2. La chromatographie d'exclusion stérique.

D'autres procédés applicables au dessalage d'une solution existent et, pour la plupart, ont le point commun d'être basés sur la séparation des différents composés contenus dans une solution, en fonction de leur poids moléculaire.

La chromatographie d'exclusion stérique est l'une des possibilités. Cette technique utilise des billes de résine poreuses qui vont retarder l'élution des petites molécules, celles-ci vont s'introduire dans les pores, et *a contrario* laisser passer les molécules à plus haut poids moléculaire (Figure 70).

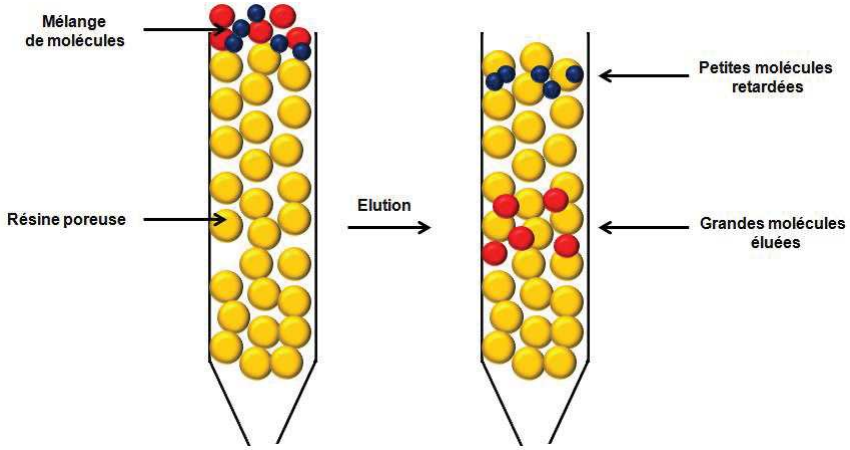


Figure 70 : Principe de la chromatographie d'exclusion stérique.

Le choix de la résine et les dimensions des pores sont intrinsèquement liés à la taille des molécules que l'on veut séparer. Ainsi, pour retarder l'élution des sels de $NaIO_4$ (Mw = 213,9 g/mol) dans notre cas, une résine Sephadex G10 est employée. Composée de polysaccharide avec des pores d'environs 100 à 300 µm, cette résine permet de piéger les molécules ayant un poids moléculaire inférieur à 700 g/mol.

Après la réaction d'oxydation, le milieu réactionnel est directement déposé sur la colonne d'exclusion stérique préalablement préparée avec la Sephadex. Par la suite, l'élution est effectuée avec 100% d'eau et la fraction récoltée est lyophilisée. Après analyse en RMN^{29}Si du solide obtenu, tout comme après la purification par chromatographie liquide en phase inverse, une hydrolyse partielle à totale de la cage POSS **54** est observée.

3. La dialyse.

La dialyse à également été utilisée pour essayer de retirer les sels de $NaIO_4$ présent dans la solution d'oxydation. Ce procédé permet de séparer à l'aide d'une membrane poreuse des molécules ou des ions en solution. Comme précédemment, la taille des pores de la membrane est choisie en fonction de la taille des molécules que l'on veut laisser passer. Le principe consiste à remplir une poche de membrane avec une solution composée d'un mélange de molécules ou d'ions. Puis la membrane est mise en suspension dans un solvant (en générale de l'eau). Par gradient de concentration les ions et les molécules, qui sont de plus petites tailles que les pores, vont traverser la membrane et passer dans le solvant extérieur jusqu'à ce que leurs concentrations soient égales de part et autre de la membrane (effet osmotique). Les grosses molécules, quant à elles, restent piégées dans la membrane (Figure 71).

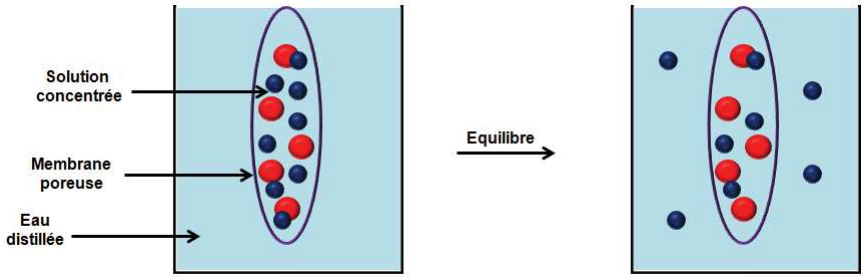


Figure 71 : Principe de la dialyse.

L'élimination totale des petites molécules ou des ions se fait en changeant plusieurs fois le solvant extérieur. L'avantage de cette méthode est que la concentration des grosses molécules reste constante tout au long du processus.

Le choix de la membrane pour isoler le POSS$(CHO)_8$ **54** s'est porté sur une membrane de cellulose avec une taille de limite d'exclusion de pores entre 100 à 500 g/mol. Le milieu réactionnel, contenant le POSS **54** et le $NaIO_4$ en solution dans l'eau, est introduit dans la membrane. Celle–ci est par la suite plongée dans un volume d'eau distillée 50 fois supérieur au volume de la réaction. La solution est laissée sous agitation à température ambiante

durant 48 heures. Durant cette période l'eau distillée est changée 4 fois. A la fin du processus, la solution à l'intérieur de la membrane est récupérée puis lyophilisée. L'analyse RMN^{1}H montre que les huit positions ont bien été oxydées et que les aldéhydes sont sous forme d'hydrate (hydrate à 5,2 ppm du à la présence d'eau dans le D_2O). L'analyse par RMN^{29}Si montre que le POSS(CHO)$_8$ **54** (signal à -65,4 ppm) est totalement condensé et que la dialyse n'a pas affectée la cage. Les résultats par Maldi-Tof viennent renforcer les analyses précédentes par la détection de l'adduit [POSS **54** + H_2O + Na]$^+$. L'adduit correspond à la forme aldéhyde du POSS **54** contrairement à l'analyse RMN^{1}H.

Différentes méthodes de purification ont été utilisées afin de séparer le POSS(CHO)$_8$ **54** de l'excédant de $NaIO_4$. La chromatographie liquide en phase inverse et d'exclusion stérique ont conduit à l'hydrolyse de la cage. Il en a été de même avec l'utilisation des billes de résine échangeuse d'ions. L'extraction solide-liquide n'a également pas donné de résultats concluants mais a permis de mettre en avant la haute solubilité du POSS **54** dans l'eau, ce qui est un très bon point pour sa future utilisation comme système multivalent dédié à la bioconjugaison. Enfin, seule la dialyse s'est avérée être la méthode la plus efficace et la plus inerte vis-à-vis de l'intégrité de la cage du POSS **54**. Malgré un processus soit long, la dialyse a permis d'isoler le POSS(CHO)$_8$ **54** sous forme de solide amorphe très hygroscopique avec un très bon rendement de 94% après oxydation des huit sites.

V.5 Analyse physico-chimique.

- Infrarouge

L'intégrité des cages précédemment synthétisées peut être confirmée par spectroscopie infrarouge. En effet, une bande de vibration caractéristique des POSS T_8 totalement condensés peut être observée aux alentours de 1100 cm^{-1} qui correspond à la bande de vibration de valence de la liaison Si-O-Si.

L'analyse infrarouge du solide a été faite sur les trois POSS T_8 précédemment obtenus. Ainsi pour le POSS-(Boc-*L*-Ser(O*t*Bu)-OH)$_8$ **52**, on trouve bien la bande de vibration caractéristique des liaisons Si-O-Si à 1111 cm^{-1}. Celle-ci nous montre aussi, la liaison amide formée entre le POSS octaaminopropyl et le dérivé de la *L*-Sérine avec la bande de vibration à 1646 cm^{-1}, qui correspond au carbonyle de la liaison amide, la bande de vibration à 1713 cm^{-1}, qui correspond au carbonyle de la protection carbamate portée par la Sérine (Figure 72).

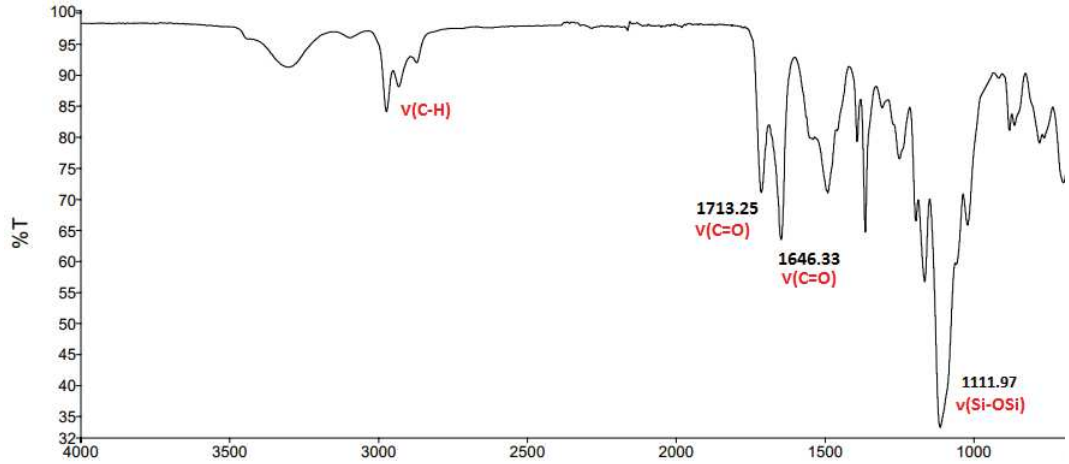


Figure 72 : Spectre infrarouge du POSS-(Boc-*L*-Ser(O*t*Bu)-OH)$_8$ **52**.

En ce qui concerne le POSS-(NH_2-*L*-Ser(OH)-OH)$_8$ **53** la bande de vibration de la liaison Si-O-Si est observée à 1103 cm^{-1}. On observe aussi la disparition de la bande de vibration du carbonyle de la fonction carbamate au profit de l'apparition de l'alcool avec une bande de vibration à 3295 cm^{-1} (Figure 73).

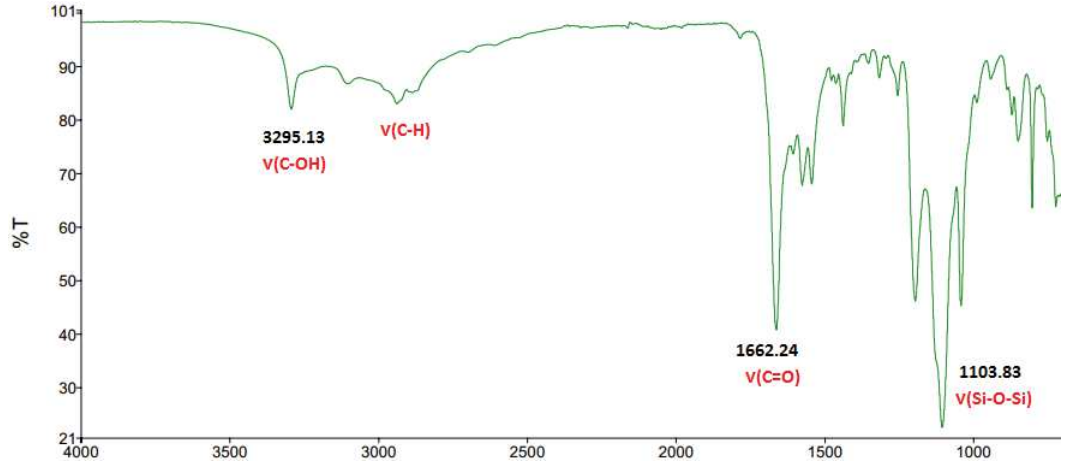


Figure 73 : Spectre infrarouge du POSS-(NH_2-*L*-Ser(OH)-OH)$_8$ **53**.

Enfin, le POSS(CHO)$_8$ **54** étant amorphe et très hygroscopique l'analyse a été faite par dépôt du POSS **54** en solution dans l'eau puis évaporation du solvant. Le spectre infrarouge montre également la liaison Si-O-Si à 1088 cm^{-1}. On observe aussi la forme hydratée du POSS **54** avec la bande de vibration à 3290 cm^{-1} liée à la liaison O-H (Figure 74).

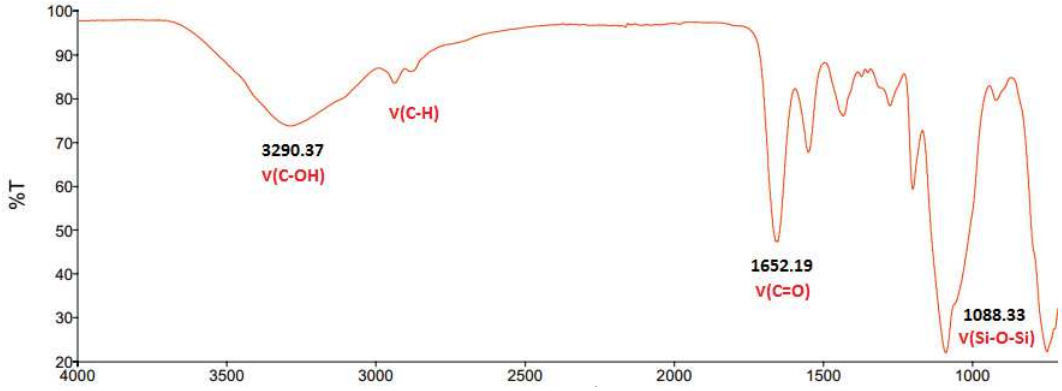


Figure 74 : Spectre infrarouge du POSS(CHO)$_8$ **54**.

- Analyse thermogravimétrique (ATG)

Les POSS sont considérés comme des composés très stables thermiquement avec une empreinte de décomposition très spécifique. En effet, la dégradation de ce type de composé se fait tout d'abord, par la décomposition des groupements organiques qui le compose puis s'ensuit la dégradation de la cage inorganique jusqu'à former le résidu SiO_2.
Ce phénomène peut être suivi par analyse thermogravimétrique (ATG). C'est une analyse thermique qui permet de mesurer la variation de la masse d'un échantillon en fonction du temps à une température donnée. Les analyses ont été réalisées sous flux d'air avec des températures allant de 25 à 850°C (Figure 75).

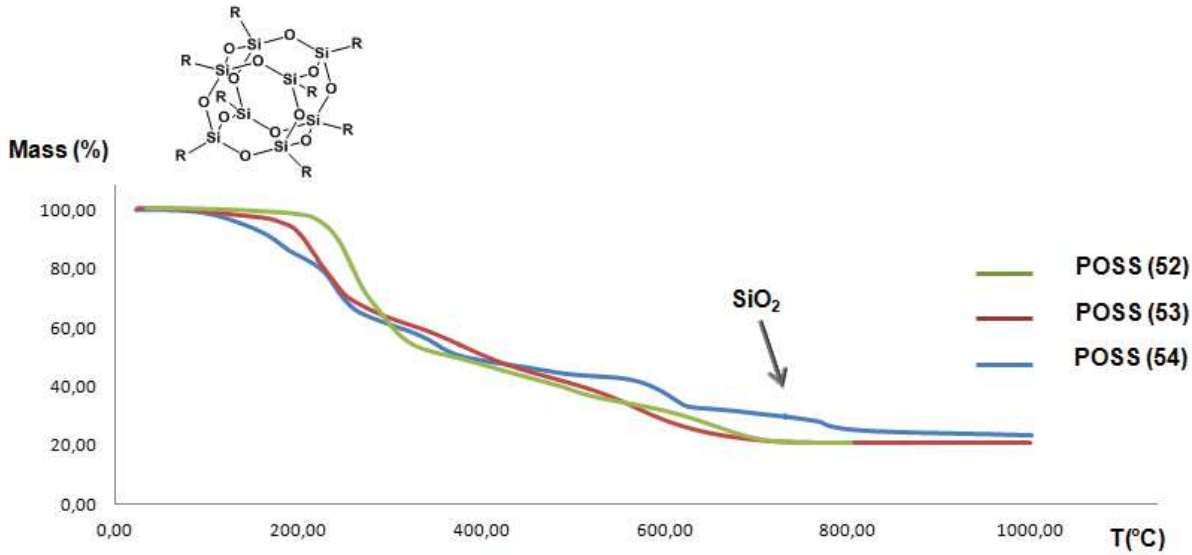


Figure 75 : Courbes (pourcentage massique en fonction de la température) des ATG des POSS **52**, **53** et **54**.

Les résultats obtenus ont été reportés dans le tableau 10 avec les températures de décompositions de chaque composé et les valeurs en pourcentage de perte de masse. Ainsi, la perte de masse assignée aux groupements organiques sont de 82 % pour le POSS-(Boc-Ser(O*t*Bu)-OH)$_8$ **52**, de 80% pour le POSS-(NH_2-*L*-Ser(OH)-OH)$_8$ **53** et de 75% pour le

POSS(CHO)$_8$ **54**. Ces valeurs mettent en évidence encore une fois l'intégrité des cages et leur pureté avec des pourcentages de marge d'erreur entre la perte de masse expérimentale et calculée inférieure à 2%.

Produit	Mw (g/mol)	Température de décomposition (C) (*)	Perte de masse en (%)		Marge d'erreur (%)
			Exp.	Calc. (**)	
POSS(**52**)	2825	217	82	83	1.2
POSS(**53**)	2488	202	80	81	1.2
POSS(**54**)	1328	156	75	76	1.3

(*) La température de début de dégradation est prise à 5% de perte de masse

(**) La perte de masse est calculée en considérant le SiO_2 comme résidu final.

Tableau 10 : Résultats de l'ATG des POSS **52**, **53** et **54**.

V.6 Ligation

En parallèle de la purification du POSS(CHO)$_8$ **54** portant les fonctions aldéhydes glyoxyliques, des tests de ligation en un seul pot, oxydation puis ligation, ont été effectués. Afin de mettre en place la méthodologie, la méthoxyamine a été choisi comme ligand. Ainsi, l'oxydation du POSS-(NH$_2$-*L*-Ser(OH)-OH)$_8$ **53** est effectuée directement dans une solution d'eau avec 0,1% de TFA qui permet la formation de la liaison oxime. Après 3 heures de réaction, suite à l'oxydation, du bisulfite de sodium ($NaSO_3H$) est ajouté au milieu réactionnel permettant la réduction et donc la neutralisation de l'excédant de $NaIO_4$ utilisé. Il est important de neutraliser le $NaIO_4$ puisque celui-ci peut oxyder par la suite les fonctions oxyamine ou hydrazide utilisées lors de la ligation (Schéma 35).

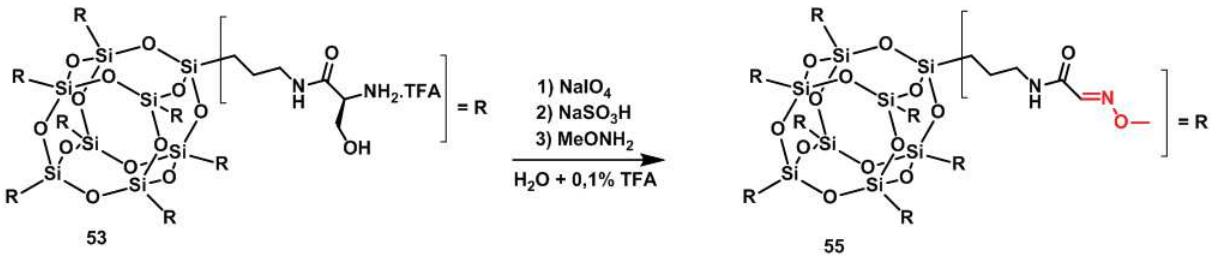


Schéma 35 : Formation du POSS **55** multiconjugué en un seul pot.

Par la suite, huit équivalents (soit 1 équivalent par position d'aldéhyde) de méthoxyamine sont additionnés au milieu réactionnel. Enfin, après 24 heures, la solution est lyophilisée puis repris dans le D_2O afin d'être analysée par RMN du proton. L'analyse montre seulement la présence du POSS **54** aldéhyde et de la méthoxyamine. L'hydrate à 5,2 ppm encore présent confirme la présence de l'aldéhyde sur le POSS et donc que la ligation n'a pas eu lieu. Des tests avec 16 et 32 équivalents de méthoxyamine avec des températures allant de 50 à 100°C ont également été effectués sans obtenir de résultats.

La ligation en un seul pot n'a pas fait l'objet de plus de recherche et a été stoppée dès lors ou le POSS(CHO)$_8$ **54** a pu être isolé après dialyse. Le solide obtenu après dialyse et lyophilisation a été solubilisé dans l'eau avec 0.1% de TFA à une concentration de 10mM. Par la suite, 10 équivalents de méthoxyamine ont été ajoutés à la solution (Schéma 36).

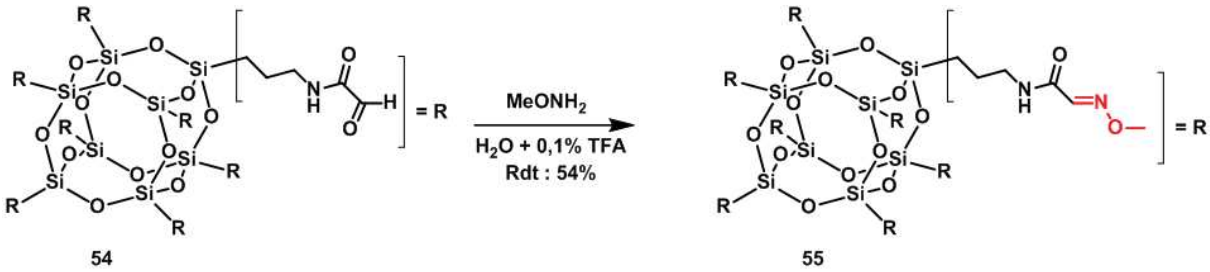


Schéma 36 : Formation du POSS **5** multiconjugué.

Après seulement 3 minutes, un précipité blanc apparait. La solution est alors centrifugée et le filtrat est ensuite retiré. Le solide blanc obtenu est lavé trois fois à l'eau puis séché sous vide. Enfin, il est repris dans du DMSO-d_6 pour être analysé en RMN du proton (Figure 76).

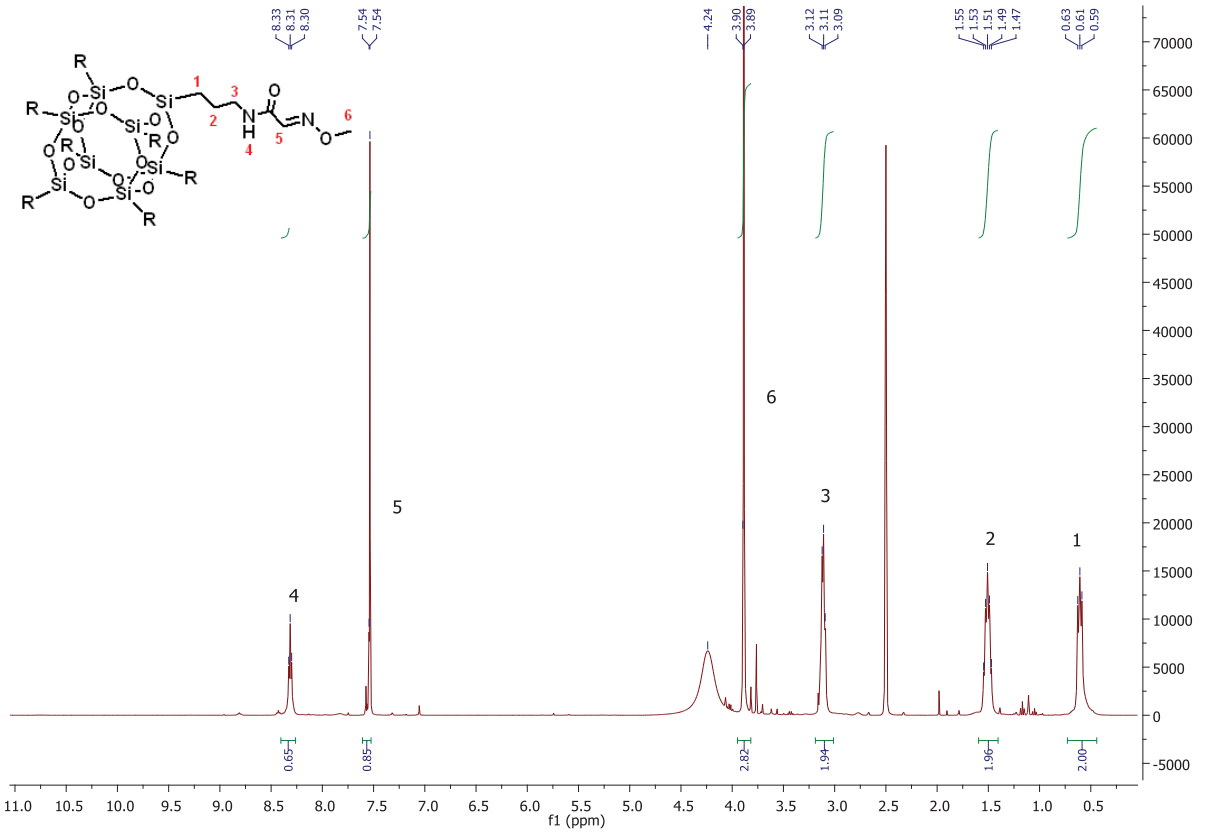


Figure 76 : Analyse RMN^{1}H du POSS **55** multiconjugué.

L'analyse montre la présence de la liaison oxime grâce au singulet situé à 7,5 ppm qui correspond au proton de la double liaison. L'analyse par Maldi-Tof montre que les huit positions ont bien été substituées par la méthoxyamine avec, notamment, la détection de l'adduit [POSS **55**+Na]$^+$ (Figure 77). Enfin, l'analyse par RMN^{29}Si a permis de valider la compatibilité entre les conditions utilisées pour la ligation et la conservation de la cage.

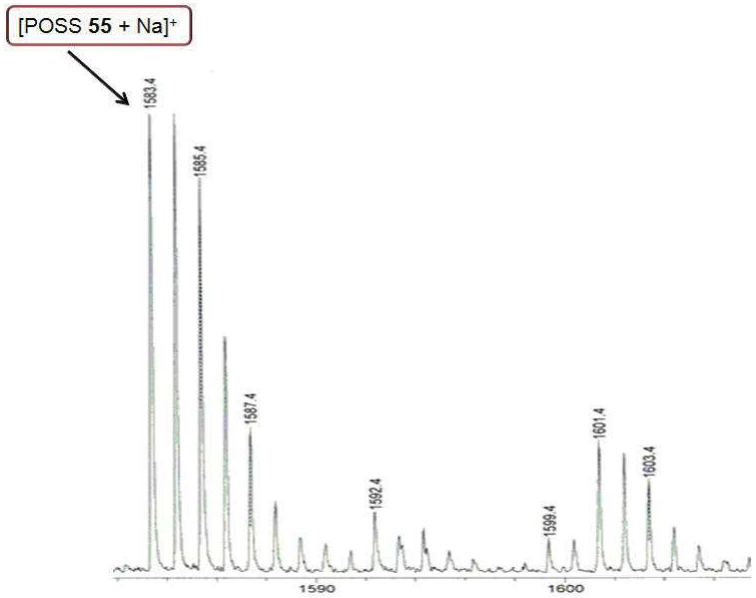


Figure 77 : MALDI-ToF du composé POSS **55**.

La méthodologie de ligation a également été effectuée à partir d'un hydrazide pour former la liaison (acyl)hydrazone. Pour cela, le ligand utilisé est l'inhibiteur benzosulfonamide hydrazide **8** synthétisé au cours du chapitre 2 (Schéma 37).

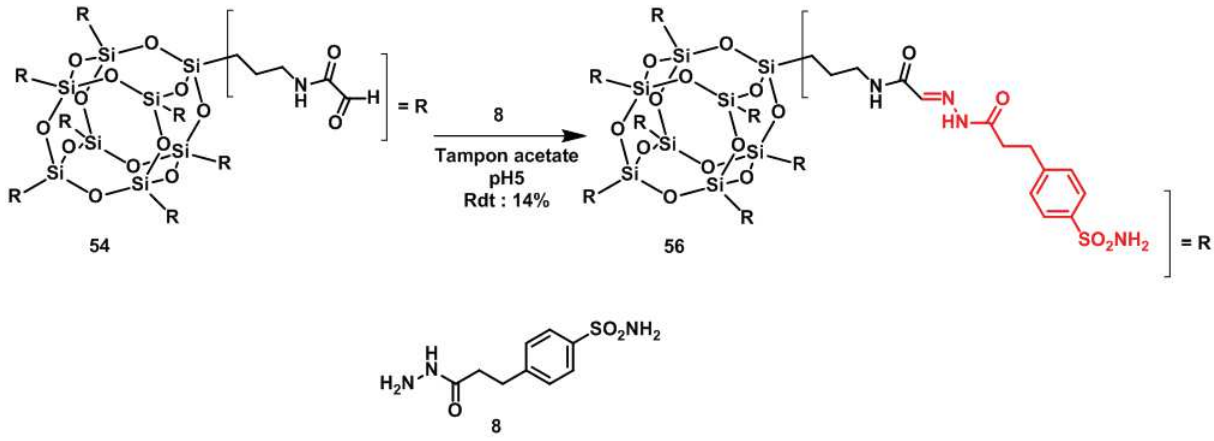


Schéma 37 : Formation du POSS **56** multiconjugué.

La réaction est effectuée à 10mM dans un tampon acétate de sodium à pH 5 en présence de 10 équivalents du ligand **8**. Après 3 minutes, le précipité formé est centrifugé puis lavé trois fois à l'eau. Ainsi, le POSS **56** décoré avec l'inhibiteur **8** de l'anhydrase carbonique a été isolé avec un rendement de 14%. Les analyses par RMN^{1}H, ^{29}Si et Maldi-ToF

confirment la formation de la liaison (acyl)hydrazone, la substitution des huit positions aldéhydes par l'hydrazide et que la cage n'a subit aucune hydrolyse.

V.6 Conclusion

Dans cette partie, une méthodologie de synthèse a été mise en place afin de synthétiser un POSS T_8 totalement inédit portant huit fonctions aldéhydes glyoxyliques. La synthèse de ce composé a été effectuée en seulement 3 étapes avec, tout d'abord, la formation de la liaison amide entre le POSS octaaminopropyl et d'un dérivé de la *L*-Sérine. Puis s'en est suivie une étape de déprotection en milieu acide pour former le POSS aminoalcool correspondant. Enfin, les aldéhydes glyoxyliques en bout de chaines, ont pu être formés après une étape d'oxydation. Afin d'isoler $POSS(CHO)_8$ **54** des sels présents lors de l'oxydation, différentes approches et techniques de purifications ont été employées. La plupart d'entre elles n'ont pas été compatibles et ont favorisé l'hydrolyse de la cage. Seule la dialyse a permis d'isoler le $POSS(CHO)_8$ **54** sans engendrer d'hydrolyse. La réactivité de ce composé, hautement soluble dans l'eau, a été testée vis-à-vis d'oxyamine et d'hydrazide pour former les liaisons oxime et (acyl)hydrazone correspondantes. Il a été démontré par RMN du ^1H et par Maldi-ToF que les huit positions avaient été substituées et que les conditions utilisées pour la ligation permettaient de conserver la cage totalement condensée.

Enfin, malgré qu'il soit hygroscopique, le $POSS(CHO)_8$ **54** a pu être synthétisé à l'échelle du gramme et peut être conservé sous argon à 0°C à l'état solide ou en solution dans l'eau pendant plus d'un mois.

Ainsi une nouvelle plateforme octavalente fonctionnalisable par bioconjugaison oxime ou (acyl)hydrazone a pu être synthétisée *via* une voie de synthèse rapide, simple et avec de très hauts rendements.

Ces résultats encourageants ont permis d'amorcer des nouveaux projets basés sur la synthèse de nanoparticules structurées et fonctionnalisées par des aldéhydes glyoxilique pour la bioconjugaison. Ainsi on peut envisager de synthétiser des POSS T_{12} ou T_4 qui peuvent apporter de nouvelles propriétés structurales et avec une valence différente (Figure 78).

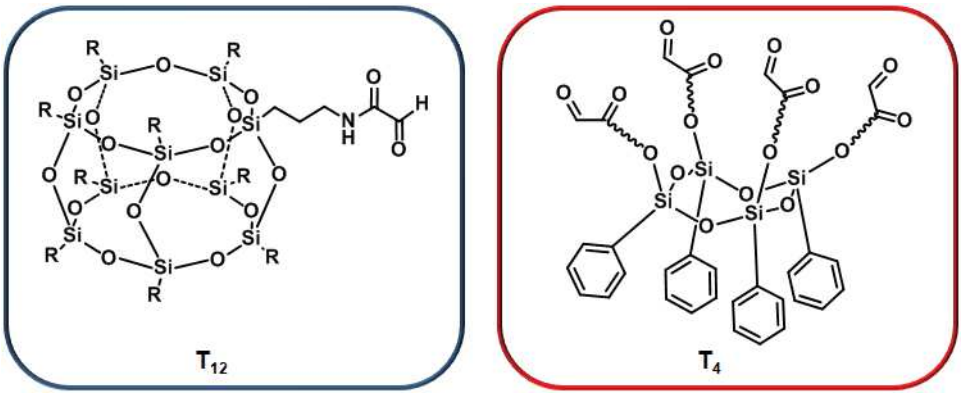


Figure 78 : POSS T12 et T4 fonctionnalisés par des aldéhydes glyoxyliques.

Chapitre V : Synthèses d'inhibiteurs hybrides, nouvelle stratégie pour le ciblage sélectif de la CA IX.

I. Introduction

Dans de nombreux cancers, l'hypoxie est un phénomène caractéristique des tumeurs solides qui consiste à une diminution de la concentration locale en oxygène par rapport aux tissus sains.[240,241] Provoquée par des changements moléculaires et/ou phénotypiques, l'hypoxie conduit à la prolifération rapide des métastases et rend les tumeurs solides moins sensibles à la radiothérapie et à la chimiothérapie en empêchant l'accès aux médicaments. Ce phénomène va induire l'accumulation de la protéine HIF-1α (HIF : *Hypoxia inducible factor*) qui agit comme un facteur de transcription.[242] L' HIF-1α va activer l'expression d'une série de gènes spécifiques impliqués dans la régulation du pH, le métabolisme et la croissance cellulaire afin de palier à ce manque d'oxygène.

Parmi ces protéines activées, l'isoforme CA IX a été identifiée.[243,244] En effet, mis à part dans les cellules des tissus gastro-intestinaux, cette isoforme est très peu exprimée dans les cellules des tissus sains mais surexprimés dans certains tissus tumoraux tels que ceux des carcinomes du colon, des reins ou des poumons. [245–248] Son implication a été rapidement mise en évidence de par son activité qui consiste à catalyser la réaction réversible d'hydratation du dioxyde de carbone en bicarbonate. Cette conversion génère un proton qui va acidifier le microenvironnement des cellules tumorales (pH_e = 6,8) (Figure 79).[244] L'acidification du milieu extracellulaire va favoriser la survie et la prolifération des métastases mais aussi diminuer l'efficacité des traitements anticancéreux, notamment ceux à caractère basiques.

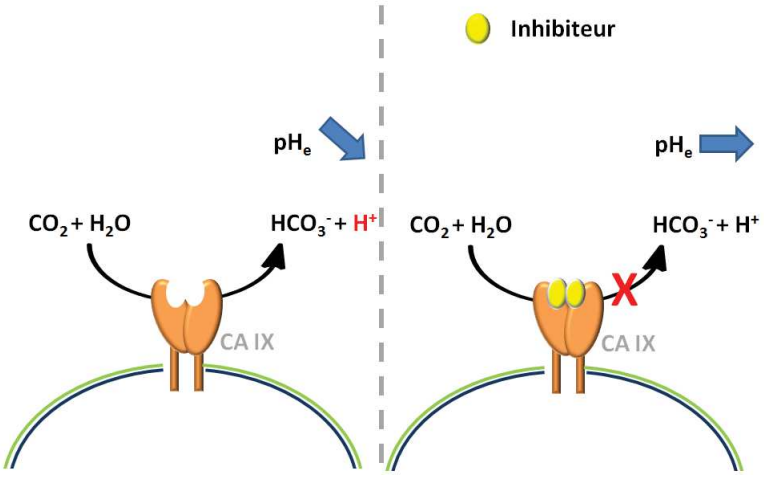


Figure 79 : Activité et inhibition de la CA IX.

De part, sa surexpression et sont rôle établit au sein des tumeurs solides sous hypoxie, l'isoforme IX de l'anhydrase carbonique est rapidement devenue une nouvelle cible intéressante pour le diagnostic et le traitement des cancers.

La conception d'inhibiteurs efficaces, mais surtout spécifiques, de l'isoforme IX de la CA est alors un enjeu considérable. Ainsi, de nombreux travaux de recherches ont permis le développement rapide de petites molécules capables d'inhiber efficacement la CA IX mais

avec un manque cruel de sélectivité envers les différentes isoformes ce qui est essentiel afin d'éviter tous effets secondaires.

D'autres approches ont également été engagées avec notamment le ciblage de la CA IX par des anticorps monoclonaux développés par Siebels et *coll.* en 2011.[249] D'excellents résultats ont été obtenus avec des essais précliniques et cliniques encourageants. Cependant les anticorps ont des propriétés pharmacocinétiques défavorables en raison de leurs poids moléculaires élevés.

L'objectif de ce chapitre est de répondre à cette problématique de manque de sélectivité en conceptualisant des inhibiteurs efficaces et sélectifs à partir d'une nouvelle approche qui tire partie de la structure de la CA IX.

II. Structure de la CA IX

L'anhydrase carbonique IX a été isolée pour la premières fois par Pastorekova et *coll*. en 1992 dans le carcinome de l'utérus des cellules humaines HeLa.[250] Cette isoforme transmembranaire de la CA, d'un poids moléculaires de 153 kDa, est sous forme de dimère lié par un pont disulfure entre deux résidus de Cystéine (Figure 80).

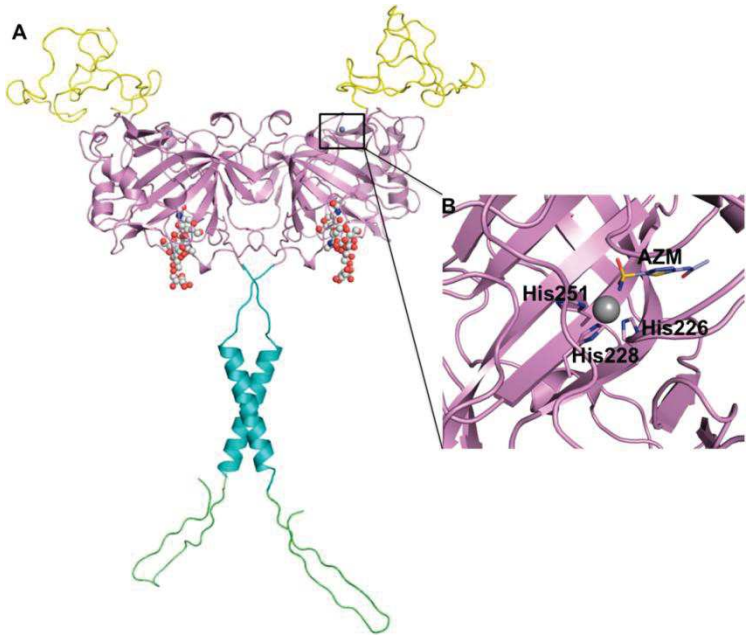


Figure 80 : (A) Modèle proposé montrant l'agencement structurel du dimère CA IX sur la membrane cellulaire, (B) Intéractions de l'acétazolamide au sein du site actif.

La CA IX a une structure complexe composée de plusieurs domaines peptidiques situés de part et d'autre de la membrane plasmique (Figure 81). Le domaine intracellulaire de la CA IX est constitué d'un fragment peptidique partitionné en deux, l'un est transmembranaire (TM) et l'autre intracytoplasmique (IC). La partie extracellulaire est

constituée d'une chaine protéoglycane (PG) en position *N*-terminale, et du site catalytique de l'enzyme (CA). Le site catalytique est très bien conservé avec des séquences peptidiques identiques aux autres isoformes de la CA. Les parties IC et TM peuvent également être retrouvées chez d'autres isoformes de la CA associées à la membrane. Cependant, la chaine protéinoglycane est caractéristique et unique à la CA IX ce qui en fait un domaine de reconnaissance intéressant pour le ciblage sélectif.



Figure 81 : Les différents domaines protéiques de la CA IX.

III. Reconnaissance spécifique de la CA IX

Tirant partie des propriétés structurales spécifiques de la CA IX, en 2010 Askoxylakis et *coll*. mettent en évidence une séquence peptidique (YNTNHVPLSPKY appelée CAIX-P1) qui permet de reconnaitre le domaine protéoglycane de l'enzyme.[251] Cette séquence peptidique a pu être déterminée par une technique de *Phage Display* qui consiste à étudier les interactions entres des protéines, en utilisant des bactériophages afin de relier les protéines aux gènes qui codent pour elles.[252] Le peptide identifié CaIX-P1 a été synthétisé et ses propriétés de liaison ont été évaluées *in vitro* sur diverses lignées cellulaires. De plus, des études de biodistribution *in vivo* chez des souris, portant des tumeurs, ont été effectuées et la stabilité du peptide, dans le sérum humain, a été étudiée. Les résultats de ces études montrent une liaison spécifique à l'CA IX et une accumulation plus élevée dans les tumeurs que dans la plupart des tissus sains.

En 2012, la même équipe a effectuée des travaux d'optimisation, sur le peptide CAIX-P1 de reconnaissance afin d'identifier les acides aminés importants qui sont responsables des interactions faites avec la chaine protéoglycane de la CA IX.[253] Pour identifier les acides aminés de liaison, un criblage (« Ala-scan ») a été effectué et divers fragments du peptide ont été synthétisés et testés pour déterminer leur affinité et leur spécificité sur des cellules cancéreuses humaines surexprimant la CA IX. Le balayage consiste à remplacer chaque acide aminé de la séquence peptidique par une Alanine, de tester les peptides et d'observer s'il y a une augmentation ou une diminution de l'affinité par rapport au peptide CAIX-P1. Ainsi, les acides aminés 3T, 4N, 5H, 8L, 9S et 12Y ont été identifiés comme étant importants pour la liaison du peptide CaIX-P1 (YNTNHVPLSPKY). Les travaux d'optimisation ont été poussés un peu plus loin, en synthétisant des fragments radiomarqués du peptide CAIX-P1. Ces fragments ont été testés sur des cellules cancéreuses du rein (SKRC 52) et le fragment CAIX-P1-4-10 (NHVPLSP) ; composés des acides aminés importants 4N, 5H, 8L et 9S ; a montré une affinité de presque 6 fois supérieures par rapport à celle du peptide CAIX-P1.

IV. Stratégie

L'objectif de ces travaux est de synthétiser des inhibiteurs sélectifs de la CA IX en tirant partie des spécificités structurales de cette isoforme. Suite aux recherches effectuées par Askoxylakis et *coll*. qui ont permis de mettre en évidence une séquence peptidique de reconnaissance de la chaine protéoglycane de la CA IX, une nouvelle approche a été mise en place afin de synthétiser des inhibiteurs sélectifs.[253] Celle-ci consiste en la synthèse de nouveaux composés hybrides constitués d'un peptide de reconnaissance de la chaine protéoglycane de la CA IX couplés à un inhibiteur de la CA (Figure 82). Ces deux entités sont liées par ligation formant un lien (acyl)hydrazone.

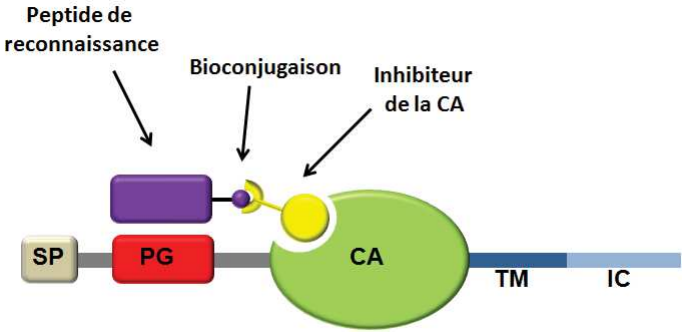


Figure 82 : Conception d'inhibiteurs hybrides sélectifs de la CA IX.

V. Synthèse des inhibiteurs hybrides

Dans ce chapitre, quatre nouveaux inhibiteurs hybrides ont été conçus à partir de deux peptides de reconnaissance de la chaine protéoglycane de la CA IX et de deux inhibiteurs de la CA, aux mécanismes d'inhibition différents (Figure 83).

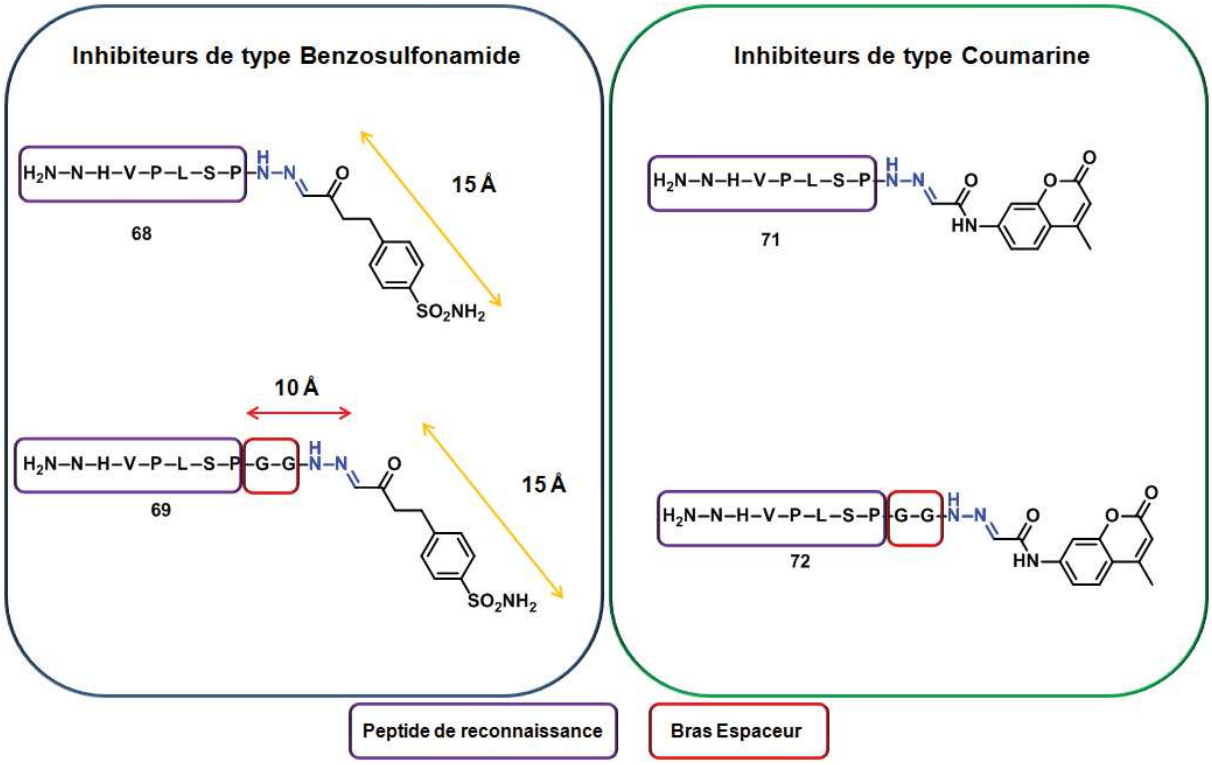


Figure 83 : Différents inhibiteurs hybrides conçus pour le ciblage sélectifs de la CA IX.

La première série d'inhibiteurs hybrides est composée d'un inhibiteur de type benzosulfonamide. Celui-ci est lié au peptide de reconnaissance développé et optimisé par Askoxylakis et *coll.*. Un analogue, portant un bras espaceur Glycine-Glycine, est également synthétisé afin d'augmenter la distance entre les deux entités et permettre à l'inhibiteur d'entrer dans le site actif de la CA. En effet, les inhibiteurs de type benzosulfonamides ont pour caractéristiques de se lier à l'ion métallique Zn^{2+}, situé au fond du site actif à une distance de 15Å, permettant l'inhibition de la CA.

De la même manière, la seconde série d'inhibiteurs hybrides est composée du peptide de reconnaissance portant, ou non, le bras espaceur Glycine-Glycine et d'un inhibiteur de type coumarine, qui ont un mécanisme d'inhibition dit d'occlusion et qui sont connus pour être sélectifs de la CA IX.

V.1. Synthèse des peptides de reconnaissance.

Les peptides **60** et **61**, présentant la fonction hydrazide en position *C*-terminale, ont été synthétisés sur support solide (Schéma 38). Pour cela, le composé 9-fluorénylméthyle

carbazate (Fmoc-hydrazide) a été couplé à la résine 2-chlorotrityle en présence d'une base : la diisopropyléthylamine. Le couplage est effectué en deux heures dans une solution de *N*-méthyl-2-pyrrolidone (NMP) et de diméthylsulfoxide (DMSO). Par la suite, les billes de résine sont filtrées et les positions chlorées qui non pas réagit avec le Fmoc-hydrazide sont bloquées avec du méthanol. Enfin, elles sont filtrées, lavées successivement avec plusieurs solvants organiques (DMSO, isopropanol, dichlorométhane puis éther diéthylique) et séchées sous vide. La charge des billes de résine **57** (0.39 g/mmol) a été déterminée par mesure de l'absorbance en UV à 299 nm de l'adduit dibenzofulvènepipéridine, qui est généré lors de la déprotection des groupements Fmoc en présence de pipéridine.

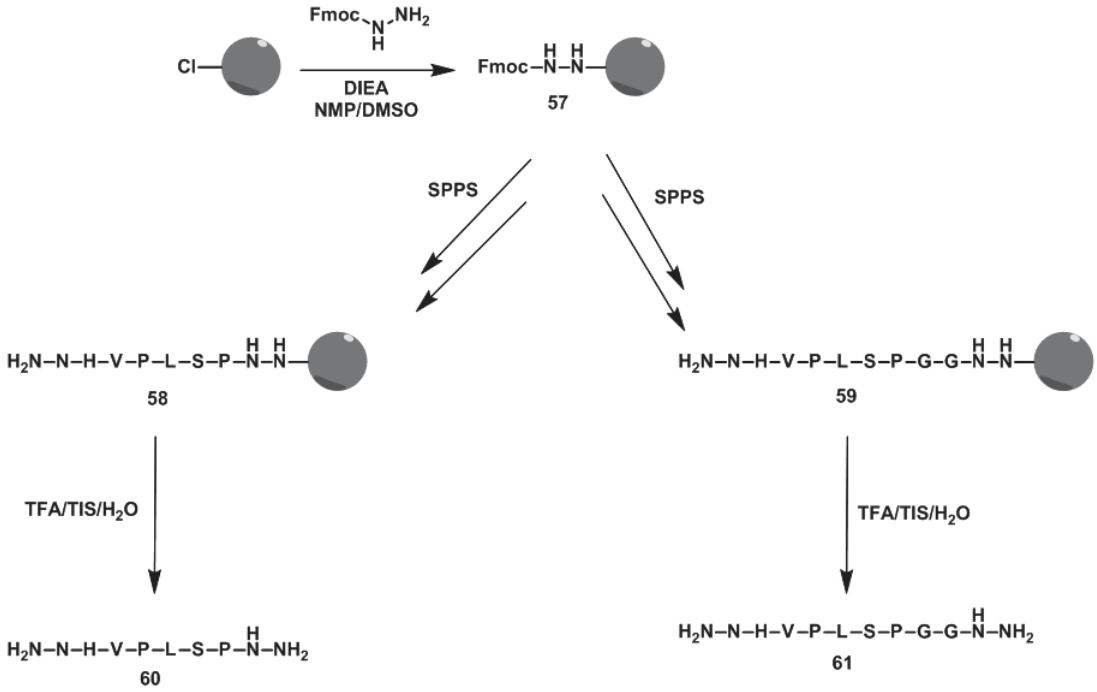


Schéma 38 : Synthèse des peptides de reconnaissance **60** et **61**.

L'incorporation des différents acides aminés sur la résine se fait de façon automatisée ; assisté par micro-ondes ; par succession de cycles de couplage et déprotection afin d'obtenir les séquences peptidiques voulues des composés **58** et **59**.[254]

Enfin les peptides sont clivés de la résine dans une solution de TFA/TIS/H_2O (95/2.5/2.5). Après 2 heures de réaction à température ambiante, la solution est filtrée afin d'éliminer les billes de résine, puis concentrée. Les peptides **60** et **61** ont été isolés avec des rendements respectifs de 10% et 25% après purification par chromatographie liquide en phase inverse.

V.2. Synthèse des inhibiteurs

Deux types d'inhibiteurs de l'anhydrase carbonique ont été choisis afin d'être fonctionnalisés puis greffés par ligation aux peptides de type hydrazide précédemment synthétisés. Le premier inhibiteur **64** fait partie de la classe des sulfonamides aromatiques

qui sont connus pour inhiber efficacement les différentes isoformes de la CA. Le second est un composé de type coumarine **67** connus pour être sélectif de l'isoforme CA IX. Les deux inhibiteurs ont été fonctionnalisés avec des aldéhydes glyoxyliques, essentiels à la ligation (Figure 84).

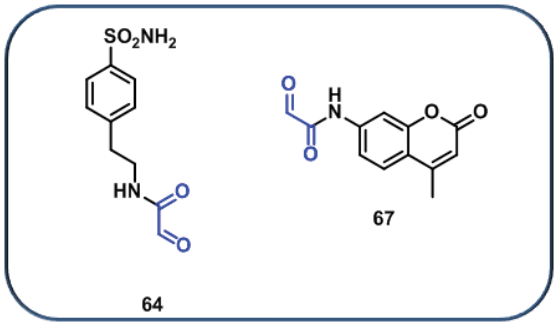


Figure 84 : Inhibiteurs de la CA fonctionnalisés par un aldéhyde glyoxylique.

L'inhibiteur **64** a été synthétisé à partir du 4-aminoéthylbenzène sulfonamide (Schéma 39). Celui-ci a été couplé à la *L*-Sérine ; protégée sur sa positon *N*-terminale et sur sa chaine latérale ; en présence de l'agent de couplage HBTU (hexafluorophosphate de 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetraméthyluronium) et de la DIEA. Après une nuit à température ambiante, le milieu réactionnel est lavé avec une solution saturée de bicarbonate de sodium, d'acide chlorydrique à 1N et une solution saturée de chlorure de sodium. Enfin, après avoir séché la phase organique sur sulfate de sodium anhydre, la solution est filtrée puis concentrée afin d'obtenir le composé **62** avec un rendement de 93%.

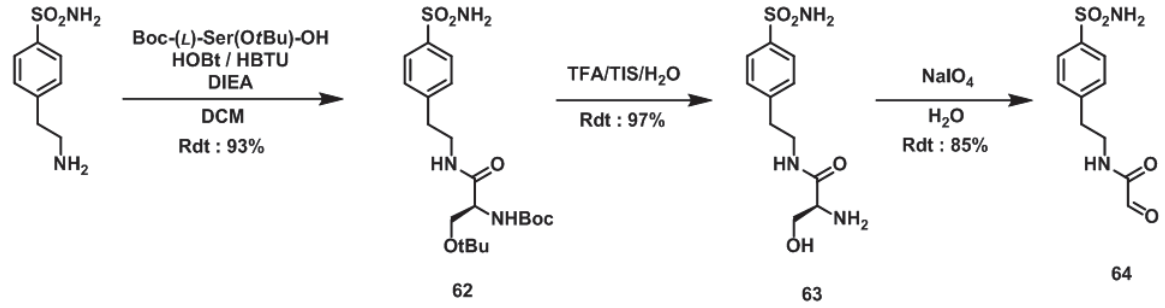


Schéma 39 : Synthèse de l'inhibiteur **64**.

Par la suite, les fonctions *tert*-butyl et *tert*-butoxycarbonyle sont éliminées par une solution de TFA/TIS/H_2O. Après 2 heures de réaction, le milieu réactionnel est concentré et le composé **63** est isolé par précipitation dans l'éther diéthylique.

Enfin, le composé **64** est obtenu par coupure oxydante de la fonction aminoalcool de l'intermédiaire **63**. La réaction est effectuée en solution dans l'eau et en présence de périodate de sodium ($NaIO_4$). Après purification sur chromatographie liquide en phase inverse l'inhibiteur **64** est isolé avec un rendement de 85%.

Le second inhibiteur coumarine fonctionnalisé a été synthétisé avec la même stratégie de synthèse que l'inhibiteur **64** avec une première étape de couplage avec la *L*-

Sérine, une étape de déprotection et, enfin, une coupure oxydante de la fonction aminoalcool, afin de former l'aldéhyde glyoxylique.

Pour cela, le composé 7-amino-4-méthyle coumarine a été choisi pour être couplé à la L-sérine (Schéma 40). Cependant, dans les mêmes conditions opératoires utilisées précédemment pour obtenir le composé **62**, la formation de l'intermédiaire **65** n'a pas été observée. Cela est probablement du à la faible nucléophilie de l'amine qui est fortement désactivé par le cycle aromatique.

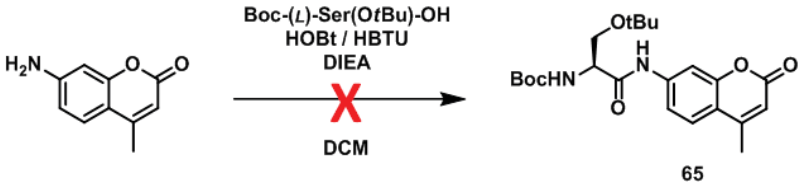


Schéma 40 : Synthèse de l'intermédiaire **65** *via* l'agent de couplage HBTU.

Pour forcer la réaction, le dichlorométhane a alors été remplacé par du diméthylformamide (DMF) afin de pouvoir chauffer la réaction à des températures plus élevées. Malgré des températures allant jusqu'à 140˚C, la formation de l'intermédiaire **65** n'a toujours pas été observée.

Pour résoudre cette problématique, différents agents de couplages ont été utilisés : l' hexafluorophosphate (benzotriazol-1-oxyloxy)tripyrrolidinophosphonium (PyBOP), l'hexafluorophosphate de (diméthylamino)-*N,N*-diméthyl[1,2,3]triazolo[4,5-b]pyridin-3-yloxy) méthaniminium (HATU), le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC) et enfin le *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (Schéma 41). Toutes les réactions ont été réalisées dans le DMF, en présence de DIEA et avec des variations de températures (T_{max} = 120˚C). Seule l'utilisation de l'agent de couplage HATU a permis de former le composé **65** à une température de 120 ˚C et avec un faible rendement de 5% après traitement.

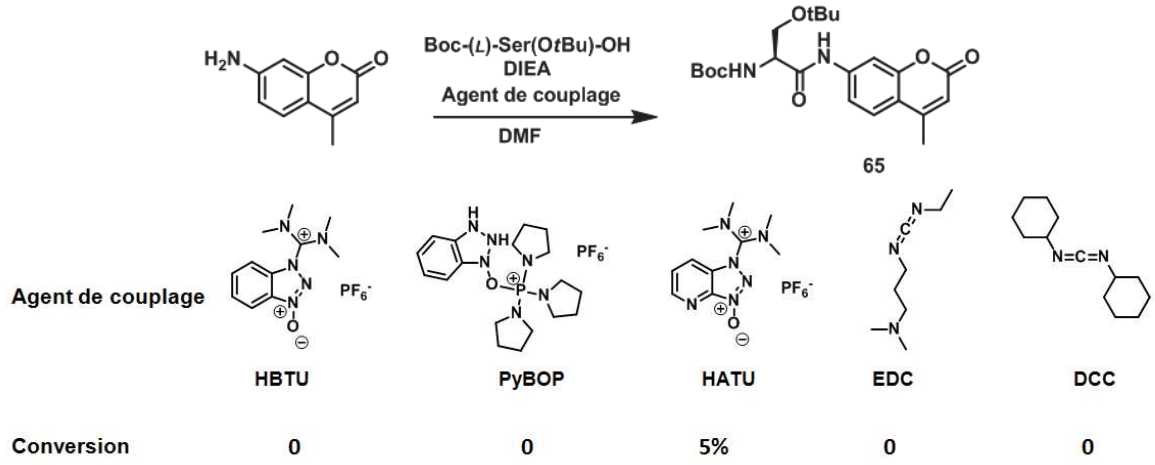


Schéma 41 : Étude de l'influence des agents de couplage sur la formation de l'intermédiaire **65**.

Une autre approche a été pensée dans le but de former le composé **65** avec un meilleur rendement. L'objectif a été de former préalablement l'ester activé de la *L*-Sérine à l'aide du *N*-hydroxysuccinimide ou du 2,3,4,5,6-pentafluorophénol (Schéma 42). Par la suite, les deux esters activés de la *L*-Sérine ont été mis en solution dans la DMF en présence de la DIEA et de la 7-amino-4-méthyle coumarine. Malgré les variations de température (T_{max} = 120˚C) aucune des réactions n'a pu permettre de former le composé **65**.

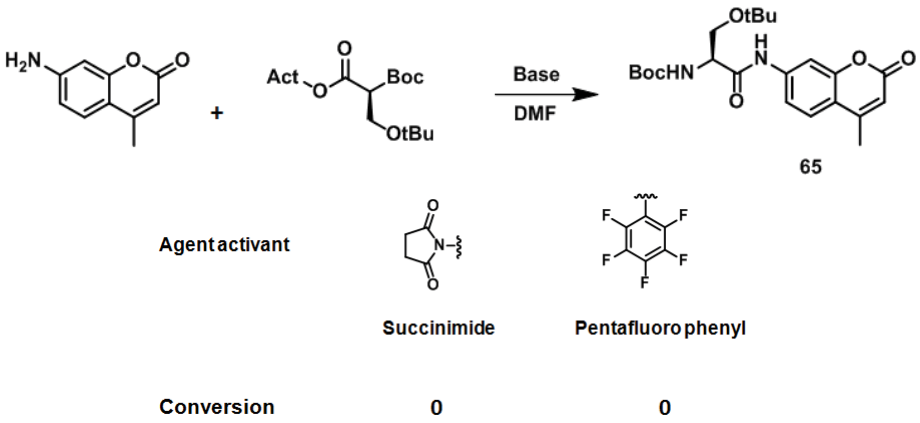


Schéma 42 : Utilisation de différents esters activés de la *L*-sérine pour la formation de l'intermédiaire **65**.

Enfin, une dernière approche a été considérée. Celle-ci consiste à former *in situ* le chlorure d'acide de la *L*-Sérine (Schéma 43). Pour cela, la 7-amino-4-méthyle coumarine a été mise en solution avec la *L*-Sérine dans de la pyridine à 0˚C. Il est ajouté par la suite, goutte à goutte, le trichlorure de phosphoryle ($POCl_3$) qui va permettre de former le chlorure d'acide. Après ajout total, le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant une nuit. Enfin, la solution est concentrée et le composé **65** a pu être isolé avec un rendement de 25% après purification sur colonne de gel de silice.

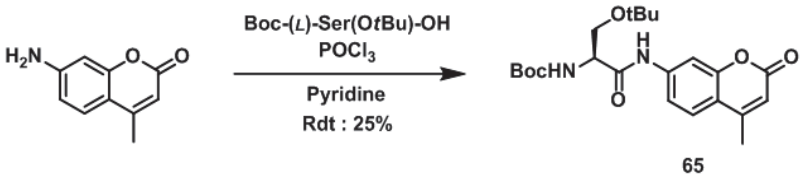


Schéma 43 : Activation de la *L*-sérine en chlorure d'acide pour la formation d l'intermédiaire **65**.

L'intermédiaire **65** est, par la suite, solubilisé dans une solution de TFA/TIS/H_2O afin d'éliminer les groupements protecteurs de la *L*-sérine ce qui permet d'obtenir le composé **66** après précipitation dans l'éther diéthylique (Schéma 44).

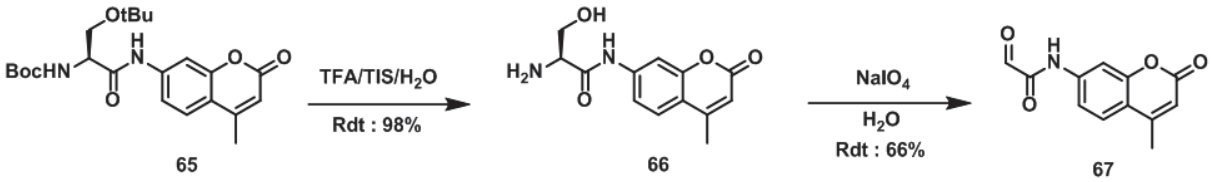


Schéma 44 : Synthèse de l'inhibiteur **67**.

Enfin, l'aminoalcool est oxydé en présence de $NaIO_4$. Lors de la réaction, qui s'effectue en solution dans l'eau, l'inhibiteur **67** précipite. Celui-ci est alors filtré, lavé à l'eau puis séché. Il a seulement pu être caractérisé par RMN du proton à cause de sa faible solubilité. En effet, le composé **67** n'a pu être solubilisé que dans le DMSO-d_6 et à une température de 110˚C. En dessous de cette température l'inhibiteur précipite.

V.3. Synthèse des inhibiteurs hybrides.

La formation des inhibiteurs hydrides est faite par ligation des inhibiteurs de l'anhydrase carbonique avec les peptides de reconnaissance. A partir de l'inhibiteur **64**, les inhibiteurs hybrides **68** et **69** ont pu être formés, respectivement en présence des peptides de type hydrazide **60** et **61,** en solution dans un tampon acétate de sodium à pH 5 (Schéma 45). Les réactions sont suivies par HPLC et après 24 heures les inhibiteurs **68** et **69** ont pu être isolés après purification sur chromatographie liquide en phase inverse avec des rendements de 58% et 79%. Enfin, l'inhibiteur monovalent de référence **70** a également été formé en liant l'inhibiteur **64** à la glycine hydrazide préalablement synthétisée au sein du laboratoire.

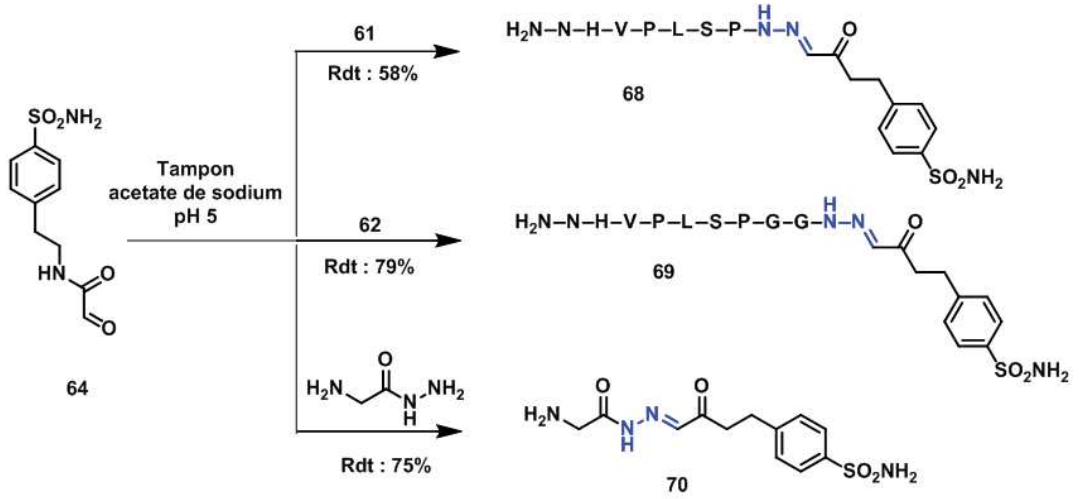


Schéma 45 : Synthèse des inhibiteurs hybrides **68** et **69** et de la référence monovalente **70**.

Pour l'inhibiteur **67**, les ligations n'ont pu aboutir du fait que celui-ci n'est pas soluble dans le tampon acétate à pH 5. Différents tests ont été effectués en modifiant le solvant et en faisant varier la température sans être concluants (Tableau 11).

	Température (°C)		
Solvant	50	80	120
Tampon acétate pH5	X	X	X
Tampon acétate pH5 / DMSO (50/50)	X	X	X
DMSO	X	X	X
Tampon acétate pH5 / Acetonitrile (50/50)	X	X	X

Tableau 11 : Influence du solvant et de la température pour la formation des bioconjugués formés à partir de l'inhibiteur **67**.

A ce stade, les travaux faits sur cet inhibiteur n'ont pas été approfondis. Cependant, des solvants acides, tel que l'acide acétique, pourront potentiellement permettre de solubiliser l'inhibiteur **67** et favoriser la formation de la liaison (acyl)hydrazone avec les différents hydrazides.

VI. Tests enzymatiques

Les inhibiteurs hybrides **68** et **69**, ainsi que le peptide de reconnaissance seul **61**, et l'inhibiteur monovalent de référence **70**, ont été testés sur les isoformes cytosoliques *h*CA I et *h*CA II et les isoformes transmembranaires *h*CA IX et *h*CA XII. De plus, les tests effectués sur la *h*CA IX ont été fait avec, ou sans, la présence de la chaine protéoglycane PG.

	***K*i [nM]**[a]				
Composé	*h*CA I	*h*CA II	CA IX	PG-CA IX	CA XII
61	> 50000	> 50000	> 50000	> 50000	> 50000
68	367	5.3	301	287	53.8
69	64	0.57	11.9	7.8	0.91
70	73.6	0.86	412	397	684

[a] Marge d'erreurs de ±10% sur les valeurs rapportées de trois essais différents.
CA IX = domaine catalytique. PG-CA IX = chaine protéoglycane + domaine catalytique.

Tableau 12 : Résultats des tests d'inhibition enzymatique sur la CA des inhibiteurs hybrides **68** et **69**, du peptide de reconnaissance seul **61**, et de l'inhibiteur monovalent de référence **70**.

Les résultats obtenus avec le peptide de reconnaissance seul **61**, indiquent que celui-ci n'a aucune activité sur l'inhibition de l'anhydrase carbonique. L'inhibiteur monovalent de référence **70** montre, quant à lui, une sélectivité envers les isoformes cytosoliques avec une

forte constante d'inhibition égale à 0.86 nM sur l'isoforme *h*CA II. Comme l'inhibiteur de référence, l'inhibiteur hybride **68** affiche une inhibition efficace et sélective de l'isoforme *h*CA II. Enfin, l'inhibiteur hybride **69**, possédant le bras espaceur Glycine-Glycine montre une forte activité d'inhibition sur les différentes isoformes de la CA sans avoir une réelle sélectivité sur l'un deux.

Dans un premier temps, les résultats obtenus permettent de mettre en évidence l'importance de l'utilisation d'un bras espaceur entre l'inhibiteur de la CA et le peptide de reconnaissance afin que le premier puisse se coordiner avec l'ion métallique (Zn^{2+}) situé dans le site actif. En effet, sans le bras espaceur Glycine-Glycine, l'inhibiteur hybride **68** affiche une faible inhibition de l'isoforme PG-CA IX possédant la chaine protéoglycane (K_I = 287 nM), tandis que l'inhibiteur **69** montre une inhibition efficace avec une constante égale à 7.8 nM. Par la suite, on peut remarquer que l'utilisation du peptide de reconnaissance de la chaine protéoglycane de la CA IX a permis *via* l'inhibiteur hybride **69** d'augmenter de plus de 50 fois la puissance d'inhibition de l'inhibiteur de référence **70** sur l'isoforme PG-CA IX.

Enfin, malgré une faible différence, l'interaction avec la chaine protéoglycane de la CA IX du peptide de reconnaissance porté par l'inhibiteur hybride **69**, est démontrée avec une constante d'inhibition plus élevée égale à 7.8 nM sur l'isoforme PG-CA IX comparée au résultat obtenu sur l'isoforme cd-CA IX, avec seulement la présence du domaine catalytique, qui est de 11.9 nM.

VII. Conclusion

Dans ce chapitre, des inhibiteurs hybrides permettant à la fois d'inhiber et de reconnaitre la chaine protéoglycane de l'isoformes CA IX ont été synthétisés à partir de la ligation entre un inhibiteur de la CA et un peptide de reconnaissance, tous deux préalablement fonctionnalisés. Ces composés ont été testés sur différentes isoformes de la CA. Grace à ces tests enzymatiques, il a été montré l'importance de l'utilisation d'un bras espaceur entre les deux entités liées, afin que l'inhibiteur puisse accéder à l'intérieur du site actif. L'emploi du peptide de reconnaissance a permis d'augmenter de plus de 50 fois le pouvoir d'inhibition sur l'isoforme PG-CA IX. Enfin, les interactions du peptide avec la chaine protéoglycane ont également été mis en évidence, en comparant les résultats obtenus sur l'isoforme composée seulement du domaine catalytique cd-CA IX avec ceux obtenus sur l'isoforme possédant la chaine protéinoglycane PG-CA IX.

Cependant, l'objectif premier a été de synthétiser des inhibiteurs hybrides composés d'un peptide permettant de reconnaitre la chaine protéoglycane de la CA IX afin d'avoir une sélectivité sur cet isoforme. Malgré des résultats encourageants, obtenus avec une inhibition efficace des différentes isoformes de la CA observées avec l'inhibiteur hybride **69** (0.57 – 64 nM) aucune sélectivité n'a été mise en évidence.

Cela est surement du à l'utilisation d'un inhibiteur de type benzosulfonamide qui est connus pour inhiber efficacement les différentes isoformes de la CA sans démontrer de la sélectivité. L'utilisation d'inhibiteurs plus sélectifs de la CA IX tel que la coumarine, détaillée

au cours de ce chapitre pourrait permettre de répondre à cette attente. Ainsi, l'optimisation de la ligation entre le dérivé coumarine synthétisé et les peptides de reconnaissance pourrait permettre de former des inhibiteurs hybrides prometteurs dans le cadre de l'inhibition et du ciblage sélectif de la CA IX.

Conclusion

Ces travaux de recherches ont permis d'utiliser la multivalence comme nouvelle approche pour l'inhibition des anhydrases carboniques. Ces métalloenzymes à zinc, qui catalysent la réaction réversible d'hydratation du dioxyde de carbone en bicarbonate, sont des cibles intéressantes dans le cadre du traitement de certaines maladies puisqu'elles entrent en jeu dans de nombreux processus pathologiques suite à un dysfonctionnement ou une surexpression. De nombreux composés de faibles poids moléculaires ont été développés sans vraiment pouvoir allier à la fois efficacité d'inhibition et sélectivité envers les différentes isoformes de la CA. Pour ne pas générer d'effet secondaires ou des dysfonctionnements encore plus graves, la sélectivité est un enjeu crucial pour ces enzymes qui sont ubiquitaires mais aussi essentielles au bon fonctionnement de certains organismes.

Afin de développer de nouveaux inhibiteurs efficaces et sélectifs, la multivalence s'est révélée être une approche intéressante. Largement utilisée dans le cadre de la reconnaissance moléculaire, celle-ci a trouvé une application récente dans l'inhibition enzymatique, c'est le cas des anhydrases carboniques. Des travaux ont rapportés des résultats intéressant sur l'augmentation de l'efficacité et de la sélectivité vis-à-vis des différentes isoformes de la CA lors de l'utilisation d'inhibiteurs multivalents comparées aux simples inhibiteurs monovalents. Des effets multivalents ont aussi été clairement mis en évidence. Cependant, seulement quatre systèmes multivalents ont été employés lors de ces différents travaux et ne permettent pas, à ce jour, de comprendre la relation structure-activité.

Ces travaux de thèses se sont inscrits autour de cette problématique et ont eu pour objectif le développement et la synthèse de nouveaux inhibiteurs multivalents des anhydrases carboniques. Ces nouveaux inhibiteurs multivalents ont été conçus à partir de systèmes multivalents de nature, valence et de structure différente afin de tirer par la suite un maximum d'informations sur la relation structure-activité lors des tests d'inhibitions enzymatiques.

Sur ces systèmes multivalents ont été greffés des inhibiteurs de la CA par bioconjugaison afin de simplifier les synthèses. Le choix de la méthode de bioconjugaison s'est porté sur la formation de liaison oxime et (acyl)hydrazide qui sont de bons outils pour la synthèse de bioconjugués puisqu'elles sont chimiosélectives, n'utilisent pas de métaux, sont réalisables en milieux aqueux et ne génèrent que de l'eau comme sous produit.

Le chapitre II a fait l'objet de la synthèse d'inhibiteurs de la CA fonctionnalisés par des groupements oxyamines et/ou hydrazides. Deux types d'inhibiteurs intéressants, du point de vue de leurs mécanismes d'inhibition, ont été choisis. Ainsi, 5 inhibiteurs portant une fonction sulfonamide connue pour inhiber efficacement les différentes isoformes de la CA avec un mécanisme de coordination de l'ion métallique Zn^{2+} ont été synthétisés. De plus, 3 inhibiteurs, de type coumarine connus pour leur sélectivité lors de l'inhibition avec un mécanisme, dit d'occlusion, ont été formés.

Dans le chapitre III, quatre inhibiteurs multivalents des anhydrases carboniques ont été préparés autour de deux systèmes multivalents de nature peptidiques, de valence égale à quatre mais de structures différentes. Le premier est cyclique et permet d'avoir une préorganisation structurale au niveau des inhibiteurs et le second est un peptide linéaire beaucoup plus flexible. Ces systèmes peptidiques ont été fonctionnalisés avec des aldéhydes glyoxyliques de telle sorte qu'ils facilitent l'insertion des inhibiteurs sur les plateformes par simple ligation oxime ou (acyl)hydrazone. Cependant, en fonction de la nature des inhibiteurs greffés, l'utilisation de ces systèmes multivalents a vite été limitée suite à des problèmes de solubilité.

Basé sur les récentes avancées des nanomatériaux dans le domaine biomédical, le Chapitre IV s'est axé sur la conception d'inhibiteurs multivalents de la CA à partir de nanoparticules de silice. Ce type de matériaux est très intéressant car il donne la possibilité de générer des composés de structures et de valences différentes. La première partie décrit la synthèse de nanoparticules sphériques, non structurées. Lors de la formation de la nanoparticule, de la fluorescéine a été intégrée ce qui a permis d'obtenir des propriétés de fluorescence intéressantes pour faire de l'imagerie. Par la suite, des inhibiteurs de la CA ont été polycondensés à la surface formant un inhibiteur bifonctionnel de valence égale à 12.

Un second système multivalent à base de silice a été développé dans la deuxième partie. Pour la première fois, des nanoparticules de silice cubique, de valence 8 destinées à la bionconjugaison ont été fonctionnalisées avec des aldéhydes glyoxyliques. Une méthodologie de synthèse a été mise en place ce qui a permis d'obtenir ce nouveau système multivalent en seulement 3 étapes, sans purification et avec de très hauts rendements. La réactivité de ce composé qui est hautement soluble dans l'eau a été testée vis-à-vis d'oxyamine et d'hydrazide pour former les liaisons oximes et (acyl)hydrazones correspondantes. Enfin, un inhibiteur multivalent a pu être généré à partir de cette plateforme sans avoir subit à ce jour les testes d'inhibitions sur la CA.

Les différents inhibiteurs multivalents issus des systèmes peptidiques linéaire, cycle et de la nanoparticule de silice sphérique ont été testés sur les isoformes de la CA. Leurs efficacités d'inhibition, leurs sélectivités mais aussi leurs effets multivalents ont pu être mis en évidence. Pour mieux comprendre la relation structure-activité de ces composés sur la CA, ces résultats sont comparés aux travaux antérieurs faits par d'autres groupes. Afin de faciliter la comparaison, seuls les meilleurs résultats obtenus, à partir d'un même système multivalent, sont référencés dans le tableau 13. De même, la comparaison est faite seulement sur l'isoforme cytosolique *h*CA II et sur l'isoforme transmembranaire *h*CA IX.

Système Multivalent	Inhibiteur	Valence	Isoforme de la CA	*K*i [nM]	pr	pr/n	réf.
Nanoparticule d'or	Sulfonamide	14	*h*CA II	451	0.5	0.03	33
			*h*CA IX	32	1.3	0.09	
PAMAM	Sulfonamide	32	*h*CA II	0.07	2285	71	120
			*h*CA IX	51.1	65.5	0.2	
Fullerène (C_{60})	Coumarine	12	*h*CA II	10000	-	-	121
			*h*CA IX	40	3.5	0.3	
Peptide cyclique	Sulfonamide	4	*h*CA II	19	13.2	3.3	255
			*h*CA IX	421	0.1	0.02	
Peptide linéaire	Sulfonamide	4	*h*CA II	51	4.9	1.2	255
			*h*CA IX	481	0.1	0.02	
Nanoparticule de silice	Sulfonamide	12	*h*CA II	0.67	71.8	6	256
			*h*CA IX	2.7	14.2	1	

Tableau 13 : Résultats d'inhibitions et effets multivalents rapportés sur les isoformes *h*CA II et *h*CA IX.

La première information qui peut être tirée de ces résultats, est que l'efficacité d'inhibition par rapport aux composés monovalents est bien souvent augmentée lors de l'utilisation d'inhibiteurs multivalents. Il est possible que les effets statistiques soient à l'origine de l'augmentation de l'efficacité d'inhibition observée ici, et opèrent grâce à une augmentation de la concentration locale des inhibiteurs de la CA.

En termes de sélectivité, les inhibiteurs multivalents ont démontré une plus forte affinité envers l'isoforme *h*CA II. Seul le système fullerène C_{60} a permis d'obtenir une forte sélectivité envers la *h*CA IX. Cela est surement du à l'emploi de l'inhibiteur de type coumarine qui est connu pour être spécifique à cette isoforme.

De même, des effets multivalents très intéressants peuvent être observés. En effet, pour la majorité des systèmes multivalents utilisés, des effets multivalents positifs ont été rapportés sur la *h*CA II. *A contrario*, des effets plus faibles voir négatifs ont été observés sur la *h*CA IX. Ces différences au niveau des effets multivalents peuvent provenir de la structure des isoformes. En effet, l'isoforme *h*CA II a une structure monomérique contrairement à l'isoforme *h*CA IX qui est sous forme de dimère. Ces différences au niveau structural peuvent favoriser ou non certains effets. Ici, un effet de *clustering* peut potentiellement avoir lieu sur la *h*CA II, avec l'agrégation de plusieurs enzymes autour de l'inhibiteur multivalent, qui a un site actif beaucoup plus facile d'accès que la *h*CA IX. Cette hypothèse pourrait être confirmée et faire l'objet de travaux très intéressants en co-cristallisant l'enzyme avec l'inhibiteur multivalent afin d'obtenir plus d'informations sur la relation structure-activité par analyse cristallographique de l'adduit.

Il a été constaté que la structure, la valence et la nature des systèmes multivalents employés peuvent affecter l'efficacité d'inhibition et la sélectivité envers les différentes isoformes de la CA. Plusieurs perspectives peuvent être pensées afin d'améliorer la sélectivité de ces inhibiteurs multivalents qui reste tout de même assez faible. Dans ce cadre là, il serait très intéressant d'utiliser des inhibiteurs avec une sélectivité plus forte pour les isoformes de la CA et de les greffer aux systèmes multivalents. De même, les systèmes conçus au cours de ces travaux sont dédiés à la bioconjugaison et peuvent parfaitement être employés pour la chimie combinatoire dynamique. Cette méthode permettrait le criblage et la formation *in-situ* d'inhibiteurs multivalents, monotypique ou hétérotopique, en présence de l'enzyme.

Enfin, la sélectivité peut également être modulée en jouant sur l'aspect structural, notamment sur les sites non conservés, des différentes isoformes de la CA. Cette approche a été étudiée dans le chapitre V. L'isoforme IX de la CA est la seule à présenter une chaine protéoglycane aux abords du site actif. Cette spécificité a été mise à profit en synthétisant des inhibiteurs hybrides composés d'un motif permettant l'inhibition de l'enzyme et d'un peptide de reconnaissance de la chaine protéoglycane. L'efficacité de l'inhibition a pu être fortement augmentée sur la *h*CA IX. Cependant, la sélectivité peut être encore améliorée *via* l'utilisation de coumarines qui sont connues pour inhiber sélectivement la *h*CA IX.

En conclusion, des inhibiteurs multivalents des anhydrases carboniques ont été synthétisés par bioconjugaison. Ces inhibiteurs ont montré une forte activité d'inhibition envers les isoformes de la CA. Cependant, il est encore difficile, à ce jour, de montrer une réelle relation structure-activité qui pourrait faciliter le développement d'inhibiteurs multivalents avec une plus grande sélectivité. Des analyses cristallographiques et la synthèse d'une plus large gamme de composés faisant varier les motifs permettant l'inhibition CA pourront sans doute satisfaire ce besoin.

Références

(1) Mammen, M.; Choi, S.-K.; Whitesides, G. M. Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37* (20), 2754–2794.

(2) Fasting, C.; Schalley, C. A.; Weber, M.; Seitz, O.; Hecht, S.; Koksch, B.; Dernedde, J.; Graf, C.; Knapp, E.-W.; Haag, R. Multivalency as a Chemical Organization and Action Principle. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (42), 10472–10498.

(3) Gouin, S. La multivalence, une voie à explorer pour l'inhibition d'enzymes ? *L'Actualité Chimique* **2013**, *373*, 14-17.

(4) Macdonald, S. J. F.; Cameron, R.; Demaine, D. A.; Fenton, R. J.; Foster, G.; Gower, D.; Hamblin, J. N.; Hamilton, S.; Hart, G. J.; Hill, A. P.; Inglis, G. G. A.; Jin, B.; Jones, H. T.; McConnell, D. B.; McKimm-Breschkin, J.; Mills, G.; Nguyen, V.; Owens, I. J.; Parry, N.; Shanahan, S. E.; Smith, D.; Watson, K. G.; Wu, W.-Y.; Tucker, S. P. Dimeric Zanamivir Conjugates with Various Linking Groups Are Potent, Long-Lasting Inhibitors of Influenza Neuraminidase Including H5N1 Avian Influenza. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (8), 2964–2971.

(5) Macdonald, S. J. F.; Watson, K. G.; Cameron, R.; Chalmers, D. K.; Demaine, D. A.; Fenton, R. J.; Gower, D.; Hamblin, J. N.; Hamilton, S.; Hart, G. J.; Inglis, G. G. A.; Jin, B.; Jones, H. T.; McConnell, D. B.; Mason, A. M.; Nguyen, V.; Owens, I. J.; Parry, N.; Reece, P. A.; Shanahan, S. E.; Smith, D.; Wu, W.-Y.; Tucker, S. P. Potent and Long-Acting Dimeric Inhibitors of Influenza Virus Neuraminidase Are Effective at a Once-Weekly Dosing Regimen. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48* (12), 4542–4549.

(6) Watson, K. G.; Cameron, R.; Fenton, R. J.; Gower, D.; Hamilton, S.; Jin, B.; Krippner, G. Y.; Luttick, A.; McConnell, D.; MacDonald, S. J. F.; Mason, A. M.; Nguyen, V.; Tucker, S. P.; Wu, W.-Y. Highly Potent and Long-Acting Trimeric and Tetrameric Inhibitors of Influenza Virus Neuraminidase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, *14* (6), 1589–1592.

(7) Lee, Y. C.; Townsend, R. R.; Hardy, M. R.; Lonngren, J.; Arnap, J.; Haraldsson, M.; Lonn, H. Binding of synthetic oligosaccharides to the hepatic Gal/GalNAc lectin. Dependence on fine structural features. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 199-202.

(8) Kanfar, N.; Bartolami, E.; Zelli, R.; Marra, A.; Winum, J.-Y.; Ulrich, S.; Dumy, P. Emerging Trends in Enzyme Inhibition by Multivalent Nanoconstructs. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (39), 9894–9906.

(9) Gestwicki, J. E.; Cairo, C. W.; Strong, L. E.; Oetjen, K. A.; Kiessling, L. L. Influencing Receptor−Ligand Binding Mechanisms with Multivalent Ligand Architecture. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (50), 14922–14933.

(10) Fiore, M.; Berthet, N.; Marra, A.; Gillon, E.; Dumy, P.; Dondoni, A.; Imberty, A.; Renaudet, O. Tetravalent Glycocyclopeptide with Nanomolar Affinity to Wheat Germ Agglutinin. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11* (41), 7113–7122.

(11) Zelli, R.; Bartolami, E.; Longevial, J.-F.; Bessin, Y.; Dumy, P.; Marra, A.; Ulrich, S. A Metal-Free Synthetic Approach to Peptide-Based Iminosugar Clusters as Novel Multivalent Glycosidase Inhibitors. *RSC Adv.* **2016**, *6* (3), 2210–2216.

(12) M. Chabre, Y.; Roy, R. Multivalent Glycoconjugate Syntheses and Applications Using Aromatic Scaffolds. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (11), 4657–4708.

(13) Rolland, O.; Turrin, C.-O.; Caminade, A.-M.; Majoral, J.-P. Dendrimers and Nanomedicine: Multivalency in Action. *New J. Chem.* **2009**, *33* (9), 1809–1824.

(14) Caminade, A.-M.; Ouali, A.; Laurent, R.; Turrin, C.-O.; Majoral, J.-P. The Dendritic Effect Illustrated with Phosphorus Dendrimers. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (12), 3890–3899.

(15) Reymond, J.-L.; Bergmann, M.; Darbre, T. Glycopeptide Dendrimers as Pseudomonas Aeruginosa Biofilm Inhibitors. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (11), 4814–4822.
(16) A. Mintzer, M.; W. Grinstaff, M. Biomedical Applications of Dendrimers : A Tutorial. *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40* (1), 173–190.
(17) De, M.; Ghosh, P. S.; Rotello, V. M. Applications of Nanoparticles in Biology. *Adv. Mater.* **2008**, *20* (22), 4225–4241.
(18) Kiessling, L. L.; Grim, J. C. Glycopolymer Probes of Signal Transduction. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (10), 4476–4491.
(19) Haag, R.; Kratz, F. Polymer Therapeutics: Concepts and Applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45* (8), 1198–1215.
(20) Boturyn, D.; Defrancq, E.; Dolphin, G. T.; Garcia, J.; Labbe, P.; Renaudet, O.; Dumy, P. RAFT Nano-Constructs: Surfing to Biological Applications. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14* (2), 224–240.
(21) Singh, Y.; Dolphin, G. T.; Razkin, J.; Dumy, P. Synthetic Peptide Templates for Molecular Recognition: Recent Advances and Applications. *ChemBioChem* **2006**, *7* (9), 1298–1314.
(22) Dondoni, A.; Marra, A. Calixarene and Calixresorcarene Glycosides: Their Synthesis and Biological Applications. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (9), 4949–4977.
(23) Sansone, F.; Baldini, L.; Casnati, A.; Ungaro, R. Calixarenes: From Biomimetic Receptors to Multivalent Ligands for Biomolecular Recognition. *New J. Chem.* **2010**, *34* (12), 2715–2728.
(24) Guichard, G.; Huc, I. Synthetic Foldamers. *Chem. Commun.* **2011**, *47* (21), 5933–5941.
(25) M. Davis, J.; K. Tsou, L.; D. Hamilton, A. Synthetic Non- Peptide Mimetics of α-Helices. *Chem. Soc. Rev.* **2007**, *36* (2), 326–334.
(26) Sadhu, K. K.; Röthlingshöfer, M.; Winssinger, N. DNA as a Platform to Program Assemblies with Emerging Functions in Chemical Biology. *Isr. J. Chem.* **2013**, *53* (1–2), 75–86.
(27) Spinelli, N.; Defrancq, E.; Morvan, F. Glycoclusters on Oligonucleotide and PNA Scaffolds: Synthesis and Applications. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (11), 4557–4573.
(28) Smith, D. K.; Hirst, A. R.; Love, C. S.; Hardy, J. G.; Brignell, S. V.; Huang, B. Self-Assembly Using Dendritic Building Blocks—towards Controllable Nanomaterials. *Prog. Polym. Sci.* **2005**, *30* (3), 220–293.
(29) Fréchet, J. M. J. Dendrimers and Supramolecular Chemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99* (8), 4782–4787.
(30) Caminade, A.-M.; Majoral, J.-P. Positively Charged Phosphorus Dendrimers. An Overview of Their Properties. *New J. Chem.* **2013**, *37* (11), 3358–3373.
(31) Caminade, A.-M.; Turrin, C.-O. Dendrimers for Drug Delivery. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2* (26), 4055–4066.
(32) Li, Z.; Huang, P.; Zhang, X.; Lin, J.; Yang, S.; Liu, B.; Gao, F.; Xi, P.; Ren, Q.; Cui, D. RGD-Conjugated Dendrimer-Modified Gold Nanorods for in Vivo Tumor Targeting and Photothermal Therapy. *Mol. Pharm.* **2010**, *7* (1), 94–104.
(33) Stiti, M.; Cecchi, A.; Rami, M.; Abdaoui, M.; Barragan-Montero, V.; Scozzafava, A.; Guari, Y.; Winum, J.-Y.; Supuran, C. T. Carbonic Anhydrase Inhibitor Coated Gold Nanoparticles Selectively Inhibit the Tumor-Associated Isoform IX over the Cytosolic Isozymes I and II. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (48), 16130–16131.

(34) Bowman, M.-C.; Ballard, T. E.; Ackerson, C. J.; Feldheim, D. L.; Margolis, D. M.; Melander, C. Inhibition of HIV Fusion with Multivalent Gold Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (22), 6896–6897.

(35) Ferris, D. P.; McGonigal, P. R.; Witus, L. S.; Kawaji, T.; Algaradah, M. M.; Alnajadah, A. R.; Nassar, M. S.; Stoddart, J. F. Oxime Ligation on the Surface of Mesoporous Silica Nanoparticles. *Org. Lett.* **2015**, *17* (9), 2146–2149.

(36) Xie, J.; Chen, K.; Lee, H.-Y.; Xu, C.; Hsu, A. R.; Peng, S.; Chen, X.; Sun, S. Ultrasmall c(RGDyK)-Coated Fe3O4 Nanoparticles and Their Specific Targeting to Integrin Avβ3-Rich Tumor Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (24), 7542–7543.

(37) Gao, J.; Chen, K.; Xie, R.; Xie, J.; Yan, Y.; Cheng, Z.; Peng, X.; Chen, X. In Vivo Tumor-Targeted Fluorescence Imaging Using Near-Infrared Non-Cadmium Quantum Dots. *Bioconjug. Chem.* **2010**, *21* (4), 604–609.

(38) M. Guldi, D. Fullerene – Porphyrin Architectures; Photosynthetic Antenna and Reaction Center Models. *Chem. Soc. Rev.* **2002**, *31* (1), 22–36.

(39) Imahori, H. Giant Multiporphyrin Arrays as Artificial Light-Harvesting Antennas. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108* (20), 6130–6143.

(40) Nierengarten, J.-F. Fullerene-(π-Conjugated Oligomer) Dyads as Active Photovoltaic Materials. *Sol. Energy Mater. Sol. Cells* **2004**, *83* (2), 187–199.

(41) Ros, T. D.; Prato, M. Medicinal Chemistry with Fullerenes and Fullerene Derivatives. *Chem. Commun.* **1999**, *0* (8), 663–669.

(42) Nakamura, E.; Isobe, H. Functionalized Fullerenes in Water. The First 10 Years of Their Chemistry, Biology, and Nanoscience. *Acc. Chem. Res.* **2003**, *36* (11), 807–815.

(43) Moghimi, S. M.; Symonds, P.; Murray, J. C.; Hunter, A. C.; Debska, G.; Szewczyk, A. A Two-Stage Poly(Ethylenimine)-Mediated Cytotoxicity: Implications for Gene Transfer/Therapy. *Mol. Ther. 11* (6), 990–995.

(44) Fletcher, S.; Hamilton, A. D. Targeting Protein–protein Interactions by Rational Design: Mimicry of Protein Surfaces. *J. R. Soc. Interface* **2006**, *3* (7), 215–233.

(45) Chen, X.; Hui, L.; Foster, D. A.; Drain, C. M. Efficient Synthesis and Photodynamic Activity of Porphyrin-Saccharide Conjugates: Targeting and Incapacitating Cancer Cells. *Biochemistry (Mosc.)* **2004**, *43* (34), 10918–10929.

(46) Ma, X.; Zhao, Y. Biomedical Applications of Supramolecular Systems Based on Host–Guest Interactions. *Chem. Rev.* **2015**, *115* (15), 7794–7839.

(47) Zadmard, R.; S. Alavijeh, N. Protein Surface Recognition by Calixarenes. *RSC Adv.* **2014**, *4* (78), 41529–41542.

(48) Uekama, K.; Hirayama, F.; Irie, T. Cyclodextrin Drug Carrier Systems. *Chem. Rev.* **1998**, *98* (5), 2045–2076.

(49) Irie, T.; Uekama, K. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins. III. Toxicological Issues and Safety Evaluation. *J. Pharm. Sci.* **1997**, *86* (2), 147–162.

(50) Regan, L. Protein Design: Novel Metal-Binding Sites. *Trends Biochem. Sci.* **1995**, *20* (7), 280–285.

(51) Tuchscherer, G.; Scheibler, L.; Dumy, P.; Mutter, M. Protein Design: On the Threshold of Functional Properties. *Pept. Sci.* **1998**, *47* (1), 63–73.

(52) Dumy, P.; Eggleston, I. M.; Esposito, G.; Nicula, S.; Mutter, M. Solution Structure of Regioselectively Addressable Functionalized Templates: An NMR and Restrained Molecular Dynamics Investigation. *Biopolymers* **1996**, *39* (3), 297–308.

(53) Robinson, J. A. β-Hairpin Peptidomimetics: Design, Structures and Biological Activities. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (10), 1278–1288.

(54) Dumy, P.; Eggleston, I. M.; Cervigni, S.; Sila, U.; Sun, X.; Mutter, M. A Convenient Synthesis of Cyclic Peptides as Regioselectively Addressable Functionalized Templates (RAFT). *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36* (8), 1255–1258.

(55) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40* (11), 2004–2021.

(56) McKay, C. S.; Finn, M. G. Click Chemistry in Complex Mixtures: Bioorthogonal Bioconjugation. *Chem. Biol.* **2014**, *21* (9), 1075–1101.

(57) Patterson, D. M.; Nazarova, L. A.; Prescher, J. A. Finding the Right (Bioorthogonal) Chemistry. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9* (3), 592–605.

(58) King, M.; Wagner, A. Developments in the Field of Bioorthogonal Bond Forming Reactions—Past and Present Trends. *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25* (5), 825–839.

(59) Huisgen, R. 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1963**, *2* (10), 565–598.

(60) Wang, Q.; Chan, T. R.; Hilgraf, R.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B.; Finn, M. G. Bioconjugation by Copper(I)-Catalyzed Azide-Alkyne [3 + 2] Cycloaddition. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (11), 3192–3193.

(61) Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective "Ligation" of Azides and Terminal Alkynes. *Angew. Chem.* **2002**, *114* (14), 2708–2711.

(62) Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (9), 3057–3064.

(63) Himo, F.; Lovell, T.; Hilgraf, R.; Rostovtsev, V. V.; Noodleman, L.; Sharpless, K. B.; Fokin, V. V. Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127* (1), 210–216.

(64) Worrell, B. T.; Malik, J. A.; Fokin, V. V. Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. *Science* **2013**, *340* (6131), 457–460.

(65) Meldal, M.; Tornøe, C. W. Cu-Catalyzed Azide−Alkyne Cycloaddition. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (8), 2952–3015.

(66) Wolbers, F.; ter Braak, P.; Le Gac, S.; Luttge, R.; Andersson, H.; Vermes, I.; van den Berg, A. Viability Study of HL60 Cells in Contact with Commonly Used Microchip Materials. *ELECTROPHORESIS* **2006**, *27* (24), 5073–5080.

(67) Speers, A. E.; Cravatt, B. F. Profiling Enzyme Activities In Vivo Using Click Chemistry Methods. *Chem. Biol.* **2004**, *11* (4), 535–546.

(68) Kennedy, D. C.; Lyn, R. K.; Pezacki, J. P. Cellular Lipid Metabolism Is Influenced by the Coordination Environment of Copper. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (7), 2444–2445.

(69) H. Northrop, B.; H. Frayne, S.; Choudhary, U. Thiol–maleimide "Click" Chemistry: Evaluating the Influence of Solvent, Initiator, and Thiol on the Reaction Mechanism, Kinetics, and Selectivity. *Polym. Chem.* **2015**, *6* (18), 3415–3430.

(70) Hoyle, C. E.; Bowman, C. N. Thiol–Ene Click Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49* (9), 1540–1573.

(71) E. Hoyle, C.; B. Lowe, A.; N. Bowman, C. Thiol -Click Chemistry: A Multifaceted Toolbox for Small Molecule and Polymer Synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (4), 1355–1387.

(72) Dondoni, A.; Marra, A. Recent Applications of Thiol –ene Coupling as a Click Process for Glycoconjugation. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41* (2), 573–586.
(73) Schrittwieser, J. H.; Velikogne, S.; Kroutil, W. Biocatalytic Imine Reduction and Reductive Amination of Ketones. *Adv. Synth. Catal.* **2015**, *357* (8), 1655–1685.
(74) Paolantoni, D.; Cantel, S.; Dumy, P.; Ulrich, S. A Dynamic Combinatorial Approach for Identifying Side Groups That Stabilize DNA-Templated Supramolecular Self-Assemblies. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16* (2), 3609–3625.
(75) Corbett, P. T.; Leclaire, J.; Vial, L.; West, K. R.; Wietor, J.-L.; Sanders, J. K. M.; Otto, S. Dynamic Combinatorial Chemistry. *Chem. Rev.* **2006**, *106* (9), 3652–3711.
(76) Kalia, J.; Raines, R. T. Hydrolytic Stability of Hydrazones and Oximes. *Angew. Chem.* **2008**, *120* (39), 7633–7636.
(77) Fina, N. J.; Edwards, J. O. The Alpha Effect. A Review. *Int. J. Chem. Kinet.* **1973**, *5* (1), 1–26.
(78) Bartolami, E.; Bessin, Y.; Gervais, V.; Dumy, P.; Ulrich, S. Dynamic Expression of DNA Complexation with Self-Assembled Biomolecular Clusters. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (35), 10183–10187.
(79) Duléry, V.; Renaudet, O.; Dumy, P. Ethoxyethylidene Protecting Group Prevents N-Overacylation in Aminooxy Peptide Synthesis. *Tetrahedron* **2007**, *63* (48), 11952–11958.
(80) Jencks, W. P. Studies on the Mechanism of Oxime and Semicarbazone Formation1. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81* (2), 475–481.
(81) El-Mahdi, O.; Melnyk, O. α-Oxo Aldehyde or Glyoxylyl Group Chemistry in Peptide Bioconjugation. *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24* (5), 735–765.
(82) Pascual, R.; Herráez, M. A. The Mechanism of the Oxidative Deamination and Decarboxylation of Serine and Threonine by Periodate in Acid Medium. *Can. J. Chem.* **1985**, *63* (9), 2349–2353.
(83) Thomas, B.; Fiore, M.; Chand Daskhan, G.; Spinelli, N.; Renaudet, O. A Multi-Ligation Strategy for the Synthesis of Heterofunctionalized Glycosylated Scaffolds. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (25), 5436–5439.
(84) Renaudet, O.; Roy, R. Multivalent Scaffolds in Glycoscience: An Overview. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (11), 4515–4517.
(85) Brissonnet, Y.; Ortiz Mellet, C.; Morandat, S.; Garcia Moreno, M. I.; Deniaud, D.; Matthews, S. E.; Vidal, S.; Šesták, S.; El Kirat, K.; Gouin, S. G. Topological Effects and Binding Modes Operating with Multivalent Iminosugar-Based Glycoclusters and Mannosidases. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135* (49), 18427–18435.
(86) Compain, P.; Decroocq, C.; Iehl, J.; Holler, M.; Hazelard, D.; Mena Barragán, T.; Ortiz Mellet, C.; Nierengarten, J.-F. Glycosidase Inhibition with Fullerene Iminosugar Balls: A Dramatic Multivalent Effect. *Angew. Chem.* **2010**, *122* (33), 5889–5892.
(87) Decroocq, C.; Rodríguez-Lucena, D.; Ikeda, K.; Asano, N.; Compain, P. Cyclodextrin-Based Iminosugar Click Clusters: The First Examples of Multivalent Pharmacological Chaperones for the Treatment of Lysosomal Storage Disorders. *ChemBioChem* **2012**, *13* (5), 661–664.
(88) Decroocq, C.; Rodríguez-Lucena, D.; Russo, V.; Mena Barragán, T.; Ortiz Mellet, C.; Compain, P. The Multivalent Effect in Glycosidase Inhibition: Probing the Influence of Architectural Parameters with Cyclodextrin-Based Iminosugar Click Clusters. *Chem. – Eur. J.* **2011**, *17* (49), 13825–13831.

(89) Joosten, A.; Decroocq, C.; de Sousa, J.; Schneider, J. P.; Etamé, E.; Bodlenner, A.; Butters, T. D.; Compain, P. A Systematic Investigation of Iminosugar Click Clusters as Pharmacological Chaperones for the Treatment of Gaucher Disease. *ChemBioChem* **2014**, *15* (2), 309–319.

(90) Brissonnet, Y.; Ladevèze, S.; Tezé, D.; Fabre, E.; Deniaud, D.; Daligault, F.; Tellier, C.; Šesták, S.; Remaud-Simeon, M.; Potocki-Veronese, G.; Gouin, S. G. Polymeric Iminosugars Improve the Activity of Carbohydrate-Processing Enzymes. *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26* (4), 766–772.

(91) Weight, A. K.; Haldar, J.; Álvarez de Cienfuegos, L.; Gubareva, L. V.; Tumpey, T. M.; Chen, J.; Klibanov, A. M. Attaching Zanamivir to a Polymer Markedly Enhances Its Activity against Drug-Resistant Strains of Influenza a Virus. *J. Pharm. Sci.* **2011**, *100* (3), 831–835.

(92) Honda, T.; Yoshida, S.; Arai, M.; Masuda, T.; Yamashita, M. Synthesis and Anti-Influenza Evaluation of Polyvalent Sialidase Inhibitors Bearing 4-Guanidino-Neu5Ac2en Derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12* (15), 1929–1932.

(93) Meldrum, N. U.; Roughton, F. J. W. Carbonic Anhydrase. Its Preparation and Properties. *J. Physiol.* **1933**, *80* (2), 113–142.

(94) Supuran, C. T. Structure and Function of Carbonic Anhydrases. *Biochem. J.* **2016**, *473* (14), 2023–2032.

(95) Supuran, C. T. Carbonic Anhydrases: From Biomedical Applications of the Inhibitors and Activators to Biotechnological Use for CO2 Capture. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2013**, *28* (2), 229–230.

(96) Supuran, C. T. Carbonic Anhydrases: Novel Therapeutic Applications for Inhibitors and Activators. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7* (2), 168–181.

(97) Neri, D.; Supuran, C. T. Interfering with PH Regulation in Tumours as a Therapeutic Strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2011**, *10* (10), 767–777.

(98) Capasso, C.; Supuran, C. T. An Overview of the Alpha-, Beta- and Gamma-Carbonic Anhydrases from Bacteria: Can Bacterial Carbonic Anhydrases Shed New Light on Evolution of Bacteria? *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2015**, *30* (2), 325–332.

(99) Kikutani, S.; Nakajima, K.; Nagasato, C.; Tsuji, Y.; Miyatake, A.; Matsuda, Y. Thylakoid Luminal θ-Carbonic Anhydrase Critical for Growth and Photosynthesis in the Marine Diatom Phaeodactylum Tricornutum. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2016**, *113* (35), 9828–9833.

(100) Del Prete, S.; Vullo, D.; Fisher, G. M.; Andrews, K. T.; Poulsen, S.-A.; Capasso, C.; Supuran, C. T. Discovery of a New Family of Carbonic Anhydrases in the Malaria Pathogen Plasmodium Falciparum—The η-Carbonic Anhydrases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (18), 4389–4396.

(101) Supuran, C. T.; Scozzafava, A. Carbonic Anhydrases as Targets for Medicinal Chemistry. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15* (13), 4336–4350.

(102) Supuran, C. T. Carbonic Anhydrases as Drug Targets - An Overview. *Curr. Top. Med. Chem.* **2007**, *7* (9), 825–833.

(103) Christianson, D. W.; Fierke, C. A. Carbonic Anhydrase: Evolution of the Zinc Binding Site by Nature and by Design. *Acc. Chem. Res.* **1996**, *29* (7), 331–339.

(104) Temperini, C.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. Carbonic Anhydrase Activators: The First X-Ray Crystallographic Study of an Adduct of Isoform I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16* (19), 5152–5156.

(105) Kim, C.-Y.; Whittington, D. A.; Chang, J. S.; Liao, J.; May, J. A.; Christianson, D. W. Structural Aspects of Isozyme Selectivity in the Binding of Inhibitors to Carbonic Anhydrases II and IV. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (4), 888–893.

(106) Alterio, V.; Di Fiore, A.; D'Ambrosio, K.; Supuran, C. T.; De Simone, G. Multiple Binding Modes of Inhibitors to Carbonic Anhydrases: How to Design Specific Drugs Targeting 15 Different Isoforms? *Chem. Rev.* **2012**, *112* (8), 4421–4468.

(107) Alterio, V.; Hilvo, M.; Fiore, A. D.; Supuran, C. T.; Pan, P.; Parkkila, S.; Scaloni, A.; Pastorek, J.; Pastorekova, S.; Pedone, C.; Scozzafava, A.; Monti, S. M.; Simone, G. D. Crystal Structure of the Catalytic Domain of the Tumor-Associated Human Carbonic Anhydrase IX. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106* (38), 16233–16238.

(108) Scozzafava, A.; Mastrolorenzo, A.; Supuran, C. T. Modulation of Carbonic Anhydrase Activity and Its Applications in Therapy. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2004**, *14* (5), 667–702.

(109) Casini, A.; Abbate, F.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. Carbonic Anhydrase Inhibitors: X-Ray Crystallographic Structure of the Adduct of Human Isozyme II with a Bis-Sulfonamide—two Heads Are Better than One? *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13* (16), 2759–2763.

(110) Roy, B. C.; Banerjee, A. L.; Swanson, M.; Jia, X. G.; Haldar, M. K.; Mallik, S.; Srivastava, D. K. Two-Prong Inhibitors for Human Carbonic Anhydrase II. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (41), 13206–13207.

(111) Banerjee, A. L.; Swanson, M.; Roy, B. C.; Jia, X.; Haldar, M. K.; Mallik, S.; Srivastava, D. K. Protein Surface-Assisted Enhancement in the Binding Affinity of an Inhibitor for Recombinant Human Carbonic Anhydrase-II. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (35), 10875–10883.

(112) Banerjee, A. L.; Eiler, D.; Roy, B. C.; Jia, X.; Haldar, M. K.; Mallik, S.; Srivastava, D. K. Spacer-Based Selectivity in the Binding of "Two-Prong" Ligands to Recombinant Human Carbonic Anhydrase I. *Biochemistry (Mosc.)* **2005**, *44* (9), 3211–3224.

(113) Vitale, R. M.; Alterio, V.; Innocenti, A.; Winum, J.-Y.; Monti, S. M.; De Simone, G.; Supuran, C. T. Carbonic Anhydrase Inhibitors. Comparison of Aliphatic Sulfamate/Bis-Sulfamate Adducts with Isozymes II and IX as a Platform for Designing Tight-Binding, More Isoform-Selective Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2009**, *52* (19), 5990–5998.

(114) D'Ambrosio, K.; Smaine, F.-Z.; Carta, F.; De Simone, G.; Winum, J.-Y.; Supuran, C. T. Development of Potent Carbonic Anhydrase Inhibitors Incorporating Both Sulfonamide and Sulfamide Groups. *J. Med. Chem.* **2012**, *55* (15), 6776–6783.

(115) Mack, E. T.; Snyder, P. W.; Perez-Castillejos, R.; Bilgiçer, B.; Moustakas, D. T.; Butte, M. J.; Whitesides, G. M. Dependence of Avidity on Linker Length for a Bivalent Ligand–Bivalent Receptor Model System. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134* (1), 333–345.

(116) Krall, N.; Pretto, F.; Neri, D. A Bivalent Small Molecule-Drug Conjugate Directed against Carbonic Anhydrase IX Can Elicit Complete Tumour Regression in Mice. *Chem. Sci.* **2014**, *5* (9), 3640–3644.

(117) Krall, N.; Pretto, F.; Decurtins, W.; Bernardes, G. J. L.; Supuran, C. T.; Neri, D. A Small-Molecule Drug Conjugate for the Treatment of Carbonic Anhydrase IX Expressing Tumors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (16), 4231–4235.

(118) Akocak, S.; Alam, M. R.; Shabana, A. M.; Sanku, R. K. K.; Vullo, D.; Thompson, H.; Swenson, E. R.; Supuran, C. T.; Ilies, M. A. PEGylated Bis-Sulfonamide Carbonic Anhydrase Inhibitors Can Efficiently Control the Growth of Several Carbonic Anhydrase IX-Expressing Carcinomas. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (10), 5077–5088.

(119) Saada, M.-C.; Montero, J.-L.; Vullo, D.; Scozzafava, A.; Winum, J.-Y.; Supuran, C. T. Carbonic Anhydrase Activators: Gold Nanoparticles Coated with Derivatized Histamine, Histidine, and Carnosine Show Enhanced Activatory Effects on Several Mammalian Isoforms. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (5), 1170–1177.

(120) Carta, F.; Osman, S. M.; Vullo, D.; AlOthman, Z.; Supuran, C. T. Dendrimers Incorporating Benzenesulfonamide Moieties Strongly Inhibit Carbonic Anhydrase Isoforms I–XIV. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (23), 6453–6457.

(121) Abellán-Flos, M.; Tanç, M.; Supuran, C. T.; Vincent, S. P. Exploring Carbonic Anhydrase Inhibition with Multimeric Coumarins Displayed on a Fullerene Scaffold. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (27), 7445–7451.

(122) Abellán-Flos, M.; Tanç, M.; Supuran, C. T.; Vincent, S. P. Multimeric Xanthates as Carbonic Anhydrase Inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2016**, *31* (6), 946–952.

(123) Scozzafava, A.; Mastrolorenzo, A.; Supuran, C. T. Carbonic Anhydrase Inhibitors and Activators and Their Use in Therapy. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2006**, *16* (12), 1627–1664.

(124) Supuran, C. T. How Many Carbonic Anhydrase Inhibition Mechanisms Exist? *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2016**, *31* (3), 345–360.

(125) Nair, S. K.; Ludwig, P. A.; Christianson, D. W. Two-Site Binding of Phenol in the Active Site of Human Carbonic Anhydrase II: Structural Implications for Substrate Association. *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116* (8), 3659–3660.

(126) Innocenti, A.; Vullo, D.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. Carbonic Anhydrase Inhibitors: Interactions of Phenols with the 12 Catalytically Active Mammalian Isoforms (CA I–XIV). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (5), 1583–1587.

(127) Carta, F.; Temperini, C.; Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Kaila, K.; Supuran, C. T. Polyamines Inhibit Carbonic Anhydrases by Anchoring to the Zinc-Coordinated Water Molecule. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (15), 5511–5522.

(128) Tars, K.; Vullo, D.; Kazaks, A.; Leitans, J.; Lends, A.; Grandane, A.; Zalubovskis, R.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. Sulfocoumarins (1,2-Benzoxathiine-2,2-Dioxides): A Class of Potent and Isoform-Selective Inhibitors of Tumor-Associated Carbonic Anhydrases. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (1), 293–300.

(129) Ferraroni, M.; Carta, F.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. Thioxocoumarins Show an Alternative Carbonic Anhydrase Inhibition Mechanism Compared to Coumarins. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (1), 462–473.

(130) Temperini, C.; Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Parkkila, S.; Supuran, C. T. The Coumarin-Binding Site in Carbonic Anhydrase Accommodates Structurally Diverse Inhibitors: The Antiepileptic Lacosamide As an Example and Lead Molecule for Novel Classes of Carbonic Anhydrase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (2), 850–854.

(131) Touisni, N.; Maresca, A.; McDonald, P. C.; Lou, Y.; Scozzafava, A.; Dedhar, S.; Winum, J.-Y.; Supuran, C. T. Glycosyl Coumarin Carbonic Anhydrase IX and XII Inhibitors Strongly Attenuate the Growth of Primary Breast Tumors. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (24), 8271–8277.

(132) Bonneau, A.; Maresca, A.; Winum, J.-Y.; Supuran, C. T. Metronidazole-Coumarin Conjugates and 3-Cyano-7-Hydroxy-Coumarin Act as Isoform-Selective Carbonic Anhydrase Inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2013**, *28* (2), 397–401.

(133) Sharma, A.; Tiwari, M.; Supuran, C. T. Novel Coumarins and Benzocoumarins Acting as Isoform-Selective Inhibitors against the Tumor-Associated Carbonic Anhydrase IX. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2014**, *29* (2), 292–296.

(134) Carta, F.; Maresca, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. 5- and 6-Membered (Thio)Lactones Are Prodrug Type Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (1), 267–270.

(135) D'Ambrosio, K.; Carradori, S.; Monti, S. M.; Buonanno, M.; Secci, D.; Vullo, D.; Supuran, C. T.; Simone, G. D. Out of the Active Site Binding Pocket for Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Chem. Commun.* **2014**, *51* (2), 302–305.

(136) Keilin, D.; Mann, T. Carbonic anhydrase. Purification and nature of the enzyme. *Biochem. J.* **1940**, *34*, 8-9.

(137) Clare, B. W.; Supuran, C. T. A Perspective on Quantitative Structure–activity Relationships and Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2006**, *2* (1), 113–137.

(138) Di Fiore, A.; Truppo, E.; Supuran, C. T.; Alterio, V.; Dathan, N.; Bootorabi, F.; Parkkila, S.; Monti, S. M.; Simone, G. D. Crystal Structure of the C183S/C217S Mutant of Human CA VII in Complex with Acetazolamide. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (17), 5023–5026.

(139) Bozdag, M.; Ferraroni, M.; Nuti, E.; Vullo, D.; Rossello, A.; Carta, F.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. Combining the Tail and the Ring Approaches for Obtaining Potent and Isoform-Selective Carbonic Anhydrase Inhibitors: Solution and X-Ray Crystallographic Studies. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22* (1), 334–340.

(140) Pinard, M. A.; Mahon, B.; McKenna, R. Probing the Surface of Human Carbonic Anhydrase for Clues towards the Design of Isoform Specific Inhibitors. *BioMed Research International* **2015**, *2015*, 15.

(141) Winum, J.-Y.; Vullo, D.; Casini, A.; Montero, J.-L.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. Carbonic Anhydrase Inhibitors: Inhibition of Transmembrane, Tumor-Associated Isozyme IX, and Cytosolic Isozymes I and II with Aliphatic Sulfamates. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (25), 5471–5477.

(142) Winum, J.-Y.; Pastorekova, S.; Jakubickova, L.; Montero, J.-L.; Scozzafava, A.; Pastorek, J.; Vullo, D.; Innocenti, A.; Supuran, C. T. Carbonic Anhydrase Inhibitors: Synthesis and Inhibition of Cytosolic/Tumor-Associated Carbonic Anhydrase Isozymes I, II, and IX with Bis-Sulfamates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15* (3), 579–584.

(143) Menchise, V.; De Simone, G.; Alterio, V.; Di Fiore, A.; Pedone, C.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. Carbonic Anhydrase Inhibitors: Stacking with Phe131 Determines Active Site Binding Region of Inhibitors As Exemplified by the X-Ray Crystal Structure of a Membrane-Impermeant Antitumor Sulfonamide Complexed with Isozyme II. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (18), 5721–5727.

(144) Winum, J.-Y.; Poulsen, Sally-Ann; Supuran, C. T. Therapeutic Applications of Glycosidic Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Med. Res. Rev.* **2009**, *29* (3), 419–435.

(145) Monti, S. M.; Maresce, A.; Viparelli, F.; Carta, F.; De Simone, G.; Muhlschelgel, F. A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. Dithiocarbamates are strong inhibitors of the beta-class fungal carbonic anhydrases from Cryptococcus neoformans, Candida albicans and Candida glabrata . *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 859-862.

(146) Vu, H.; Pham, N. B.; Quinn, R. J. Direct Screening of Natural Product Extracts Using Mass Spectrometry. *J. Biomol. Screen.* **2008**, *13* (4), 265–275.

(147) Maresca, A.; Temperini, C.; Vu, H.; Pham, N. B.; Poulsen, S.-A.; Scozzafava, A.; Quinn, R. J.; Supuran, C. T. Non-Zinc Mediated Inhibition of Carbonic Anhydrases: Coumarins Are a New Class of Suicide Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (8), 3057–3062.

(148) Maresca, A.; Temperini, C.; Pochet, L.; Masereel, B.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. Deciphering the Mechanism of Carbonic Anhydrase Inhibition with Coumarins and Thiocoumarins. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (1), 335–344.

(149) Carta, F.; Vullo, D.; Maresca, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. New Chemotypes Acting as Isozyme-Selective Carbonic Anhydrase Inhibitors with Low Affinity for the Offtarget Cytosolic Isoform II. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (6), 2182–2185.

(150) Carta, F.; Maresca, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. Novel Coumarins and 2-Thioxo-Coumarins as Inhibitors of the Tumor-Associated Carbonic Anhydrases IX and XII. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20* (7), 2266–2273.

(151) Maresca, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. 7,8-Disubstituted- but Not 6,7-Disubstituted Coumarins Selectively Inhibit the Transmembrane, Tumor-Associated Carbonic Anhydrase Isoforms IX and XII over the Cytosolic Ones I and II in the Low Nanomolar/Subnanomolar Range. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (24), 7255–7258.

(152) Grandane, A.; Tanc, M.; Zalubovskis, R.; Supuran, C. T. Synthesis of 6-Tetrazolyl-Substituted Sulfocoumarins Acting as Highly Potent and Selective Inhibitors of the Tumor-Associated Carbonic Anhydrase Isoforms IX and XII. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22* (5), 1522–1528.

(153) Tanc, M.; Carta, F.; Bozdag, M.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. 7-Substituted-Sulfocoumarins Are Isoform-Selective, Potent Carbonic Anhydrase II Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21* (15), 4502–4510.

(154) Lou, Y.; McDonald, P. C.; Oloumi, A.; Chia, S.; Ostlund, C.; Ahmadi, A.; Kyle, A.; Keller, U. auf dem; Leung, S.; Huntsman, D.; Clarke, B.; Sutherland, B. W.; Waterhouse, D.; Bally, M.; Roskelley, C.; Overall, C. M.; Minchinton, A.; Pacchiano, F.; Carta, F.; Scozzafava, A.; Touisni, N.; Winum, J.-Y.; Supuran, C. T.; Dedhar, S. Targeting Tumor Hypoxia: Suppression of Breast Tumor Growth and Metastasis by Novel Carbonic Anhydrase IX Inhibitors. *Cancer Res.* **2011**, *71* (9), 3364–3376.

(155) Winum, J.-Y.; Dogné, J.-M.; Casini, A.; de Leval, X.; Montero, J.-L.; Scozzafava, A.; Vullo, D.; Innocenti, A.; Supuran, C. T. Carbonic Anhydrase Inhibitors: Synthesis and Inhibition of Cytosolic/Membrane-Associated Carbonic Anhydrase Isozymes I, II, and IX with Sulfonamides Incorporating Hydrazino Moieties. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (6), 2121–2125.

(156) Jorge, S. D.; Masunari, A.; Rangel-Yagui, C. O.; Pasqualoto, K. F. M.; Tavares, L. C. Design, Synthesis, Antimicrobial Activity and Molecular Modeling Studies of Novel Benzofuroxan Derivatives against Staphylococcus Aureus. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17* (8), 3028–3036.

(157) Hoyle, J. Preparation of Sulphonic Acids, Esters, Amides and Halides. In *Sulphonic Acids, Esters and their Derivatives (1991)*; Patai, essor S., Rappoport, Z., Eds.; John Wiley & Sons, Ltd, 1991; pp 351–399.

(158) Huntress, E. H.; Carten, F. H. Identification of Organic Compounds. I. Chlorosulfonic Acid as a Reagent for the Identification of Aryl Halides. *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, *62* (3), 511–514.

(159) Wey, S.-J.; Augustyniak, M. E.; Cochran, E. D.; Ellis, J. L.; Fang, X.; Garvey, D. S.; Janero, D. R.; Letts, L. G.; Martino, A. M.; Melim, T. L.; Murty, M. G.; Richardson, S. K.; Schroeder, J. D.; Selig, W. M.; Trocha, A. M.; Wexler, R. S.; Young, D. V.; Zemtseva, I. S.; Zifcak, B. M. Structure-Based Design, Synthesis, and Biological Evaluation of

Indomethacin Derivatives as Cyclooxygenase-2 Inhibiting Nitric Oxide Donors. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (25), 6367–6382.

(160) Appel, R.; Berger, G. Hydrazinsulfonsäure-Amide, I. Über Das Hydrazodisulfamid. *Chem. Ber.* **1958**, *91* (6), 1339–1341.

(161) Tsuri, T.; Haga, N.; Matsui, T.; Kamata, S.; Kakushi, H.; Uchida, K. A Novel Class of Platelet Activating Factor (PAF) Antagonists. I. Synthesis and Structure-Activity Studies on PAF-Sulfonamide Isosters. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 75-84.

(162) v. Pechmann, H. Neue Bildungsweise Der Cumarine. Synthese Des Daphnetins. I. *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1884**, *17* (1), 929–936.

(163) Salahuddin, S.; Renaudet, O.; Reymond, J.-L. Aldehyde Detection by Chromogenic/Fluorogenic Oxime Bond Fragmentation. *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2* (10), 1471–1475.

(164) TAMURA, Y.; MINAMIKAWA, J.; IKEDA, M. O-Mesitylenesulfonylhydroxylamine and Related Compounds - Powerful Aminating Reagents. *Synthesis* **1977**, *1977* (01), 1–17.

(165) Trouche, N.; Wieckowski, S.; Sun, W.; Chaloin, O.; Hoebeke, J.; Fournel, S.; Guichard, G. Small Multivalent Architectures Mimicking Homotrimers of the TNF Superfamily Member CD40L: Delineating the Relationship between Structure and Effector Function. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (44), 13480–13492.

(166) Mutter, M. Nature's Rules and Chemist's Tools: A Way for Creating Novel Proteins. *Trends Biochem. Sci.* **1988**, *13* (7), 260–265.

(167) Yoo, B.; Shin, S. B. Y.; Huang, M. L.; Kirshenbaum, K. Peptoid Macrocycles: Making the Rounds with Peptidomimetic Oligomers. *Chem. – Eur. J.* **2010**, *16* (19), 5528–5537.

(168) Mutter, M.; Vuilleumier, S. A Chemical Approach to Protein Design—Template-Assembled Synthetic Proteins (TASP). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28* (5), 535–554.

(169) Mutter, M.; Dumy, P.; Garrouste, P.; Lehmann, C.; Mathieu, M.; Peggion, C.; Peluso, S.; Razaname, A.; Tuchscherer, G. Template Assembled Synthetic Proteins (TASP) as Functional Mimetics of Proteins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, *35* (13–14), 1482–1485.

(170) Peng, Z.-H. Solid Phase Synthesis and NMR Conformational Studies on Cyclic Decapeptide Template Molecule. *Biopolymers* **1999**, *49* (7), 565–574.

(171) Peluso, S.; Rückle, T.; Lehmann, C.; Mutter, M.; Peggion, C.; Crisma, M. Crystal Structure of a Synthetic Cyclodecapeptide for Template-Assembled Synthetic Protein Design. *ChemBioChem* **2001**, *2* (6), 432–437.

(172) Mutter, M.; Tuchscherer, G. G.; Miller, C.; Altmann, K. H.; Carey, R. I.; Wyss, D. F.; Labhardt, A. M.; Rivier, J. E. Template-Assembled Synthetic Proteins with Four-Helix-Bundle Topology. Total Chemical Synthesis and Conformational Studies. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114* (4), 1463–1470.

(173) Rau, H. K.; Haehnel, W. Design, Synthesis, and Properties of a Novel Cytochrome b Model. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120* (3), 468–476.

(174) Murat, P.; Cressend, D.; Spinelli, N.; Van der Heyden, A.; Labbé, P.; Dumy, P.; Defrancq, E. A Novel Conformationally Constrained Parallel G Quadruplex. *ChemBioChem* **2008**, *9* (16), 2588–2591.

(175) Dolphin, G. T.; Dumy, P.; Garcia, J. Control of Amyloid β-Peptide Protofibril Formation by a Designed Template Assembly. *Angew. Chem.* **2006**, *118* (17), 2765–2768.

(176) Desgrosellier, J. S.; Cheresh, D. A. Integrins in Cancer: Biological Implications and Therapeutic Opportunities. *Nat Rev Cancer* **2010**, *10* (1), 9–22.

(177) Ruoslahti, E. Rgd and Other Recognition Sequences for Integrins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **1996**, *12* (1), 697–715.
(178) Boturyn, D.; Coll, J.-L.; Garanger, E.; Favrot, M.-C.; Dumy, P. Template Assembled Cyclopeptides as Multimeric System for Integrin Targeting and Endocytosis. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126* (18), 5730–5739.
(179) Garanger, E.; Boturyn, D.; Jin, Z.; Dumy, P.; Favrot, M.-C.; Coll, J.-L. New Multifunctional Molecular Conjugate Vector for Targeting, Imaging, and Therapy of Tumors. *Mol. Ther.* **2005**, *12* (6), 1168–1175.
(180) Pujol, A. M.; Cuillel, M.; Renaudet, O.; Lebrun, C.; Charbonnier, P.; Cassio, D.; Gateau, C.; Dumy, P.; Mintz, E.; Delangle, P. Hepatocyte Targeting and Intracellular Copper Chelation by a Thiol-Containing Glycocyclopeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133* (2), 286–296.
(181) Renaudet, O.; Dumy, P. Chemoselectively Template-Assembled Glycopeptide Presenting Clustered Cancer Related T-Antigen. *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45* (1), 65–68.
(182) Renaudet, O.; Dumy, P. Chemoselectively Template-Assembled Glycoconjugates as Mimics for Multivalent Presentation of Carbohydrates. *Org. Lett.* **2003**, *5* (3), 243–246.
(183) Galan, M. C.; Dumy, P.; Renaudet, O. Multivalent Glyco(Cyclo)Peptides. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42* (11), 4599–4612.
(184) Bossu, I.; Šulc, M.; Křenek, K.; Dufour, E.; Garcia, J.; Berthet, N.; Dumy, P.; Křen, V.; Renaudet, O. Dendri-RAFTs: A Second Generation of Cyclopeptide-Based Glycoclusters. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (6), 1948–1959.
(185) André, S.; Renaudet, O.; Bossu, I.; Dumy, P.; Gabius, H.-J. Cyclic Neoglycodecapeptides: How to Increase Their Inhibitory Activity and Selectivity on Lectin/Toxin Binding to a Glycoprotein and Cells. *J. Pept. Sci.* **2011**, *17* (6), 427–437.
(186) Berthet, N.; Thomas, B.; Bossu, I.; Dufour, E.; Gillon, E.; Garcia, J.; Spinelli, N.; Imberty, A.; Dumy, P.; Renaudet, O. High Affinity Glycodendrimers for the Lectin LecB from Pseudomonas Aeruginosa. *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24* (9), 1598–1611.
(187) Verpoorte, J. A.; Mehta, S.; Edsall, J. T. Esterase Activities of Human Carbonic Anhydrases B and C. *J. Biol. Chem.* **1967**, *242* (18), 4221–4229.
(188) Cha, S. Tight-Binding Inhibitors—I. *Biochem. Pharmacol.* **1975**, *24* (23), 2177–2185.
(189) Krishnamurthy, V. M.; Kaufman, G. K.; Urbach, A. R.; Gitlin, I.; Gudiksen, K. L.; Weibel, D. B.; Whitesides, G. M. Carbonic Anhydrase as a Model for Biophysical and Physical-Organic Studies of Proteins and Protein−Ligand Binding. *Chem. Rev.* **2008**, *108* (3), 946–1051.
(190) Moghimi, S. M.; Hunter, A. C.; Murray, J. C. Nanomedicine: Current Status and Future Prospects. *FASEB J.* **2005**, *19* (3), 311–330.
(191) Thomas, C. R.; Ferris, D. P.; Lee, J.-H.; Choi, E.; Cho, M. H.; Kim, E. S.; Stoddart, J. F.; Shin, J.-S.; Cheon, J.; Zink, J. I. Noninvasive Remote-Controlled Release of Drug Molecules in Vitro Using Magnetic Actuation of Mechanized Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132* (31), 10623–10625.
(192) Gao, J.; Xu, B. Applications of Nanomaterials inside Cells. *Nano Today* **2009**, *4* (1), 37–51.
(193) Sun, T.; Zhang, Y. S.; Pang, B.; Hyun, D. C.; Yang, M.; Xia, Y. Engineered Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Therapy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53* (46), 12320–12364.

(194) Jin, Y.; Li, A.; Hazelton, S. G.; Liang, S.; John, C. L.; Selid, P. D.; Pierce, D. T.; Zhao, J. X. Amorphous Silica Nanohybrids: Synthesis, Properties and Applications. *Coord. Chem. Rev.* **2009**, *253* (23), 2998–3014.

(195) Knopp, D.; Tang, D.; Niessner, R. Review: Bioanalytical Applications of Biomolecule-Functionalized Nanometer-Sized Doped Silica Particles. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *647* (1), 14–30.

(196) Hom, C.; Lu, J.; Tamanoi, F. Silica Nanoparticles as a Delivery System for Nucleic Acid-Based Reagents. *J. Mater. Chem.* **2009**, *19* (35), 6308–6316.

(197) Stöber, W.; Fink, A.; Bohn, E. Controlled Growth of Monodisperse Silica Spheres in the Micron Size Range. *J. Colloid Interface Sci.* **1968**, *26* (1), 62–69.

(198) Bagwe, R. P.; Yang, C.; Hilliard, L. R.; Tan, W. Optimization of Dye-Doped Silica Nanoparticles Prepared Using a Reverse Microemulsion Method. *Langmuir* **2004**, *20*, 8336-8342.

(199) Eden-Assmann, S.; Lindlar, B.; Maret, G. Synthesis and characterization of colloidal fluorescent mesoporous silica particles. *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, *271*, 120-123.

(200) Rao, K. S.; El-Hami, K.; Kodaki, T.; Matsushige, K.; Makino, K. A Novel Method for Synthesis of Silica Nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *289* (1), 125–131.

(201) Yang, W.; Zhang, C. G.; Qu, H. Y.; Yang, H. H.; Xu, J. G. Novel Fluorescent Silica Nanoparticle Probe for Ultrasensitive Immunoassays. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *503* (2), 163–169.

(202) Chatterjee, K.; Sarkar, S.; Jagajjanani Rao, K.; Paria, S. Core/Shell Nanoparticles in Biomedical Applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2014**, *209*, 8–39.

(203) Tan, W.; Wang, K.; He, X.; Zhao, X. J.; Drake, T.; Wang, L.; Bagwe, R. P. Bionanotechnology Based on Silica Nanoparticles. *Med. Res. Rev.* **2004**, *24* (5), 621–638.

(204) Yang, H.-H.; Qu, H.-Y.; Lin, P.; Li, S.-H.; Ding, M.-T.; Xu, J.-G. Nanometer Fluorescent Hybrid Silica Particle as Ultrasensitive and Photostable Biological Labels. *Analyst* **2003**, *128* (5), 462–466.

(205) Karlsson, M.; Mårtensson, L.-G.; Jonsson, B.-H.; Carlsson, U. Adsorption of Human Carbonic Anhydrase II Variants to Silica Nanoparticles Occur Stepwise: Binding Is Followed by Successive Conformational Changes to a Molten-Globule-like State. *Langmuir* **2000**, *16* (22), 8470–8479.

(206) Supuran, C. T. Structure-Based Drug Discovery of Carbonic Anhydrase Inhibitors. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2012**, *27* (6), 759–772.

(207) Allouche, F.; Chabchoub, F.; Carta, F.; Supuran, C. T. Synthesis of Aminocyanopyrazoles via a Multi-Component Reaction and Anti-Carbonic Anhydrase Inhibitory Activity of Their Sulfamide Derivatives against Cytosolic and Transmembrane Isoforms. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2013**, *28* (2), 343–349.

(208) Claudiu, C. T. Carbonic anhydrases: from biomedical applications of the inhibitors and activators to biotechnological use for CO2 capture. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2013**, 28, 229-230.

(209) Smiljanic, N.; Moreau, V.; Yockot, D.; Benito, J. M.; García Fernández, J. M.; Djedaïni-Pilard, F. Supramolecular Control of Oligosaccharide–Protein Interactions: Switchable and Tunable Ligands for Concanavalin A Based on β-Cyclodextrin. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45* (33), 5465–5468.

(210) Li, G.; Wang, L.; Ni, H.; Pittman, C. U. Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane (POSS) Polymers and Copolymers: A Review. *J. Inorg. Organomet. Polym.* **2001**, *11* (3), 123–154.

(211) Fabritz, S.; Hörner, S.; Avrutina, O.; Kolmar, H. Bioconjugation on Cube-Octameric Silsesquioxanes. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, *11* (14), 2224–2236.

(212) Ye, Q.; Zhou, H.; Xu, J. Cubic Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane Based Functional Materials: Synthesis, Assembly, and Applications. *Chem. – Asian J.* **2016**, *11* (9), 1322–1337.

(213) Siddiqui, W. H.; York, R. G. Quaternary Silsesquioxane: A Developmental Toxicity Study in Rats. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1993**, *21* (1), 66–70.

(214) McCusker, C.; B. Carroll, J.; M. Rotello, V. Cationic Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane (POSS) Units as Carriers for Drug Delivery Processes. *Chem. Commun.* **2005**, *0* (8), 996–998.

(215) Tan, M.; Ye, Z.; Jeong, E.-K.; Wu, X.; Parker, D. L.; Lu, Z.-R. Synthesis and Evaluation of Nanoglobular Macrocyclic Mn(II) Chelate Conjugates as Non-Gadolinium(III) MRI Contrast Agents. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22* (5), 931–937.

(216) Yuan, H.; Luo, K.; Lai, Y.; Pu, Y.; He, B.; Wang, G.; Wu, Y.; Gu, Z. A Novel Poly(l-Glutamic Acid) Dendrimer Based Drug Delivery System with Both PH-Sensitive and Targeting Functions. *Mol. Pharm.* **2010**, *7* (4), 953–962.

(217) Sprung, M. M.; Guenther, F. O. The Partial Hydrolysis of Ethyltriethoxysilane. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77* (15), 3996–4002.

(218) Cordes, D. B.; Lickiss, P. D.; Rataboul, F. Recent Developments in the Chemistry of Cubic Polyhedral Oligosilsesquioxanes. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (4), 2081–2173.

(219) Marcolli, C.; Calzaferri, G. Monosubstituted Octasilasesquioxanes. *Appl. Organomet. Chem.* **1999**, *13* (4), 213–226.

(220) Ervithayasuporn, V.; Wang, X.; Kawakami, Y. Synthesis and Characterization of Highly Pure Azido-Functionalized Polyhedral Oligomeric Silsesquioxanes (POSS). *Chem. Commun.* **2009**, *0* (34), 5130–5132.

(221) Fabritz, S.; Heyl, D.; Bagutski, V.; Empting, M.; Rikowski, E.; Frauendorf, H.; Balog, I.; Fessner, W.-D.; J. Schneider, J.; Avrutina, O.; Kolmar, H. Towards Click Bioconjugations on Cube-Octameric Silsesquioxane Scaffolds. *Org. Biomol. Chem.* **2010**, *8* (9), 2212–2218.

(222) Heyl, D.; Rikowski, E.; Hoffmann, R. C.; Schneider, J. J.; Fessner, W.-D. A “Clickable” Hybrid Nanocluster of Cubic Symmetry. *Chem. – Eur. J.* **2010**, *16* (19), 5544–5548.

(223) Boullanger, A.; Gracy, G.; Bibent, N.; Devautour-Vinot, S.; Clément, S.; Mehdi, A. From an Octakis(3-Cyanopropyl)Silsesquioxane Building Block to a Highly COOH-Functionalized Hybrid Organic–Inorganic Material. *Eur. J. Inorg. Chem.* **2012**, *2012* (1), 143–150.

(224) Dittmar, U., Hendan, B. J.; Florke, U.; Marsmann, H. C. Funktionalisierte octa-(propylsilsesquioxane) (3-XC3H6)8(Si8O12) modellverbindungen für oberflächenmodifizierte kieselgele. *J. Organometallic Chem.* **1995**, *489*, 185-194.

(225) Trastoy, B.; Pérez-Ojeda, M. E.; Sastre, R.; Chiara, J. L. Octakis(3-Azidopropyl)Octasilsesquioxane: A Versatile Nanobuilding Block for the Efficient Preparation of Highly Functionalized Cube-Octameric Polyhedral Oligosilsesquioxane Frameworks Through Click Assembly. *Chem. – Eur. J.* **2010**, *16* (12), 3833–3841.

(226) Suárez, J. R.; Trastoy, B.; Pérez-Ojeda, M. E.; Marín-Barrios, R.; Chiara, J. L. Nonafluorobutanesulfonyl Azide: A Shelf-Stable Diazo Transfer Reagent for the

Synthesis of Azides from Primary Amines. *Adv. Synth. Catal.* **2010**, *352* (14–15), 2515–2520.

(227) Fabritz, S.; Hörner, S.; Könning, D.; Empting, M.; Reinwarth, M.; Dietz, C.; Glotzbach, B.; Frauendorf, H.; Kolmar, H.; Avrutina, O. From Pico to Nano: Biofunctionalization of Cube-Octameric Silsesquioxanes by Peptides and Miniproteins. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (31), 6287–6293.

(228) Fan, H.; Yang, R. Synthesis and Characterization of Polyhedral Oligomeric Azido-Octaphenylsilsesquioxane. *J. Appl. Polym. Sci.* **2012**, *124* (5), 4389–4397.

(229) Cai, H.; Xu, K.; Liu, X.; Fu, Z.; Chen, M. A Facile Synthesis of Octa(Carboxyphenyl)Silsesquioxane. *Dalton Trans.* **2012**, *41* (23), 6919–6921.

(230) Tamaki, R.; Tanaka, Y.; Asuncion, M., Z.; Choi, J.; Laine, R., M. Octa(aminophenyl)silsesquioxane as a Nanoconstruction Site. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12416-12417.

(231) Trastoy, B.; Bonsor, D. A.; Pérez-Ojeda, M. E.; Jimeno, M. L.; Méndez-Ardoy, A.; García Fernández, J. M.; Sundberg, E. J.; Chiara, J. L. Synthesis and Biophysical Study of Disassembling Nanohybrid Bioconjugates with a Cubic Octasilsesquioxane Core. *Adv. Funct. Mater.* **2012**, *22* (15), 3191–3201.

(232) Lin, Y.-C.; Kuo, S.-W. Self-Assembly and Secondary Structures of Linear Polypeptides Tethered to Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane Nanoparticles through Click Chemistry. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **2011**, *49* (10), 2127–2137.

(233) Lin, Y.-C.; Kuo, S.-W. Hierarchical Self-Assembly and Secondary Structures of Linear Polypeptides Graft onto POSS in the Side Chain through Click Chemistry. *Polym. Chem.* **2012**, *3* (1), 162–171.

(234) Conte, M. L.; Staderini, S.; Chambery, A.; Berthet, N.; Dumy, P.; Renaudet, O.; Marra, A.; Dondoni, A. Glycoside and Peptide Clustering around the Octasilsesquioxane Scaffold via Photoinduced Free-Radical Thiol –ene Coupling. The Observation of a Striking Glycoside Cluster Effect. *Org. Biomol. Chem.* **2012**, *10* (16), 3269–3277.

(235) Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R. Copper-Free Click Chemistry for Dynamic in Vivo Imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, *104* (43), 16793–16797.

(236) Manson, B. W.; Morrison, J. J.; Coupar, P. I.; Jaffrès, P.-A.; Morris, R. E. Synthesis of Aldehyde Functionalised Polyhedral Oligomeric Silsesquioxanes. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **2001**, No. 7, 1123–1127.

(237) Chimjarn, S.; Kunthom, R.; Chancharone, P.; Sodkhomkhum, R.; Sangtrirutnugul, P.; Ervithayasuporn, V. Synthesis of Aromatic Functionalized Cage-Rearranged Silsesquioxanes (T8, T10, and T12) via Nucleophilic Substitution Reactions. *Dalton Trans.* **2014**, *44* (3), 916–919.

(238) Janeta, M.; John, Ł.; Ejfler, J.; Szafert, S. High-Yield Synthesis of Amido-Functionalized Polyoctahedral Oligomeric Silsesquioxanes by Using Acyl Chlorides. *Chem. – Eur. J.* **2014**, *20* (48), 15966–15974.

(239) Feher, F. J.; Wyndham, K. D.; Soulivong, D.; Nguyen, F. Syntheses of Highly Functionalized Cube-Octameric Polyhedral Oligosilsesquioxanes (R8Si8O12). *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* **1999**, No. 9, 1491–1498.

(240) Höckel, M.; Vaupel, P. Tumor Hypoxia: Definitions and Current Clinical, Biologic, and Molecular Aspects. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **2001**, *93* (4), 266–276.

(241) Vaupel, P.; Mayer, A. Hypoxia in Cancer: Significance and Impact on Clinical Outcome. *Cancer Metastasis Rev.* **2007**, *26* (2), 225–239.

(242) Semenza, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3*, 721-732.
(243) Grabmaier, K.; de Weijert, M.; G. W.; Schalken, J. A; Oosterwijk, E. Strict regulation of CAIXG250/MN by HIF-1[alpha] in clear cell renal cell carcinoma. *Oncogene* **2004**, *23*, 5624-5631.
(244) Wykoff, C. C.; Beasley, N. J. P.; Watson, P. H.; Turner, K. J.; Pastorek, J.; Sibtain, A.; Wilson, G. D.; Turley, H.; Talks, K. L.; Maxwell, P. H.; Pugh, C. W.; Ratcliffe, P. J.; Harris, A. L. Hypoxia-Inducible Expression of Tumor-Associated Carbonic Anhydrases. *Cancer Res.* **2000**, *60* (24), 7075.
(245) Potter, C. P. S.; Harris, A. L. Diagnostic, Prognostic and Therapeutic Implications of Carbonic Anhydrases in Cancer. *Br. J. Cancer* **2003**, *89* (1), 2–7.
(246) Niemelä, A. M.; Hynninen, P.; Mecklin, J.-P.; Kuopio, T.; Kokko, A.; Aaltonen, L.; Parkkila, A.-K.; Pastorekova, S.; Pastorek, J.; Waheed, A.; Sly, W. S.; Ørntoft, T. F.; Kruhøffer, M.; Haapasalo, H.; Parkkila, S.; Kivelä, A. J. Carbonic Anhydrase IX Is Highly Expressed in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiol. Prev. Biomark.* **2007**, *16* (9), 1760–1766.
(247) McGuire, B. B.; Fitzpatrick, J. M. Biomarkers in Renal Cell Carcinoma. *Curr. Opin. Urol.* **2009**, *19* (5).
(248) Kim, S. J.; Rabbani, Z. N.; Dewhirst, M. W.; Vujaskovic, Z.; Vollmer, R. T.; Schreiber, E.-G.; Oosterwijk, E.; Kelley, M. J. Expression of HIF-1α, CA IX, VEGF, and MMP-9 in Surgically Resected Non-Small Cell Lung Cancer. *Lung Cancer* **2005**, *49* (3), 325–335.
(249) Siebels, M.; Rohrmann, K.; Oberneder, R.; Stahler, M.; Haseke, N.; Beck, J.; Hofmann, R.; Kindler, M.; Kloepfer, P.; Stief, C. A Clinical Phase I/II Trial with the Monoclonal Antibody CG250 (RENCAREX®) and Interferon-Alpha-2a in Metastatic Renal Cell Carcinoma Patients. *World J. Urol.* **2011**, *29* (1), 121–126.
(250) Pastoreková, S.; Závadová, Z.; Košťál, M.; Babušíková, O.; Závada, J. A Novel Quasi-Viral Agent, MaTu, Is a Two-Component System. *Virology* **1992**, *187* (2), 620–626.
(251) Askoxylakis, V.; Garcia-Boy, R.; Rana, S.; Krämer, S.; Hebling, U.; Mier, W.; Altmann, A.; Markert, A.; Debus, J.; Haberkorn, U. A New Peptide Ligand for Targeting Human Carbonic Anhydrase IX, Identified through the Phage Display Technology. *PLOS ONE* **2011**, *5* (12), 15962.
(252) Pasqualini, R.; Ruosiahti, E. Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature* **1996**, *380*, 364-366.
(253) Rana, S.; Nissen, F.; Marr, A.; Markert, A.; Altmann, A.; Mier, W.; Debus, J.; Haberkorn, U.; Askoxylakis, V. Optimization of a Novel Peptide Ligand Targeting Human Carbonic Anhydrase IX. *PLOS ONE* **2012**, *7* (5), e38279.
(254) Bartolami, E.; Bessin, Y.; Bettache, N.; Gary-Bobo, M.; Garcia, M.; Dumy, P.; Ulrich, S. Multivalent DNA Recognition by Self-Assembled Clusters: Deciphering Structural Effects by Fragments Screening and Evaluation as SiRNA Vectors. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13* (36), 9427–9438.
(255) Kanfar, N.; Tanc, M.; Dumy, P.; Supuran, C. T.; Ulrich, S.; Winum, J.-Y. Effective Access to Multivalent Inhibitors of Carbonic Anhydrases Promoted by Peptide Bioconjugation. *Chem. – Eur. J.* **2017**, *23* (28), 6788–6794.
(256) Touisni, N.; Kanfar, N.; Ulrich, S.; Dumy, P.; Supuran, C. T.; Mehdi, A.; Winum, J.-Y. Fluorescent Silica Nanoparticles with Multivalent Inhibitory Effects towards Carbonic Anhydrases. *Chem. – Eur. J.* **2015**, *21* (29), 10306–10309.

(257) Khalifah, R. G. The Carbon Dioxide Hydration Activity of Carbonic Anhydrase I. Stop-Flow kinetic studies on the native human isoenzymes B and C. *J. Biol. Chem.* **1971**, *246* (8), 2561–2573.

Experimental Part

Materials and methods

All reagents and solvents were of commercial quality and used without further purification.

TLC analyses were performed on silica gel 60 F254 plates (Merck), and visualized either under 254nm UV illumination, or by ninhydrin staining.

Melting points were determined on a Büchi Melting Point 510.

^{1}H, **^{13}C** and **^{29}Si NMR** spectra were recorded on Brucker Avance 400 instruments and were referenced with respect to the residual solvent peak. Data are reported as follows: chemical shift (δ in ppm), multiplicity (s for singlet, d for doublet, t for triplet, m for multiplet, dd for doublet of doublet and br of broad), coupling constant (J in Hertz) and integration.

Flash chromatography was performed on silica gel (40–63 µm) purchased from Merck.

HPLC analyses were performed on a Waters HPLC 2695 (EC Nucleosil 300-5 C18, (125 × 3 mm) column, MachereyNagel) equipped with a Waters 996 DAD detector. The following linear gradients of solvent B (acetonitrile) into solvent A (100 mM triethylammonium acetate/acetonitrile 95/5) were used: 0 to 95% of solvent B in 45 min. Retention times (tR) are given in minutes. Semipreparative RP-HPLC was performed on a Waters 515 HPLC (VP Nucleodur HTec C18, 7 µm, (250 × 21) column, Macherey-Nagel) equipped with a Waters 2487 detector. Method A: linear gradient of acetonitrile into (100 mM triethylammonium acetate/acetonitrile 95/5): 0% to 40% in 45 min. Method B: the following linear gradient of acetonitrile/TFA 99.9/0.1 into H2O: 0% to 40% in 45 min.

MALDI-TOF and **high resolution mass** spectrometry analyses were carried out on an Ultraflex III and a Waters MicromassQ ToF mass spectrometer (positive mode).

Transmission Electron Microscopy (TEM) observations were carried out at 100 kV on a JEOL 1200 EXII microscope. Samples for TEM measurements were prepared using ultramicrotomy techniques and then deposited on copper grids.

The nitrogen adsorption isotherms were measured at liquid temperature (77 K) using a Micromeritics Tristar 3000 analyzer. Before the measurements, the samples were out gassed under *vacuum* for 12 h at 80 °C. The specific surface areas were calculated by the Brunauer–Emmett–Teller (BET) method (using 74 points and starting from 0.01 as the value of the relative pressure).

Thermogravimetric analyses (TGA) were carried out on a Netzsch STA 409 PC apparatus at 5°C min-1 under air between 25°C and 900°C using ca. 20 mg samples in Pt pans.

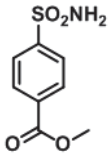
Elemental analyses were performed on a FLASH EA 1112 CHNS analyser.

FTIR spectra were performed with a Spectrum 100 FT-IR (ATR) spectrometer from Perkin Elmer. Samples were used under solid form

Carbonic Anhydrases assays

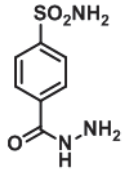
An Applied Photophysics stopped-flow instrument has been used for assaying the CA catalyzed CO_2 hydration activity. Phenol red (at a concentration of 0.2 mM) has been used as indicator, working at the absorbance maximum of 557 nm, with 20 mM Hepes (pH 7.5) as buffer, and 20 mM Na_2SO_4 (for maintaining constant the ionic strength), following the initial rates of the CA-catalyzed CO_2 hydration reaction for a period of 10-100 s. The CO_2 concentrations ranged from 1.7 to 17 mM for the determination of the kinetic parameters and inhibition constants. At maximum the concentrations used in the assay system were: 9.2 nM for hCA I; 7.8 nM for hCA II; 10.2 nM for hCA IX and 14.1 nM for hCA XII. For each inhibitor at least six traces of the initial 5-10% of the reaction have been used for determining the initial velocity.[257] The uncatalyzed rates were determined in the same manner and subtracted from the total observed rates. Stock solutions of inhibitor (0.1 mM) were prepared in distilled-deionized water and dilutions up to 0.01 nM were done thereafter with distilled-deionized water. Inhibitor and enzyme solutions were preincubated together for 15 min - 2 hours (or longer, i.e., 4-6 hours) at room temperature (at 4°C for the longer incubation periods than 15 min) prior to assay, in order to allow for the formation of the E-I complex. The inhibition constants were obtained by non-linear leastsquares methods using PRISM 3, and represent the mean from at least three different determinations.

Chapter II



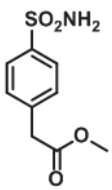
Methyl 4-sulfamoylbenzoate(1)

A solution of 4-sulfamoylbenzoic acid (1 gr, 5.0 mmol, 1 equiv.) in methanol (30 mL) was refluxed for 3 hours with sulfuric acid (1.3 mL, 25 mmol, 5 equiv.). The excess of solvent was removed under reduced pressure and the residue was triturated with Et_2O. The formed precipitate was filtered off, washed with Et_2O and dried in *vacuo* to give a white solid. **Yield**: 93%; **^{1}H NMR** (400MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 8.3 (d, *J*=8.8 Hz, 2H, CH_{ar}), 8 (d, *J*=8.8 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.6 (s, 2H, SO_2NH_2), 3.9 (s, 3H, O-CH_3); **^{13}C NMR** (101MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 171,63 (*C*=O), 145.18 (C_{ar}-SO_2NH_2), 138.26 (C_{ar}-C=O), 130.64 (*C*H_{ar}), 125.24 (*C*H_{ar}), 52.58 (O-*C*H_3).



4-(hydrazinecarbonyl)benzosulfonamide (2)

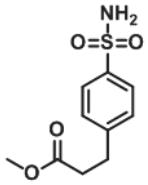
A solution of methyl 4-sulfamoylbenzoate **1** (0.87 gr, 4.0 mmol, 1 equiv.) in methanol (40 mL) was refluxed for 7 hours with hydrazine monohydrate (0.21 mL, 4.4 mmol, 1.1 equiv.). The reaction mixture was stirred at 0°C for 30min. The formed precipitate was filtered off, washed with methanol and dried in *vacuo.* The solid obtained was recristallized in ethanol to give a white solid. **Yield**: 75%; **mp**: 231°C; **^{1}H NMR** (400MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 10 (s, 1H, *NH*-NH_2), 8 (d, *J*=8.8 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.9 (d, *J*=8.8 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.4 (s, 2H, SO_2NH_2), 4.6 (s, 2H, NH-NH_2); **^{13}C NMR** (101MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 169,8 (*C*=O), 145.2 (C_{ar}-SO_2NH_2), 139.4 (C_{ar}-C=O), 127.6 (*C*H_{ar}), 125.6 (*C*H_{ar}).



Methyl 2-(4-sulfamoylphenyl) acetate (5)

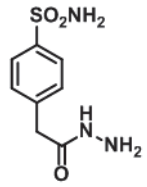
Phenylacetic acid (3.0 g, 22.0 mmol, 1 equiv) was slowly added to chlorosulfonic acid (8.8 mL, 132.3 mmol, 6 equiv) at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C (ice bath) for 1

hour and then warmed to room temperature and stirred for 3 hours. The suspension was filtered and the solid was washed with cold water and then dried in *vacuo*. The resulting solid was added to a solution of ammonium hydroxide (3 mL, 25 % in water) and stirred at 60 °C overnight. After the addition of 2 mL of water, the mixture was acidified to pH 2–3 with a 3 M aqueous solution of HCl. After concentration under *vacuum*, the obtained yellow solid was refluxed for 3 hours in a solution of 1.6 mL sulfuric acid in 40 mL of methanol. The solvent was then removed under reduced pressure and the residue obtained was triturated with Et_2O to afford a white precipitate, which was filtered, washed with Et_2O, and dried in *vacuo*. **Yield**: 10%; **^{1}H NMR** (400MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 7.8 (d, *J*=8.8 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.5 (d, *J*=8.8 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.3 (s, 2H, SO_2NH_2), 3.8 (s, 2H, CH_2), 3.6 (s, 3H, O-CH_3); **^{13}C NMR** (101MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 172.6 (*C*=O), 145.8 (C_{ar}-SO_2NH_2), 142.0 (C_{ar}-CH_2), 129.7 (*C*H_{ar}), 125.6 (*C*H_{ar}), 51.8 (O-*C*H_3), 39.7 (*C*H_2-C=O).



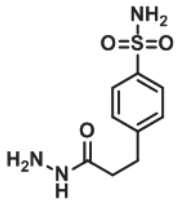
Methyl 3-(4-sulfamoylphenyl) propanoate (6)

Hydrocinnamic acid (3.0 g, 19.9 mmol, 1 equiv) was slowly added to chlorosulfonic acid (7.9 mL, 119.4 mmol, 6 equiv) at 0 °C. The reaction mixture was stirred at 0 °C (ice bath) for 1 hour and then warmed to room temperature and stirred for 3 hours. The suspension was filtered and the solid was washed with cold water and then dried in *vacuo*. The resulting solid was added to a solution of ammonium hydroxide (3 mL, 25 % in water) and stirred at 60 °C overnight. After the addition of 2 mL of water, the mixture was acidified to pH 2–3 with a 3 M aqueous solution of HCl. After concentration under *vacuum*, the obtained yellow solid was refluxed for 3 hours in a solution of 1.8 mL sulfuric acid in 40 mL of methanol. The solvent was then removed under reduced pressure and the residue obtained was triturated with Et_2O to afford a white precipitate, which was filtered, washed with Et_2O, and dried in *vacuo*. **Yield:** 12 %; **mp:** 109 °C; **^{1}H NMR** (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 7.7 (d, *J*=8.4 Hz, 2 H, CH_{ar}), 7.4 (d, *J*=8.4 Hz, 2 H, CH_{ar}), 7.2 (s, 2 H, SO_2NH_2), 3.5 (s, 3 H, O-CH_3), 2.9 (t, *J*=7.5 Hz, 2 H, CH_2-CH_2-C=O), 2.6 (t, *J*=7.5 Hz, 2 H, CH_2-CH_2-C=O); **^{13}C NMR** (101 MHz, DMSO-d_6) *δ*/ppm 172.3 (*C*=O), 145.2 (C_{ar}-SO_2NH_2), 142.2 (C_{ar}-CH_2), 128.8 (*C*H_{ar}), 125.74 (*C*H_{ar}), 51.40 (O-*C*H_3), 34.37 (CH_2-*C*H_2-C=O), 29.95 (*C*H_2-CH_2-C=O); **HR-ESI-MS**: *m*/*z* calcd for $[C_{10}H_{14}NO_4S]^+$: 244.0644 $[M+H]^+$; found: 244.0645.



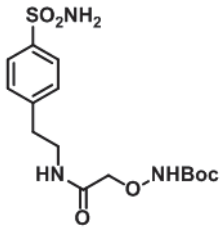
4-(2-hydrazinyl-2-oxoethyl)benzenesulfonamide (7)

A solution of compound **5** (0.5 g, 2.1 mmol, 1 equiv) in methanol (22 mL) was refluxed for 7 hours with hydrazine monohydrate (0.11 mL, 2.3 mmol, 1.1 equiv). Then the reaction mixture was cooled at 0 °C for 30 min until formation of a precipitate. The latter was filtered, washed with methanol, and dried in *vacuo*. The solid was recrystallized from ethanol to give the expected compound as a white solid. **Yield**: 70%; **mp**: 218°C; **^{1}H NMR** (DMSO-d_6, 400MHz) δ/ppm 9.3 (s, 1H, N*H*-NH_2); 7.8 (d, *J*=8.8 Hz, CH_{ar}), 7.4 (d, *J*=8.8 Hz, CH_{ar}), 7.3 (s, 2H, SO_2NH_2), 4.2 (s, 2H, NH-NH_2); 3.4 (s, 2H, CH_2); **^{13}C NMR** (DMSO-d_6, 400MHz) δ/ppm 171.1 (*C*=O), 144.9 (C_{ar}-SO_2NH_2), 142.1 (C_{ar}-CH_2), 129.2 (*C*H_{ar}), 125.7 (*C*H_{ar}), 39.8 (CH_2-C=O).



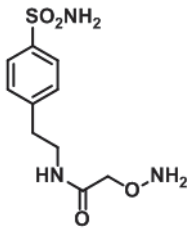
4-(3-hydrazinyl-3-oxopropyl)benzenesulfonamide (8)

A solution of compound **6** (0.6 g, 2.6 mmol, 1 equiv) in methanol (27 mL) was refluxed for 7 hours with hydrazine monohydrate (0.14 mL, 2.8 mmol, 1.1 equiv). Then the reaction mixture was cooled at 0 °C for 30 min until formation of a precipitate. The latter was filtered, washed with methanol, and dried in *vacuo*. The solid was recrystallized from ethanol to give the expected compound as a white solid. **Yield**: 67 %; **mp**: 128 °C; **^{1}H NMR** (400 MHz, DMSO-d_6) *δ*/ppm 9.0 (s, 1 H, *NH*-NH_2), 7.7 (d, *J*=8.4 Hz, 2 H, CH_{ar}), 7.3 (d, *J*=8.4 Hz, 2 H, CH_{ar}), 7.3 (s, 2 H, SO_2NH_2), 4.2 (br, 2 H, NH-NH_2), 2.9 (t, *J*=7.6 Hz, 2 H, CH_2-CH_2-C=O), 2.3 (t, *J*=7.6 Hz, 2 H, CH_2-CH_2-C=O); **^{13}C NMR** (101 MHz, DMSO-d_6) *δ*/ppm 170.65 (*C*=O), 145.77 (C_{ar}-SO_2NH_2), 142.16 (C_{ar}-CH_2), 128.83 (*C*H_{ar}), 125.79 (*C*H_{ar}), 34.60 (CH_2-*C*H_2-C=O), 30.74 (*C*H_2-CH_2-C=O); **HR-ESI-MS**: *m*/*z* calcd for $[C_9H_{14}N_3O_3S]^+$: 244.0756 [*M*+H]$^+$; found: 244.0760.



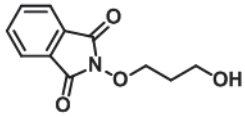
***tert*-butyl 2-oxo-2-((4-sulfamoylphenethyl)amino)ethoxycarbamate (9)**

4-(2-aminoethyl)benzenesulfonamide (1.0 g, 5.0 mmol, 1 equiv), HBTU (2.84 g, 7.5 mmol, 1.5 equiv), HOBt (0.9 g, 6.0 mmol, 1.2 equiv), and (Boc-aminooxy)acetic acid (1.1 g, 6.0 mmol, 1.2 equiv) were dissolved in 50 mL of dry DCM. The reaction mixture was stirred under N_2 atmosphere. Diisopropylethylamine (1.7 mL, 10.0 mmol, 2 equiv) was added dropwise to the solution. After stirring for 1 day at RT, the organic layer was washed successively with saturated solution of $NaHCO_3$, 1 N aqueous solution of HCl, and brine. After drying over anhydrous sodium sulfate and filtration, the filtrate was concentrated under *vacuum* to give the expected compound **9** as oil. **Yield**: 92 %; **^{1}H NMR** (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 10.3 (s, 1 H, *NH*), 8.2 (s, 1 H, N*H*), 7.8 (d, *J*=8 Hz, 2 H, CH_{ar}), 7.4 (d, *J*=8 Hz, 2 H, CH_{ar}), 7.3 (s, 2 H, SO_2NH_2), 3.8 (s, 2 H, CH_2-O), 3.4 (m, 2 H, CH_2-CH_2-NH), 2.8 (m, 2 H, CH_2-CH_2-NH), 1.5 (s, 9H, $CO_2C(CH_3)_3$); **^{13}C NMR** (101 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 173.2 (*C*=O), 162.1 (*C*=O), 148.8 (C_{Ar}), 147.3 (C_{Ar}), 134.3 (*C*H$_{Ar}$), 130.9 (*C*H$_{Ar}$), 85.8 (*C*H$_2$), 79.9 (*C*H$_2$), 76.4 (*C*(CH$_3$)$_3$), 39.9 (*C*H$_2$), 33.1 ((*C*H$_3$)$_3$).



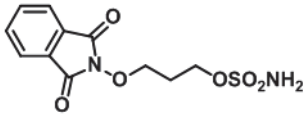
2-(aminooxy)-*N*-(4-sulfamoylphenethyl)acetamide (10)

Compound **9** (1.0 g; 2.6 mmol) was solubilized in 10 mL of TFA/H_2O/TIS solution (95/2.5/2.5) and kept at room temperature for 3 hrs. The mixture was then partially concentrated, precipitated by adding Et_2O and centrifuged for 15 min (4500 rpm). The supernatant was then removed and the resulting solid was dried to remove traces of solvent. **Yield**: 98 %; **^{1}H NMR** (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 8.2 (s, 1 H, N*H*), 8.0 (s, 2 H, NH_2), 7.8 (d, *J*=8 Hz, 2 H, CH_{ar}), 7.4 (d, *J*=8 Hz, 2 H, CH_{ar}), 7.3 (s, 2 H, SO_2NH_2), 3.8 (s, 2 H, CH_2-O), 3.4 (m, 2 H, CH_2-CH_2-NH), 2.8 (m, 2 H, CH_2-CH_2-NH); **^{13}C NMR** (101 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 173.6 (*C*=O), 148.9 (C_{Ar}), 147.2 (C_{Ar}), 134.3 (*C*H$_{Ar}$), 130.9 (*C*H$_{Ar}$), 85.8 (*C*H$_2$), 79.9 (*C*H$_2$), 39.9 (*C*H$_2$).



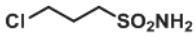
2-(3-hydroxypropoxy)isoindoline-1,3-dione (11)

A solution of *N*-hydroxyphthalimide (1.0 g, 6.1 mmol, 1 equiv.), sodium acetate (1.5 g, 18.3 mmol, 3 equiv.), and 3-bromo-1-propanol (1.1 mL, 12 mmol, 2 equiv.) in DMSO (5 mL) was heated to 70 °C for 1 day. After it was cooled down to room temperature, water (50 mL) was added to the reaction mixture, and it was extracted three times with DCM. The combined organic extracts were washed with water, 1 M HCl, and brine, dried over anhydrous sodium sulfate, filtered, and concentrated. The resulting crude material was purified on silica gel using Cyclohexane/AcOEt (4/6) as eluent. The expected compound was obtained as white solid. **Yield**: 58 %; **^{1}H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm 7.8 (m, 2 H, CH_{ar}), 7.7 (m, 2 H, CH_{ar}), 4.4 (t, *J*=4 Hz, 2 H, CH_2), 3.9 (t , *J*=4 Hz, 2 H, CH_2), 2.1 (br, 1H, O*H*), 2.0 (m, 2 H, CH_2).



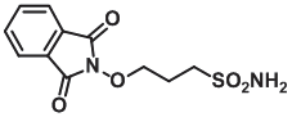
3-((1,3-dioxoisoindolin-2-yl)oxy)propyl sulfamate (12)

A solution of chlorosulfonyl isocyanate (0.6 mL, 6.9 mmol, 2.2 equiv.) and formic acid (0.3 mL, 6.9 mmol, 2.2 equiv) in dry CH_3CN (3 mL) was stirred at 0 °C (ice-bath) for 30 min and then 2 hours at room temperature. A solution of compound **11** (0.7 g, 3.2 mmol, 1 equiv.) in *N*-*N*-dimethylacetamide was added dropwise the solution at 0 °C. After stirring for 1 day at room temperature, solvents were removed under reduced pressure and the resulting crude material was purified on silica gel using Cyclohexane/AcOEt (4/6) as eluent. The expected compound was obtained as brown solid. **Yield**: 33 %; **^{1}H NMR** (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 7.9 (s, 4 H, CH_{ar}), 7.5 (s, 2 H, SO_2NH_2), 4.2 (m, 4 H, CH_2), 2.0 (m, 2 H, CH_2).



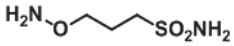
3-Chloropropane-1-sulfonamide (14)

1.2 mL of ammonium hydroxide solution (25 % in water) was added to a solution of 3-chloro-propane sulfonyl chloride (0.14 mL, 1.1 mmol, 1 equiv) in DCM (1.2 mL). After stirring three hours, the solvent was removed under reduced pressure. The residue was triturated in DCM, and the precipitate was filtered and washed with DCM. The filtrate was then concentrated in *vacuo* to give colorless oil. **Yield**: 95 %; **^{1}H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm 5.2 (s, 2 H, SO_2NH_2), 3.7 (t, *J*=6.2 Hz, 2 H, CH_2-SO_2NH_2), 3.3 (t, *J*=6.2 Hz, 2 H,Cl-CH_2), 2.3–2.2 (m, 2 H, CH_2-CH_2-CH_2); **^{13}C NMR** (101 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm 52.5 (*C*H_2-SO_2NH_2), 42.6 (Cl-*C*H_2), 27.1 (CH_2-*C*H_2-CH_2).



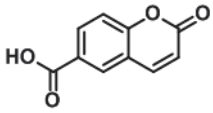
3-((1,3-Dioxoisoindolin-2-yl)oxy)propane-1-sulfonamide (15)

To a solution of compound **14** (0.3 g, 1.9 mmol, 1 equiv) in DMF (2 mL) were added successively *N*-hydroxyphtalimide (0.22 g, 2.2 mmol, 1.2 equiv), tetrabutylammonium iodide (0.85 g, 2.2 mmol, 1.2 equiv), and triethylamine (0.18 mL, 0.22 mmol, 1.2 equiv). After refluxing overnight, the mixture was filtered and the precipitate washed with AcOEt. The mixture was then washed twice with a saturated solution of $NaHCO_3$, and brine. The organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered, and concentrated under *vacuum*. The resulting powder was recrystallized from ethanol to give a white solid. **Yield**: 62 %; **mp**: 181 °C; **^{1}H NMR** (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 7.8 (s, 4 H, CH_{ar}), 6.9 (s, 2 H, SO_2NH_2), 4.2 (t, J=6.4 Hz, 2 H, O-CH_2), 3.2–3.1 (m, 2 H, CH_2-SO_2NH_2), 2.1–2.0 (m, 2 H, CH_2-CH_2-CH_2); **^{13}C NMR** (101 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 163.6 (*C*=O), 134.9 (*C*H_{ar}), 129.1 (*C*H_{ar}), 123.4 (*C*H_{ar}), 76.47 (O-*C*H_2), 51.7 (*C*H_2-SO_2NH_2), 23.4 (CH_2-*C*H_2-CH_2); **HR-ESI-MS**: *m*/*z* calcd for $[C_{11}H_{13}N_2O_5S]^+$: 285.0545 [*M*+H]$^+$; found: 285.0550.



3-(Aminoxy)propane-1-sulfonamide (16)

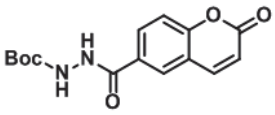
Methylhydrazine (36 µL; 0.7 mmol; 2 equiv) was added to a solution of compound **15** (0.1 g, 0.35 mmol, 1 equiv) in EtOH (1 mL). After stirring at room temperature for four hours, the mixture was concentrated under *vacuum* and the residue was purified on silica gel using AcOEt/EtOH (9/1) as eluent. The expected compound was obtained as colorless oil. **Yield**: 83 %; **^{1}H NMR** (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ ppm 6.8 (s, 2 H, SO_2NH_2), 6.0 (br, 2 H, O-NH_2), 3.6 (t, J=6.3 Hz, 2 H, O-CH_2), 3.0–2.9 (m, 2 H, CH_2-SO_2NH_2), 1.9–1.8 (m, 2 H, CH_2-CH_2-CH_2); **^{13}C NMR** (101 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 72.6 (O-*C*H_2), 51.7 (*C*H_2-SO_2NH_2), 22.9 (CH_2-*C*H_2-CH_2); **HR-ESI-MS**: *m*/*z* calcd for $[C_3H_{11}N_2O_3S]^+$: 155.0490 [*M*+H]$^+$; found: 155.0492.



2-oxo-2*H*-chromene-6-carboxylic acid (18a)

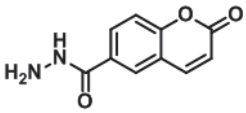
To an ice cold sulfuric acid (7.5 mL) was added slowly malic acid (0.7 g, 5.4 mmol, 1.5 equiv.) and then 4-hydroxybenzoic acid (0.5 g, 3.6 mmol, 1 equiv.) with constant stirring. After completion of the addition, reaction mixture was stirred for 6 hours at 70°C. Then the mixture was poured into ice and the precipitate formed was filtered and dried in *vacuo*. **Yield**: 29 %; **^{1}H NMR** (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ ppm 13.2 (br, 1H, COO*H*), 8.4 (s, 1H, C*H*), 8.2 (d, 1H, J=8 Hz, C*H*), 8.1 (d, 1H, J=12 Hz, C*H*), 7.51 (d, 1H, J=8 Hz, C*H*), 6.6 (d, 1H, J=12 Hz, C*H*); **^{13}C**

NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 171.1 (*C*OOH), 164.7 (*C*=O), 158.1 (*C*), 144.2 (*C*H), 132.0 (*C*H), 130.9 (*C*H), 127.6 (*C*), 119.3 (*C*), 116.8 (*C*H), 116.7 (*C*H).



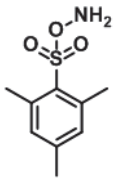
***tert*-butyl 2-(2-oxo-2*H*-chromene-6-carbonyl)hydrazinecarboxylate (20)**

To a solution of compound **18a** (0.3 g, 1.6 mmol, 1 equiv.) in DMF (16 mL) was added *tert*-butyl carbazate (0.2 g, 1.6 mmol, 1 equiv.) followed by 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (0.3 g, 1.6 mmol, 1 equiv.). The mixture was stirred overnight at room temperature. Then the solution was concentrated under pressure and DCM (30 mL) was added. The organic layer was washed sequentially with a saturated solution of $NaHCO_3$, brine and then dried over anhydrous sodium sulfate, filtered, and concentrated under *vacuum* to give compound **20** as pink solid. **Yield**: 68 %; **^{1}H NMR** (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ ppm 10.3 (s, 1H, N*H*), 8.9 (s, 1H, N*H*), 8.2 (s, 1H, C*H*), 8.1 (d, 1H, *J*=8 Hz, C*H*), 8.0 (d, 1H, *J*=12 Hz, C*H*), 7.5 (d, 1H, *J*=8 Hz, C*H*), 6.5 (d, 1H, *J*=12 Hz, C*H*), 1.4 (s, 3H, (CH_3)$_3$); **^{13}C NMR** (101 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 168.1 (*C*=O), 164.7 (*C*=O), 159.2 (*C*=O), 158.4 (*C*), 144.1 (*C*H), 132.1 (*C*H), 131.1 (*C*H), 127.4 (*C*), 119.8 (*C*), 116.8 (*C*H), 116.7 (*C*H). 79.4 (*C*(CH$_3$)$_3$), 28.7 (C(*C*H$_3$)$_3$).



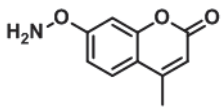
2-oxo-2*H*-chromene-6-carbohydrazide (21)

Compound **20** (0.3 g; 1.1 mmol) was solubilized in 5 mL of TFA/H_2O/TIS solution (95/2.5/2.5) and kept at room temperature for 3 hrs. The mixture was then partially concentrated, precipitated by adding Et_2O and centrifuged for 15 min (4500 rpm). The supernatant was then removed and the resulting solid was dried to remove traces of solvent. **Yield**: 88 %; **^{1}H NMR** (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ ppm 11.5 (br, 1H, N*H*), 9.0 (s, 1 H, N*H*-C=O), 8.3 (s, 1 H, *C*H), 8.2 (d, 1H, *J*=8 Hz, C*H*), 8.1 (d, 1H, *J*=12 Hz, C*H*), 7.5 (d, 1H, *J*=8 Hz, C*H*), 6.6 (d, 1H, *J*=12 Hz, C*H*), 3.9 (br, 2H, NH_2); **^{13}C NMR** (101 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 171.1 (*C*=O), 164.7 (*C*=O), 158.1 (*C*), 144.2 (*C*H), 132.0 (*C*H), 130.9 (*C*H), 127.6 (*C*), 119.3 (*C*), 116.8 (*C*H), 116.7 (*C*H).



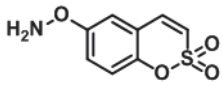
O-(mesitylenesulfonyl)hydroxylamine (22)

To a solution of ethyl-*O*-(mesitylenesulfonyl)-acetohydroxamate (5 g) in dioxane (2.8 mL) was added 70% perchloric acid (1.7 mL) with stirring at 0˚C over 10 min. When about 1 mL of the acid was added, the reaction mixture became pasty. After stirring was continued for further 10 min, the reaction mixture was poured into ice/water to give a white solid, which was filtered, washed with cold water, petroleum ether and dried.



7-(aminooxy)-4-methyl-2*H*-chromen-2-one (23)

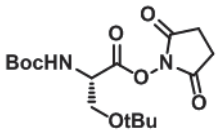
Potassium *tert*-butoxide (0.3 g, 2.8 mmol, 1 equiv.) was added to a solution of 4-methylumberlliferone (0.5 g, 2.8 mmol, 1 equiv.) in methanol (40 mL). After evaporation of the methanol under *vacuum*, the resulting yellow solid was dissolved in DMF (20 mL). *O*-mesitylenesulfonylhydroxylamine (o.6 g, 2.8 mmol, 1 equiv.), freshly prepared, was added and the solution stirred for 1 hours at 0°C. The mixture was then taken up with ethyl acetate (50 mL) and the organic layer washed with cold saturated solution of 1 M NaOH and water. The organic layer was dried with anhydrous sodium sulfate and concentrated under *vacuum* to give **23** as a yellow solid. **Yield**: 66 %; **^{1}H NMR** (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 7.6 (d, 1 H, *J*=8 Hz, C*H*), 7.2 (s, 2 H, O-NH_2), 7.1 (d, 1 H, *J*=4 Hz, C*H*), 7.0 (dd, 1 H, *J*=4 and 8 Hz, C*H*), 6.2 (s, 1 H, *J*=4 Hz, C*H*), 2.4 (s, 3 H, CH_3).



6-(aminooxy)benzo[*e*][1,2]oxathiine 2,2-dioxide 24

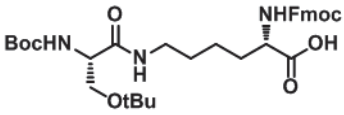
Potassium *tert*-butoxide (0.26 g, 2.5 mmol, 1 equiv.) was added to a solution of 6-hydroxybenzo[*e*][1,2]oxathiine 2,2-dioxide (0.5 g, 2.5 mmol, 1 equiv.) in methanol (38 mL). After evaporation of the methanol under *vacuum*, the resulting yellow solid was dissolved in DMF (20 mL). *O*-mesitylenesulfonylhydroxylamine (0.5 g, 2.8 mmol, 1 equiv.), freshly prepared, was added and the solution stirred for 1 hours at 0°C. The mixture was then taken up with ethyl acetate (50 mL) and the organic layer washed with cold saturated solution of 1 M NaOH and water. The organic layer was dried with anhydrous sodium sulfate and concentrated under *vacuum* to give **24** as a yellow solid. **Yield**: 58 %; **^{1}H NMR** (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 7.7 (d, 1 H, *J*=8 Hz, C*H*), 7.5 (d, 1 H, *J*=8 Hz, C*H*), 7.4 (d, 1 H, *J*=4 Hz, C*H*), 7.3 (d, 1 H, *J*=8 Hz, C*H*), 7.2 (dd, 1 H, *J*=4 and 8 Hz, C*H*), 7.1 (s, 2 H, O-NH_2).

Chapter III



2,5-dioxopyrrolidin-1-yl *N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*O*-(*tert*-butyl)-*L*-serinate (25)

To a stirred solution of Boc-*L*-Ser(O*t*Bu)-OH (5.0 g; 19.1 mmol; 1 equiv.) and *N*-hydroxysuccinimide (2.35 g; 20.5 mmol; 1.05 equiv.) in 1:1 AcOEt/1,4-dioxane (180 mL) cooled in ice bath were added dicyclohexylcarbodiimide (4.2 g; 20.5 mmol; 1.05 equiv.). After 3.5 h stirring at room temperature under argon, the reaction mixture was filtered through a pad of Celite with AcOEt and the collected filtrate was concentrated. A solution of the oily residue in AcOEt was washed with 1M aqueous HCl, two times with 5% aqueous $NaHCO_3$, then water and brine. The organic phase was dried over Na_2SO_4, filtered and concentrated to give **25** as a white solid. **Yield**: 96%; **^{1}H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm 5.4 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, CH-*NH*), 4.8 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, CH-*NH*), 3.9 – 3.9 (m, 1H, CH-*CH*-HO), 3.7-3.6 (m, 1H, CH-CH-*HO*), 2.8 (s, 4H, COCH_2CH_2CO), 1.5 (s, 9H, $CO_2C(CH_3)_3$), 1.4 (s, 9H, $CH_2CO_2C(CH_3)_3$).; **HR-ESI-MS**: *m/z* calcd for $[C_{16}H_{26}N_2O_7]^+$: 359.17 $[M+H]^+$; found 359.66.



***N*^{2}-(((9H-fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)-*N*^{6}-(*N*-(*tert*-butoxycarbonyl)-*O*-(*tert*-butyl)-L-seryl)-L-lysine (26)**

A solution of **25** (6.8 g; 19.1 mmol; 1 equiv.) in 67.5 mL of CH_2Cl_2 was added dropwise over 30 min to a stirred suspension of Fmoc-L-Lys-OH (9.3 g; 25.3 mmol; 1.3 equiv.) and DIEA (13.2 mL; 75.8 mmol; 4 equiv.) in CH_2Cl_2 (109 mL). After 3.5 h stirring at room temperature under argon, the mixture was concentrated. A solution of the residue in AcOEt was washed with 10% aqueous citric acid solution, saturated aqueous $NaHCO_3$ solution, water and brine. The organic phase was dried over Na_2SO_4 and concentrated to give **26** as a white solid. Yield: 98%; **^{1}H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm 7.7 (d, ^3J=7.5, 2H, CH_{ar}), 7.5 (m, 2H, CH_{ar}), 7.3-7.2 (m, 4H, CH_{ar}), 6.5 (s, 1H, N*H*), 5.6 (s, 1H, N*H*), 5.4 (s, 1H, N*H*), 4.3-4.1 (m, 7H, C*H*-CH_2-CH_2, C*H*-CH_2-O, C_{ar}-CH-CH_2, C_{ar}-C*H*-CH_2), 3.7 (m, 1H, CH-CH-*H*-O), 3.3-3.2 (m, 3H, CH-CH-*H*-O, CH-CH_2-CH_2), 1.8-1.3 (m, 4H+9H, CH-CH_2-CH_2-CH_2, CH-CH_2-CH_2-CH_2, CO-O-C(CH_3)$_3$), 1.09 (s, 9H, O-C(CH_3)$_3$;); **HR-ESI-MS**: *m/z* calcd for $[C_{33}H_{45}N_3O_8]^+$: 612.32 $[M+H]^+$; found 612.69.

General procedure of linear protected peptides synthesis by SPPS

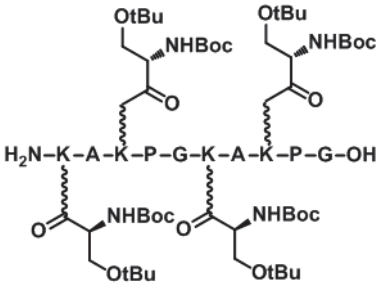
Synthesis of linear protected peptide was performed automatically by solid phase peptide synthesis (SPPS) using the 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) strategy. Initially, 2-chlorotrityl chloride resin was functionalized manually with 3 equiv. of Fmoc-Gly-OH, 5 equiv. of DIEA and 3 equiv. of HBTU in DCM for 2 hours and non-functionalized position were capped with methanol two times for 10 min. The resin was then filtered and washed with DCM and Et_2O before being dried in *vacuo*.

In order to determine the resin loading, 10 mg of resin were suspended in 1 mL of a solution of piperidine/DMF (2/8) for 20 min and filtered. Then, 100 µL of the filtrate were dissolved in 9.9 mL of DMF and UV-Vis absorbance was measured at 299 nm. The resin charge was determined as:

$$Resin\ loading\ (mmol/g) = \frac{\text{Abs} \times \text{Vtot}}{\text{Ɛ} \times l}$$

Where Abs represents the absorbance measured at 299 nm, Vtot represents the volume of the overall solution prepared (µL), Ɛ represents the molar attenuation coefficient ($M^{-1}.cm^{-1}$) (7800 $M^{-1}.cm^{-1}$ at 299 nm for the dibenzo-fluvene-piperidine) and l represents the length of the cuvette (cm).

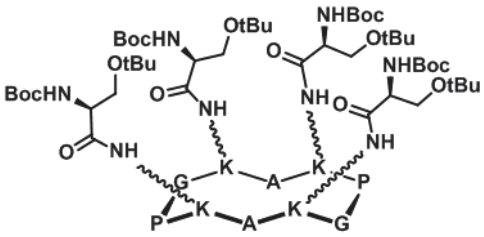
Resin was suspended in DMF (10 mL per gram of resin) and then placed in the synthesizer reactor. Coupling reaction were performed using, corresponding to the resin loading 3 eq of Fmoc-protected amino acids, 5 eq of DIEA and 3 eq of HBTU in DMF during 5 min at 70˚C. In order to provide diketopiperzine formation, the couplings of the first two amino acids were performed without any heating.



Lineair RAFT(Boc-Ser(OtBu)$_4$) (29)

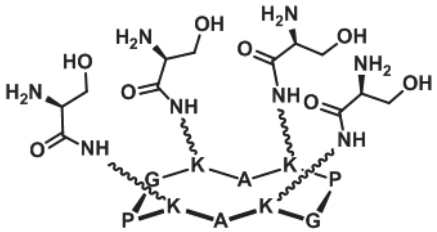
After completion of the peptide synthesis, the resin was cleaved with 15 mL of a solution of TFA-CH_2Cl_2 (1:99) for 3 min for two times. 10 mL of a solution of MeOH/pyridine (8/2) was added to the filtrate to quench TFA. The filtrate was partially concentrated and Et_2O was added to precipitate the protected peptide. The mixture was centrifuged for 15 min (4500 rpm) and the supernatant was removed. The resulting solid was dried to remove traces of Et_2O and solubilized in H_2O Milli-Q and freeze dried. The linear peptide was purified by semi-preparative HPLC in H_2O-acetonitrile with 0.1 % of TFA gradient (0 to 40% in 10 min,

then 40% to 65% in 25 min and 65% to 100% in 10 min of acetonitrile with 0.1% of TFA) to obtain **Lineair RAFT(Boc-Ser(OtBu)$_4$) 29** as a white solid. **Yield**: 43 %; **HPLC**: t_R: 4.93 min (Method B); **HR-ESI-MS**: *m/z* calcd for $[C_{92}H_{165}N_{18}O_{27}+2H]^{2+}$: 978.10 $[M+2H]^{2+}$; found 979.72.



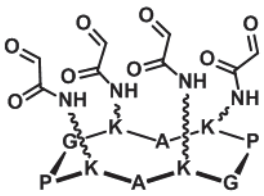
Cyclic RAFT(Boc-Ser(OtBu)$_4$) (30)

Linear protected peptide **29** (222.6 mg; 0.108 mmol; 1 equiv.) was solubilized in DMF (0.5 mM) and PyBOP (61.6 mg, 0.118 mmol; 1.1 equiv.) and DIEA (206 µL, 1.18 mmol; 11 equiv.) were added to the solution. The mixture was stirred at room temperature for 30 min and the DMF was partially concentrated. The cyclic peptide was precipitated by adding Et_2O and was centrifuged for 15 min (4500 rpm). The supernatant was then removed and the resulting solid was dried to remove traces of solvent. The product was solubilized in H_2O Milli-Q and freeze dried. The resulting product **Cyclic RAFT(Boc-Ser(OtBu)$_4$) 30** was obtained as a white solid. **Yield**: quantitative; **HPLC**: t_R: 5.70 min (Method B).



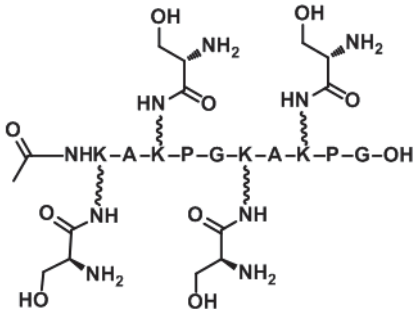
Cyclic RAFT(NH$_2$-Ser(OH)$_4$) (31)

Protected cyclic peptide **30** (209 mg; 0.108 mmol) was solubilized in 10 mL of TFA/H_2O/TIS solution (95/2.5/2.5) and kept at room temperature for 2 hours. The mixture was then partially concentrated, precipitated by adding Et_2O and centrifuged for 15 min (4500 rpm). The supernatant was then removed and the resulting solid was dried to remove traces of solvent. The product was solubilized in H_2O Milli-Q and freeze dried. **Cyclic RAFT(NH$_2$-Ser(OH)$_4$) 31** was obtained as a white solid. **Yield**: 71 %; **HPLC**: t_R: 2.06 min (Method B); **HR-ESI-MS**: *m/z* calcd for $[C_{56}H_{98}N_{18}O_{18}+2H]^{2+}$: 656.36 $[M+2H]^{2+}$; found 657.16; **MALDI-ToF** (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid): calcd for $[C_{56}H_{98}N_{18}O_{18}+Na]^{+}$ 1333.72, found 1333.70.



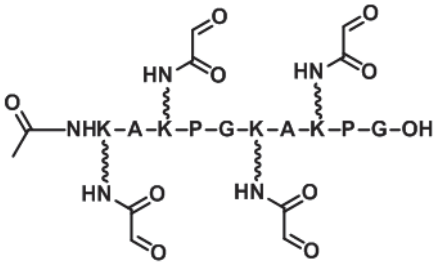
CyRAFT(CHO)$_4$ (32)

$NaIO_4$ (615.0 mg, 2.6 mmol, 10 equiv.) was added to a solution of **31** (341.0 mg, 0.260 mmol, 1equiv.) in H_2O Milli-Q (10 mM). After 2 hours stirring, the mixture was purified by semi-preparative HPLC in H_2O-acetonitrile with 0.1% of TFA gradient (0 to 40% in 10 min, then 40% to 65% in 25 min and 65% to 100% in 15 min of acetonitrile with 0.1% TFA) to obtain **CyRAFT(CHO)$_4$ 32** as a white powder. **Yield**: 59 %; **HPLC**: t_R: 1.65 min (Method B); **MALDI-ToF** (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid): calcd for $[C_{52}H_{78}N_{14}O_{18}+Na]^+$ 1209.98, found 1209.57.



Linear RAFT(NH$_2$-Ser(OH)$_4$) (33)

After completion of the peptide synthesis, the terminal amine was acetylated with 10 mL of a solution of Ac_2O/CH_2Cl_2 (50/50) for 20 min. The acetylation was repeated for 20 min, then, the resin was cleaved for 2 min first and then for 2 h with 20 mL of a solution of TFA/H_2O/TIS (95/2.5/2.5). The filtrate was concentrated and precipitated by adding Et_2O before centrifugation (4500 rpm for 5 min). Supernatant was removed and precipitate dried under vacuum before being dissolved in H_2O and freeze dried. **Linear RAFT(NH$_2$-Ser(OH)$_4$) 33** was obtained as a white solid. **Yield**: 71 %; **HPLC**: t_R: 1.65 min (Method B); **HR-ESI-MS**: *m/z* calcd for $[C_{58}H_{102}N_{18}O_{20}+H]^+$: 1371.75 $[M+H]^+$; found 1371.30.

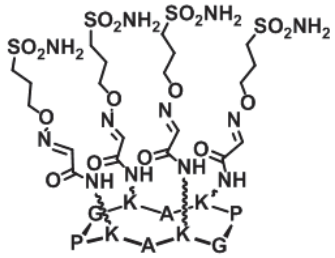


liRAFT(CHO)$_4$ (34)

$NaIO_4$ (403.0 mg, 1.8 mmol, 10 equiv.) was added to a solution of **33** (326.0 mg, 0.218 mmol, 1equiv.) in H_2O Milli-Q (10 mM). After 2 hours stirring, the mixture was purified by semi-preparative HPLC in H_2O-acetonitrile with 0.1% of TFA gradient (0 to 25% in 25 min, and then 25% to 100% in 10 min of acetonitrile with 0.1% TFA) to obtain **liRAFT(CHO)$_4$ 34** as a white powder. **Yield**: 47%; **HPLC**: t_R: 1.61 min (Method B); **MALDI-ToF** (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid): calcd for $[C_{54}H_{82}N_{14}O_{20}+K]^+$ 1285.58, found 1285.52.

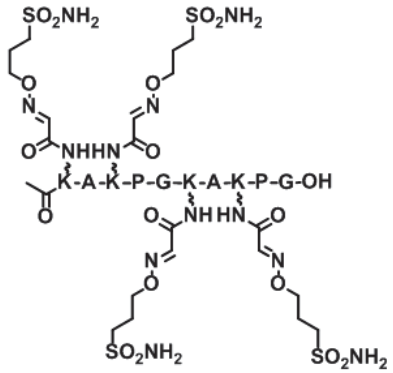
General procedure for multivalent inhibitors (35) and (36)

8 equiv. of oxyamine **16** per scaffold were added from a 200 mM stock solution in H_2O/DMF (9/1) into a 1 mM solution of scaffold **cyRAFT(CHO)$_4$ 32** or **liRAFT(CHO)$_4$ 34** in H_2O/TFA (99.9/0.1) and the mixture was stirred overnight at room temperature. The crude product was then purified on semi-preparative RP-HPLC using the method B to afford a white solid after freeze-drying.



Cy-Alk-Ox (35)

Yield: 31 %; **HPLC**: t_R = 9.91 min (Methode B); **MALDI-ToF** (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid): calcd for $[C_{64}H_{110}N_{22}O_{26}S_4 + Na]^+$ 1753.66, found 1753.69.

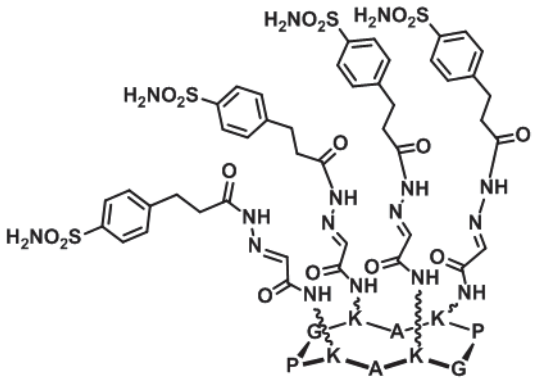


Ly-Alk-Ox (36)

Yield: 75 %; **HPLC**: t_R = 8.23 min (Methode B); **MALDI-ToF** (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid): calcd for $[C_{66}H_{114}N_{22}O_{28}S_4 + Na]^+$ 1813.69, found 1813.65.

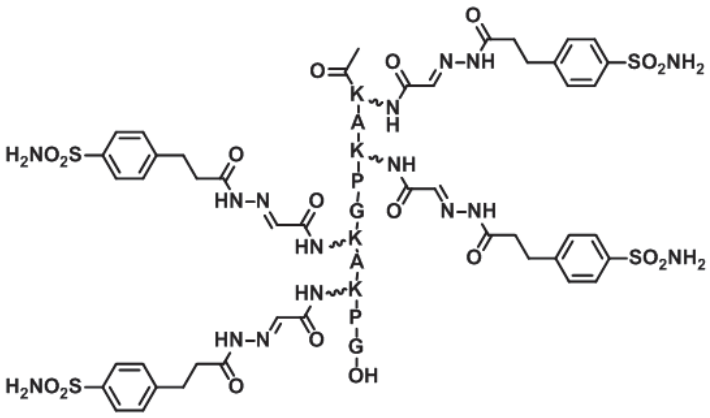
General procedure for multivalent inhibitors (37) and (38)

8 equiv. of hydrazide **8** per scaffold were added from a 200 mM stock solution in H_2O/DMF (9/1) into a 1 mM solution of scaffold **cyRAFT(CHO)$_4$ 32** or **liRAFT(CHO)$_4$ 34** in aqueous buffer (100 mM sodium acetate, pH 5.0) and the mixture was stirred overnight at room temperature. The crude product was then purified on semi-preparative RP-HPLC using the method A to afford a white solid after freeze-drying.



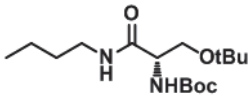
Cy-Ar-Hy (37)

Yield: 35 %; **HPLC**: t_R = 13.24 min (Methode A); **MALDI-ToF** (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid): calcd for $[C_{88}H_{122}N_{26}O_{26}S_4 + Na]^+$ 2109.77, found 2109.81.



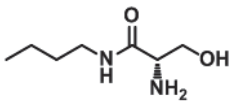
Ly-Ar-Hy (38)

Yield: 61 %; **HPLC**: t_R = 12.25 min (Methode A); **MALDI-ToF** (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid): calculated for $[C_{90}H_{126}N_{26}O_{28}S_4 + Na]^+$ 2169.79, found 2169.84.



***tert*-butyl (3-(*tert*-butoxy)-1-(butylamino)-1-oxopropan-2-yl)carbamate (39)**

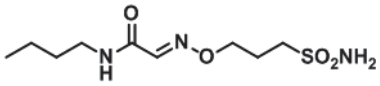
In 16 mL of DCM is added Boc-Ser(O*t*Bu)-succinimide (1 g; 2.8 mmol; 1 equiv.), *N*-butylamine (0.36 mL; 3.6 mmol; 1.3 equiv.) and diisopropylamine (1.9 mL; 11 mmol; 4 equiv.). After stirring at room temperature overnight, the mixture was washed with HCl 1N, $NaHCO_3$ saturated, water and brine. The organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate. The filtrate was concentrated and dried under vacuum to get a white solid. **Yield**: 84 %; **mp**: 71°C; **^{1}H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm 6.5 (br, 1H, CH_2-*NH*), 5.4 (br, 1H, CH-*NH*), 4.1 (s, 1H, *CH*), 3.8 – 3.7 (m, 1H, CH-*CH_2*), 3.3 (s, 1H, CH-*CH_2*), 3.2 (dd, *J* = 12.8, 6.6 Hz, 2H, *CH_2*-NH), 1.4 (3, 11H, CH_2-*CH_2*-CH_2, NH-*Boc*), 1.4 – 1.3 (m, 2H, *CH_2*-CH_3), 1.2 (s, 9H, O-*tBu*), 0.9 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH_2-*CH_3*); **^{13}C NMR** (101 MHz, $CDCl_3$) δ 170.62 (CH-*C*=O), 155.58 ((*C*=O)O-Boc),73.92 (*C*-$(CH_3)_3$) 62.00 (CH-*CH_2*), 39.20 (*CH_2*-NH), 38.70 (*CH*), 31.65 (CH_2-*CH_2*-CH_2), 28.40 (C-(*CH_3*)$_3$),27.51 (C-(*CH_3*)$_3$), 20.03 (*CH_2*-CH_3), 13.74 (CH_2-*CH_3*); **HR-ESI-MS**: *m/z* calcd for $[C_{16}H_{33}N_2O_4]^+$: 317.2440 $[M+H]^+$; found 317.2440.



2-amino-*N*-butyl-3-hydroxypropanamide (40)

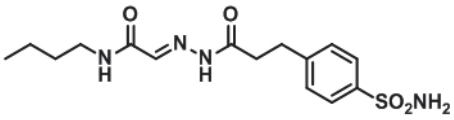
The compound **39** (0.69 g; 2.2 mmol; 1 equiv.) is added in 28 ml of a solution of TFA/TIS/H_2O (95/2.5/2.5) and stirred for 4 hours at room temperature, then the mixture is concentrated under *vacuum*. The residue was triturated with Et_2O and the resulting precipitate was filtered and washed with Et_2O to give a white solid. **Yield**: 96 %; **mp**: 99°C; **^{1}H NMR** (400 MHz, DMSO-*d_6*) δ/ppm 8.3 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, CH_2-*NH*), 8.1 (s, 2H, CH-*NH_2*), 5.52

(br, 1H, CH_2-*OH*), 3.8 – 3.6 (m, 3H, *CH*-CH_2), 3.11 (dd, *J* = 12.5, 6.8 Hz, 2H, CH_2-NH), 1.4 – 1.3 (m, 2H, CH_2-CH_2-CH_2), 1.3 – 1.2 (m, 2H, CH_2-CH_3), 0.9 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH_2-CH_3); **^{13}C NMR** (101 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 166.60 (CH-*C*=O), 60.61 (CH-CH_2), 54.66 (*CH*), 38.44 (CH_2-NH), 30.93 (CH_2-CH_2-CH_2), 19.42 (CH_2-CH_3), 13.62 (CH_2-CH_3); **HR-ESI-MS**: *m/z* calcd for $[C_7H_{17}N_2O_2]^+$: 161.1290 $[M+H]^+$; found 161.1288.



***N*-butyl-2-((3-sulfamoylpropoxy)imino)acetamide (42)**

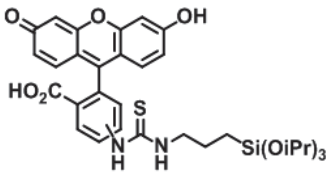
The compound **40** (0.1 g; 0.6 mmol, 1 equiv.) was dissolved in 60 ml of H_2O/TFA (99.9/0.1) and then $NaIO_4$ (0.14 g; 0.66 mmol, 1.1 equiv.) was added. After stirring 3 hours at room temperature, the mixture was quenched with $Na_2S_2O_3$ (0.1 g; 0.66 mmol, 1.1 equiv.). Finally, oxyamine **16** (0.18 g; 1.2 mmol, 2 equiv.) was added and the mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was extracted twice with AcOEt and the organic layer was washed with brine and dried over anhydrous sodium sulfate. The organic layer was concentrated and purified on silica gel chromatography using AcOEt/Cyclohexane (8/2). The expected compound **42** is obtained as yellow oil. **Yield**: 12 %; **^{1}H NMR** (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 8.2 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, *NH*), 7.5 (s, 1H, *CH*), 6.8 (s, 2H, SO_2NH_2), 4.2 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, O-CH_2), 3.2 – 3.1 (m, 2H, CH_2-SO_2NH_2), 3.1 – 3.0 (m, 2H, CH_2-NH), 2.1 – 2.0 (m, *J* = 12.2, 6.5 Hz, 2H, O-CH_2-CH_2), 1.5 – 1.4 (m, 2H, CH_2-CH_2-CH_2), 1.3 – 1.1 (m, 2H, CH_2-CH_3), 0.9 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH_2-CH_3); **^{13}C NMR** (101 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 160.8 (NH-*C*=O), 144.3 (*CH*=N), 72.3 (O-CH_2), 51.1 (CH_2-SO_2NH_2), 38.2 (CH_2-NH), 30.9 (CH_2-CH_2-CH_2), 23.6 (O-CH_2-CH_2), 19.5 (CH_2-CH_3), 13.6 (CH_2-CH_3); **HR-ESI-MS**: *m/z* calcd for $[C_9H_{20}N_3O_4S]^+$: 266.1175 $[M+H]^+$; found 266.1176.



***N*-butyl-2-(2-(3-(4-sulfamoylphenyl)propanoyl)hydrazino)acetamide (43)**

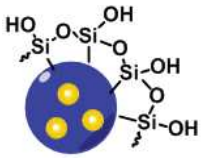
Compound **43** was synthesized in aqueous buffer (100 mM sodium acetate, pH 5.0) following the procedure of compound **42** and using the hydrazide **8**. The expected compound is obtained as a white solid. **Yield**: 27 %; **mp**: 119°C; **^{1}H NMR** (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 10.5 (br, 1H, *CH*=N), 8.2 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, CH_2-*NH*-C=O), 7.7 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.4 (dd, *J* = 13.7, 8.2 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.2 (s, 2H, SO_2NH_2), 3.1 (dd, *J* = 13.3, 6.8 Hz, 2H, CH_2-NH), 3.0 – 2.8 (m, 4H, CH_2-CH_2-C=O), 1.5 – 1.3 (m, 2H, CH_2-CH_2-CH_2), 1.2 (dt, *J* = 14.5, 7.3 Hz, 2H, CH_2-CH_3), 0.9 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH_2-CH_3); **^{13}C NMR** (101 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 173.9 (N-NH-*C*=O), 162.4 (CH_2-NH-*C*=O), 145.5 (C_{ar}-SO_2NH_2), 141.7 (C_{ar}-CH_2), 136.9 (*CH*=N), 128.9 (CH_{ar}), 125.6 (CH_{ar}), 38.0 (CH_2-NH), 32.8 (CH_2-CH_2-C=O), 31.2 (CH_2-CH_2-CH_2), 29.4 (CH_2-CH_2-C=O), 19.6 (CH_2-CH_3), 13.6 (CH_2-CH_3); **HR-ESI-MS**: *m/z* calcd for $[C_{15}H_{23}N_4O_4S]^+$: 355.1440 $[M+H]^+$; found 355.1445.

Chapter IV



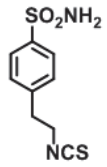
FITC (3-isopropoxysilyl)propyl thiourea (44)

A solution of fluoresceine isothiocyanate (0.541 g, 1.28 mmol, 1.1 equiv.) in acetonitrile (5 mL) are reacted with 3-aminopropyltriisopropoxysilane (0.308 g, 1.17 mmol, 1 equiv.) at room temperature under inert atmosphere. The mixture is stirred overnight, then filtered and washed with diethyl ether. The expected compound **44** is obtained as a powder. **Yield** : 77%; **mp** : > 220°C; **^{1}H RMN** (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 0.53 (dd, 2H, *J*=23.3Hz, *J*=31.2Hz), 1.31 (d, 18H); 1.64 (dd, 2H, *J* = 7.7 Hz, *J* = 15.5 Hz), 4.23 (m, 2H), 6.45-6.76 (m, 8H), 7.18 (d, 1H, *J*=8.2 Hz); 10.14 (s, 1H); **^{13}C RMN** (100.5 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 9.12, 22.36, 25.93, 46.70, 62.30, 64.68, 102.49, 112.83, 124.32, 129.30; **^{29}Si RMN** (79.4 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 49.62; **MS (ESI+/ESI-)** *m/z* 653.18 $[M+H]^+$, 675.17 $[M+Na]^+$, 686.91 $[M+Cl]^-$;Elemental analysis % calculated: %N:4.29 ; %C: 60.71 ; %H: 6.18; found : %N: 4.29; %C: 60.75 ; %H: 6.1.



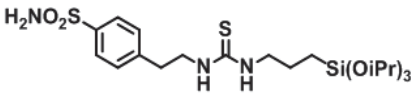
NHFS (45)

To a solution of compound **44** (0.336 g, 0.5 mmol, 1 equiv.) in a mixture water/ NH_4OH (0.72 mL/1.8 µL) are added tetramethoxysilane (0.685 g, 4.5 mmol, 9 equiv) at room temperature in an ultra-sonic bath. After 30 minutes were added 86 mmol (9.3 mL) of cyclohexane, 16.7 mmol (9.84 mL) of triton X-100, 30 mmol (3.77 mL) of hexanol and 133 mmol (2.4 mL) of water. After one night at room temperature, the mixture is centrifuged, and the precipitate was washed once with ethanol, and 4 times with a solution water/ethanol 1/3-2/3. **TGA** loss of mass de 9.5%; **BET** porous volume: 0.9194 mL/g; **SBET**: 332 et DBdB: >100 A; **Elemental analysis** % found : %N : 1.82; %C: 2.52; %H: 1.01; %S:0.39.



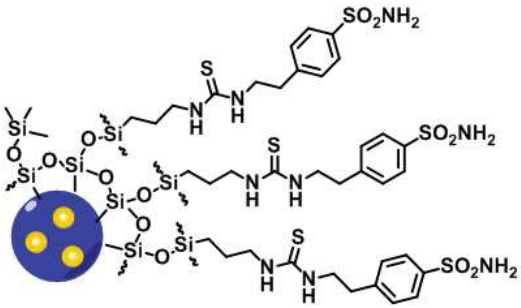
4-(2-isothiocyanatoethyl)benzenesulfonamide (46)

To a solution of dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (2.06 g, 9.99 mmol, 1 equiv.) in anhydrous THF (50 mL) is added carbon disulfide solution (0.76 g, 64.9 mmol, 6.5 equiv.) and aminoethylbenzene sulfonamide (2 g, 9.99 mmol, 1 equiv.) at room temperature. After stirring overnight, the mixture was filtered and washed with THF. The filtrate was then concentrated under *vacuum* and purified on silica gel using methylene chloride and eluent with a gradient of methanol (0 to 5%). **Yield**: 83%; **mp**: 144-146°C; **^{1}H RMN** (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 3.03 (t, 2H, *J*=6.4 Hz), 3.94 (t, 2H, *J*=6.4 Hz), 7.35 (s, 2H), 7.47 (d, 2H, *J*=8.1 Hz), 7.54 (d, 2H, *J*=8.1 Hz); **^{13}C RMN** (100.5 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 34.83, 45.46, 125.73, 125.75, 127.74, 129.34, 141.77; **IR** (KBr, cm-1) ν 3372, 3269, 2102-2197, 1568, 1320, 1143; **MS (ESI+/ESI-)** *m/z* 243.19 $[M+H]^+$, 265.21 $[M+Na]^+$, 241.17 $[M-H]^-$, 277.21 $[M+Cl]^-$.



4-(2-ethylthioureido-(3-triisopropoxysylil)propyl)benzensulfonamide (47)

To a solution of compound **46** (0.540 g, 2.05 mmol, 1 equiv.) in acetonitrile (5 mL) was added 3-aminopropyltriisopropoxysilane (0.496 g, 2.05 mmol, 1 equiv.) at room temperature under argon. The mixture was stirred overnight, and then filtered. The precipitate was washed with acetonitrile, and the filtrate concentrated under *vacuum*. **Yield**: 71%;; **^{1}H RMN** (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 0.57 (m, 2H), 1.19 (d,18H), 1.55 (m, 2H), 2.9 (m, 2H), 3.6 (t, 2H), 4.15 (m, 3H), 7.29 (s, 2H), 7.42 (d, 2H, *J*=8.1 Hz), 7.75 (d, 2H, *J*=8.1 Hz); **^{13}C RMN** (100.5 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 9.25, 23, 25.92, 35, 64.85, 34.83, 45.46, 126.20, 129.58, 127.74, 129.34, 141.77; **^{29}Si RMN** (79.4 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 49.12; Elemental analysis % calculated: %N : 8.31; %C: 49.87 ; %H: 7.77; found : %N: 8.32; %C: 49.86; %H: 7.79; **MS (ESI+/ESI-)** *m/z* 528.09 $[M+Na]^+$, 504.41 $[M+H]^-$, 539.89 $[M+Cl]^-$.



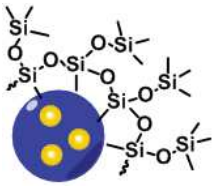
NHFS inhibitor (48)

Compound **47** (0.1g, 0.198 mmol) was added to 0.2 g of **45** in methanol (50 mL) under reflux. After one night, the mixture was centrifuged and the precipitate was washed twice with methanol. The precipitate was then reacted in 4mL of HMDS/toluene 50/50 v/v under reflux. After 4 hours, the mixture was centrifuged and the precipitate was washed three times with acetone. **TGA** loss of mass 11.65%; **BET** porous volume 0.8799 mL/g; **SBET**: 258 and DBdB:>100 A°; **Elemental analysis** % found %N: 1.71; %C: 2.15; %H: 5.98; %S: 0.71.

Estimation of number of ligand per nanoparticle

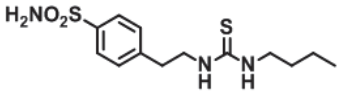
First, if we consider that the silica is fully condensed, the general formula of the Nps **48** can be as: $RSiO_{1.5}/nSiO_2$ with R= inhibitor ligand **46** (MW = 580 g/mol)

From the elemental analysis, the % of sulfur is 0.4%. Thus 0.4 = 100 x (2 x 32)/(580 + n x 60). We found n=253 which indicates that for one ligand there are 253 SiO_2.
To estimate, the number of ligand per nanoparticle, we used the size of Nps. From the diameter (4 nm) of Nps, the volume ($\pi r^3 x4/3$) was found to be 33.5 nm^3. The volume of SiO_2 unit is around 0.01 nm^3. (Holleman, A. F.; Wiberg, E. (2001), Inorganic Chemistry, San Diego: Academic Press, ISBN 0-12-352651-5.) From this volume, we can estimate the number of silica units in one nanoparticle to be 3350. From the ratio 253 SiO_2 for one ligand, we deduce the number of ligand in each nanoparticle to be 13 (3350/253).



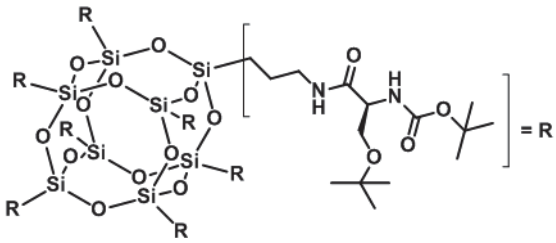
NHFS reference (49)

A solution of 0.050 g of **45** in methanol (15mL) was refluxed one night. Then the mixture was centrifuged and the precipitate was washed twice with methanol. The precipitate was then reacted in 4mL of HMDS/toluene 50/50 v/v under reflux. After 4 hours, the mixture was centrifuged and the precipitate was washed three times with acetone. **TGA** loss of mass 11.09%.



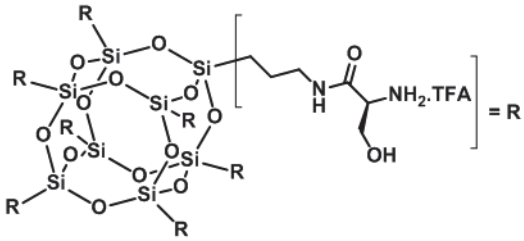
4-(2-(3-butylthioureido)ethyl)benzenesulfonamide (50)

To a solution of compound **46** (0.738 g, 3.04 mmol, 1 equiv.) in acetone (6 mL) was added *n*- butylamine (0.3 mL, 3.04 mmol, 1 equiv.) at room temperature. After stirring overnight, the mixture was concentrated under vacuum. The oil obtained was precipitated, filtered and washed with diethyl ether. **Yield**: 71%; **mp**: 145-147°C; **^{1}H RMN** (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 0.87 (t, 3H, J=4 Hz), 1.26 (m, 2H), 1.43 (m, 2H), 2.88 (t, 2H, *J*=8 Hz), 3.33 (br, 2H), 3.61 (br, 2H), 7.28 (s, 2H), 7.35 (br, 2H), 7.41 (d, 2H, *J*=8 Hz), 7.75 (d, 2H, *J*=8 Hz); **^{13}C RMN** (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 14.65, 20.50, 31.90, 35.70, 44.09, 45.72, 126.66, 130.07, 143.01, 144.55; **Elemental analysis** % calculated : %C : 49.50; %H : 6.71; %N : 13.32; Found: %C : 49.44; %H : 6.49; %N : 13.21; **MS (ESI+/ESI-)** m/z 316.10 $[M+H]^+$, 338.10 $[M+Na]^+$, 314.05 $[M+H]^-$.



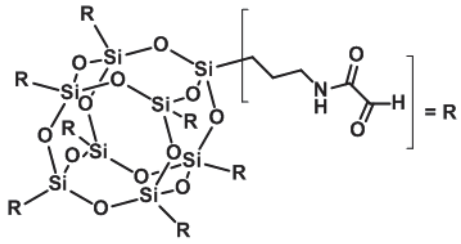
POSS-(Boc-*L*-Ser(OtBu))$_8$ (52)

Octa(3-aminopropyl)silsesquioxane hydrochloride (1.00 g, 0.85 mmol, 1 equiv), HBTU (3.87 g, 10.2 mmol, 12 equiv), HOBt (1.10 g, 8.1 mmol, 9.5 equiv), and Boc-*L*-Ser(OtBu)-OH (2.66 g, 10.2 mmol, 12 equiv) were dissolved in 40 mL of dry DMF at 0°C on ice bath. The reaction mixture was stirred under N_2 atmosphere. Diisopropylethylamine (4.75 mL, 27.2 mmol, 32 equiv) was added dropwise to the solution, and then the resulting mixture was warmed to room temperature. After stirring for 1 day at RT, the DMF was removed under *vacuum* and the obtained residue was dissolved in chloroform (200 mL). The organic layer was washed successively with saturated solution of $NaHCO_3$, 1 N aqueous solution of HCl, and brine. After drying over anhydrous sodium sulfate and filtration, the filtrate was concentrated under *vacuum* to get a brown solid which was recrystallized from acetonitrile to give the expected compound **52** as a white solid. **Yield**: 92 %; **mp**: 180˚C; **IR spectrum** (ATR) *v* (cm^{-1}): 3301, 3102, 2974, 2933, 2901, 1713, 1646, 1493, 1489, 1367, 1363, 1256, 1249, 1169, 1163, 1111, 1019, 878, 876, 777, 776, 697, 695; **^{1}H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm 6.98 (brs, 1H, CH_2-*NH*), 5.62 (brs, 1H, CH-*NH*), 4.19 (brs, 1H, *CH*), 3.71 – 3.70 (dd, *J* = 4 Hz, 1H, CH-*CH_2*), 3.45 - 3.41(t, *J* = 8 Hz, 1H, CH-*CH_2*), 3.22 (m, 2H, CH_2-CH_2-*CH_2*-NH), 1.58 (m, 2H, CH_2-*CH_2*-CH_2-NH), 1.44 (s, 9H, NH-*Boc*), 1.16 (s, 9H, O-*tBu*), 0.60 (m, 2H, *CH_2*-Si); **^{13}C NMR** (101 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm 170.86 (CH-*C*=O), 155.63 ((*C*=O)O-*t*Bu), 73.71 (*C*-$(CH_3)_3$), 62.25 (CH-*CH_2*), 54.68 (*CH*), 41.83 (CH_2-CH_2-*CH_2*-NH), 28.42 (C-(*CH_3*)$_3$),27.51 (C-(*CH_3*)$_3$), 22.92 (CH_2-*CH_2*-CH_2-NH), 9,07 (*CH_2*-Si); **^{29}Si NMR** (75.3 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm -66.93 (s); **MALDI-ToF** (2,5-dihydroxybenzoic acid): calcd for $[C_{120}H_{232}N_{16}O_{44}Si_8 + Na]^+$: 2848.44, found: 2848.0; **Elemental analysis: calc**.: % C: 50.97, % H: 8.27, % N: 7.92; found: % C: 51.03, % H: 8.03, % N: 8.26.



POSS-(NH$_2$-*L*-Ser(OH).TFA)$_8$ (53)

POSS-(Boc-*L*-Ser(OtBu))$_8$ 52 (1.00 g; 0.354 mmol; 1 equiv) was added to 13 mL of a solution of TFA/TIS/H_2O (95/2.5/2.5) and stirred for 4 hours at room temperature. The mixture was then concentrated under *vacuum* and the residue was triturated with Et_2O. The resulting precipitate was filtered and washed with Et_2O to give compound **53** as a white solid. **Yield**: 96 %; **mp**: 177˚C; **IR spectrum** (ATR) *v* (cm^{-1}): 3295, 3101, 2939, 2903, 1662, 1575, 1543, 1437, 1315, 1253, 1194, 1103, 1040, 980, 848, 801, 721, 690; **^{1}H NMR** (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 8.1 (br, 1H, CH_2-*NH*), 8.12 (brs, 2H, CH-*NH$_2$*), 3.70 (m, 3H, *CH*-*CH$_2$*), 3.10 (m, 2H, CH_2-CH_2-*CH$_2$*-NH), 1.46 (m, 2H, CH_2-*CH$_2$*-CH_2-NH), 0.60 (m, 2H, *CH$_2$*-Si); **^{13}C NMR** (101 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 166.68 (CH-*C*=O), 60.41 (CH-*CH$_2$*), 54.39 (*CH*), 41.29 (CH_2-CH_2-*CH$_2$*-NH), 22.30 (CH_2-*CH$_2$*-CH_2-NH), 8.79 (*CH$_2$*-Si); **^{29}Si NMR** (75.3 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm -66.33 (s); **MALDI-ToF** (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid): calcd for $[C_{48}H_{104}N_{16}O_{28}Si_8 + H]^+$: 1577.53, found 1577.5; **Elemental analysis**: calc.: % C: 30.87, % H: 4.53, % N: 9.00; found: % C: 28.45, % H: 4.37, % N: 7.78.

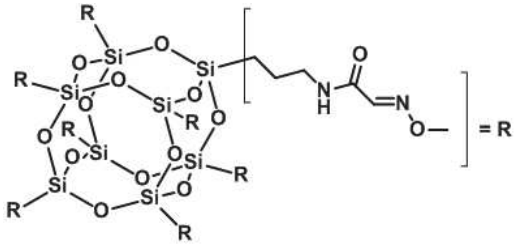


POSS-(C(OH)$_2$)$_8$ (54)

POSS-(NH$_2$-L-Ser(OH))$_8$ 53 (0.30 g, 0.120 mmol, 1 equiv) was dissolved in 12 mL of water and then $NaIO_4$ (0.225 g, 1.05 mmol, 8.8 equiv) was added. The resulting mixture was stirred for 6 hours at room temperature. In order to remove $NaIO_4$, the reaction mixture was loaded in dialysis tubing and dialyzed against deionized water at room temperature. After 2 days, the mixture was freeze drying to afford a white solid. **Yield**: 94 %; **mp**: > 250˚C; **IR spectrum** (ATR) *v* (cm^{-1}): 3290, 2937, 1652, 1549, 1433, 1275, 1198, 1088, 919, 748; **^{1}H NMR** (400 MHz, D_2O) δ/ppm 5.31 (s, 1H, *CH*(OH)$_2$), 3.26 (brs, 2H, CH_2-CH_2-*CH$_2$*-NH), 1.66 (brs, 2H, CH_2-*CH$_2$*-CH_2-NH), 0.74 (brs, 2H, *CH$_2$*-Si); **^{13}C NMR** (101 MHz, D_2O) δ/ppm 172.03 (CH-*C*=O), 86.81 (*CH*(OH)$_2$), 41.49 (CH_2-CH_2-*CH$_2$*-NH), 22.13 (CH_2-*CH$_2$*-CH_2-NH), 8.14 (*CH$_2$*-Si); **^{29}Si NMR** (75.3 MHz, D_2O) δ/ppm -65.41 (s); **MALDI-ToF** (2,5-dihydroxybenzoic acid): calcd for $[C_{40}H_{64}N_8O_{28}Si_8 + H_2O + Na]^+$: 1369.17, found 1369.2.

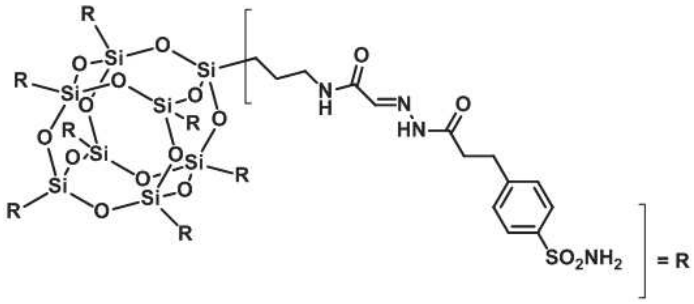
General procedure of ligation for (55) and (56)

POSS-$(C(OH)_2)_8$ 54 (0.050 g, 0.034 mmol, 1 equiv) was solubilized in 3.4 mL of a solution of H_2O/TFA (99.9/0.1) for oxime ligation or in aqueous buffer (100 mM sodium acetate, pH 5.0) for acylhydrazone ligation. 16 equiv. of appropriate ligand were added to the mixture. After 10 min of stirring at room temperature, the formed precipitate was centrifuged (4500 rpm for 15 min) and the supernatant was removed. The obtained solid was washed twice with ACN, centrifuged and supernatants were again removed. The desired product was then dried *in vacuo*.



POSS-$(CH=NOMe)_8$ (55)

Yield: 56 %; **^{1}H NMR** (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 8.33 - 8.30 (t, J = 4 Hz, 1H, CH_2-*NH*), 7.54 (s, 1H, *CH*=N), 3.89 (s, 3H, CH_3-O), 3.12 (m, J = 8 Hz and 4 Hz, 2H, CH_2-CH_2-*CH_2*-NH), 1.51 (m, J = 8 Hz, 2H, CH_2-*CH_2*-CH_2-NH), 0.61 (t, J = 8 Hz, 2H, *CH_2*-Si); **^{13}C NMR** (101 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 160.70 (CH-*C*=O), 144.05 (*CH*=N),62.27 (CH_3-O), 40.96 (CH_2-CH_2-*CH_2*-NH), 22.24 (CH_2-*CH_2*-CH_2-NH), 8.65 (*CH_2*-Si); **^{29}Si NMR** (75.3 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm -66.28 (s); **MALDI-ToF** (2,5-dihydroxybenzoic acid): calcd for $[C_{48}H_{88}N_{16}O_{28}Si_8 + Na]^+$: 1583.39, found 1583.4.



POSS-(CH=NNH-Benzosulfonamide)$_8$ (56)

Yield: 14 %; **^{1}H NMR** (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 11.71 and 11.50 (brs, 1H, *CH*=N), 8.35 - 8.25 (brs, 1H, CH_2-*NH*),7.72 (m, 2H, *CH_{ar}*-SO_2NH_2), 7.40 (m, 2H, *CH_{ar}*-CH_2), 7.28 (m, 2H, CH_{ar}-SO_2*NH_2*), 3.09 (brs, 2H, CH_2-CH_2-*CH_2*-NH),), 2.95 and 2.57 (m, 4H, *CH_2*-*CH_2*-C=O), 1.48 (brs, 2H, CH_2-*CH_2*-CH_2-NH), 0.56 (brs, 2H, *CH_2*-Si); **^{13}C NMR** (101 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 174.02 (N-NH-*C*=O), 162.40 (CH_2-NH-*C*=O), 145.48 and 145.05 (*C_{ar}*-SO_2NH_2), 141.90 and 141.76 (*C_{ar}*-CH_2), 140.14 and 136.84 (*CH*=N), 128.80 and 128.73 (*CH_{ar}*), 125.73 and 125.61 (*CH_{ar}*), 41.01 (CH_2-CH_2-*CH_2*-NH), 35.24 and 32.60 (CH_2-*CH_2*-C=O), 30.06 and 29.34 (*CH_2*-CH_2-C=O), 22.41 (CH_2-*CH_2*-CH_2-NH), 8.69 (*CH_2*-Si); **^{29}Si NMR** (75.3 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm -66.28 (s); **MALDI-**

ToF (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid): calcd for $[C_{112}H_{152}N_{32}O_{44}Si_8 + Na]^+$: 3151,6, found 3151,7.

Chapter V

General procedure of peptides 60 and 61 synthesis by SPPS

Synthesis of peptides was performed automatically by solid phase peptide synthesis (SPPS) using the 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) strategy. Initially, 2-chlorotrityl chloride resin was functionalized manually. DIEA (2.45 mL, 14.05 mmol, 5 equiv.) was added to a suspension of 2-chlorotrityl chloride resin (1.75 g, 2.81 mmol Cl g^{-1}) in NMP/DMSO (4/1) (9 mL). A solution of 9-fluorenylmethyl carbazate (2.14 g, 8.43 mmol, 3 equiv.) in DMSO (9 mL) was then added and the mixture was stirred for 2 hours. After filtration, capping was performed by mixing with MeOH for a few minutes. The resin was then filtered, washed with DMSO (3×), DCM (2×), isopropanol (1×), DCM (2×) and Et2O (3×), and dried in *vacuo*.

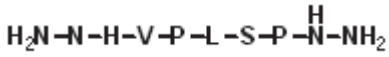
In order to determine the resin loading, 10 mg of resin were suspended in 1 mL of a solution of piperidine/DMF (2/8) for 20 min and filtered. Then, 100 µL of the filtrate were dissolved in 9.9 mL of DMF and UV-Vis absorbance was measured at 299 nm. The resin charge was determined as:

$$Resin\ loading\ (mmol/g) = \frac{\mathrm{Abs} \times \mathrm{Vtot}}{\varepsilon \times l}$$

Where Abs represents the absorbance measured at 299 nm, Vtot represents the volume of the overall solution prepared (µL), Ɛ represents the molar attenuation coefficient ($M^{-1}.cm^{-1}$) (7800 $M^{-1}.cm^{-1}$ at 299 nm for the dibenzo-fluvene-piperidine) and l represents the length of the cuvette (cm).

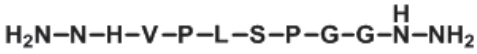
Resin was suspended in DMF (10 mL per gram of resin) and then placed in the synthesizer reactor. Coupling reaction were performed using, corresponding to the resin loading 3 eq of Fmoc-protected amino acids, 5 eq of DIEA and 3 eq of HBTU in DMF during 5 min at 70˚C. In order to provide diketopiperzine formation, the couplings of the first two amino acids were performed without any heating.

After completion of the peptide synthesis, the resin was cleaved with 15 mL of a solution of TFA/TIS/H_2O (95/2.5/2.5) for 3 min for two times. After filtration, the filtrate was partially concentrated and Et_2O was added to precipitate the peptide. The mixture was centrifuged for 15 min (4500 rpm) and the supernatant was removed. The resulting solid was dried to remove traces of Et_2O and solubilized in H_2O Milli-Q and freeze dried. The peptide was purified by semi-preparative HPLC in H_2O-acetonitrile with 0.1 % of TFA gradient (0 to 40% in 10 min, then 40% to 65% in 25 min and 65% to 100% in 10 min of acetonitrile with 0.1% of TFA).



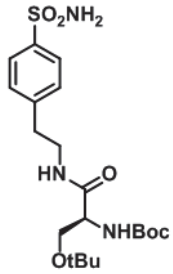
Peptide (60)

Yield: 10 %; **HPLC**: t_R: 4.26 min (Method A).



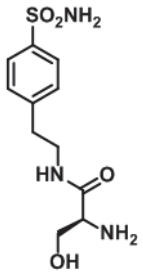
Peptide (61)

Yield: 25 %; **HPLC**: t_R: 4.68 min (Method A).



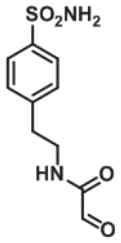
(*S*)-*tert*-butyl (3-(*tert*-butoxy)-1-oxo-1-((4-sulfamoylphenethyl)amino)propan-2-yl)carbamate (62)

4-(2-aminoethyl)benzenesulfonamide (1.0 g, 5.0 mmol, 1 equiv), HBTU (2.84 g, 7.5 mmol, 1.5 equiv), HOBt (0.9 g, 6.0 mmol, 1.2 equiv), and Boc-*L*-Ser(*t*Bu)-OH (1.6 g, 6.0 mmol, 1.2 equiv) were dissolved in 50 mL of dry DCM. The reaction mixture was stirred under N_2 atmosphere. Diisopropylethylamine (1.7 mL, 10.0 mmol, 2 equiv) was added dropwise to the solution. After stirring for 1 day at RT, the organic layer was washed successively with saturated solution of $NaHCO_3$, 1 N aqueous solution of HCl, and brine. After drying over anhydrous sodium sulfate and filtration, the filtrate was concentrated under *vacuum* to give the expected compound **62** as solid. **Yield**: 93 %; **^{1}H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm 7.8 (d, *J*=8 Hz, 2 H, CH_{ar}), 7.3 (d, *J*=8 Hz, 2 H, CH_{ar}), 6.6 (br, 1 H, *NH*), 5.3 (s, 1 H, N*H*), 5.1 (s, 2 H, SO_2NH_2), 4.1 (m, 1H, CH-CH_2), 3.7 (m, 1H, *CH*), 3.6 (m, 2 H, CH_2-CH_2-NH), 3.3 (m, 1H, CH-CH_2), 2.9 (m, 2 H, CH_2-CH_2-NH), 1.4 (s, 9H, C(CH_3)$_3$), 1.1 (s, 9H, C(CH_3)$_3$); **^{13}C NMR** (101 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm 167.2 (*C*=O), 156.1 (*C*=O), 143.4 (C_{Ar}), 142.5 (C_{Ar}), 130.1 (CH_{Ar}), 125.4 (CH_{Ar}), 75.3 ($C(CH_3)_3$), 60.4 (CH_2), 54.6 (*C*H), 39.8 (CH_2), 34.6 (CH_2), 28.4 ((CH_3)$_3$)), 27.5 ((CH_3)$_3$).



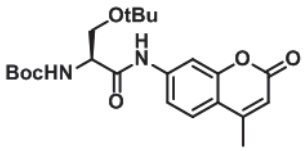
(*S*)-2-amino-3-hydroxy-*N*-(4-sulfamoylphenethyl)propanamide (63)

Compound **62** (1.0 g; 2.2 mmol) was solubilized in 9 mL of TFA/H_2O/TIS solution (95/2.5/2.5) and kept at room temperature for 3 hrs. The mixture was then partially concentrated, precipitated by adding Et_2O and centrifuged for 15 min (4500 rpm). The supernatant was then removed and the resulting solid was dried to remove traces of solvent. **Yield**: 97 %; **^{1}H NMR** (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 8.5 (br, 1H, N*H*), 8 (br, 2H, NH_2), 7.7 (d, *J*=8 Hz, 2 H, CH_{ar}), 7.4 (d, *J*=8 Hz, 2 H, CH_{ar}), 7.3 (s, 2 H, SO_2NH_2), 5.5 (br, 1H, O*H*), 3.7 (m, 3H, C*H*-CH_2), 3.4 (m, 2 H, CH_2-CH_2-NH), 2.8 (m, 2 H, CH_2-CH_2-NH); **^{13}C NMR** (101 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 166.7 (*C*=O), 143.3 (C_{Ar}), 142.1 (C_{Ar}), 129.2 (*C*H_{Ar}), 125.6 (*C*H_{Ar}), 60.3 (*C*H_2), 54.3 (*C*H), 39.9 (*C*H_2), 34.5 (*C*H_2).



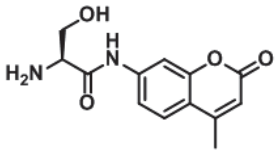
2-oxo-*N*-(4-sulfamoylphenethyl)acetamide (64)

The compound **63** (0.8 g; 2.7 mmol, 1 equiv.) was dissolved in 54 ml of H_2O and then $NaIO_4$ (0.6 g; 2.9 mmol, 1.1 equiv.) was added. After 3 hours, the crude product was then purified on semi-preparative RP-HPLC using the method A to afford a white solid after freeze-drying. **Yield**: 85 %; **^{1}H NMR** (400 MHz, D_2O) δ/ppm 7.7 (d, *J*=8 Hz, 2 H, CH_{ar}), 7.3 (d, *J*=8 Hz, 2 H, CH_{ar}), 5.0 (s, 1H, C*H*$(OH)_2$), 3.4 (t, 2 H, *J* = 8 Hz, CH_2-CH_2-NH), 2.8 (t, 2 H, *J* = 8 Hz, CH_2-CH_2-NH); **^{13}C NMR** (101 MHz, D_2O) δ/ppm 169.7 (*C*=O), 143.5 (C_{Ar}), 142.1 (C_{Ar}), 129.3 (*C*H_{Ar}), 125.1 (*C*H_{Ar}), 88.7 (*C*H$(OH)_2$), 40.1 (*C*H_2), 34.8 (*C*H_2).



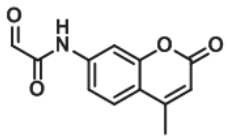
(*S*)-*tert*-butyl (3-(*tert*-butoxy)-1-((4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)amino)-1-oxopropan-2-yl)carbamate (65)

7-amino-4-methylcoumarin (1.0 g, 5.7 mmol, 1 equiv) and Boc-*L*-Ser(*t*Bu)-OH (1.7 g, 6.3 mmol, 1.1 equiv) were dissolved in 10 mL of pyridine. The reaction mixture was stirred at 0˚C. $POCl_3$ (0.8 mL, 8.55 mmol, 1.5 equiv) was added dropwise to the solution. The reaction mixture was stirred at 0 °C (ice bath) for 1 hour and then warmed to room temperature and stirred for overnight. Then the mixture was concentrated and purified on silica gel chromatography using AcOEt/Cyclohexane (4/6). The expected compound **65** is obtained as yellow oil. **Yield**: 25 %; **^{1}H NMR** (400 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm 9.1 (br, 1H, N*H*), 7.6 (s, 1H, CH_{Ar}), 7.5 (d, 1H, *J* = 8 Hz, CH_{Ar}), 7.4 (d, 1H, *J* = 8 Hz, CH_{Ar}), 6.1 (s, 1H, C*H*), 5.5 (br, 1H, N*H*), 4.3 (s, 1H, C*H*), 3.8 (m, 1H, CH_2), 3.5 (m, 1H, CH_2), 2.4 (s, 3H, CH_3), 1.4 (s, 9H, C(CH_3)$_3$), 1.2 (s, 9H, C(CH_3)$_3$); **^{13}C NMR** (101 MHz, $CDCl_3$) δ/ppm 169.5, 161.1, 154.3, 152.3, 141.1, 125.3, 115.6, 113.5, 107.2, 74.8, 61.9, 28.4, 27.6, 18.6.



(*S*)-2-amino-3-hydroxy-*N*-(4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)propanamide (66)

Compound **65** (0.2 g; 0.48 mmol) was solubilized in 2 mL of TFA/H_2O/TIS solution (95/2.5/2.5) and kept at room temperature for 3 hrs. The mixture was then partially concentrated, precipitated by adding Et_2O and centrifuged for 15 min (4500 rpm). The supernatant was then removed and the resulting solid was dried to remove traces of solvent. **Yield**: 98 %; **^{1}H NMR** (400 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 11.0 (br, 1H, N*H*), 8.3 (br, 2H, NH_2), 7.8 (m, 2H, 2CH_{Ar}), 7.5 (d, 1H, *J* = 8 Hz, CH_{Ar}), 6.3 (s, 1H, C*H*), 4.1 (s, 1H, C*H*), 3.9 (m, 2H, CH_2), 2.4 (s, 3H, CH_3); **^{13}C NMR** (101 MHz, DMSO-d_6) δ/ppm 166.5, 159.9, 153.6, 153.1, 141.5, 126.2, 115.6, 115.4, 112.7, 106.6, 60.1, 55.3, 18.0.

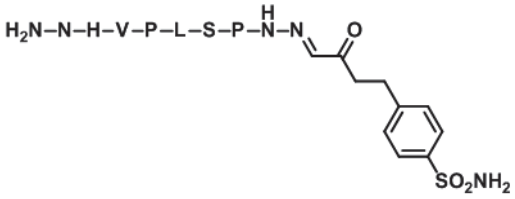


***N*-(4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)-2-oxoacetamide (67)**

The compound **66** (0.1 g; 0.35 mmol, 1 equiv.) was dissolved in 7 mL of H_2O and then $NaIO_4$ (0.08 g; 0.38 mmol, 1.1 equiv.) was added. After 3 hours, the mixture was centrifuged for 15 min (4500 rpm). The supernatant was then removed and the resulting solid was dried to remove traces of solvent. **Yield**: 66 %; **^{1}H NMR** (400 MHz, D_2O) δ/ppm 7.8 (m, 2H, 2CH_{Ar}), 7.5 (d, 1H, J = 8 Hz, CH_{Ar}), 6.2 (s, 1H, CH), 5.1 (s, 1H, CH(OH)$_2$), 2.3 (s, 3H, CH_3).

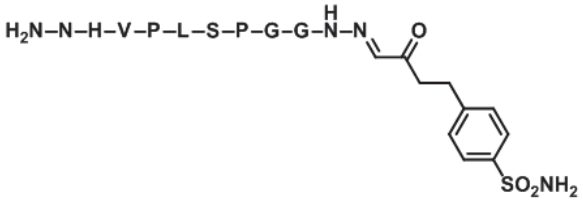
General procedure for hybride inhibitors (68), (69) and the reference (70)

1.2 equiv. of aldehyde glyoxylique **64** were added from a 200 mM stock solution in H_2O into a 1 mM solution of peptide **60** or **61** or Glycine hydrazide in aqueous buffer (100 mM sodium acetate, pH 5.0) and the mixture was stirred overnight at room temperature. The crude product was then purified on semi-preparative RP-HPLC using the method A to afford a white solid after freeze-drying.



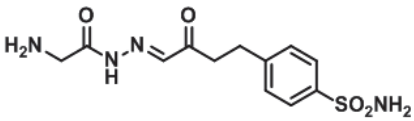
Hybride inhibitor (68)

Yield: 58 %; **HPLC** : t_R = 8.55 min (Methode A); **MALDI-ToF** (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid): calculated for $[C_{44}H_{66}N_{14}O_{22}S + Na]^+$ 1037.45, found 1037.35.



Hybride inhibitor (69)

Yield: 79 %; **HPLC**: t_R = 8.72 min (Methode A); **MALDI-ToF** (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid): calculated for $[C_{44}H_{66}N_{14}O_{22}S + Na]^+$ 1151.49, found 1151.25.



4-(4-(2-(2-aminoacetyl)hydrazino)-3-oxobutyl)benzenesulfonamide (70)

Yield: 75 %; **HPLC**: t_R = 1.55 min (Methode A); **HR-ESI-MS**: *m/z* calcd for $[C_{12}H_{17}N_5O_4S]^+$: 328.1066 $[M+H]^+$; found 328.1104

Annexes

Ce travail de thèse a fait l'objet de 2 présentations posters :

- Journées Méditerranéennes des Jeunes Chercheurs, du 12 au 14 Octobre 2015 à Montpellier.
- ED Sciences Chimiques Balard, le 6 décembre 2016 à Montpellier.

Et de 2 communications orales :

- Journée Grand Sud-Ouest, le 27 Novembre 2016 à Montpellier.
- Journées Méditerranéennes des Jeunes Chercheurs, les 13 et 14 Octobre 2016 à Nice.

Il a également abouti à quatre publications :

- **Flurorescent silica nanoparticles with multivalent inhibitory effects towards carbonic anhydrases.** N., Touisni; **N., Kanfar**; S., Ulrich; P., Dumy; C.T., Supuran; A., Mehdi; J-Y., Winum; *Chem. Eur. J.* **2015**, *21* (29), 10306-10309. *Cover Page, Hot article*
- **Emerging trends in enzyme inhibition by multivalent nanoconstructs. N., Kanfar**; E., Bartolami; R., Zelli; A., Marra; J-Y., Winum; S., Ulrich; P., Dumy; *Org. Biomol. Chem*. **2015**, *13*, 9894-9906.
- **Effective access to multivalent inhibitors of carbonic anhydrases promoted by peptide bioconjugation. N., Kanfar**; M., Tanc; P., Dumy; C.T., Supuran; S., Ulrich; J-Y., Winum; *Chem. Eur. J.* **2017**, 6788-6794. *Cover Page, Hot article*
- **Polyhedral oligomeric silsesquioxane (POSS) bearing glyoxylic aldehyde as clickable platform towards multivalent conjugates**. **N., Kanfar**; A., Mehdi; P., Dumy; S., Ulrich, J-Y., Winum; *Chem. Eur. J.* **2017**, DOI: 10.1002/chem.201703794. *Cover Page, Hot Article*

A Journal of
ChemPubSoc Europe

CHEMISTRY
A European Journal

www.chemeurj.org

2015-21/29



Concept
Chiral Iminophosphoranes–An Emerging Class of Superbase Organocatalysts
Ł. Albrecht et al.
Minireview
Recent Progress towards Transition-Metal-Catalyzed Synthesis of Fluorenes
C. Zhu, L.-W. Ye et al.

CEUJED 21 (29) 10245–10580 (2015) · ISSN 0947-6539 · Vol. 21 · No. 29 · 2015

Supported by ACES

WILEY-VCH

ChemPubSoc Europe

DOI: 10.1002/chem.201501037

CHEMISTRY A European Journal Communication

Inhibitors |*Hot Paper*|

Fluorescent Silica Nanoparticles with Multivalent Inhibitory Effects towards Carbonic Anhydrases



Nadia Touisni,[a] Nasreddine Kanfar,[a] Sébastien Ulrich,[a] Pascal Dumy,[a] Claudiu T. Supuran,[b] Ahmad Mehdi,[c] and Jean-Yves Winum*[a]

Abstract: Multifunctional silica nanoparticles decorated with fluorescent and sulfonamide carbonic anhydrase (CA) inhibitors were prepared and investigated as multivalent enzyme inhibitors against the cytosolic isoforms hCA I and II and the transmembrane tumor-associated ones hCA IX and XII. Excellent inhibitory effects were observed with these nanoparticles, with K_I values in the low nanomolar range (6.2–0.67 nM) against all tested isozymes. A significant multivalency effect was seen for the inhibition of the monomeric enzymes hCA I and II compared to the dimeric hCA IX and hCA XII isoforms, where no multivalent effect was observed, suggesting that the multivalent binding is occurring through enzyme clustering.

Carbonic anhydrases (CAs, EC 4.2.1.1) are well known zinc metalloproteins which catalyze a simple but essential physiological reaction: carbon dioxide hydration to bicarbonate and proton.[1] These enzymes are of clinical relevance in cancer therapy as, among the 15 isoforms known in humans, some catalytically active isozymes are critical in various fundamental physiological processes and have been clinically exploited for the treatment or prevention of various pathologies such as glaucoma and neurological disorders. The lack of selectivity of conventional inhibitors against the different CA isozymes have led researchers to investigate new approaches for achieving such a goal.[1] For example, different strategies were reported in recent years for obtaining compounds that specifically target the tumor-associated CA IX,[2] especially the sugar approaches developed by our group.[3,4] Beside the rational drug design of more selective enzyme inhibitors, the nanoparticles approach was applied by our group to carbonic anhydrases and we demonstrated the possibility of activity modulation of carbonic anhydrases using nano-objects.[5,6] Due to their size, ease of synthesis, and their potential applications, silica-based nanoparticles received great attention for their biomedical applications both for the site-specific delivery of drugs or for imaging purposes.[7–9] Moreover it constitutes a good platform for developing multivalent interactions, which is a promising option for the specific treatment of diseases.

Multivalent enzyme inhibitors that combine multiple copies of an inhibitor conjugated to a single scaffold may lead to an overall increase of the binding affinity, avidity, and/or specificity.[10] These changes that are associated with the multivalent presentation of inhibitors depend on the nature of the biological target and may arise from different mechanisms: 1) a statistical rebinding effect, 2) a chelate effect, 3) a subsite binding effect, or 4) a clustering effect.[11] Though the multivalency approach has been extensively studied in the context of lectins that contain multiple binding sites,[12] its application in the field of enzyme inhibition has received less attention until recently. For instance, the multivalency strategy has been successfully applied in the case of glycosidase inhibitors.[13–14] In the case of carbonic anhydrase, only studies on bivalent inhibitors were recently reported. Indeed, Whiteside's research group described in 2012 the binding of monovalent and bivalent benzene sulfonamide ligands to a synthetic dimer of carbonic anhydrase.[15] The group of Neri reported the use of bivalent small molecule ligand–drug conjugates against carbonic anhydrase IX.[16] Besides the classical small-molecule approach, which has been applied with some success on the in vitro and in vivo inhibition of human CA (hCA), the use of multivalent nanoplatforms could therefore be of great interest and a promising strategy in this field.

In this paper, we describe the synthesis and multivalent inhibition of sulfonamide carbonic anhydrase inhibitor-coated silica nanoparticles against cytosolic/transmembrane CA isoforms.

CA inhibitor-coated silica nanoparticles were prepared following the synthetic strategy depicted in Scheme 1. First, two organosilylated ligands **3** and **6** were synthesized, the first one by coupling 3-aminopropyltriisopropoxylsilane **1** with fluorescein isothiocyanate **2**, the latter by coupling of 3-aminopropyltriisopropylsilane **1** with 4-isothiocyanato(ethyl) benzene sulfonamide **5**. Previously, **6** has been prepared by reacting 4-aminoethylbenzene sulfonamide **4** with dicyclohexylcarbodi-

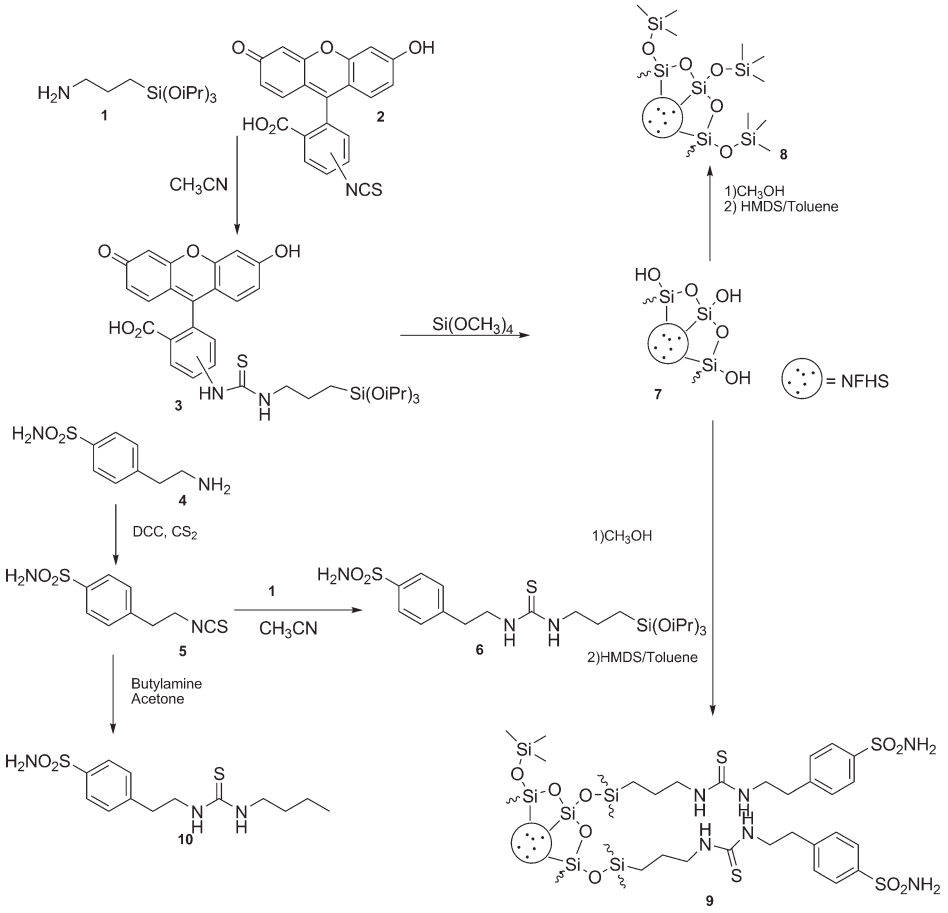
[a] *Dr. N. Touisni, N. Kanfar, Dr. S. Ulrich, Prof. Dr. P. Dumy, Dr. J.-Y. Winum*
Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM)
UMR 5247 CNRS-ENSCM-Université de Montpellier, ENSCM
8 rue de l'Ecole Normale, 34296 Montpellier Cedex (France)
E-mail: jean-yves.winum@univ-montp2.fr

[b] *Prof. Dr. C. T. Supuran*
Neurofarba Department
Section of Pharmaceutical and Nutriceutical Sciences
Università degli Studi di Firenze
Via Ugo Schiff 6, 50019 Sesto Fiorentino, Florence (Italy)

[c] *Prof. Dr. A. Mehdi*
Institut Charles Gerhardt
UMR 5253, Equipe Chimie Moléculaire et Organisation du Solide
Université de Montpellier
Place Eugène Bataillon, 34095 Montpellier Cedex 05 (France)

Supporting information for this article is available on the WWW under http://dx.doi.org/10.1002/chem.201501037.

© 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim



Scheme 1. Schematic representation of NFHS particle synthesis with carbonic anhydrase inhibitors immobilization.

imide (DCC) and carbon disulfide.[17,18] Isothiocyanate **5** was reacted with *n*-butylamine in acetone to afford the thiourea **10**, which was used as a monovalent reference in the enzymatic inhibition assays. The nanometer-sized fluorescent hybrid silica (NFHS) particles **7** were then prepared by a hydrolysis and polycondensation approach, using the water-in-oil microemulsion method.[19–21] Co-hydrolysis and polycondensation of a mixture of the fluorescent silylated precursor **3** and tetramethoxysilane in the presence of a base as catalyst in an ultrasound bath[22] led to fluorescein-labelled nanoparticle **7**, which was isolated after centrifugation and several treatments with ethanol and water. The silica surface was then modified, on the one hand, by treatment with methanol overnight under reflux. The capping of Si–OH functions was performed by treatment with hexamethyldisilazane (HMDS) for four hours to yield the nanoparticle **8**.[23] On the other hand, the bifunctional (fluorescent + inhibitor) system was prepared by reacting nanoparticle **7** with silylated inhibitor ligand **6** in methanol under reflux overnight. The same treatment with HMDS was subsequently performed to afford nanoparticle **9** (Scheme 1).

The size of the composite NFHS particles was investigated by transmission electron microscopy (TEM) and the mean diameter and standard derivation of the particles were determined from TEM pictures by averaging the size of 150 particles. The results showed that the particles **9** were monodisperse with a diameter of about (3.5 ± 0.8) nm (Figure 1).

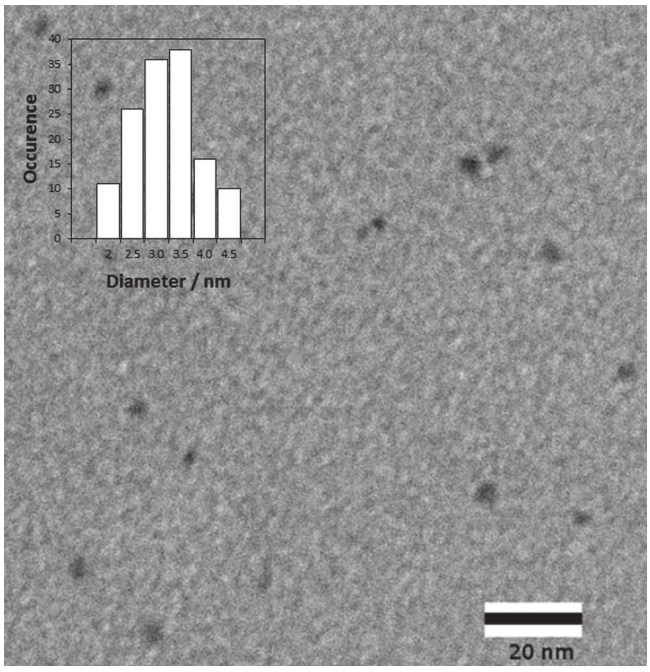


Figure 1. TEM picture of NFHS particle **9**.

The nitrogen sorption analyses showed that the NFHS particles are not porous, and the Brunauer–Emmett–Teller (BET) specific surface areas are respectively 330 m^2g^{-1} for NFHS particle **7** and 260 m^2g^{-1} for NFHS particle **9**. This diminution shows clearly the surface modification by the ligand **6**. With the help of elemental analyses, a silica/ligand molar ratio of around 250 was obtained for nanoparticle **9**. Based on NFHS particle size and this ratio, the number of sulfonamide ligands per nanoparticle was estimated to be between 12 and 14 (see the Supporting Information).

The NFHS particles **8** and **9** have been assayed for their inhibitory potency against the physiologically relevant cytosolic hCA I and II, as well as against the two tumour-associated isoforms hCA IX and XII. It can be observed from the data in Table 1 that no inhibition or a weak inhibition was observed

© 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Table 1. hCA I, II, IX, XII inhibition data for monovalent inhibitor **10** and with NFHS particles **8** and **9** determined by a stopped-flow, CO_2 hydration assay method[24] at pH 8.4.

	K_I [nM][a]			
	hCA I	hCA II	hCA IX	hCA XII
10	142	48.1	38.3	29.8
8	38800	268	560	92650
9	4.4	0.67	2.7	6.2
rp	32.3	71.8	14.2	4.8
rp/*n*	2.7	6	1	0.4

[a] Mean from three different assays, errors in the range of ±10% of the reported values (data not shown). rp: relative potency = K_I(**10**)/K_I(**9**). rp/*n*: relative potency/number of sulfonamide units.

for all isoforms with the inhibitor-free nanoparticle **8**. However, nanoparticle **9** exhibited excellent inhibitory effects, in low nanomolar range, with K_I values in the range 6.2–0.67 nM against all tested isozymes.

Multivalent effects were clearly seen for nanoparticle **9** when compared with monovalent inhibitor **10**. With hCA I and II, the inhibition constants K_I decrease from 142 to 4.4 nM for hCA I and from 48.1 nM to 670 pM for hCA II, which corresponds to an inhibitory potency improvement of 32 and 72 times, respectively (Table 1). Interestingly, no multivalent effect was characterized in the case of hCA IX, where a linear inhibitory effect was observed in reference to the ligand **10**, the relative potency normalized to the sulfonamide units (rp/*n*) being equal to 1. For the isoform XII, an increase of the overall inhibitory potency from 29.8 to 6.2 nM was observed between the monovalent compound **10** and the multivalent system **9**, but amounted to a negative multivalent effect; the relative potency of a sulfonamide inhibitor being weaker in the nanoplatform compared to the single compound reference. These results indicate that the multivalency approach can be a promising strategy for enhancing not only the binding affinity of CA inhibitors but also the selectivity between different isoforms. For instance, the selectivity was modified when shifting from a monovalent (K_I(hCA II)/K_I(hCA IX) = 1.25) to a multivalent system (K_I(hCA II)/K_I(hCA IX) = 0.24), the monovalent inhibitor becoming a hCA II-selective multivalent inhibitor compared to hCA IX and hCA XII.

Note also the inhibition data observed with inhibitor-free nanoparticles **8.** Even if inhibitory activity is relatively weak, a significant selectivity was noticed with hCA II and hCA IX compared to other isoforms tested. The inhibitory mechanism could be explained by adsorption phenomena of silica nanoparticles on the border of the active site cavity.[25]

In conclusion, NFHS nanoparticles incorporating fluorescein and benzenesulfonamide moieties were prepared by an original procedure in order to investigate the effect of multivalency on the inhibition of CA isoforms with important physiologic and pathologic functions such as the widely distributed cytosolic CA I and II,[26] as well as the transmembrane, tumor-associated CA IX and XII.[27] In fact, the only other contribution dealing with this was our earlier work in which we reported gold nanoparticles derivatized with a thiol-containing benzenesulfonamide, which showed excellent inhibitory and multivalency effects for inhibiting the tumor-associated CA IX (but were much less effective as CA I and II inhibitors).[5] For the nanoparticles reported here, based on silica nanoparticles, the opposite effect was observed: for the cytosolic isoforms hCA I and II, the inhibition constants decreased from 142 to 4.4 nM for hCA I, and from 48 to 0.67 nM for hCA II, corresponding to an inhibitory potency improvement of 32 and 72 times, respectively, when compared to the monovalent system. However, multivalency effects were not observed for the transmembrane isoforms hCA IX and XII. The main difference between the cytosolic isoforms hCA I and II on the one hand, and hCA IX and XII on the other hand (apart from the different cellular localization) is that the two transmembrane isoforms are dimers, whereas the cytosolic CA I and II are monomers.[28,29] Although the active sites of CA I, II, IX and XII are rather similar, the fact that the two transmembrane isoforms have two different active sites in their molecule may have consequences for the access of a multivalent inhibitor in both of them concomitantly. In fact, the sulfonamide **10** is a better inhibitor of hCA IX and XII compared to hCA I and II. However, this effect is not preserved when **10** was attached to the NFHS nanoparticles. However, a significant multivalency effect was seen for the inhibition of hCA I and II (monomeric enzymes) probably because there are no steric hindrance effects related to the access of the derivatized nanoparticle to the enzyme active site. This may suggest that multivalent binding occurs in this case through enzyme clustering.[11] As hCA I and II are important drug targets for obtaining diuretics,[30] antiglaucoma,[31] and anticonvulsant agents,[32] we estimate that this type of NFHS nanoparticle may have interesting biomedical theragnostic applications, combining therapy through carbonic anhydrase inhibition and fluorescence imaging.

Acknowledgements

This work was supported by the French Ministry of Research (MESR) with a Ph.D fellowship for N.K. We thank the CNRS and LabEx CheMISyst (ANR-10-LABX-05-01) and La Ligue contre le Cancer (Comité des Pyrénées-Orientales) for funding. Authors thank Simon Cassegrain for technical assistance designing the cover page.

Keywords: carbonic anhydrase · inhibitors · multivalency · nanoparticles · sulfonamide

[1] C. T. Supuran, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2008**, *7*, 168–181.
[2] J.-Y. Winum, M. Rami, A. Scozzafava, J. L. Montero, C. T. Supuran, *Med. Res. Rev.* **2008**, *28*, 445–463.
[3] J.-Y. Winum, S. A. Poulsen, C. T. Supuran, *Med. Res. Rev.* **2009**, *29*, 419–435.
[4] J.-Y. Winum, P. A. Colinas, C. T. Supuran, *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 1419–1426.
[5] M. Stiti, A. Cecchi, M. Rami, M. Abdaoui, A. Scozzafava, Y. Guari, J.-Y. Winum, C. T. Supuran, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16130–16131.
[6] M. C. Saada, J. L. Montero, D. Vullo, A. Scozzafava, J.-Y. Winum, C. T. Supuran, *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 1170–1177.
[7] K. E. Sapsford, W. R. Algar, L. Berti, K. B. Gemmill, B. J. Casey, E. Oh, M. H. Stewart, I. L. Medintz, *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 1904–2074.

© 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

[8] S. Iltis, J. Choi, M. Vollmers, M. Shenoi, J. Bischof, G. J. Metzger, *NMR Biomed.* **2014**, *27*, 1063 – 1069.
[9] M. Helle, E. Rampazzo, M. Monchanin, F. Marchal, F. Guillemin, S. Bonacchi, F. Salis, L. Prodi, L. Bezdetnaya, *ACS Nano* **2013**, *7*, 8645 – 8657.
[10] C. Fasting, C. A. Schalley, M. Weber, O. Seitz, S. Hecht, B. Koksch, J. Dernedde, C. Graf, E.-W. Knapp, R. Haag, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 10472 – 10498; *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 10622 – 10650.
[11] L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki, L. E. Strong, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 2348 – 2368; *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 2408 – 2429.
[12] O. Renaudet, R. Roy, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 4515 – 4517.
[13] P. Compain, A. Bodlenner, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 1239 – 1251.
[14] S. G. Gouin, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 11616 – 11628.
[15] E. T. Mack, P. W. Snyder, R. Perez-Castillejos, B. Bilgiçer, D. T. Moustakas, M. J. Butte, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 333 – 345.
[16] N. Krall, F. Pretto, W. Decurtins, G. J. L. Bernardes, C. T. Supuran, D. Neri, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 4231 – 4235; *Angew. Chem.* **2014**, *126*, 4315 – 4320.
[17] S. Eiden-Assmann, B. Lindlar, G. Maret, *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, *271*, 120 – 123.
[18] K. S. Rao, K. El-Hami, T. Kodaki, K. Matsushige, K. Makino, *J. Colloid Interface Sci.* **2005**, *289*, 125 – 131.
[19] W. Yang, C. G. Zhang, H. Y. Qu, H. H. Yang, J. G. Xu, *Anal. Chim. Acta* **2004**, *503*, 163 – 169.
[20] W. Tan, K. Wang, X. He, X. J. Zhao, T. Drake, L. Wang, R. P. Bagwe, *Med. Res. Rev.* **2004**, *24*, 621 – 638.
[21] R. P. Bagwe, C. Yang, L. R. Hilliard, W. Tan, *Langmuir* **2004**, *20*, 8336 – 8342.
[22] H. H. Yang, H. Y. Qu, P. Lin, S. H. Li, M. T. Ding, J. G. Xu, *Analyst* **2003**, *128*, 462 – 466.
[23] The capping of the Si–OH group was realized in order to reduce drastically the interaction of silanol functions with the surface of the protein, and reduce the potential inhibitory activity of non-capped nanoparticles.
[24] R. G. Khalifah, *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 2561 – 2573.
[25] M. Karlsson, L.-G. Martensson, B.-H. Jonsson, U. Carlsson, *Langmuir* **2000**, *16*, 8470 – 8479.
[26] C. T. Supuran, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2012**, *27*, 759 – 772.
[27] F. Allouche, F. Chabchoub, F. Carta, C. T. Supuran, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2013**, *28*, 343 – 349.
[28] C. T. Supuran, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2013**, *28*, 229 – 230.
[29] D. Neri, C. T. Supuran, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2011**, *10*, 767 – 777.
[30] F. Carta, C. T. Supuran, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2013**, *23*, 681 – 691.
[31] F. Fabrizi, F. Mincione, T. Somma, G. Scozzafava, F. Galassi, E. Masini, F. Impagnatiello, C. T. Supuran, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2012**, *27*, 138 – 147.
[32] C. T. Supuran, *Expert Opin. Ther. Pat.* **2013**, *23*, 677 – 679.

Received: March 17, 2015
Published online on May 12, 2015

© 2015 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

Organic & Biomolecular Chemistry

REVIEW

View Article Online
View Journal

Published on 24 August 2015. Downloaded by University of Regina on 07/09/2015 06:59:16.

Cite this: DOI: 10.1039/c5ob01405k

Emerging trends in enzyme inhibition by multivalent nanoconstructs

Nasreddine Kanfar, Eline Bartolami, Renaud Zelli, Alberto Marra, Jean-Yves Winum,* Sébastien Ulrich* and Pascal Dumy

Received 10th July 2015,
Accepted 24th August 2015

DOI: 10.1039/c5ob01405k

www.rsc.org/obc

Multivalent nanoconstructs, extensively used for enhancing the recognition of biomolecular targets, have been recently exploited for enzyme inhibition showing interesting properties such as improvement of inhibitory potency and selectivity. We review herein the recent results highlighting the potential of multivalent nanoconstructs for the inhibition of different enzymes, and the emerging trends in the generation and identification of multivalent clusters as enzyme inhibitors.

1 Introduction

1.1 The principle of multivalency in biomolecular recognition

Numerous biological recognition processes such as cell–cell recognition, cell adhesion and cell–virus recognition involve multivalent interactions.[1,2] These biological examples have spurred interest in the generation of synthetic multivalent systems which are nanoconstructs that feature multiple binding units of biomolecules. Indeed, multivalency represents a general solution for achieving effective biomolecular recognition by combining multiple non-covalent interactions that are otherwise weak in aqueous media when considered individually. The simultaneous presentation of multiple binding units may thus enhance the relative potency (rp) of the multivalent nanoconstruct with respect to the monovalent ligand. This outcome is highly desirable for increasing the overall binding affinity of weak ligands of biomolecules.

Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), UMR 5247 CNRS, Université Montpellier, ENSCM, Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier, 8 Rue de l'Ecole Normale, 34296 Montpellier cedex 5, France. E-mail: jean-yves.winum@univ-montp2.fr, sebastien.ulrich@enscm.fr; Tel: +33(0)4.67.14.43.46



Alberto Marra

Alberto Marra graduated in Pharmaceutical Sciences from the University of Pisa (Italy) and obtained his PhD degree from the University of Paris VI (France) under the supervision of Prof. P. Sinaÿ at the Ecole Normale Supérieure. After a postdoctoral fellowship at the University of Zurich (Switzerland) with Prof. A. Vasella, he joined the group of Prof. A. Dondoni at the University of Ferrara (Italy). In 1998 he was promoted to the position of Associate Professor in Organic Chemistry at the same university and in 2012 he moved to the University of Montpellier (France).



Jean-Yves Winum

Jean-Yves Winum received his PhD in chemistry from the University of Montpellier 2 (France) in 1998. He then worked as a postdoctoral fellow in the Department of Chemistry of Georgetown University (Washington, DC) and in the Department of Organic Chemistry of the University of Geneva (Switzerland). In 1999, he joined the Department of Chemistry of the University of Montpellier, where he is now an Associate Professor. His research interests are focused on organic/medicinal chemistry of metallo-enzyme inhibitors. The results of his studies have been published in more than 130 articles (h-index 31). He is an associate editor of Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry *and a member of the editorial board of* Expert Opinion on Therapeutic Patents, *and* Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry.

Published on 24 August 2015. Downloaded by University of Regina on 07/09/2015 06:59:16.

Interestingly, the relative affinity of a ligand (relative potency per binding unit, rp/*n*) may also be enhanced in a multivalent system, meaning that a ligand can become more effective in a cluster than alone.[3] Therefore, these thermodynamic changes in binding upon going from the monovalent to the multivalent systems may be harnessed for enhancing the overall binding affinity and the binding selectivity. This approach is thus of great interest for medicinal chemistry and, in particular, for the design of enzyme inhibitors. Thus, the multivalency approach may be useful for turning low-affinity and weakly-selective ligands into potent and selective binders.

1.2 Scope of the review

The application of multivalent nanoconstructs has been extensively studied for biomolecular recognition. For instance, numerous synthetic nanoconstructs have been prepared and studied in the last few decades for mimicking the biological processes of multivalent recognition of biomolecular targets such as lectins.[4] However, recent reports have extended the interest in multivalent architectures to the field of enzyme inhibition. This review summarizes the recent advances and emerging trends in the application of multivalent clusters for enzyme inhibition.

1.3 Prospects for multivalent nanoconstructs

The preparation of multivalent clusters has been a challenging task due to the difficulty of performing multiple one-pot reactions in order to covalently link together a controlled number of bioactive ligands. Indeed, high reaction yields must be achieved to retain a sufficiently-high overall yield that enables the isolation of the desired product. In addition, reactions that tolerate the use of unprotected ligands are highly desirable to avert deprotection steps that would otherwise be equally challenging. Owing to the recent advances in click-type bioconjugation techniques,[5] this challenge has been greatly facilitated and numerous multivalent compounds have been prepared. The most explored strategy for preparing multivalent clusters follows a template-assembled methodology whereby several ligands are conjugated onto a multifunctional scaffold (Fig. 1). Different (bio)molecular scaffolds, such as aromatics,[6] calixarenes,[7] foldamers,[8] linear and cyclic peptides,[9] oligonucleotides,[10,11] polymers,[12] dendrimers,[13] and nanoparticles[14] are commonly used in conjunction with different ligation

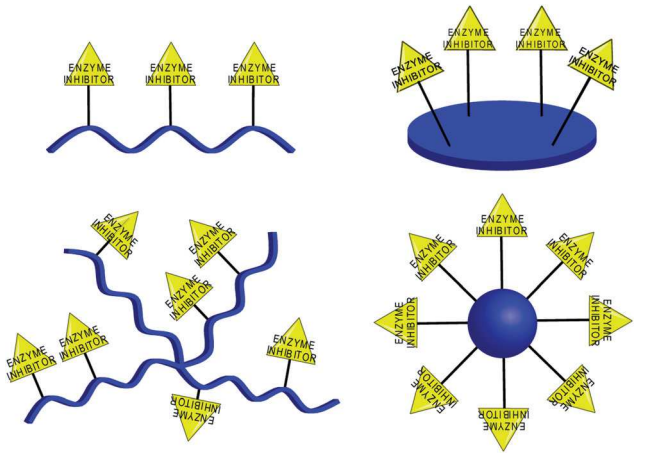


Fig. 1 Multivalent nanoconstructs bearing multiple enzyme inhibitor units (yellow triangles) in various three-dimensional spatial arrangements.



Sébastien Ulrich

Sébastien Ulrich carried out his PhD under the guidance of Prof. Jean-Marie Lehn at ISIS, Strasbourg, France, developing molecular switches for controlling dynamic combinatorial libraries. He subsequently joined the groups of Prof. Harry L. Anderson (Oxford University, UK) as an EPSRC fellow and of Prof. Eric T. Kool (Stanford University, CA, USA) as a Fulbright fellow. In 2011 he was awarded an ANR starting grant and joined the group of Prof. Pascal Dumy, first in Grenoble, then at IBMM in Montpellier, France where he was promoted to a permanent CNRS research position. In 2014 he was named a Junior Distinguished Member of the French Chemical Society (SCF). His current research interests on supramolecular bioorganic chemistry focus on bioactive dynamic self-assemblies and multivalent recognition systems for biological applications such as gene delivery and enzyme inhibition.



Pascal Dumy

Pascal Dumy was appointed director of the National School of Chemistry, Montpellier (ENSCM) in February 2012. After a PhD carried out at the University of Montpellier 1 in 1993, he began his career at the University of Lausanne with Professor Manfred Mutter at the Institute of Organic Chemistry. In 1998 he joined the University of Grenoble 1 as a full professor in chemical biology. His research interests at IBMM focus on the design, synthesis and the validation of integrated functional systems and interfaces endowed with tailor-made properties for therapeutic and/or diagnostic applications or as model studies against certain pathologies. He is a co-author of over 200 publications.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

Published on 24 August 2015. Downloaded by University of Regina on 07/09/2015 06:59:16.

reactions, such as the Cu^{I}-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC),[15] the oxime ligation,[16] and the free-radical thiol–ene coupling (TEC).[17] The study of the recognition properties of these multivalent nanoconstructs toward a particular biological target may help decipher the origin of the multivalency effect and provide guidelines for designing artificial systems mimicking biological processes such as signal transduction.[1,18] For instance, multivalent effects have been shown to occur in the context of sugar–lectin interactions.[4] Given the existence of multiple binding sites on the surface of lectins, it could be expected that multivalent effects were observed. However, minute structural changes can have tremendous effects on the recognition process,[19] and very effective and diversity-oriented synthetic methodologies are required in order to prepare a large number of multivalent compounds to test. Recently, multivalent effects have also been observed in the context of enzyme inhibition, which raises many questions and open new opportunities in medicinal chemistry. At first sight it may indeed be surprising that the activity of enzymes containing a single, often buried, active site is sensitive to the multivalent presentation of enzyme inhibitors. In this review we will present the current body of knowledge addressing the design, evaluation and mode of action of multivalent nanoconstructs for enzyme inhibition.

1.4 Mode of action

A positive multivalent effect arises when the relative potency of the ligands is higher in the multivalent system compared to the monovalent system. This effect can emerge from different phenomena: (1) a statistical rebinding effect that is generated by an enhanced local concentration around the binding site, (2) a chelation effect when several identical binding sites are present on the target, (3) a subsite binding effect when at least two different binding sites are present on the target, and (4) a clustering effect when the association of several targets together is favorable (Fig. 2).[18] While the chelation and statistical rebinding effects may affect the overall binding affinity of the systems, (allosteric) subsite and clustering effects may greatly contribute to affecting the binding selectivity.

The mode of action of multivalent nanoconstructs may depend on the nature of the biomolecular target (number of binding sites, tendency to multimerize *vs.* steric shielding) and on the structure and composition of the multivalent system (conformation, valency, size). The size of the multivalent cluster with respect to the biological target is a parameter that must be taken into consideration for choosing the most appropriate scaffold. For instance, it has recently been reported that the size of functionalized nanoparticles may have a strong effect on the mode of enzyme inhibition.[20]

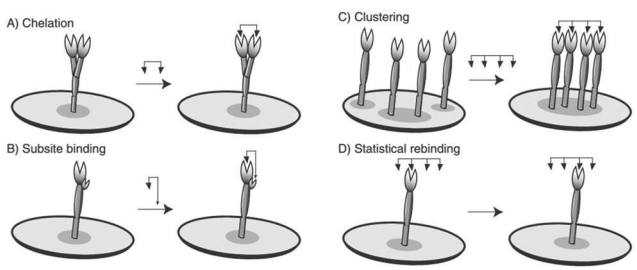


Fig. 2 Mode of multivalent binding to a biomolecular target. Reprinted with the permission from ref. 18. Copyright 2006 Wiley-VCH.

2 Enzyme inhibition by multivalent nanoconstructs

Multivalent nanoconstructs bearing multiple copies of enzyme inhibitors have been prepared and evaluated. The data summarized in Table 1 describe the different multivalent compounds investigated to date for enzyme inhibition, and report their relative potency. The main results and the modes of multivalent effect are discussed below.

2.1 Glycosidases

The multivalent strategy has been implemented for the inhibition of glycosidases, the enzymes that catalyze the hydrolysis of the glycosidic bond in di-, oligo-, and polysaccharides as well as glycoconjugates.[48] Transition-state analogues such as iminosugars (*e.g.* deoxynojirimycin, DNJ, and deoxymannojirimycin, DMJ) have become valuable tools for the inhibition of glycosidases. However, they typically display moderate potency (micromolar inhibitory activity) and weak selectivity. Gouin and coworkers have designed di- and trivalent DNJ iminosugar clusters using flexible oligoethyleneglycol scaffolds (Fig. 3).[21] The authors found that the trivalent iminosugar **1** displays a 7.6-fold affinity enhancement (relative potency with respect to the number of inhibitor moieties rp/n = 2.5) towards Jack bean α-mannosidase. Multivalency was also demonstrated to affect the selectivity between different glycosidases.

Compain, Ortiz Mellet, Nierengarten and coworkers have subsequently prepared DNJ clusters using fullerene C_{60} as scaffolds (Fig. 4).[23] They found that the dodecavalent iminosugar **2** displays a 2147-fold enhancement of inhibitory activity with Jack bean α-mannosidase (179-fold increase in relative potency per iminosugar moiety). The activity profile of this compound was also shown to be different from the monovalent systems.

Compain and coworkers have then extended their initial approach by preparing novel iminosugar clusters based on β-cyclodextrin scaffolds (Fig. 5).[24] Heptavalent cluster **3** was found to display multivalent effects on β-glucocerebrosidase (200-fold activity enhancement compared to the monovalent reference, rp/n = 29), while the tetradecavalent cluster **4** did not show any multivalent effect (17-fold activity enhancement compared to the monovalent reference, rp/n = 1.2), thereby demonstrating that valency is not the sole parameter leading to a multivalent effect in the context of enzyme inhibition.

The same groups have then studied in more detail the effect of valency, ligand structure, and topology on enzyme

Published on 24 August 2015. Downloaded by University of Regina on 07/09/2015 06:59:16.

Table 1 Summary of applications of multivalent nanoconstructs for enzyme inhibition (JbMan: Jack bean α-mannosidase; GCase: β-glucocerebrosidase; p.r.a.: plaque reduction assay; hCA II: human carbonic anhydrase II; hCA IX: human carbonic anhydrase IX; mPTPB: *Mycobacterium* protein tyrosine phosphatase B)

Entry	Target enzyme	Platform	Ligand	Valency (n)	Relative potency (rp)	Ref.
1	Glycosidases	Oligoethyleneglycol	Iminosugar	3	7.6 (JbMan)	21
2	Glycosidases	Calixarene	Iminosugar	4	267 (JbMan)	22
		Porphyrin		4	800 (JbMan)	
		Sugar		8	19 (JbMan)	
3	Glycosidases	Fullerene C_{60}	Iminosugar	12	2147(JbMan)	23
4	Glycosidases	β-Cyclodextrin	Iminosugar	7	200 (GCase)	24–26
				14	17 (GCase)	
				21	9900 (JbMan)	
5	Glycosidases	Dextran polymers	Iminosugar	23–902	444–109 142 (JbMan)	27
6	Glycosidases	Aliphatic, aromatic	Zanamivir	2	1000 (sialidase)	28,29
				3–4	100 (sialidase)	
7	Glycosidases	Polyglutamic acids	Zanamivir	~47	~500 000 (p.r.a.)	30,31
8	Carbonic anhydrases	Nanoparticles	Sulfonamide	12–15	72 (hCA II)	32,33
					14 (hCA IX)	
9	Carbonic anhydrases	Peptide	Sulfonamide	2	3 (*in vivo*)	34
10	Carbonic anhydrases	Flexible	Sulfonamide	2	50 (dimeric hCA II)	35
11	Carbonic anhydrases	PAMAM dendrimers	Sulfonamide	4	6 (hCA II), 13 (hCA IX)	36
				8	206 (hCA II), 23 (hCA IX)	
				16	688 (hCA II), 65 (hCA IX)	
				32	9142 (hCA II), 93 (hCA IX)	
12	Carbonic anhydrases	Fullerene C_{60}	Coumarin	12	5 (hCA II), 3.5 (hCA IX)	37
13	Acetylcholinesterase	Flexible	Heteroaromatic	2	3000-fold	38
14	Proteases	β-Cyclodextrin	(Aminomethyl)benzene	2	28 333 (β-tryptase)	39
15	β-Tryptase (serine protease)	Fused cycle	Guanidinium	2	101 613	40
16	Proteases	Polyethyleneglycol	Tripeptide aldehyde	2	90 (proteasome)	41
17	Proteases	Polyaminohexanoic acid	Peptide	2	607 (proteasome)	42
18	Proteases	Peptide	Benzamidine	2	7931 (thrombin)	43
19	Phosphatases	Aromatics	Small molecules	2	n.d. (mPTPB)	44
20	Glycogen phosphorylase	Substituted benzene	Sugar	3	3	45
21	Oxidoreductases	Substituted benzene	Aminophenylarsenoxide	3	10	46
22	5-Lipoxygenase	Pentaerythritol	Caffeic acid	4	38	47

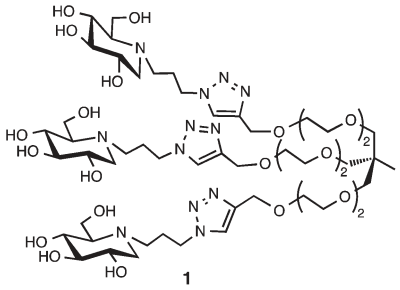


Fig. 3 Glycosidase inhibition: flexible trivalent iminosugar clusters.

inhibition activity.[25,49] They prepared various cyclodextrin- and fullerene-based iminosugar clusters through Cu^{I}-catalyzed azide–alkyne cycloaddition. The compounds vary in valency (valency = 7, 12, 14) and have different spacer lengths connecting the scaffold and the ligands. An increase of valency has been clearly shown to enhance the potency towards the Jack bean α-mannosidase, up to four orders of magnitude in the case of the tetradecavalent cluster **4** (9273-fold increase in relative potency, rp/n = 662). Further synthetic efforts have enabled the construction of the cyclodextrin-based iminosugar cluster **5** (Fig. 6) with a valency of 21, but this system did not display enhanced potency (rp/n = 471).[26]

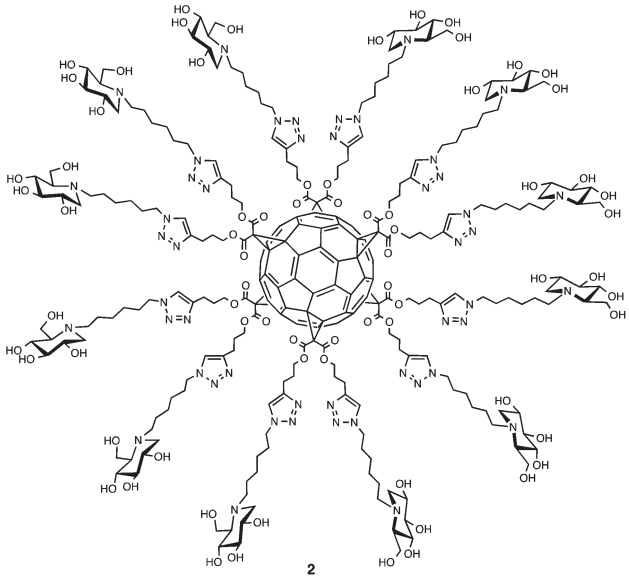


Fig. 4 Glycosidase inhibition: dodecavalent fullerene-based iminosugar clusters.

Also, lengthening the spacer has been shown to positively contribute to the potency of these multivalent inhibitors, probably by allowing easier access to the active site of the enzyme.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

Published on 24 August 2015. Downloaded by University of Regina on 07/09/2015 06:59:16.

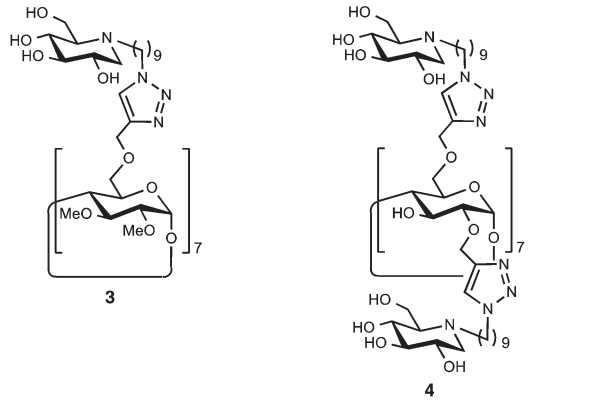


Fig. 5 Glycosidase inhibition: cyclodextrin-based iminosugar clusters.

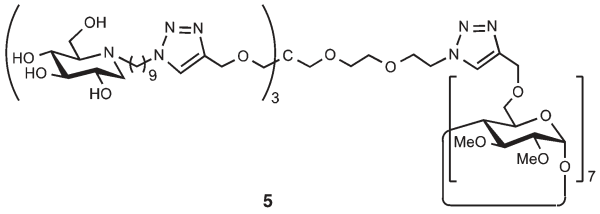


Fig. 6 Glycosidase inhibition: cyclodextrin-based heneicosavalent cluster.

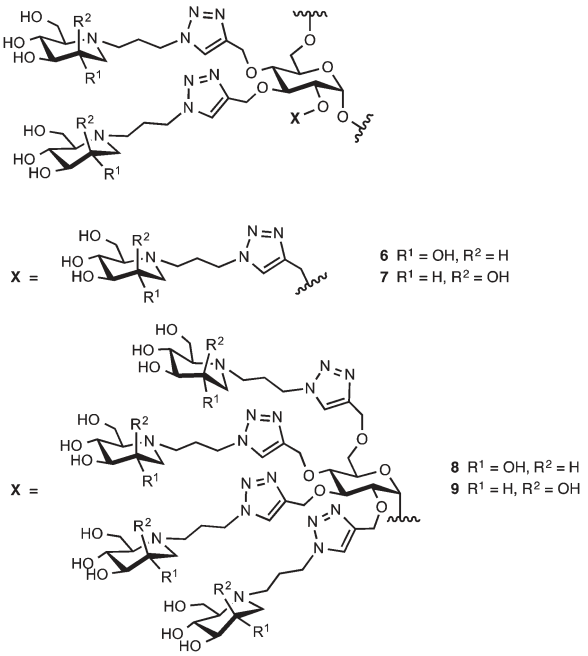


Fig. 7 Glycosidase inhibition: linear and branched dextran-based DNJ- and DMJ-decorated polymers.

The effect of the topology of the scaffold has been demonstrated to affect the selectivity of enzyme inhibition in the family of glycosidases.[49,50] The authors have used isothermal titration calorimetry (ITC) to determine the thermodynamic parameters of the interaction between these clusters and α-mannosidase.[49] The interaction was enthalpy-driven and enthalpy–entropy compensation was observed. The ITC results indicate that the binding stoichiometry is close to unity, thereby suggesting that clustering effects do not account for the multivalency effects observed in this context. In contrast, Gouin and coworkers conclude, on the basis of atomic force microscopy and dynamic light scattering experiments performed with the same Jack bean α-mannosidase and various calixarene-, porphyrin-, and sugar-based multivalent iminosugars, that clustering effects may be at the origin of the observed multivalency effects.[22] However, García Fernández, Nierengarten, Ortiz Mellet and coworkers suggest that multivalent inhibitors can bind simultaneously at the catalytic site and secondary, lectin-type binding sites, therefore taking advantage of a subsite binding effect (see Fig. 2) which may explain the increased activity of multivalent inhibitors against the Jack bean α-mannosidase.[51]

The latter glycosidase was also the target of a new class of iminosugar-based multivalent inhibitors, namely the deoxynojirimycin- (DNJ) and deoxymannojirimycin-decorated (DMJ) dextrans **6**, **8** and **7**, **9**, respectively (Fig. 7). Both the linear (**6** and **7**) and branched (**8** and **9**) polymeric inhibitors featured very high average valency of iminosugars, ranging from 23 to 902, and low μM valency-corrected K_i values. However, the best inhibition activity per iminosugar unit was not always observed for the most functionalized polymers since rp/n = 69 was found for **6** having an average valency of 98 while rp/n = 121 was observed for **7** bearing the highest content of iminosugar (average deoxymannojirimycin valency = 902). It is worth noting that the branched polymers **8** and **9** were less potent inhibitors, per iminosugar moiety, than the corresponding linear ones, a finding that indicates the importance of the spatial presentation of the ligand. The DMJ-dextrans **7** and **9** and the DNJ-dextrans **6** and **8** were also assayed against another α-mannosidase (from *Drosophila melanogaster*) and an α-galactosidase (from *Thermotoga maritima*), respectively. For these glycosidases, the increase of inhibition per iminosugar unit was found to be significantly lower, the highest rp/n values being 8.5 for the mannosidase and 42 for the galactosidase.

In the search for new agents against influenza viruses, multivalent compounds have gained interest since there are multiple copies of the viral tetramer enzyme neuraminidase (sialidase) on the surface of each influenza virion. Earlier examples of low-molecular-weight multivalent compounds used in this context were based on dimeric,[28] trimeric and tetrameric[29] compounds featuring derivatives of zanamivir (Relenza™, **10**, Fig. 8), a potent (nanomolar) small-molecule inhibitor of neuraminidase linked together through different molecular scaffolds.[28,29] These molecules were found to be 10 to 100 times more active than zanamivir in standard influenza A and B cytopathic effect assays. Also the *in vivo* (mice) activity

Published on 24 August 2015. Downloaded by University of Regina on 07/09/2015 06:59:16.

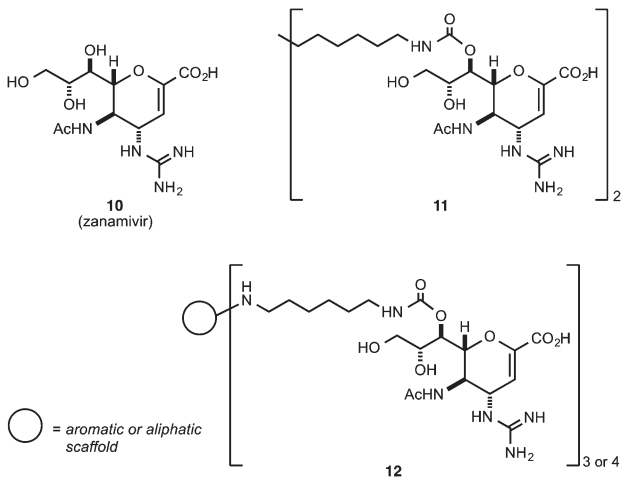


Fig. 8 Di-, tri- and tetravalent zanamivir derivatives as neuraminidase inhibitors.

of the tri- and tetravalent inhibitors **12** was largely higher than that shown by the monovalent reference compound. Interestingly, when tested in plaque reduction assays, the divalent compound **11** featured an outstanding antiviral activity (up to 1000-fold increase), which was explained by its ability to cross-link two neuraminidase units located onto different enzyme tetramers belonging to the same virus (intravirion binding) or to distinct influenza viruses (intervirion binding) rather than by merely an improved enzyme inhibition potency. Therefore, this study confirmed that dimers bearing a linker with an appropriate length lead to a dramatic increase of enzyme inhibition owing to a strong clustering effect (see Fig. 2C). Other research groups explored the biological activity of polyglutamic acid (M_r = 50–100 kDa) decorated with zanamivir such as the polyvalent inhibitors **13** [31] and **14** [30] (Fig. 9). Although all the prepared polymers were less potent than the monovalent inhibitor **10** (Fig. 8) against the neuraminidase, the *in vitro* (plaque reduction assays) and *in vivo* (mice survival rate) experiments in the presence of H1N1 influenza virus showed a high efficacy (up to 100-fold increase, on a valency-corrected basis) of compound **13** when compared to the monovalent

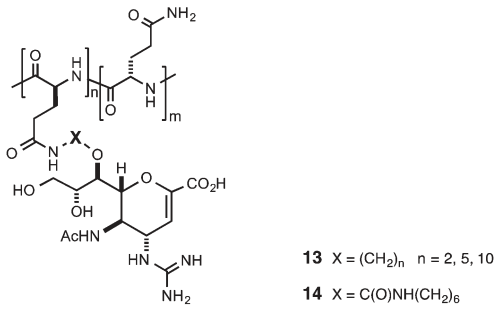


Fig. 9 Polyglutamic acids bearing zanamivir units as neuraminidase inhibitors.

reference zanamivir. The observed activity was probably due to the entropically enhanced binding of the polymers to the viral neuraminidase.

Also the polymer **14** was endowed with a strong activity against wild-type as well as drug-resistant human and avian influenza viruses (H1N1, H3N2, H4N2) as determined by plaque reduction assays. In particular, compound **14** featuring an intermediate zanamivir loading ($n/(m + n)$ = 0.1) was the most powerful showing a *ca.* 10 000-fold activity enhancement with respect to **10** against the H4N2 avian virus strain.

As already observed for other glycosidases, recent studies have indicated that the neuraminidase also contains accessory modules attached to the catalytic site, some of which are carbohydrate binding modules (CBM). These modules, that can be single, tandem, or multiple, help to target the enzyme to its substrate for efficient hydrolysis by increasing the concentration of the glycosidase at the substrate surface. Actually, polypeptides bearing one to four CBMs (from *Vibrio cholera* sialidase) were synthesized and their affinity and selectivity for α(2,3)- and α(2,6)-linked sialylgalactosides was studied using ITC and SPR.[52] It was thus demonstrated that the compound containing four modules showed up to 1500-fold affinity enhancement compared to the single CBM polypeptide.

Although multivalent systems were mainly investigated as inhibitors of glycosidases, several studies were also performed to assess their inhibition activity against other enzymes, *e.g.* carbonic anhydrases and glycosyl transferases (see below).

2.2 Carbonic anhydrases

Carbonic anhydrases (CAs, EC 4.2.1.1) are widespread zinc metallo-enzymes catalyzing the reversible hydration of carbon dioxide.[53] Mammalian CAs exist in 12 active isoforms which are localized in the cytosol or bound to the cytoplasmic membrane. In the last few years, many of the CA isozymes have become important therapeutic targets for pharmaceutical research. For example, the activity of the membrane associated isoforms such as carbonic anhydrase IX (hCA IX) and carbonic anhydrase XII (hCA XII) has been linked to tumorigenesis, thus raising the interest in the design of isoform-specific inhibitors.[53] Among the different approaches reported in the literature to address the selectivity and potency of CA inhibitors,[54] the use of multimeric CA-directed pharmacological agents appears to be an interesting strategy for achieving such a goal.

One of the first examples in this field was published by our group in 2009 where we described the inhibitory activity of bis-sulfamate *vs.* monosulfamate against the different CA isoforms. Our study revealed that bis-sulfamates incorporating 8 or 10 carbon atoms had higher affinity for the tumor-associated isozyme CA IX compared to hCA II, whereas the opposite was true for the corresponding monosulfamates. This behavior was explained by considering crystallographic and molecular modeling studies, which identified the region incorporating amino acid residues to be considered for obtaining compounds with increased affinity and selectivity for the various isozymes.[55]

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

Published on 24 August 2015. Downloaded by University of Regina on 07/09/2015 06:59:16.

In 2012, Whitesides and coworkers have demonstrated and rationalized the advantage of bivalent recognition in the context of carbonic anhydrase recognition. Bivalent ligands bound to synthetic dimers of carbonic anhydrases with low picomolar avidities whereas the monovalent ligand displayed low nanomolar binding affinity for a single carbonic anhydrase.[35] According to the chelate effect, the spacer length between the two ligands was found to be crucial for the overall avidity of the bivalent inhibitors.

The same year we showed that elongated molecules incorporating two zinc binding groups (sulfamide and sulfonamide), separated by a linker of an appropriate length, allowed the simultaneous binding to different sites inside the enzyme. Gradual elongation of the spacer led to a 10 times improvement of the inhibitory properties against physiologically relevant human (h) isoforms, hCA II, IX, and XII.[56]

In 2014, Neri and coworkers have developed potent bivalent inhibitors of CA IX that elicit complete tumor regression in mice.[34] The bivalent ligand features two sulfonamide moieties linked together through a peptide spacer (Fig. 10). This bivalent binder was further conjugated to the potent cytotoxic drug DM1 **15**. Binding experiments performed by surface plasmon resonance showed that, under these experimental conditions, the bivalent ligand does not dissociate from the enzyme while the monovalent reference does.

Besides the studies of bivalent inhibitors, multivalent approaches have been reported in the field of carbonic anhydrase using different platforms. In 2008, Winum, Supuran and coworkers have functionalized gold nanoparticles with sulfonamide inhibitors **16** in order to target the extracellular isoform CA IX (Fig. 11).[33] Although an increase of activity was not evidenced in this case, a binding selectivity enhancement was clearly observed in favor of CA IX. The same approach was reported in 2011 with carbonic anhydrase activator coated gold nanoparticles. This study revealed a dramatic enhancement of the CA activating properties of the NPs on all the isoforms tested compared to activators alone. These compounds also effectively activated CA, in whole blood *ex vivo* experiments, with an increase of 200–280% of the CA activity.[57]

Important results obtained with small silica nanoparticles functionalized with carbonic anhydrase inhibitors **17** have been described very recently by our group and evidenced positive and negative multivalent effects affecting both the activity and the selectivity profile of enzymatic inhibition of carbonic anhydrase isoforms (Fig. 10).[32]

Multivalent inhibitory effects have also been reported in 2015 on the different carbonic anhydrase isoforms with a series of poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers grafted with carbonic anhydrase inhibitors. The increase in the number of grafted inhibitors from dendrimer generation 0 to generation 3 lead to inhibitory potency improvement and strong multivalent effects against hCA II, V, VII, IX, XII and XIV.[36]

A fullerene scaffold has also been described in 2015 by the group of Vincent, as a platform for the multimeric presentation of CA inhibitors in the coumarin series. Although no multivalent effect was observed, the multimers containing twelve grafted coumarin units always exhibited stronger inhibitory properties than the monomeric species and affected the selectivity against the four isozymes tested.[37]

Even if the active site is well conserved between the different CA isozymes, amino acid differences exist in specific regions. Crystallographic studies and amino-acid sequence alignment analysis of the conserved and non-conserved regions allowed the identification of secondary binding pockets (defined as the selective pockets) that are located at the edge of the active site relative to the catalytic zinc or out of the enzyme active site of the different CA isoforms. This provides useful information guiding the future rational design of heterotopic multivalent systems for the selective inhibition of carbonic anhydrase through a multi-point recognition process (subsite binding mechanism, see Fig. 2B).[58]

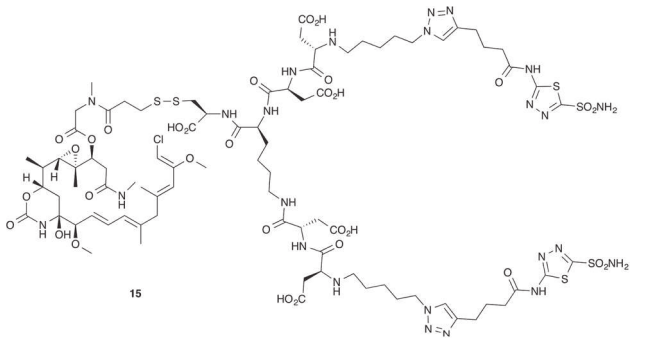


Fig. 10 Bivalent carbonic anhydrase inhibitor developed by Neri and coworkers.

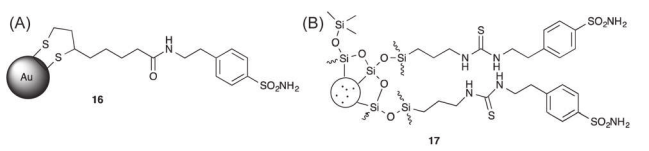


Fig. 11 Multivalent carbonic anhydrase inhibitors assembled on gold (A) and silica (B) nanoparticles.

2.3 Less explored enzymatic targets

Bivalent compounds have been prepared and evaluated as inhibitors of acetylcholinesterase and an increase in potency and selectivity up to 3000-fold has been achieved.[38] The multivalency approach has also been applied to protease inhibitors such as human β-tryptase where the design can be guided by the structure of the tetrameric target.[39,40] However, the structures of these bivalent systems vary significantly in terms of scaffolds and ligands: they feature rigid calixarene[39] or fused cyclic[40] scaffolds, and, respectively, (aminomethyl)benzene and guanidinium binding units. Positioning monovalent (aminomethyl)benzene ligands having low affinity (17 μM) at the correct distance with respect to each other on the scaffold resulted in potent bivalent inhibitors (K_i = 2.5 nM).[39] Also, the selectivity for human β-tryptase against trypsin and thrombin

Published on 24 August 2015. Downloaded by University of Regina on 07/09/2015 06:59:16.

was increased more than 300-fold. Enhancement of inhibition potency up to 10^4-fold has been reported with the bivalent systems featuring guanidinium ligands.[40]

The proteasome, a multicatalytic protease complex, is also an interesting target for applying a multivalency approach. Moroder and coworkers designed bivalent compounds combining peptide aldehyde ligands linked together by a flexible PEG spacer.[41] The authors demonstrated that an enhancement of inhibition potency (up to two orders of magnitude) originates from the bivalency of these systems. More recently, Vidal, Reboud-Ravaux and coworkers have reported the evaluation of a series of dimerized inhibitors of the eukaryotic 20S proteasome that led to the identification of potent inhibitors with low nanomolar inhibition constants.[42] Similarly, bivalent inhibitors of thrombin have been identified.[43]

In the medicinal challenge of developing new drugs for treating tuberculosis, *Mycobacterium* protein tyrosine phosphatase B has been identified as a virulent phosphatase which is essential for the survival and persistence of the bacterium in the host. Bivalent and trivalent compounds were prepared by CuAAC and found to be potent inhibitors of protein tyrosine phosphatases displaying inhibitory constants up to 160 nM and a selectivity increase of more than 25-fold due to multivalency.[44] A subsite binding mode was proposed in this case.

In a recent paper,[59] Nierengarten, Vincent and co-workers described the synthesis of various dodecavalent fullerene-based *O*-glycoside clusters (**18–23**, Fig. 12) *via* CuAAC and their inhibitory activity against the heptosyltransferase WaaC, the enzyme that allows the incorporation of the first L-heptose unit into the bacterial lipopolysaccharide (LPS). Although all the prepared compounds were found to be good inhibitors (IC_{50} ranging from 6.7 to 47 μM), the relative potency per sugar moiety was rather modest compared to the corresponding monovalent inhibitor derivative (rp/n = 0.9 to 5.1). The inhibition potency along the series increased according to the size of the sugar, the octose-decorated cluster **23** being the most active. These findings demonstrated that the substituent at the position 5 of the pyranose unit plays an important role in the heptosyltransferase WaaC inhibition.

The multivalency strategy is being explored on other multiple subunit biological targets such as Shiga toxin type 2,[60] glycogen phosphorylase,[45] or for the inhibition of oxidative protein folding.[46] New applications continue to emerge. For instance, bivalent inhibitors of aberrant multiprotein transcription factors may represent interesting biomedical tools.[61]

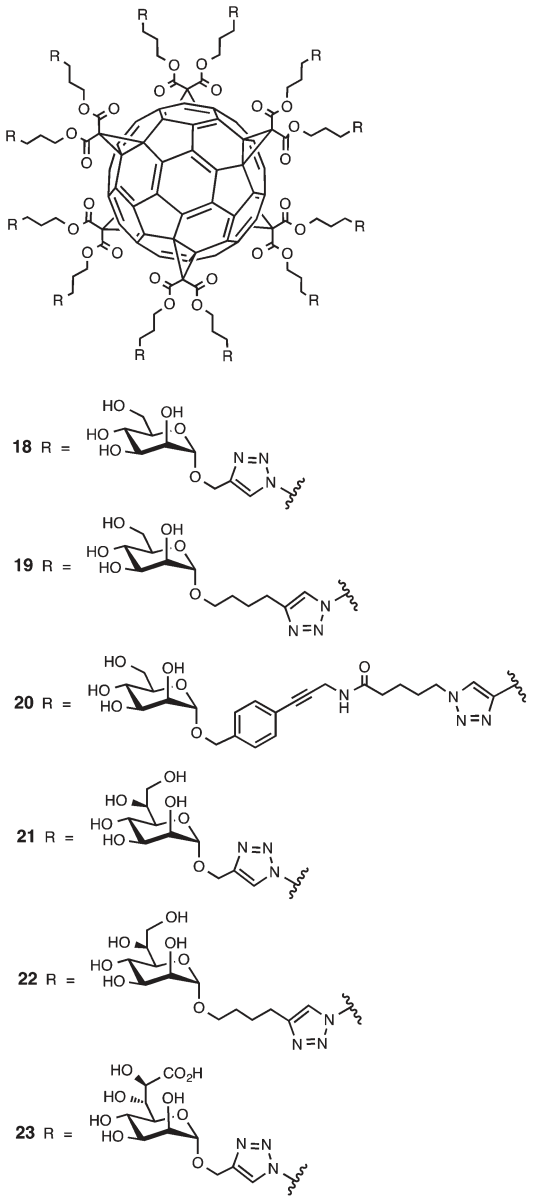


Fig. 12 Fullerene-based inhibitors of the bacterial heptosyltransferase WaaC.

3 Emerging trends

3.1 Self-assembled multivalency

Although powerful synthetic methods are now available for generating multivalent nanoconstructs, the preparation and isolation of such types of compounds remain tedious and hamper the screening of a large set of compounds. Indeed, the preparation of multivalent compounds requires performing simultaneously multiple ligation reactions. High yields for each reaction is mandatory to order to retain good overall yields. Furthermore, the isolation of the final compound may be difficult to achieve if intermediates are still present in the crude.

Self-assembly approaches have recently emerged as valuable alternative strategies for generating bioactive multivalent clusters.[62] Various self-assembly processes based on host–guest chemistry,[63] metal coordination,[64,65] supramolecular polymer formation,[66,67] and DNA/PNA hybridization,[10,68] may be used to generate multivalent/multifunctional structures in a programmed bottom-up fashion.[69]

Several examples have already shown that self-assembly can be harnessed for achieving multivalent biomolecular reco-

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

Published on 24 August 2015. Downloaded by University of Regina on 07/09/2015 06:59:16.

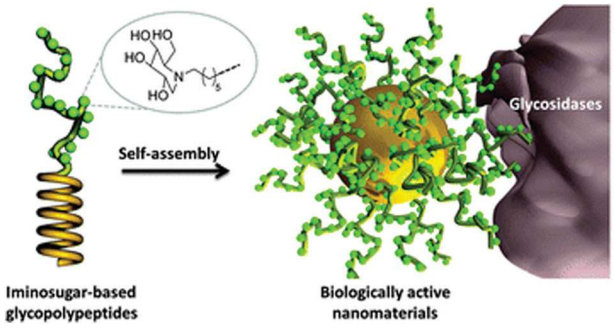


Fig. 13 Self-assembly of iminosugar-based glycopolypeptides into micellar nanoparticles that exhibit multivalent effects in the inhibition of glycosidases. Reproduced from ref. 76 with the permission from The Royal Society of Chemistry.

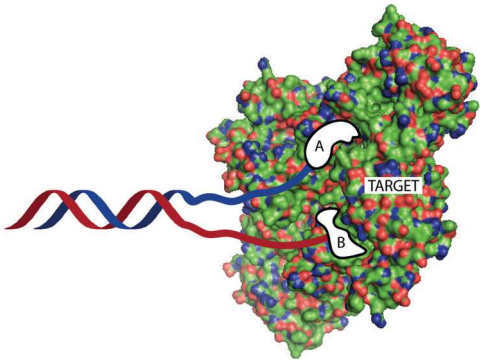


Fig. 14 DNA-templated self-assembled dimers that inhibit carbonic anhydrase IX.

gnition. For instance, the self-assembly of functional compounds bearing sialic-acid into multivalent liposome and polymersome nanoparticles has been studied for the inhibition of influenza virus infection.[70] Hamilton and coworkers have shown that the self-assembly of cyclic peptides into G-quadruplex structures leads to the formation of tetravalent clusters that are potent surface binding inhibitors of α-chymotrypsin.[71] Recent studies also reported the implementation of self-assembly for the multivalent recognition of lectins.[64,67] Other examples exploiting self-assembled multivalency have focused on DNA recognition by amphiphiles,[72] biomolecular clusters,[73] polymers[74] and frameworks.[75]

Examples of self-assembled systems for enzyme inhibition remain hitherto scarce. Lecommandoux, Compain and coworkers have exploited self-assembly processes based on peptide aggregation to generate nanoparticles that are potent multivalent inhibitors of glycosidases (Fig. 13).[76]

DNA-encoded libraries represent a powerful way to encode and screen homotopic and heterotopic multivalent systems.[77] In this technology, ligands are covalently tethered to DNA and multimerization is induced by DNA hybridization with a templating DNA strand. Neri, Scheuermann and coworkers applied this technology to the identification of bivalent enzyme inhibitors and identified, in a DNA-encoded library of 111 100 compounds, potent subnanomolar inhibitors of carbonic anhydrase IX (Fig. 14).[78]

3.2 Dynamic combinatorial chemistry

As previously mentioned, the screening of a large library of multivalent nanoconstructs varying in scaffold topology, spacer length, valency *etc.* still remains a cumbersome task due to the need to synthesise and isolate each nanoconstruct before testing its biological activity.

Dynamic combinatorial chemistry (DCC)[79] represents now a mature technology that can alleviate this process by enabling it to perform a one-pot screening that leads to the target-assisted identification of bioactive multivalent nanoconstructs. The operational principle of DCC rests on the generation of a dynamic combinatorial library (DCL) of constituents that are self-assembled through reversible covalent bonds.[80] By virtue of this reversibility, constituents can readily interconvert. Upon addition of a biological target, complex formation with (a) member(s) of the DCL leads to a constitutional adaptation of the whole DCL, according to Le Chatelier principle, and the determination of this constitutional change enables identifying the most potent binder(s) (Fig. 15). Since the selection process originates from the interactions established between the target and each fragment of the bound constituent, DCC is ideally suited for identifying, by selection of optimal scaffolds/ligands/spacers, multivalent enzyme inhibitors that operate through the simultaneous recognition of multiple points of the biological target (chelate and subsite binding mechanisms, see Fig. 2). This approach is thus of particular interest for identifying highly-potent (high rp value) and highly-selective enzyme inhibitors.

To date, DCC has already been used for identifying enzyme inhibitors of proteases, tyrosine phosphatases, carbonic anhydrases, glycosidases, acetylcholine esterase, glutathione-*S*-transferase, and neuraminidase. Recent reviews focusing on the application of DCC for identifying multivalent bioactive compounds summarize the development of this field.[81] The recently-reported combination of DNA-encoded approach and DCC may represent an interesting opportunity for improvement in this area.[82]

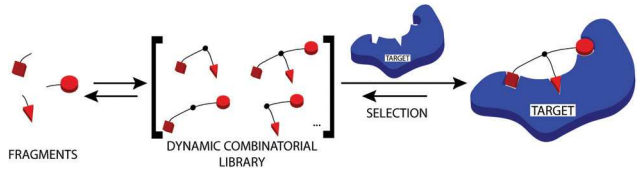


Fig. 15 Principle of dynamic combinatorial chemistry for the identification of multivalent enzyme inhibitors. Generation of a dynamic combinatorial library by the reversible connection of components, and adaptation to the presence of a biomolecular target that reveal the best binding combination of components.

Published on 24 August 2015. Downloaded by University of Regina on 07/09/2015 06:59:16.

4 Conclusions and perspectives

Modern bioconjugation technologies have enabled the generation of numerous types of multivalent nanoconstructs for biomolecular recognition. As described in this review, the application in enzyme inhibition is an emerging approach that has already been successful for different enzyme targets. It is particularly interesting for enhancing the inhibition potency of weak inhibitors, and also for modulating the selectivity towards different isoforms of an enzyme target. While the optimization of binding selectivity may be difficult with small-molecular inhibitors, the multivalency approach represents an interesting alternative where multi-point surface recognition can be exploited for achieving a desirable binding selectivity. The methodology for generating multivalent nanoconstructs is also rapidly evolving. The recent progress in the use of orthogonal click-type bioconjugation techniques[83] should enable the more effective preparation – ideally in one-pot through simultaneous or successive ligations – of multifunctional nanoconstructs which may serve for dual targeting or for combining, for instance, sensing, imaging and therapeutic actions. The proof-of-concept of the antiviral activity of multivalent enzyme inhibitors has already been demonstrated for the inhibition of viruses such as herpes simplex virus,[84] HIV,[85] Ebola,[86] influenza viruses (*vide supra*), and bacteria (*Bacillus anthracis*).[87] These results pave the way toward the medical use of multivalent and multifunctional nanoconstructs as potent and selective tools for enzyme inhibition.

Acknowledgements

We thank the CNRS, the Université de Montpellier, the Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier, the Ligue contre le Cancer (comité des Pyrénées-Orientales), the LabEx CheMISyst (ANR-10-LABX-05-01) and the ANR (ANR-11-PDOC-002-02) for funding. N.K. thanks the French Ministère de la Recherche for a doctoral fellowship.

References

1 C. Fasting, C. A. Schalley, M. Weber, O. Seitz, S. Hecht, B. Koksch, J. Dernedde, C. Graf, E. W. Knapp and R. Haag, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2012, **51**, 10472–10498.
2 M. Mammen, S. K. Choi and G. M. Whitesides, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 1998, **37**, 2755–2794.
3 J. J. Lundquist and E. J. Toone, *Chem. Rev.*, 2002, **102**, 555–578.
4 O. Renaudet and R. Roy, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 4507–4844, Special issue on Multivalent scaffolds in glycoscience: an overview.
5 G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Academic Press, Elsevier edn., San Diego, 3rd edn, 2013.
6 Y. M. Chabre and R. Roy, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 4657–4708.
7 F. Sansone, L. Baldini, A. Casnati and R. Ungaro, *New J. Chem.*, 2010, **34**, 2715–2728; A. Dondoni and A. Marra, *Chem. Rev.*, 2010, **110**, 4949–4977.
8 G. Guichard and I. Huc, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 5933–5941; J. M. Davis, L. K. Tsou and A. D. Hamilton, *Chem. Soc. Rev.*, 2007, **36**, 326–334.
9 D. Boturyn, E. Defrancq, G. T. Dolphin, J. Garcia, P. Labbe, O. Renaudet and P. Dumy, *J. Pept. Sci.*, 2008, **14**, 224–240; Y. Singh, G. T. Dolphin, J. Razkin and P. Dumy, *ChemBioChem*, 2006, **7**, 1298–1314.
10 K. K. Sadhu, M. Rothlingshofer and N. Winssinger, *Isr. J. Chem.*, 2013, **53**, 75–86.
11 N. Spinelli, E. Defrancq and F. Morvan, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 4557–4573.
12 R. Haag and F. Kratz, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2006, **45**, 1198–1215.
13 A.-M. Caminade, A. Ouali, R. Laurent, C.-O. Turrin and J.-P. Majoral, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 3890–3899; J. L. Reymond, M. Bergmann and T. Darbre, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 4814–4822; M. A. Mintzer and M. W. Grinstaff, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 173–190; O. Rolland, C. O. Turrin, A. M. Caminade and J. P. Majoral, *New J. Chem.*, 2009, **33**, 1809–1824.
14 M. De, P. S. Ghosh and V. M. Rotello, *Adv. Mater.*, 2008, **20**, 4225–4241.
15 P. Thirumurugan, D. Matosiuk and K. Jozwiak, *Chem. Rev.*, 2013, **113**, 4905–4979.
16 S. Ulrich, D. Boturyn, A. Marra, O. Renaudet and P. Dumy, *Chem. – Eur. J.*, 2014, **20**, 34–41.
17 A. Dondoni and A. Marra, *Chem. Soc. Rev.*, 2012, **41**, 573–586; C. E. Hoyle and C. N. Bowman, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, **49**, 1540–1573; A. Dondoni, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2008, **47**, 8995–8997.
18 L. L. Kiessling, J. E. Gestwicki and L. E. Strong, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2006, **45**, 2348–2368.
19 M. Fiore, N. Berthet, A. Marra, E. Gillon, P. Dumy, A. Dondoni, A. Imberty and O. Renaudet, *Org. Biomol. Chem.*, 2013, **11**, 7113–7122.
20 J. Vonnemann, S. Liese, C. Kuehne, K. Ludwig, J. Dernedde, C. Böttcher, R. R. Netz and R. Haag, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, **137**, 2572–2579.
21 J. Diot, M. I. Garcia-Moreno, S. G. Gouin, C. O. Mellet, K. Haupt and J. Kovensky, *Org. Biomol. Chem.*, 2009, **7**, 357–363.
22 Y. Brissonnet, C. O. Mellet, S. Morandat, M. I. G. Moreno, D. Deniaud, S. E. Matthews, S. Vidal, S. Šesták, K. E. Kirat and S. G. Gouin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 18427–18435.
23 P. Compain, C. Decroocq, J. Iehl, M. Holler, D. Hazelard, T. M. Barragan, C. O. Mellet and J. F. Nierengarten, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2010, **49**, 5753–5756.
24 C. Decroocq, D. Rodriguez-Lucena, K. Ikeda, N. Asano and P. Compain, *ChemBioChem*, 2012, **13**, 661–664.
25 C. Decroocq, D. Rodriguez-Lucena, V. Russo, T. M. Barragan, C. O. Mellet and P. Compain, *Chem. – Eur. J.*, 2011, **17**, 13825–13831.

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

Published on 24 August 2015. Downloaded by University of Regina on 07/09/2015 06:59:16.

26 A. Joosten, J. P. Schneider, M. L. Lepage, C. Tarnus, A. Bodlenner and P. Compain, *Eur. J. Org. Chem.*, 2014, 1866–1872.
27 Y. Brissonnet, S. Ladeveze, D. Teze, E. Fabre, D. Deniaud, F. Daligault, C. Tellier, S. Sestak, M. Remaud-Simeon, G. Potocki-Veronese and S. G. Gouin, *Bioconjugate Chem.*, 2015, **26**, 766–772.
28 S. J. F. Macdonald, R. Cameron, D. A. Demaine, R. J. Fenton, G. Foster, D. Gower, J. N. Hamblin, S. Hamilton, G. J. Hart, A. P. Hill, G. G. A. Inglis, B. Jin, H. T. Jones, D. B. McConnell, J. McKimm-Breschkin, G. Mills, V. Nguyen, I. J. Owens, N. Parry, S. E. Shanahan, D. Smith, K. G. Watson, W. Y. Wu and S. P. Tucker, *J. Med. Chem.*, 2005, **48**, 2964–2971; S. J. Macdonald, K. G. Watson, R. Cameron, D. K. Chalmers, D. A. Demaine, R. J. Fenton, D. Gower, J. N. Hamblin, S. Hamilton, G. J. Hart, G. G. A. Inglis, B. Jin, H. T. Jones, D. B. McConnell, A. M. Mason, V. Nguyen, I. J. Owens, N. Parry, P. A. Reece, S. E. Shanahan, D. Smith, W. Y. Wu and S. P. Tucker, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2004, **48**, 4542–4549.
29 K. G. Watson, R. Cameron, R. J. Fenton, D. Gower, S. Hamilton, B. Jin, G. Y. Krippner, A. Luttick, D. McConnell, S. J. F. MacDonald, A. M. Mason, V. Nguyen, S. P. Tucker and W. Y. Wu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004, **14**, 1589–1592.
30 A. K. Weight, J. Haldar, L. A. de Cienfuegos, L. V. Gubareva, T. M. Tumpey, J. Z. Chen and A. M. Klibanov, *J. Pharm. Sci.*, 2011, **100**, 831–835.
31 T. Masuda, S. Yoshida, M. Arai, S. Kaneko, M. Yamashita and T. Honda, *Chem. Pharm. Bull.*, 2003, **51**, 1386–1398; T. Honda, S. Yoshida, M. Arai, T. Masuda and M. Yamashita, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2002, **12**, 1929–1932.
32 N. Touisni, N. Kanfar, S. Ulrich, P. Dumy, C. T. Supuran, A. Mehdi and J.-Y. Winum, *Chem. – Eur. J.*, 2015, **21**, 10306–10309.
33 M. Stiti, A. Cecchi, M. Rami, M. Abdaoui, V. Barragan-Montero, A. Scozzafava, Y. Guari, J. Y. Winum and C. T. Supuran, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 16130–16131.
34 N. Krall, F. Pretto and D. Neri, *Chem. Sci.*, 2014, **5**, 3640–3644; N. Krall, F. Pretto, W. Decurtins, G. J. L. Bernardes, C. T. Supuran and D. Neri, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2014, **53**, 4231–4235.
35 E. T. Mack, P. W. Snyder, R. Perez-Castillejos, B. Bilgicer, D. T. Moustakas, M. J. Butte and G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 333–345.
36 F. Carta, S. M. Osman, D. Vullo, Z. AlOthman and C. T. Supuran, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, **13**, 6453–6457; F. Carta, S. M. Osman, D. Vullo, A. Gullotto, J. Y. Winum, Z. AlOthman, E. Masini and C. T. Supuran, *J. Med. Chem.*, 2015, **58**, 4039–4045.
37 M. Abellán-Flos, M. Tanç, C. T. Supuran and S. P. Vincent, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, **13**, 7445–7451.
38 Y. F. Han, C. P. L. Li, E. Chow, H. Wang, Y. P. Pang and P. R. Carlier, *Bioorg. Med. Chem.*, 1999, **7**, 2569–2575.
39 N. Schaschke, G. Matschiner, F. Zettl, U. Marquardt, A. Bergner, W. Bode, C. P. Sommerhoff and L. Moroder, *Chem. Biol.*, 2001, **8**, 313–327.
40 T. Selwood, K. C. Elrod and N. M. Schechter, *Biol. Chem.*, 2003, **384**, 1605–1611.
41 G. Loidl, H. J. Musiol, M. Groll, R. Huber and L. Moroder, *J. Pept. Sci.*, 2000, **6**, 36–46; G. Loidl, M. Groll, H. J. Musiol, R. Huber and L. Moroder, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1999, **96**, 5418–5422.
42 A. Desvergne, E. Genin, X. Marechal, N. Gallastegui, L. Dufau, N. Richy, M. Groll, J. Vidal and M. Reboud-Ravaux, *J. Med. Chem.*, 2013, **56**, 3367–3378.
43 T. Steinmetzer, M. Renatus, S. Kunzel, A. Eichinger, W. Bode, P. Wikstrom, J. Hauptmann and J. Sturzebecher, *Eur. J. Biochem.*, 1999, **265**, 598–605.
44 R. J. He, Z. H. Yu, Y. T. He, L. F. Zeng, J. Xu, L. Wu, A. M. Gunawan, L. N. Wang, Z. X. Jiang and Z. Y. Zhang, *ChemMedChem*, 2010, **5**, 2051–2056.
45 S. Cecioni, O. A. Argintaru, T. Docsa, P. Gergely, J. P. Praly and S. Vidal, *New J. Chem.*, 2009, **33**, 148–156.
46 A. Sapra, D. Ramadan and C. Thorpe, *Biochemistry*, 2015, **54**, 612–621.
47 J. Doiron, L. H. Boudreau, N. Picot, B. Villebonet, M. E. Surette and M. Touaibia, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2009, **19**, 1118–1121.
48 R. Zelli, J.-F. Longevial, P. Dumy and A. Marra, *New J. Chem.*, 2015, **39**, 5050–5074; P. Compain and A. Bodlenner, *ChemBioChem*, 2014, **15**, 1239–1251; S. G. Gouin, *Chem. – Eur. J.*, 2014, **20**, 11616–11628.
49 C. Decroocq, A. Joosten, R. Sergent, T. M. Barragan, C. O. Mellet and P. Compain, *ChemBioChem*, 2013, **14**, 2038–2049.
50 M. L. Lepage, A. Meli, A. Bodlenner, C. Tarnus, F. De Riccardis, I. Izzo and P. Compain, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2014, **10**, 1406–1412.
51 R. Risquez-Cuadro, J. M. G. Fernández, J. F. Nierengarten and C. O. Mellet, *Chem. – Eur. J.*, 2013, **19**, 16791–16803.
52 H. Connaris, P. R. Crocker and G. L. Taylor, *J. Biol. Chem.*, 2009, **284**, 7339–7351.
53 C. T. Supuran, *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2008, **7**, 168–181.
54 V. Alterio, A. Di Fiore, K. D'Ambrosio, C. T. Supuran and G. De Simone, *Chem. Rev.*, 2012, **112**, 4421–4468.
55 R. M. Vitale, V. Alterio, A. Innocenti, J. Y. Winum, S. M. Monti, G. De Simone and C. T. Supuran, *J. Med. Chem.*, 2009, **52**, 5990–5998.
56 K. D'Ambrosio, F. Z. Smaine, F. Carta, G. De Simone, J. Y. Winum and C. T. Supuran, *J. Med. Chem.*, 2012, **55**, 6776–6783.
57 M. C. Saada, J. L. Montero, D. Vullo, A. Scozzafava, J. Y. Winum and C. T. Supuran, *J. Med. Chem.*, 2011, **54**, 1170–1177.
58 K. D'Ambrosio, S. Carradori, S. M. Monti, M. Buonanno, D. Secci, D. Vullo, C. T. Supuran and G. De Simone, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 302–305; M. A. Pinard, B. Mahon and

Published on 24 August 2015. Downloaded by University of Regina on 07/09/2015 06:59:16.

R. McKenna, *Biomed Res. Int.*, 2015, **453543**, DOI: 10.1155/2015/453543.

59 M. Durka, K. Buffet, J. Iehl, M. Holler, J. F. Nierengarten and S. P. Vincent, *Chem. – Eur. J.*, 2012, **18**, 641–651.

60 S. Dasgupta, P. I. Kitov, J. M. Sadowska and D. R. Bundle, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2014, **53**, 1510–1515.

61 A. Illendula, J. A. Pulikkan, H. Zong, J. Grembecka, L. Xue, S. Sen, Y. Zhou, A. Boulton, A. Kuntimaddi, Y. Gao, R. A. Rajewski, M. L. Guzman, L. H. Castilla and J. H. Bushweller, *Science*, 2015, **347**, 779–784.

62 K. Petkau-Milroy and L. Brunsveld, *Org. Biomol. Chem.*, 2013, **11**, 219–232; D. A. Uhlenheuer, K. Petkau and L. Brunsveld, *Chem. Soc. Rev.*, 2010, **39**, 2817–2826.

63 D. T. Dang, H. D. Nguyen, M. Merkx and L. Brunsveld, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2013, **52**, 2915–2919; J. Boekhoven, C. M. R. Perez, S. Sur, A. Worthy and S. I. Stupp, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2013, **52**, 12077–12080.

64 M. J. Chmielewski, E. Buhler, J. Candau and J. M. Lehn, *Chem. – Eur. J.*, 2014, **20**, 6960–6977.

65 M. I. Sanchez, J. Mosquera, M. E. Vazquez and J. L. Mascarenas, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2014, **53**, 9917–9921; P. Reeh and J. de Mendoza, *Chem. – Eur. J.*, 2013, **19**, 5259–5262.

66 L. Albertazzi, F. J. Martinez-Veracoechea, C. M. A. Leenders, I. K. Voets, D. Frenkel and E. W. Meijer, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2013, **110**, 12203–12208.

67 K. Petkau-Milroy and L. Brunsveld, *Eur. J. Org. Chem.*, 2013, 3470–3476.

68 S. Barluenga and N. Winssinger, *Acc. Chem. Res.*, 2015, **48**, 1319–1331; Z. Zhang, M. A. Eckert, M. M. Ali, L. Liu, D.-K. Kang, E. Chang, E. J. Pone, L. S. Sender, D. A. Fruman and W. Zhao, *ChemBioChem*, 2014, **15**, 1268–1273; E. A. Englund, D. Y. Wang, H. Fujigaki, H. Sakai, C. M. Micklitsch, R. Ghirlando, G. Martin-Manso, M. L. Pendrak, D. D. Roberts, S. R. Durell and D. H. Appella, *Nat. Commun.*, 2012, **3**, 614; R. Liu, B. Jiang, H. Y. Yu and J. C. Chaput, *ChemBioChem*, 2011, **12**, 1813–1817.

69 G. M. Whitesides and B. Grzybowski, *Science*, 2002, **295**, 2418–2421.

70 A. Nazemi, S. M. M. Haeryfar and E. R. Gillies, *Langmuir*, 2013, **29**, 6420–6428; W. Spevak, J. O. Nagy, D. H. Charych, M. E. Schaefer, J. H. Gilbert and M. D. Bednarski, *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, **115**, 1146–1147; J. E. Kingerywood, K. W. Williams, G. B. Sigal and G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 7303–7305.

71 J. F. Cai, B. A. Rosenzweig and A. D. Hamilton, *Chem. – Eur. J.*, 2009, **15**, 328–332.

72 N. P. Gabrielson and J. J. Cheng, *Biomaterials*, 2010, **31**, 9117–9127; D. Joester, M. Losson, R. Pugin, H. Heinzelmann, E. Walter, H. P. Merkle and F. Diederich, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2003, **42**, 1486–1490; M. Guillot, S. Eisler, K. Weller, H. P. Merkle, J. L. Gallani and F. Diederich, *Org. Biomol. Chem.*, 2006, **4**, 766–769; M. Guillot-Nieckowski, D. Joester, M. Stohr, M. Losson, M. Adrian, B. Wagner, M. Kansy, H. Heinzelmann, R. Pugin, F. Diederich and J. L. Gallani, *Langmuir*, 2007, **23**, 737–746; S. P. Jones, N. P. Gabrielson, D. W. Pack and D. K. Smith, *Chem. Commun.*, 2008, 4700–4702; S. P. Jones, N. P. Gabrielson, C. H. Wong, H. F. Chow, D. W. Pack, P. Posocco, M. Fermeglia, S. Pricl and D. K. Smith, *Mol. Pharmaceutics*, 2011, **8**, 416–429; A. Barnard, P. Posocco, S. Pricl, M. Calderon, R. Haag, M. E. Hwang, V. W. T. Shum, D. W. Pack and D. K. Smith, *J. Am. Chem. Soc.*, 2011, **133**, 20288–20300; X. X. Liu, J. H. Zhou, T. Z. Yu, C. Chen, Q. Cheng, K. Sengupta, Y. Y. Huang, H. T. Li, C. Liu, Y. Wang, P. Posocco, M. H. Wang, Q. Cui, S. Giorgio, M. Fermeglia, F. Q. Qu, S. Pricl, Y. H. Shi, Z. C. Liang, P. Rocchi, J. J. Rossi and L. Peng, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2014, **53**, 11822–11827.

73 E. Bartolami, Y. Bessin, V. Gervais, P. Dumy and S. Ulrich, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2015, **54**(35), 10183–10187.

74 C. Bouillon, D. Paolantoni, J. C. Rote, Y. Bessin, L. W. Peterson, P. Dumy and S. Ulrich, *Chem. – Eur. J.*, 2014, **20**, 14705–14714.

75 R. Catana, M. Barboiu, I. Moleavin, L. Clima, A. Rotaru, E.-L. Ursu and M. Pinteala, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 2021–2024.

76 C. Bonduelle, J. Huang, T. Mena-Barragan, C. O. Mellet, C. Decroocq, E. Etame, A. Heise, P. Compain and S. Lecommandoux, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 3350–3352.

77 L. Mannocci, M. Leimbacher, M. Wichert, J. Scheuermann and D. Neri, *Chem. Commun.*, 2011, **47**, 12747–12753.

78 M. Wichert, N. Krall, W. Decurtins, R. M. Franzini, F. Pretto, P. Schneider, D. Neri and J. Scheuermann, *Nat. Chem.*, 2015, **7**, 241–249; F. Buller, M. Steiner, K. Frey, D. Mircsof, J. Scheuermann, M. Kalisch, P. Buhlmann, C. T. Supuran and D. Neri, *ACS Chem. Biol.*, 2011, **6**, 336–344.

79 A. Herrmann, *Chem. Soc. Rev.*, 2014, **43**, 1899–1933; *Topics in Current Chemistry: Constitutional Dynamic Chemistry*, ed. M. Barboiu, Springer, Berlin, Heidelberg, Germany, 2012, vol. 322; F. B. L. Cougnon and J. K. M. Sanders, *Acc. Chem. Res.*, 2012, **45**, 2211–2221; J. W. Li, P. Nowak and S. Otto, *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 9222–9239; *Dynamic Combinatorial Chemistry in Drug Discovery, Bioorganic Chemistry, and Materials Science*, ed. B. L. Miller, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2010; *Dynamic Combinatorial Chemistry*, ed. J. N. H. Reek and S. Otto, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2010; S. Ladame, *Org. Biomol. Chem.*, 2008, **6**, 219–226; P. T. Corbett, J. Leclaire, L. Vial, K. R. West, J. L. Wietor, J. K. M. Sanders and S. Otto, *Chem. Rev.*, 2006, **106**, 3652–3711; J.-M. Lehn, *Chem. – Eur. J.*, 1999, **5**, 2455–2463.

80 S. J. Rowan, S. J. Cantrill, G. R. L. Cousins, J. K. M. Sanders and J. F. Stoddart, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2002, **41**, 898–952.

81 M. Mondal and A. K. H. Hirsch, *Chem. Soc. Rev.*, 2015, **44**, 2455–2488; S. Ulrich and P. Dumy, *Chem. Commun.*, 2014, **50**, 5810–5825.

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2015

Published on 24 August 2015. Downloaded by University of Regina on 07/09/2015 06:59:16.

82 F. V. Reddavide, W. Lin, S. Lehnert and Y. Zhang, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2015, **54**, 7924–7928.

83 B. Thomas, M. Fiore, G. C. Daskhan, N. Spinelli and O. Renaudet, *Chem. Commun.*, 2015, **51**, 5436–5439; G. Viault, S. Dautrey, N. Maindron, J. Hardouin, P. Y. Renard and A. Romieu, *Org. Biomol. Chem.*, 2013, **11**, 2693–2705; C.-H. Wong and S. C. Zimmerman, *Chem. Commun.*, 2013, **49**, 1679–1695; D. M. Beal and L. H. Jones, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2012, **51**, 6320–6326; M. Galibert, O. Renaudet, P. Dumy and D. Boturyn, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2011, **50**, 1901–1904.

84 D. Baram-Pinto, S. Shukla, N. Perkas, A. Gedanken and R. Sarid, *Bioconjugate Chem.*, 2009, **20**, 1497–1502; P. Orlowski, E. Tomaszewska, M. Gniadek, P. Baska, J. Nowakowska, J. Sokolowska, Z. Nowak, M. Donten, G. Celichowski, J. Grobelny and M. Krzyzowska, *PLoS One*, 2014, 9; D. Baram-Pinto, S. Shukla, A. Gedanken and R. Sarid, *Small*, 2010, **6**, 1044–1050.

85 P. Di Gianvincenzo, M. Marradi, O. M. Martinez-Avila, L. M. Bedoya, J. Alcami and S. Penades, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, **20**, 2718–2721; M. C. Bowman, T. E. Ballard, C. J. Ackerson, D. L. Feldheim, D. M. Margolis and C. Melander, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 6896–6897.

86 J. Luczkowiak, S. Sattin, I. Sutkeviciute, J. J. Reina, M. Sanchez-Navarro, M. Thepaut, L. Martinez-Prats, A. Daghetti, F. Fieschi, R. Delgado, A. Bernardi and J. Rojo, *Bioconjugate Chem.*, 2011, **22**, 1354–1365.

87 S. Patke, M. Boggara, R. Maheshwari, S. K. Srivastava, M. Arha, M. Douaisi, J. T. Martin, I. B. Harvey, M. Brier, T. Rosen, J. Mogridge and R. S. Kane, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2014, **53**, 8037–8040.

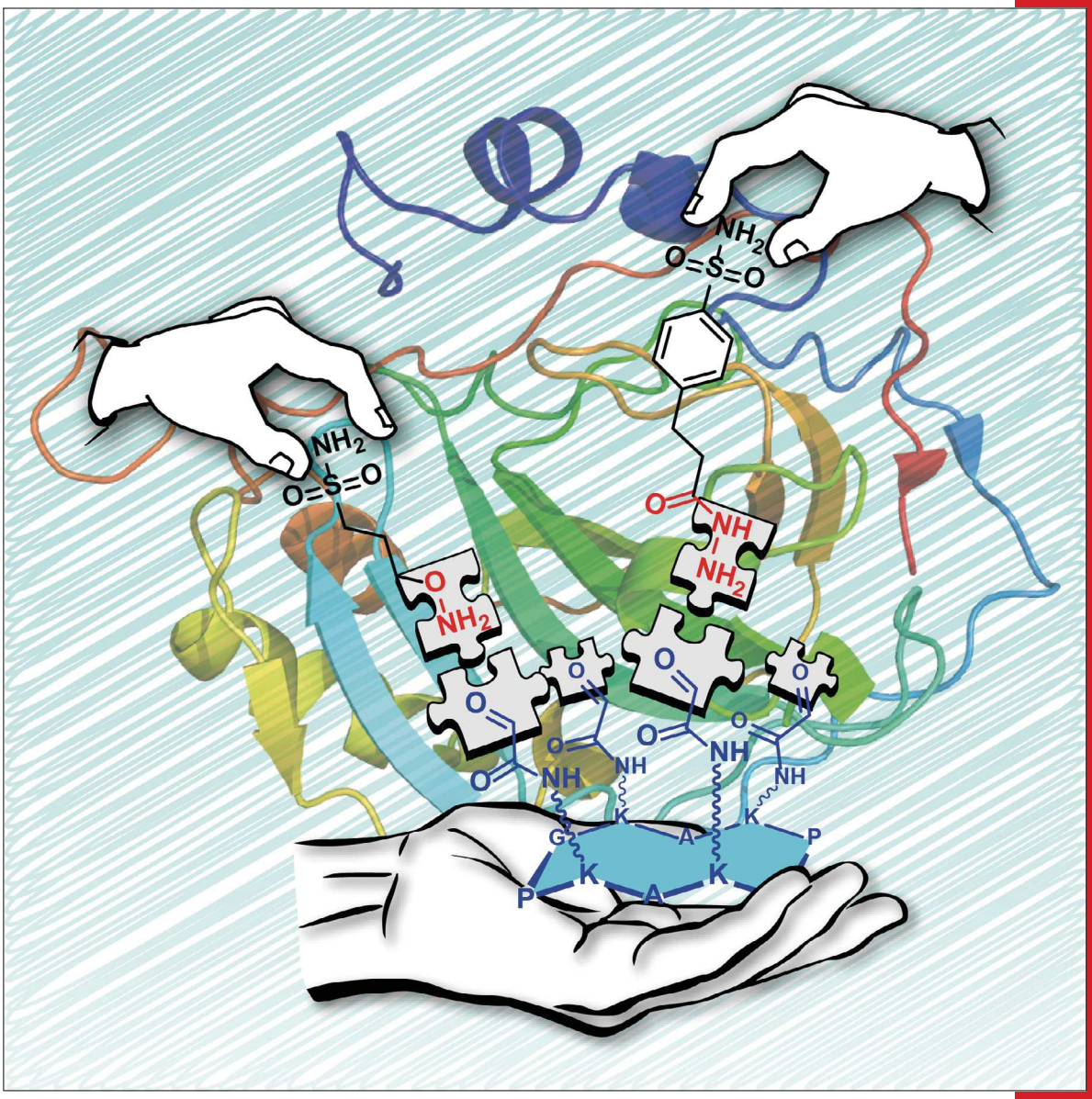
CHEMISTRY
A European Journal

A Journal of

ChemPubSoc Europe

www.chemeurj.org

2017-23/28



Cover Picture:
S. Ulrich, J.-Y. Winum et al.
Effective Access to Multivalent Inhibitors of Carbonic Anhydrases Promoted by Peptide Bioconjugation

Supported by

ACES Asian Chemical Editorial Society

WILEY-VCH

CHEMISTRY
A European Journal

A Journal of
ChemPubSoc Europe

Accepted Article

Title: Effective Access to Multivalent Inhibitors of Carbonic Anhydrases Promoted by Peptide Bioconjugation.

Authors: Nasreddine Kanfar, Muhammet Tanc, Pascal Dumy, Claudiu Supuran, Sébastien Ulrich, and Jean-Yves Winum

This manuscript has been accepted after peer review and appears as an Accepted Article online prior to editing, proofing, and formal publication of the final Version of Record (VoR). This work is currently citable by using the Digital Object Identifier (DOI) given below. The VoR will be published online in Early View as soon as possible and may be different to this Accepted Article as a result of editing. Readers should obtain the VoR from the journal website shown below when it is published to ensure accuracy of information. The authors are responsible for the content of this Accepted Article.

To be cited as: *Chem. Eur. J.* 10.1002/chem.201700241

Link to VoR: http://dx.doi.org/10.1002/chem.201700241

Supported by
ACES

WILEY-VCH

10.1002/chem.201700241

WILEY-VCH

Effective Access to Multivalent Inhibitors of Carbonic Anhydrases Promoted by Peptide Bioconjugation.

Nasreddine Kanfar,[a] Muhammet Tanc,[b] Pascal Dumy,[a] Claudiu T. Supuran,[b] Sébastien Ulrich*[a] and Jean-Yves Winum*[a]

Abstract: Multivalency has impressive effects on (bio)molecular recognition, through the simultaneous presentation of multiple copies of a ligand, which can change a weak millimolar binder into a potent nanomolar one. The implementation of multivalency in enzyme inhibition is rather recent, being exemplified by few serendipitous discoveries, and hitherto relying on the random exploration of new multivalent structures as potential enzyme inhibitors. We report here a straightforward and versatile method that enables the construction of multivalent systems for the inhibition of carbonic anhydrases (CA), widespread enzymes that catalyse a fundamental biochemical reaction. Oxime and hydrazone click-type bioconjugation techniques were successfully used for the preparation of tetravalent peptide conjugates tethered with sulphonamide CA inhibitors. The enzyme inhibition assays show that multivalent effects were present with these novel compounds, but also reveal various structural effects provided by the scaffolds. The versatility of this approach may facilitate the exploration of structure-activity relationships for various types of other enzyme inhibitors.

Introduction

Multivalency effects have been extensively explored in biomolecular recognition as a tool to strengthen a non-covalent association through the simultaneous combination of multiple interactions.[1] For example, many different types of synthetic glycoclusters display an affinity for lectins that is enhanced by several orders of magnitude compared to the single sugar derivative.[2] The role of multivalency in enzyme inhibition has received much less attention, most likely because enzymes usually possess a single active site which should make them less sensitive to a multivalent presentation of inhibitors. However, intriguing effects have been recently reported in the area.[3] Multivalent iminosugar clusters were found to display a greater potency compared to the monovalent compound toward the inhibition of certain glycosidases.[4] The mechanistic origin of this effect is still under debate. It can involve binding to a secondary site, clustering of the enzymes onto the multivalent compound, or simply statistical effects that result from the increased local concentration of inhibitors. The application of multivalency in enzyme inhibition is therefore still in its infancy and rest on an exploratory approach that requires effective and versatile synthetic methods. The development of multivalent enzyme inhibitors could be of great interest, not only for improving the potency of enzyme inhibitors, but also for modulating their selectivity, especially for enzymes which are dimers or tetramers Herein we report the design, synthesis, and evaluation of multivalent inhibitors of carbonic anhydrases (CAs, EC 4.2.1.1) that are effectively obtained by using bioconjugation techniques. It should be mentioned that many CAs are monomeric enzymes, but some of them are also dimers, or higher oligomers (dimers, tetramers, etc).[5] Indeed, the CAs are widespread zinc metalloproteins in higher vertebrates. By catalyzing the interconversion of CO_2 and the bicarbonate ion, the 12 catalytically active isoforms found in humans are involved in numerous physiological processes such as such as respiration, pH regulation and fluid formation.[6] Pathological processes can be induced upon deregulated activity of these isoforms and many of them are established important therapeutic targets for diseases such as glaucoma (hCA II, hCA IV, hCA XII),[7] cancer (hCA IX and hCA XII),[8] and epilepsy (hCA II, hCA VII).[9]

The multivalent approach has been recently implemented in the field of CA inhibition for improving the inhibitory activity but also to circumvent the lack of selectivity of conventional inhibitors against the different hCA isozymes.[3]

Using DNA-encoded libraries, Neri's group identified bivalent CA inhibitors of submicromolar potency and proposed, based on crystallographic data,[10] that the bivalency effect originates from binding to a secondary polar site located near the active site.[11] In this context, Whitesides et al. have reviewed the different types of secondary interactions that can be exploited by bivalent inhibitors, enabling inhibition potency up to the picomolar range.[12]

More recently, systems of higher valency have been explored for the inhibition of carbonic anhydrases. We previously used fluorescent silica nanoparticles coated with multiple copies (12-15) of sulfonamide-based CA inhibitors.[13] The results showed an increase of inhibitory potency (low nanomolar activity, as previously observed with gold nanoparticles[14]), but also a specific multivalency effect against the cytosolic isoforms hCA I and hCA II *versus* the transmembrane isoforms hCA IX and hCA XII. The Vincent group described multimeric CA-inhibitors having different types of zinc binding functions,[15] such as xanthate (3-6 inhibitors)[16] or coumarin (12 inhibitors).[17] Even if weak multivalent effects were observed for the inhibition of carbonic anhydrases (2-4 fold valence-corrected increase), improved potency (in the micromolar range) and selectivity were noticed compared to the monovalent analogues. These multivalent systems were constructed from, respectively, polyol and fullerene scaffolds using the click-type copper-mediated azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) reaction. Supuran's group reported the use of different generations of poly(amidoamine) (PAMAM)-type dendrimer incorporating 4, 8, 16 or 32

[a] N. Kanfar, Prof. Dr. P. Dumy, Dr. S. Ulrich, Dr. J.-Y. Winum, Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) UMR 5247 CNRS, ENSCM, Université de Montpellier, 8 rue de l'Ecole Normale, 34296 Montpellier Cedex (France) E-mail: sebastien.ulrich@enscm.fr, jean-yves.winum@umontpellier.fr

[b] Dr. M. Tanc, Prof. Dr. C.T. Supuran Neurofarba Department ; Section of Pharmaceutical and Nutriceutical Sciences, Università degli Studi di Firenze ; Via Ugo Schiff 6, 50019 Sesto Fiorentino, Florence (Italy)

Supporting information for this article is given via a link at the end of the document.

Accepted Manuscript

This article is protected by copyright. All rights reserved.

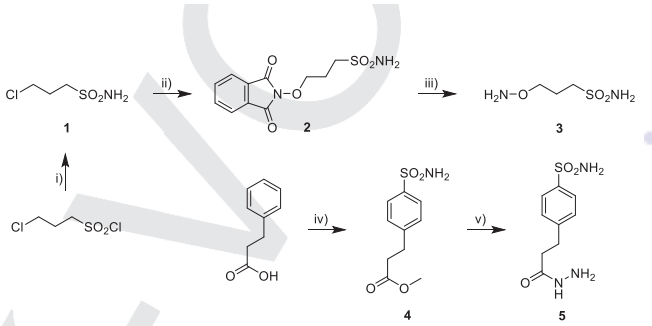
benzenesulfonamides as multivalent CA inhibitors.[18] These dendrimers, which were synthesized by multiple amide-bond formation from PAMAM dendrimers and activated esters, showed excellent improvement of the inhibitory properties against the different CA isoforms tested compared to the monovalent inhibitor. Depending on the isoform considered, weak to important dendritic effects (or multivalent, or generation effect)[19] were evidenced with these systems.

Despite these significant advances, the multivalent systems reported up to now still have a limited solubility in aqueous media, which is crucial when considering potential biomedical applications. Furthermore, their synthesis involves either the use of toxic metal catalysts that are difficult to remove, or chemical reactions that produce by-products. Therefore, it is important to develop novel synthetic approaches for preparing multivalent CA inhibitors. In this work, we explore the use of peptide-based scaffolds and metal-free click-type bioconjugation techniques. The use of peptides as scaffolds is expected to impart enhanced water-solubility. We selected hydrazone and oxime ligations[20] as an effective and facile way of preparing such multivalent systems. Indeed, these ligations proceed with high yields – which is a key prerequisite when carrying out multiple ligations in one pot –, do not require metal catalysts to operate, and only produce water as a side-product. We show that this synthetic approach enables the effective preparation of multivalent systems that act as effective CA inhibitors.

Results and Discussion

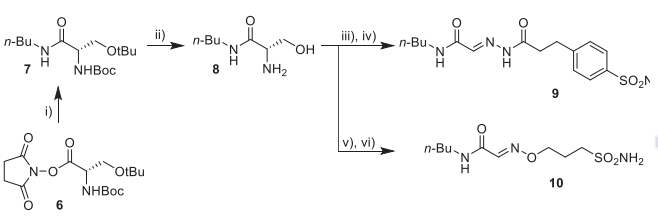
Present in many clinically used drugs, primary sulfonamides R-SO_2NH_2 (where R may be aliphatic or aromatic moiety) constitute one of the most important class of inhibitors acting as zinc binding function on the metalloenzymes carbonic anhydrases. This model of pharmacophore function was therefore selected for this study.[15] On the other hand, based on our previous experience,[21] we selected cyclic and linear peptides bearing multiple reactive aldehyde groups as multivalent scaffolds. While the linear peptide scaffold is most probably unstructured and quite flexible, its cyclic counterpart is highly pre-organized – due to β-sheet-type interactions – with the four chains bearing the reactive aldehyde groups pointing towards the same direction.[22] These scaffolds have already been used for preparing, through multiple oxime ligations (up to 84)[23], different types of peptide-based bioconjugates, which display good aqueous solubility and good stability *in vitro* and *in vivo*.[20, 24]

Thus, we engaged the synthesis of sulfonamide inhibitors bearing aminooxy and hydrazide functions that will enable the conjugation through, respectively, oxime and hydrazone ligations. Both of them are efficient click methods allowing the bioconjugations to operate chemoselectively in mild conditions and high yields, which make them an excellent tool for the preparation of multivalent and multifunctional nanoconstructs for biological applications. The sulfonamide-aminooxy compound **3** was prepared in three steps (Scheme 1). First, 3-chloro-propanesulfonyl was reacted with aqueous ammonia to provide the sulfonamide **1**.[25] The nucleophilic substitution of the chlorine by *N*-hydroxyphthalimide then furnished compound **2** in 62% yield. The final deprotection with hydrazine provides the final sulfonamide-aminooxy compound **3**. The sulfonamide-hydrazide compound **5** was prepared in two steps starting from hydrocinnamic acid (Scheme 1). The sulfonamide group was installed by the subsequent reaction with chlorosulfonic acid and aqueous ammonia. Esterification was carried out in the same pot and gave compound **4**. Finally, the hydrazide **5** was formed by reaction with hydrazine. These compounds can then be conjugated with various scaffolds bearing aldehydes.



Scheme 1. Synthesis of CA inhibitors bearing aminooxy and hydrazide groups for further conjugation by, respectively, oxime and hydrazone ligations. i) NH_4OH, DCM, 95%; ii) *N*-hydroxyphtalimide, tetrabutylammonium iodide, Et_3N DCM, 62%; iii) NH_2NH_2, MeOH, 83%; iv) 1) HSO_3Cl, 2) NH_4OH, 3) H_2SO_4, MeOH, 12% overall; v) NH_2NH_2, MeOH, 67%.

From these synthons, we first prepared monovalent conjugates **9** and **10** (Scheme 2) that will serve as reference for identifying multivalent effects. Thus, we conjugated sulfonamides **3** and **5** with a glyoxylic aldehyde that mimic the structure present in the peptide-based multivalent systems. Compound **6**, the succinimide activated ester of protected *L*-serine,[26] was coupled to *n*-butylamine to make compound **7**, and the protecting groups were then removed in acidic conditions to afford unprotected serine derivative **8**. The oxidative cleavage of the amino alcohol, and the ligation reaction were then subsequently carried out in one pot to afford monovalent compounds **9** and **10**. Note that the hydrazone ligation and the oxime ligation were carried out in acidic media, respectively in a pH 5.0 buffer and in a H_2O/TFA 99.9/0.1 mixture.



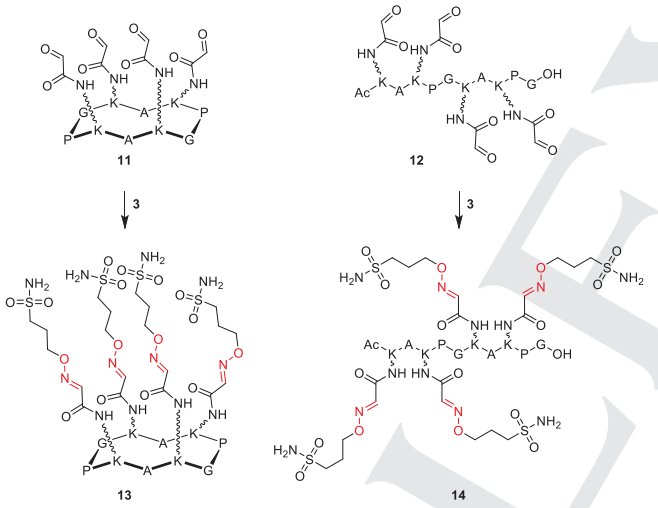
Scheme 2. Synthesis of monovalent sulphonamide-type CA inhibitors. i) *n*-butylamine, *N*,*N*-diisopropylethylamine, DCM, 84%; ii) TFA/TIS/H_2O, 96%; iii) $NaIO_4$, sodium acetate buffer (100 mM, pH 5.0); iv) hydrazide **5**, sodium acetate buffer (100 mM, pH 5.0), 27% for two steps; v) $NaIO_4$, H_2O/TFA 99.9/0.1; vi) aminooxy **3**, H_2O/TFA 99.9/0.1, 12% for two steps.

Accepted Manuscript

This article is protected by copyright. All rights reserved.

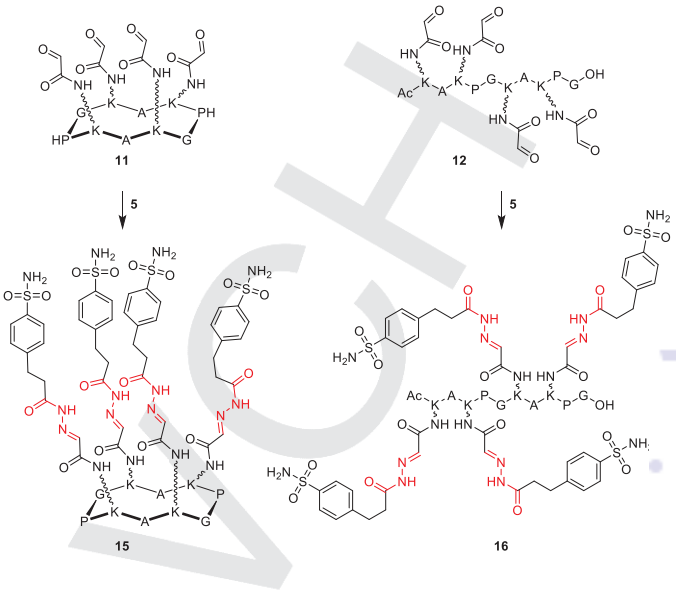
10.1002/chem.201700241

Then, we went on to preparing multivalent systems from the functionalized peptide scaffolds **11** and **12**. While the linear peptide scaffold **12** is most probably unstructured and quite flexible, it has been clearly demonstrated that the cyclic peptide scaffold **11** is highly pre-organized in the solid-state and in solution – the four arms pointing towards the same direction.[22] Both peptide scaffolds were prepared by automated solid-phase peptide synthesis (SPPS) on a 2-chlorotrityl chloride resin, as previously described.[27] The synthesis of the cyclic peptide involves in-solution cyclization under high-dilution conditions, followed by an oxidative cleavage of serine side-chains in order to unmask the glyoxylic aldehyde groups. The synthesis of the linear peptide involves acetylation of the N-terminal, cleavage and deprotection, and oxidative cleavage of serine side-chains. We then prepared two series of multivalent CA inhibitors: the first one prepared by oxime ligation from enzyme inhibitor **3** (Scheme 3), and the second one prepared by hydrazone ligation from enzyme inhibitor **5** (Scheme 4). The oxime ligation was typically carried out in acidic medium (H_2O/TFA 99.9/0.1) and the acylhydrazone ligation was performed in acidic acetate buffer at pH 5.0. The tetravalent conjugates were isolated by semi-preparative reverse-phase HPLC in 30-75% yield, which correspond to individual reaction yields of 74-93%.



Scheme 3. Synthesis of multivalent CA inhibitors **13** and **14** by oxime ligation from pre-organized and flexible functionalized peptide scaffolds, respectively **11** and **12**. Ligation reactions carried out in H_2O/TFA 99.9/0.1.

In vitro enzyme inhibition assays were used to compare the potency of the monovalent and multivalent compounds against the physiologically relevant CA isoforms – the cytosolic hCA I and II – as well as the transmembrane and tumor-associated hCA IV, VII, IX and XII. First of all, we observed than no inhibition is observed with the peptide scaffolds **11** and **12** (Table 1). In the oxime series, we observed that the monovalent conjugate **10** is a potent CA inhibitor displaying a marked selectivity for hCAIX (K_i = 36 nM, Table 1).



Scheme 4. Synthesis of multivalent CA inhibitors **15** and **16** by hydrazone ligation from pre-organized and flexible functionalized peptide scaffolds, respectively **11** and **12**. Ligation reactions carried out in acetate buffer (100 mM, pH 5.0).

On the other hand, the corresponding multivalent conjugates **13** and **14** are much less potent inhibitors of hCA IX (as well as hCA VII and hCA XII). However, an improvement in inhibition potency when comparing the multivalent system **13** to the monovalent **10** is observed on hCA II and IV (Table 1). In this case, the relative potency (rp) increases 13- and 5-fold, respectively.

Table 1. Results of the CA inhibition assay for the peptide scaffolds **11** and **12**, the monovalent oxime **10**, and multivalent oxime conjugates **13** and **14**.

	Ki (nM)					
Cpds	hCA I	hCA II	hCA IV	hCA VII	hCA IX	hCA XII
11	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
12	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
10	63	250	392	>10000	36	652
13	89	19	81	>10000	421	>10000
rp	0.7	13.2	4.8	n/a	0.1	n/a
rp/*n*	0.18	3.3	1.2	n/a	0.02	n/a
14	55	51	608	>10000	481	-
rp	1.2	4.9	0.6	n/a	0.1	-
rp/*n*	0.3	1.2	0.15	n/a	0.02	-

[a] Errors were in the range of ±10% of the reported values (data not shown).

Accepted Manuscript

This article is protected by copyright. All rights reserved.

For the inhibition of hCA II a positive multivalent effect could be detected since the relative potency per sulfonamide inhibitor (rp/n) increases by a factor of 3.3 comparing to the corresponding monovalent compound that contains the exact same sulfonamide-type inhibitor.

The multivalent conjugate built from the linear peptide scaffold (compound **14**, Table 1) turns out to be less potent on all CA isoforms than the multivalent conjugate built from the cyclic peptide scaffold (compound **13**, Table 1).

In the hydrazone series, we found that the monovalent conjugate **9** is a very good inhibitor of hCA IX (K_i = 9 nM, Table 2), with a good selectivity among the isoforms tested. Multivalent effects were observed with conjugate **15** on hCA isoforms II, IV and XII (rp/n > 1, Table 1). Again, the multivalent conjugate made of the cyclic scaffold (compound **15**) shows an improved potency when compared to the multivalent conjugate made of the linear scaffold (compound **16**, Table 2).

Table 2. Results of the CA inhibition assay for the monovalent compound **9**, and the corresponding multivalent conjugates **15** and **16**, in the hydrazone series.

	Ki (nM)[a]					
Cpds	hCA I	hCA II	hCA IV	hCA VII	hCA IX	hCA XII
9	48	619	811	97	9	817
15	329	53	80	34	100	103
rp	0.1	11.7	10.1	2.8	0.1	7.9
rp/*n*	0.02	2.9	2.5	0.7	0.02	1.9
16	460	89	428	75	10	938
rp	0.1	6.9	1.9	1.3	0.9	0.9
rp/*n*	0.02	1.7	0.5	0.3	0.2	0.2

[a] Errors were in the range of ±10% of the reported values (data not shown).

Conclusions

We reported here a straightforward approach that enables the effective preparation of multivalent CA inhibitors from functionalized peptide scaffolds. The enzyme inhibition assays revealed that multivalent effects occur specifically with a couple of CA isoforms, and more specifically hCA II. This phenomenon could be due to the existence of a secondary binding site as previously suggested, or by the ability of certain isoforms to cluster favorably onto the multivalent system. We also observed structural differences, the nature of the scaffold – cyclic versus linear – having a surprising effect on the potency of these CA inhibitors. The fact that pre-organized conjugates **13** and **15** show an enhanced potency compared to conjugates **14** and **16** seem to indicate that the structural fit between CAs and the multivalent inhibitor play an important role. Thus, it is possible that statistical effects are at the origin of the multivalent effects observed here and operate through an increase in the local concentration of CA inhibitors. In addition to structural data about possible sites for secondary interactions,[12] this versatile methodology should facilitate the development of more comprehensive structure-activity relationships in this area of CA inhibition by multivalent systems.

Experimental Section

General

All reagents and solvents were of commercial quality and used without further purification. TLC analyses were performed on silica gel 60 F254 plates (Merck), and visualized either under 254nm UV illumination, or by ninhydrin staining. Melting points were determined on a Büchi Melting Point 510. ^{1}H and ^{13}C NMR spectra were recorded on Brucker Avance 400 instruments and were referenced with respect to the residual solvent peak. Data are reported as follows: chemical shift (δ in ppm), multiplicity (s for singlet, d for doublet, t for triplet, m for multiplet, dd for doublet of doublet and br of broad), coupling constant (*J* in Hertz) and integration. Flash chromatography was performed on silica gel (40–63 µm) purchased from Merck. HPLC analyses were performed on a Waters HPLC 2695 (EC Nucleosil 300-5 C18, (125 × 3 mm) column, Macherey-Nagel) equipped with a Waters 996 DAD detector. The following linear gradients of solvent B (acetonitrile) into solvent A (100 mM triethylammonium acetate/acetonitrile 95/5) were used: 0 to 95% of solvent B in 45 min. Retention times (t_R) are given in minutes. Semi-preparative RP-HPLC was performed on a Waters 515 HPLC (VP Nucleodur HTec C18, 7 µm, (250 × 21) column, Macherey-Nagel) equipped with a Waters 2487 detector. Method A: linear gradient of acetonitrile into (100 mM triethylammonium acetate/acetonitrile 95/5): 0% to 40% in 45 min. Method B: the following linear gradient of acetonitrile/TFA 99.9/0.1 into H_2O: 0% to 40% in 45 min. MALDI-TOF and high resolution mass spectrometry analyses were carried out on an Ultraflex III and a Waters MicromassQ ToF mass spectrometer (positive mode).

Synthesis

3-chloropropane-1-sulfonamide (1). 1.2 mL of ammonium hydroxide solution (25% in water) was added to a solution of 3-chloro-propane sulfonyl chloride (0.14 mL; 1.1 mmol; 1 equiv.) in DCM (1.2 mL). After stirring 3 hours, the solvent was removed under reduced pressure. The residue was triturated in DCM, and the precipitate was filtered and washed with DCM. The filtrate was then concentrated in *vacuo* to give a colourless oil. Yield: 95 %; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 5.25 (s, 2H, SO_2NH_2), 3.70 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H, CH_2-SO_2NH_2), 3.35 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H,Cl-CH_2), 2.37 – 2.26 (m, 2H, CH_2-CH_2-CH_2); ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 52.55 (CH_2-SO_2NH_2), 42.65 (Cl-CH_2), 27.07 (CH_2-CH_2-CH_2).

3-((1,3-dioxoisoindolin-2-yl)oxy)propane-1-sulfonamide (2). To a solution of compound **1** (0.3 g; 1.9 mmol; 1 equiv.) in DMF (2 mL) were added successively *N*-hydroxyphtalimide (0.22 g; 2.2 mmol; 1.2 equiv.), tetrabutylammonium iodide (0.85 g; 2.2 mmol; 1.2 equiv.) and triethylamine (0.18 mL; 0.22 mmol; 1.2 equiv.). After refluxing overnight, the mixture was filtered and the precipitate washed with AcOEt. The mixture was then washed twice with a saturated solution of $NaHCO_3$, and brine. The organic layer was dried over anhydrous sodium sulfate, filtered and concentrated under vacuum. The resulting powder was re-cristallized from ethanol to give a white solid. Yield: 62 %; mp: 181°C; HR-ESI-MS $[M+H]^+$ calculated for $[C_{11}H_{13}N_2O_5S]^+$: 285.0545 found

Accepted Manuscript

This article is protected by copyright. All rights reserved.

285.0550; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.86 (s, 4H, CH_{ar}), 6.89 (s, 2H, SO_2NH_2), 4.25 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, O-CH_2), 3.22 – 3.19 (m, 2H, CH_2-SO_2NH_2), 2.14 – 2.03 (m, 2H, CH_2-CH_2-CH_2). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 163.67 (C=O), 134.97 (CH_{ar}), 129.04 (CH_{ar}), 123.41 (CH_{ar}), 76.47 (O-CH_2), 51.68 (CH_2-SO_2NH_2), 23.40 (CH_2-CH_2-CH_2).

3-(aminoxy)propane-1-sulfonamide (3). Methylhydrazine (36 µL; 0.7 mmol; 2 equiv.) was added to a solution of compound **2** (0.1 g; 0.35 mmol; 1 equiv.) in EtOH (1 mL). After stirring at room temperature for 4 hours, the mixture was concentrated under vacuum and the residue was purified on silica gel using AcOEt/EtOH (9/1) as eluent. The expected compound was obtained as a colourless oil. Yield: 83 %; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 6.78 (s, 2H, SO_2NH_2), 6.00 (br, 2H, O-NH_2), 3.58 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H, O-CH_2), 3.01 – 2.93 (m, 2H, CH_2-SO_2NH_2), 1.97 – 1.85 (m, 2H, CH_2-CH_2-CH_2); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 72.64 (O-CH_2), 51.67 (CH_2-SO_2NH_2), 22.98 (CH_2-CH_2-CH_2); HR-ESI-MS $[M+H]^+$ calculated for $[C_3H_{11}N_2O_3S]^+$: 155.0490, found 155.0492.

Methyl 3-(4-sulfamoylphenyl)propanoate (4). Hydrocinnamic acid (3.0 g; 19.9 mmol; 1 equiv.) was slowly added to chlorosulfonic acid (7.9 mL; 119.4 mmol; 6 equiv.) at 0°C. The reaction mixture was stirred at 0°C (ice bath) for 1 hour and then warmed to room temperature and stirred for 3 hours. The suspension was filtered and the solid was washed with cold water, then dried in *vacuo*. The resulting solid was added to a solution of ammonium hydroxide (3 mL, 25% in water) and stirred at 60°C overnight. After addition of 2 mL of water, the mixture was acidified to pH 2-3 with a 3M aqueous solution of HCl. After concentration under vacuum the obtained yellow solid was refluxed 3 hours in a solution of 1.8 mL sulfuric acid in 40 mL of methanol. The solvent was then removed under reduced pressure and the residue obtained was triturated with Et_2O to afford a white precipitate, which was filtered, washed with Et_2O and dried in *vacuo*. Yield: 12%; mp: 109°C; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.72 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.41 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.29 (s, 2H, SO_2NH_2), 3.56 (s, 3H, O-CH_3), 2.91 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH_2-CH_2-C=O), 2.67 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, CH_2-CH_2-C=O); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 172.29 (C=O), 145.23 (C_{ar}-SO_2NH_2), 142.19 (C_{ar}-CH_2), 128.79 (CH_{ar}), 125.74 (CH_{ar}), 51.40 (O-CH_3), 34.37 (CH_2-CH_2-C=O), 29.95 (CH_2-CH_2-C=O); HR-ESI-MS $[M+H]^+$ calculated for $[C_{10}H_{14}NO_4S]^+$: 244.0644 found 244.0645.

4-(3-hydrazinyl-3-oxopropyl)benzenesulfonamide (5). A solution of compound **4** (0.6 g; 2.6 mmol; 1 equiv.) in methanol (27 mL) was refluxed for 7 hours with hydrazine monohydrate (1.2 mL; 26.2 mmol, 10 equiv.). Then the reaction mixture was cooled at 0°C for 30 min until formation of a precipitate. The latter was filtered, washed with methanol and dried in *vacuo*. The solid was re-cristallized from ethanol to give the expected compound as a white solid. Yield: 67%; mp: 128°C; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 9.01 (s, 1H, NH-NH_2), 7.75 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.37 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.29 (s, 2H, SO_2NH_2), 4.18 (br, 2H, NH-NH_2), 2.88 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH_2-CH_2-C=O), 2.35 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, CH_2-CH_2-C=O); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 170.65 (C=O), 145.77 (C_{ar}-SO_2NH_2), 142.16 (C_{ar}-CH_2), 128.83 (CH_{ar}), 125.79 (CH_{ar}), 34.60 (CH_2-CH_2-C=O), 30.74 (CH_2-CH_2-C=O). HR-ESI-MS $[M+H]^+$ calculated for $[C_9H_{14}N_3O_3S]^+$: 244.0756, found 244.0760.

(2*S*)-*N*-butyl-2-([*tert*-butoxycarbonyl]amino)-3-(*tert*-butoxy) propanamide (7). In a solution of Boc-Ser(O*t*bu)-succinimide (1 g; 2.8 mmol; 1 equiv.) in DCM (16 mL) was added *n*-butylamine (0.36 mL; 3.6 mmol; 1.3 equiv.) and *N*,*N*-diisopropylethylamine (1.9 mL; 11 mmol; 4 equiv.). After stirring at room temperature overnight, the mixture was washed successively with 1N aqueous solution of HCl, saturated solution of $NaHCO_3$, and brine. The organic layer was dried over anhydrous sodium sulphate and filtered. The filtrate was concentrated under vacuum to get compound **7** as a white solid. Yield: 84 %; mp: 71°C; ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 6.55 (br, 1H, CH_2-NH), 5.43 (br, 1H, CH-NH), 4.10 (s, 1H, CH), 3.83 – 3.71 (m, 1H, CH-CH_2), 3.34 (s, 1H, CH-CH_2), 3.26 (dd, *J* = 12.8, 6.6 Hz, 2H, CH_2-NH), 1.44 (3, 11H, CH_2-CH_2-CH_2, NH-Boc), 1.39 – 1.26 (m, 2H, CH_2-CH_3), 1.17 (s, 9H, O-*t*Bu), 0.91 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH_2-CH_3). ^{13}C NMR (101 MHz, $CDCl_3$) δ 170.62 (CH-C=O), 155.58 ((C=O)O-*t*Bu), 73.92 ($C(CH_3)_3$) 62.00 (CH-CH_2), 39.20 (CH_2-NH), 38.70 (CH), 31.65 (CH_2-CH_2-CH_2), 28.40 ($C(CH_3)_3$), 27.51 ($C(CH_3)_3$), 20.03 (CH_2-CH_3), 13.74 (CH_2-CH_3). HR-ESI-MS $[M+H]^+$ calculated for $[C_{16}H_{33}N_2O_4]^+$: 317.2440, found 317.2440.

(2*S*)-*N*-butyl-2-amino-3-hydroxypropanamide (8). Compound **7** (0.69 g; 2.2 mmol; 1 equiv.) was added to 28 mL of a solution of TFA/TIS/H_2O (95/2.5/2.5) and stirred for 4 hours at room temperature. The mixture was then concentrated under vacuum and the residue was triturated with Et_2O. The resulting precipitate was filtered and washed with Et_2O to give compound **8** as a white solid. Yield: 96 %; mp: 99°C; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.36 (t, *J* = 5.4 Hz, 1H, CH_2-NH), 8.11 (s, 2H, CH-NH_2), 5.52 (br, 1H, CH_2-OH), 3.80 – 3.60 (m, 3H, CH-CH_2), 3.11 (dd, *J* = 12.5, 6.8 Hz, 2H, CH_2-NH), 1.46 – 1.35 (m, 2H, CH_2-CH_2-CH_2), 1.31 – 1.22 (m, 2H, CH_2-CH_3), 0.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH_2-CH_3); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 166.60 (CH-C=O), 60.61 (CH-CH_2), 54.66 (CH), 38.44 (CH_2-NH), 30.93 (CH_2-CH_2-CH_2), 19.42 (CH_2-CH_3), 13.62 (CH_2-CH_3); HR-ESI-MS $[M+H]^+$ calculated for $[C_7H_{17}N_2O_2]^+$: 161.1290, found 161.1288.

***N*-butyl-2-(2-(3-(4-sulfamoylphenyl)propanoyl)hydrazono)acetamide (9)**. Compound **8** (0.1 g; 0.6 mmol, 1 equiv.) was dissolved in 60 mL of aqueous buffer (100 mM sodium acetate, pH 5.0) and then $NaIO_4$ (0.14 g; 0.66 mmol, 1.1 equiv.) was added. The resulting mixture was stirred 3 hours at room temperature, and then quenched with $Na_2S_2O_3$ (0.1 g; 0.66 mmol, 1.1 equiv.). Hydrazide **5** (0.3 g; 1.2 mmol, 2 equiv.) was then added and the solution was stirred overnight at room temperature. The mixture was extracted twice with AcOEt and the organic layer was washed with brine, then dried over anhydrous sodium sulfate and filtered. The filtrate was concentrated under vacuum and the residue was purified on silica gel using AcOEt/Cyclohexane (8/2) as eluent. The expected compound **9** was obtained as a white solid. Yield: 27 %; mp: 119°C; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 10.5 (br, 1H, CH=N), 8.20 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, CH_2-NH-C=O), 7.72 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.43 (dd, *J* = 13.7, 8.2 Hz, 2H, CH_{ar}), 7.25 (s, 2H, SO_2NH_2), 3.13 (dd, *J* = 13.3, 6.8 Hz, 2H, CH_2-NH), 3.04 – 2.87 (m, 4H, CH_2-CH_2-C=O), 1.49 – 1.35 (m, 2H, CH_2-CH_2-CH_2), 1.27 (dt, *J* = 14.5, 7.3 Hz, 2H, CH_2-CH_3), 0.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH_2-CH_3); δ ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 173.99 (N-NH-C=O), 162.42 (CH_2-NH-C=O), 145.59 (C_{ar}-SO_2NH_2), 141.78 (C_{ar}-CH_2), 136.96 (CH=N), 128.92 (CH_{ar}), 125.66 (CH_{ar}), 38.02 (CH_2-NH), 32.80 (CH_2-CH_2-C=O), 31.26 (CH_2-CH_2-CH_2), 29.46 (CH_2-CH_2-C=O), 19.68 (CH_2-CH_3), 13.68 (CH_2-CH_3); HR-ESI-MS $[M+H]^+$ calculated for $[C_{15}H_{23}N_4O_4S]^+$: 355.1440, found 355.1445.

N-butyl-2-((3-sulfamoylpropoxy)imino)acetamide (10). Compound **10** was prepared following the same procedure as for compound **9** but using oxyamine **3** (0.1 g; 0.65 mmol, 1 equiv.) in 65 mL of a mixture H_2O/TFA (99.9/0.1). The expected compound was obtained as a yellow oil. Yield: 12 %; ^{1}H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ 8.27 (t, *J* = 5.7 Hz, 1H, NH), 7.56 (s, 1H, CH), 6.83 (s, 2H, SO_2NH_2), 4.22 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, O-CH_2), 3.18 – 3.08 (m, 2H, CH_2-SO_2NH_2), 3.07 – 2.99 (m, 2H, CH_2-NH), 2.08 – 2.03 (m, *J* = 12.2, 6.5 Hz, 2H, O-CH_2-CH_2), 1.48 – 1.36 (m, 2H, CH_2-CH_2-CH_2), 1.33 – 1.19 (m, 2H, CH_2-CH_3), 0.87 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH_2-CH_3); ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO-d_6) δ 160.83 (NH-C=O), 144.37 (CH=N), 72.35 (O-CH_2), 51.09 (CH_2-SO_2NH_2), 38.19 (CH_2-NH), 30.97 (CH_2-CH_2-CH_2), 23.64 (O-CH_2-CH_2), 19.50 (CH_2-CH_3), 13.60 (CH_2-CH_3); HR-ESI-MS $[M+H]^+$ calculated for $[C_9H_{20}N_3O_4S]^+$: 266.1175, found 266.1176.

General procedure for the synthesis of oxime conjugates 13 and 14. 8 equiv. (per peptide scaffold) of aminooxy compound **3** were added,

Accepted Manuscript

This article is protected by copyright. All rights reserved.

from a 200 mM stock solution in H_2O/DMF (9/1), onto a 1 mM solution of scaffold **11** or **12** in H_2O/TFA (99.9/0.1). The mixture was stirred overnight at room temperature then purified on semi-preparative RP-HPLC using the method B (see general conditions) to afford a white solid after freeze-drying.

Oxime conjugate 13. Yield: 31 %; HPLC: t_R = 9.91 min; MALDI-ToF (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid): calculated for $[C_{64}H_{110}N_{22}O_{26}S_4 + Na]^+$ 1753.66, found 1753.69.

Oxime conjugate 14. Yield: 75 %; HPLC: t_R = 8.23 min; MALDI-ToF (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid): calculated for $[C_{66}H_{114}N_{22}O_{28}S_4 + Na]^+$ 1813.69, found 1813.65.

General procedure for the synthesis of hydrazone conjugates 15 and 16. 8 equiv. (per peptide scaffold) of hydrazide **5** were added, from a 200 mM stock solution in H_2O/DMF (9/1), onto a 1 mM solution of scaffold **11** or **12** in aqueous buffer (100 mM sodium acetate, pH 5.0). The mixture was stirred overnight at room temperature and then purified on semi-preparative RP-HPLC using method A (see general conditions) to afford a white solid after freeze-drying.

Hydrazone conjugate 15. Yield: 35 %; HPLC: t_R = 13.24 min; MALDI-ToF (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid): calculated for $[C_{88}H_{122}N_{26}O_{26}S_4 + Na]^+$ 2109.77, found 2109.81.

Hydrazone conjugate 16. Yield: 61 %; HPLC: t_R = 12.25 min; MALDI-ToF (α-cyano-4-hydroxycinnamic acid): calculated for $[C_{90}H_{126}N_{26}O_{28}S_4 + Na]^+$ 2169.79, found 2169.84.

CA inhibition assay. An Applied Photophysics stopped-flow instrument has been used for assaying the CA catalyzed CO_2 hydration activity. Phenol red (at a concentration of 0.2 mM) has been used as indicator, working at the absorbance maximum of 557 nm, with 20 mM Hepes (pH 7.5) as buffer, and 20 mM Na_2SO4 (for maintaining constant the ionic strength), following the initial rates of the CA-catalyzed CO_2 hydration reaction for a period of 10-100 s. The CO_2 concentrations ranged from 1.7 to 17 mM for the determination of the kinetic parameters and inhibition constants. At maximum the concentrations used in the assay system were: 9.2 nM for hCA I; 7.8 nM for hCA II; 10.2 nM for hCA IX and 14.1 nM for hCA XII. For each inhibitor at least six traces of the initial 5-10% of the reaction have been used for determining the initial velocity.[28] The uncatalyzed rates were determined in the same manner and subtracted from the total observed rates. Stock solutions of inhibitor (0.1 mM) were prepared in distilled-deionized water and dilutions up to 0.01 nM were done thereafter with distilled-deionized water. Inhibitor and enzyme solutions were preincubated together for 15 min - 2 h (or longer, *i.e.*, 4-6 h) at room temperature (at 4°C for the longer incubation periods than 15 min) prior to assay, in order to allow for the formation of the E-I complex. The inhibition constants were obtained by non-linear least-squares methods using PRISM 3, and represent the mean from at least three different determinations.

Acknowledgements

We thank the Ligue contre le Cancer (comité des Pyrénées-Orientales) and the LabEx CheMISyst (ANR-10-LABX-05-01) for funding. N.K. thanks the French Ministère de la Recherche for a doctoral fellowship.

Keywords: multivalency • enzyme inhibition • carbonic anhydrase • bioconjugation

[1] a) E. Mahon, M. Barboiu, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 10590-10599; b) C. Fasting, C. A. Schalley, M. Weber, O. Seitz, S. Hecht, B. Koksch, J. Dernedde, C. Graf, E. W. Knapp, R. Haag, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 10472-10498; c) M. Mammen, S. K. Choi, G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, *37*, 2755-2794.
[2] O. Renaudet, R. Roy, *Chem. Soc. Rev.*, **2013**, *42*, 4507-4844.
[3] N. Kanfar, E. Bartolami, R. Zelli, A. Marra, J.-Y. Winum, S. Ulrich, P. Dumy, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 9894-9906.
[4] a) C. Matassini, C. Parmeggiani, F. Cardona, A. Goti, *Tet. Lett.*, **2016**, *57*, 5407-5415; b) R. Zelli, J.-F. Longevial, P. Dumy, A. Marra, *New J. Chem.*, **2015**, *39*, 5050-5074; c) P. Compain, A. Bodlenner, *ChemBioChem*, **2014**, *15*, 1239-1251; d) S. G. Gouin, *Chem. Eur. J.*, **2014**, *20*, 11616-11628.
[5] C. T. Supuran, *Biochem. J.*, **2016**, *473*, 2020-2032.
[6] V. Alterio, A. Di Fiore, K. D'Ambrosio, C. T. Supuran, G. De Simone, *Chem. Rev.*, **2012**, *112*, 4421-4468.
[7] A. Scozzafava, C. T. Supuran, *Subcell Biochem.*, **2014**, *75*, 349-359.
[8] C. T. Supuran, J. Y. Winum, *Future Medicinal Chemistry*, **2015**, *7*, 1407-1414.
[9] A. Thiry, J. M. Dogne, C. T. Supuran, B. Masereel, *Curr. Pharm. Des.*, **2008**, *14*, 661-671.
[10] A. Casini, F. Abbate, A. Scozzafava, C. T. Supuran, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**, *13*, 2759-2763.
[11] a) N. Krall, F. Pretto, D. Neri, *Chem. Sci.*, **2014**, *5*, 3640-3644; b) F. Buller, M. Steiner, K. Frey, D. Mircsof, J. Scheuermann, M. Kalisch, P. Buhlmann, C. T. Supuran, D. Neri, *ACS Chem. Biol.*, **2011**, *6*, 336-344.
[12] V. M. Krishnamurthy, G. K. Kaufman, A. R. Urbach, I. Gitlin, K. L. Gudiksen, D. B. Weibel, G. M. Whitesides, *Chem. Rev.*, **2008**, *108*, 946-1051.
[13] N. Touisni, N. Kanfar, S. Ulrich, P. Dumy, C. T. Supuran, A. Mehdi, J.-Y. Winum, *Chem. Eur. J.*, **2015**, *21*, 10306-10309.
[14] M. Stiti, A. Cecchi, M. Rami, M. Abdaoui, V. Barragan-Montero, A. Scozzafava, Y. Guari, J. Y. Winum, C. T. Supuran, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 16130-16131.
[15] J. Y. Winum, C. T. Supuran, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2015**, *30*, 321-324.
[16] M. Abellan-Flos, M. Tanc, C. T. Supuran, S. P. Vincent, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, **2016**, *31*, 946-952.
[17] M. Abellán-Flos, M. Tanç, C. T. Supuran, S. P. Vincent, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 7445-7451.
[18] a) F. Carta, S. M. Osman, D. Vullo, A. Gullotto, J. Y. Winum, Z. AlOthman, E. Masini, C. T. Supuran, *J. Med. Chem.*, **2015**, *58*, 4039-4045; b) F. Carta, S. M. Osman, D. Vullo, Z. AlOthman, C. T. Supuran, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 6453-6457.
[19] A.-M. Caminade, A. Ouali, R. Laurent, C.-O. Turrin, J.-P. Majoral, *Chem. Soc. Rev.*, **2015**, *44*, 3890-3899.
[20] S. Ulrich, D. Boturyn, A. Marra, O. Renaudet, P. Dumy, *Chem. Eur. J.*, **2014**, *20*, 34-41.
[21] a) R. Zelli, E. Bartolami, J. F. Longevial, Y. Bessin, P. Dumy, A. Marra, S. Ulrich, *RSC Adv.*, **2016**, *6*, 2210-2216; b) E. Bartolami, Y. Bessin, N. Bettache, M. Gary-Bobo, M. Garcia, P. Dumy, S. Ulrich, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 9427-9438.
[22] a) S. Peluso, T. Ruckle, C. Lehmann, M. Mutter, C. Peggion, M. Crisma, *Chembiochem*, **2001**, *2*, 432-437; b) P. Dumy, I. M. Eggleston, G. Esposito, S. Nicula, M. Mutter, *Biopolymers*, **1996**, *39*, 297-308.
[23] B. Thomas, N. Berthet, J. Garcia, P. Dumy, O. Renaudet, *Chem. Commun.*, **2013**, *49*, 10796-10798.
[24] a) D. Boturyn, E. Defrancq, G. T. Dolphin, J. Garcia, P. Labbe, O. Renaudet, P. Dumy, *J. Peptide Sci.*, **2008**, *14*, 224-240; b) Y. Singh, G. T. Dolphin, J. Razkin, P. Dumy, *ChemBioChem*, **2006**, *7*, 1298-1314.
[25] T. Tsuri, N. Haga, T. Matsui, S. Kamata, H. Kakushi, K. Uchida, *Chem. Pharm. Bull.*, **1992**, *40*, 75-84.
[26] S. Foillard, M. O. Rasmussen, J. Razkin, D. Boturyn, P. Dumy, *J. Org. Chem.*, **2008**, *73*, 983-991.
[27] E. Bartolami, Y. Bessin, V. Gervais, P. Dumy, S. Ulrich, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, 10183-10187.
[28] R. G. Khalifah, *The Journal of Biological Chemistry*, **1971**, *246*, 2561-2573.

Accepted Manuscript

This article is protected by copyright. All rights reserved.

10.1002/chem.201700241

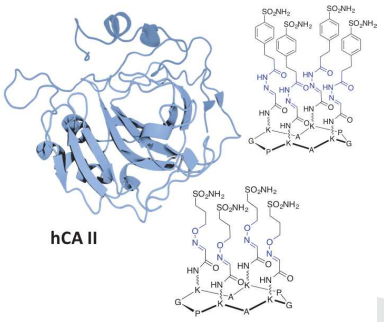
WILEY-VCH

Entry for the Table of Contents (Please choose one layout)

Layout 1:

FULL PAPER

The application of multivalency in enzyme inhibition has been recently exemplified by a few serendipitous discoveries. We report here a straightforward and versatile method that enables the effective construction of multivalent peptide-based systems for the inhibition of carbonic anhydrases. The enzyme inhibition assays show that multivalent effects were present with these novel compounds.



Nasreddine Kanfar, Muhammat Tanc, Pascal Dumy, Claudiu T. Supuran, Sébastien Ulrich and Jean-Yves Winum**

Page No. – Page No.

Effective Access to Multivalent Inhibitors of Carbonic Anhydrases Promoted by Peptide Bioconjugation

WILEY-VCH Accepted Manuscript

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Manuscript Click here to download Manuscript ChemEurJ_2017_Final .docx

WILEY-VCH

COMMUNICATION

Polyhedral oligomeric silsesquioxane (POSS) bearing glyoxylic aldehyde as clickable platform towards multivalent conjugates.

Nasreddine Kanfar,[a] Ahmad Mehdi,[b] Pascal Dumy,[a] Sébastien Ulrich*[a] and Jean-Yves Winum*[a]

Abstract: The straightforward access to octafunctional "cubic" silsesquioxane platform grafter with pendant glyoxylic aldehydes is described. This clickable hybrid platform readily reacts with oxyamine or hydrazide compounds to provide, respectively, oxime and acylhydrazone conjugates, thereby offering a new and effective access from which one can elaborate multivalent systems for the targeting of biomolecules of interest.

Remarkable advances through the development of "chimie douce"[1] has afforded innovative organic-inorganic hybrid nanostructures.[2] In particular, polyhedral oligomeric silsesquioxanes (POSS) are of increasing interest as a platform that can be post-synthetically functionalized in order to introduce the desired chemical moieties for the application pursued. One of the most prevalent and studied nanosized POSS is the well-defined and symmetrical T_8 structure (hexahedral octasilsesquioxane $(RSiO_{1.5})_8$) – abbreviated as COSS for Cubic Octameric SilSesquioxane – which possesses a compact and rigid three-dimensional cage-like structure made of an inorganic silica-like core flanked with eight functionalizable organic groups at the corners.[2-3] POSS have become very popular in material sciences for various applications, for instance as porous materials,[4] ionic liquids,[5] catalysts,[6] nano-reactor,[7] nanocomposites,[2a] and supramolecular self-assemblies.[8] Thanks to their biocompatibility and low toxicity,[9] COSS are also finding increasing applications in biological sciences, for instance in drug delivery,[10] anti-cancer drug,[11] and biomedical imaging.[12] This versatile class of organosilica compounds are indeed of great value as platforms for accessing multivalent conjugates for biomolecular recognition[13] or enzyme inhibition,[14] providing effective synthetic methods afford their complete functionalization.[3]

COSS derivatives bearing reactive functional groups such as amine, azide, vinyl, cyano, halogen have been reported in literature.[2-3] The availability of 3-aminopropyl-functionalized COSS[15] has prompted its functionalization through coupling with carboxylic acids, anhydrides and acyl chlorides.[16] However, these coupling methods have a limited scope due to the lack of chemoselectivity. Therefore, click-type reactions have been recently implemented for the post-synthetic functionalization of COSS.[3, 17] The azido and vinyl derivatives have thus attracted strong interest since ligands can be effectively attached through, respectively, copper-catalyzed azide-alkyne Huisgen cycloaddition and photo-initiated thiol-ene reaction.[18] Hydrazone and oxime ligations have also gained strong interest due to their effectiveness (quantitative yields), chemoselectivity with respect to a variety of functional groups, mild reaction conditions that do not require additional catalysts that may be toxic and difficult to discard, and lack of by-products.[19] COSS bearing aminooxy groups have been recently reported for oxime ligation.[20] However, having pendant amino groups can be detrimental to the stability of the COSS core,[21] thereby reviving interest in the alternative strategy of using COSS appended with aldehyde groups. Up to now, only two examples of COSS bearing aldehyde groups has been reported.[22] However, these COSS derivatives are difficult to isolate and feature aromatic aldehydes which impede water solubility and are not optimal for the stability of hydrazone and oxime conjugates. Herein, we report the effective and straightforward synthesis of a COSS bearing glyoxylic aldehydes – which are known to lead to more stable conjugates[23] – and demonstrate the formation of multivalent conjugates through hydrazone and oxime conjugation (Figure 1).

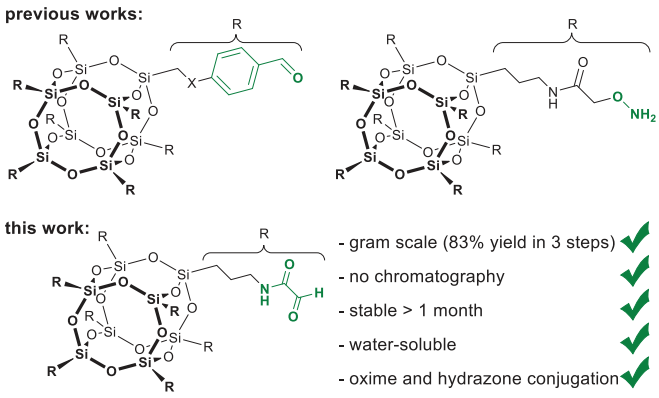


Figure 1. Summary of previously prepared COSS platform prepared for conducting oxime/hydrazone conjugates, and presentation of the platform presented here and its comparative advantages.

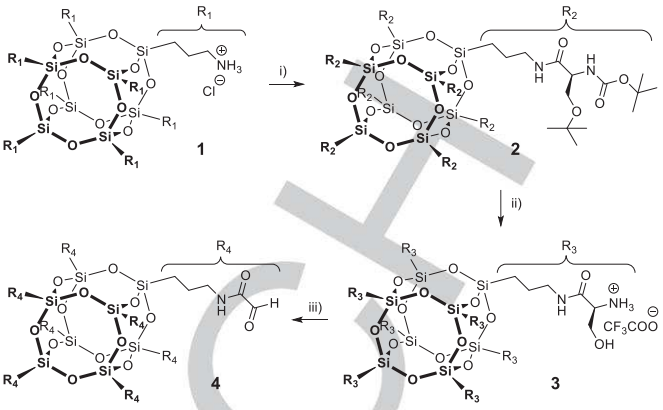
[a] N. Kanfar, Prof. Dr. P. Dumy, Dr. S. Ulrich, Prof. Dr. J.-Y. Winum, Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM) UMR 5247 CNRS, ENSCM, Université de Montpellier, 8 rue de l'Ecole Normale, 34296 Montpellier Cedex (France) E-mail: sebastien.ulrich@enscm.fr, jean-yves.winum@umontpellier.fr

[b] Prof.Dr. Ahmad Mehdi, *Institut Charles Gerhardt (ICGM) UMR 5253 CNRS, ENSCM, Université de Montpellier, Place Eugène Bataillon, 34090 Montpellier - France.*

Supporting information for this article is given via a link at the end of the document.

WILEY-VCH

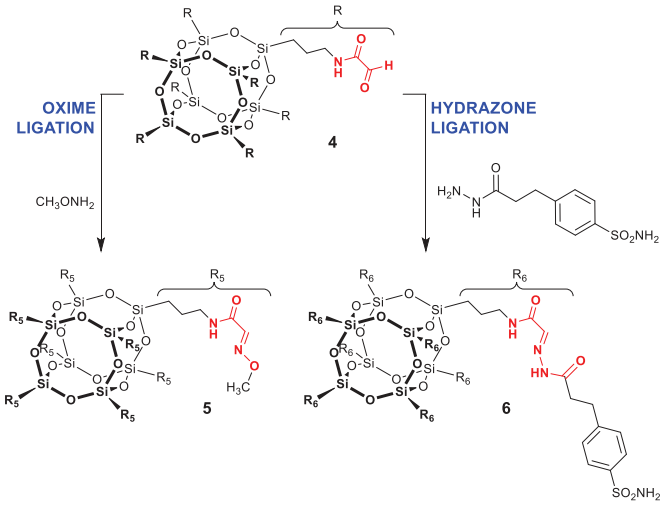
The clickable T_8-silsesquioxane platform functionalized with eight glyoxylic aldehydes **4** was prepared as depicted in scheme 1, starting from the commercially available hydrochloric salt of the 3-aminopropyl substituted silsesquioxane $T_8(CH_2CH_2CH_2NH_3^+Cl^-)_8$ **1**.[15] The peptide coupling with the protected serine Boc-L-Ser(O*t*-Bu)OH, mediated by HBTU as coupling reagent in the presence of diisopropylethylamine (DIEA) as a base, successfully afforded compound **2** in 92% yield after recrystallization. ^{1}H NMR analysis confirms the octa-functionalization of the platform (Figure S1), which is further supported by MALDI-ToF mass spectrometry (Figure S4) and elemental analysis. ^{29}Si NMR showed only one type of silicon nuclei at -66.90 ppm (Figure S3). This chemical shift is characteristic for T substructure[3] and expected for a T_8-POSS unit and therefore indicates that the structure of the platform remains intact. In fact, the absence of resonance near -100 ppm corresponding to Q substructures denotes clearly that there is no cleavage of Si-C bonds during this chemical reaction. The subsequent deprotection of Boc and *t*-Bu groups was carried out in trifluoroacetic acid (TFA)/triisopropyl silane (TIS)/water 95/2.5/2.5, giving after trituration in diethylether compound **3** in 96% yield. The complete deprotection was proved by ^{1}H NMR (Figure S7), MALDI-ToF mass spectrometry (Figure S10) and elemental analysis. ^{29}Si NMR analysis showed a single and sharp peak at -66,33 ppm (Figure S9), which again confirms that no cage opening or rearrangement take place during this step. Finally, the oxidative cleavage of the amino alcohol **3** was carried out in water using a slight excess of $NaIO_4$ (8.8 eq.). The desired T_8-glyoxylic aldehyde **4** was obtained in 94% yield after purification by dialysis (see Supporting Informations). ^{1}H and ^{13}C NMR showed characteristic signals indicating that compound **4** is present exclusively in its hydrated form, respectively at 5.31 ppm (–$CH(OH)_2$) and 86.81 ppm (–$CH(OH)_2$) (Figure S13-S14). ^{29}Si NMR confirmed the integrity of the T_8-POSS core with a single singlet signal observed at -65.41 ppm (Figure S15). For all compounds, Thermogravimetric analysis (TGA) were conducted from 25 °C to 850 °C under air (Figure S6, S12, S18). The progressive weight losses assigned to the decomposition of the organic groups are around 82% for the POSS-(Boc-L-Ser(O*t*-Bu))$_8$ 2, 80% for the POSS-(L-Ser.TFA)$_8$ **3** and 75% for the POSS-$(C(OH)_2)_8$ **4**. These values are very close to the theoretical values of, respectively, 83%, 81% and 76%. IR analysis also showed characteristic absorption band of silsesquioxane cages, in particular the narrow and intense Si–O–Si vibrations which appear at 1111, 1103 and 1088 cm^{-1}, and the Si-C vibrations which appear at 777, 721 and 748 cm^{-1}, respectively for **2**, **3**, and **4** (see Supporting Informations).



Scheme 1. Synthesis of COSS bearing glyoxylic aldehyde 4. i) Boc-L-Ser(O*t*-Bu)OH, HBTU, DIEA, 92%; ii) TFA/TIS/H2O 95/2.5/2.5, 96%; iii) $NaIO_4$, 94%.

Taken together, these results prove the structural integrity of the POSS platform throughout the synthesis, and show that this POSS platform **4** can be obtained in three straightforward synthetic steps, only involving recrystallization and dialysis and no column or HPLC chromatography, in an overall yield of 83% and up to the gram scale. It is also noteworthy to mention that we found compound **4** to be stable, as a solid and even in aqueous solution, for at least a month.

In order to demonstrate the utility of this platform for accessing multivalent conjugates, we carried out oxime and acylhydrazone ligation reactions (Scheme 2). The oxime ligation was carried out in acidic water (H_2O/TFA 99.9/0.1) using methoxyamine (16 eq.) as reactive partner. The acylhydrazone ligation was conducted in acidic buffer (100 mM sodium acetate, pH 5.0) as previously described,[24] using a specific hydrazide (16 eq.) flanked with an aromatic sulphonamide that we recently prepared as carbonic anhydrase inhibitor.[14a] MALDI-ToF mass spectrometry show, in both cases, the complete conjugation of the eight sites (Figures S22 and S26). ^{1}H NMR data show integrals ratio converging toward complete functionalization although slight differences with theoretical values probably indicate that there are still some intermediates as minor products (Figures S19-S23). Satisfyingly, ^{29}Si NMR confirmed the integrity of the T_8-POSS core with single singlets observed at -66.28 ppm for compounds **5** and **6** (Figures S21 and S25). Both multivalent conjugates **5** and **6** could be successfully isolated by precipitation in, respectively, 56% and 14%. Taking into account that eight ligation reactions take place, this amounts to individual yields of, respectively, 93% and 78%.



Scheme 2. Preparation of multivalent conjugates through oxime and acylhydrazone ligation reactions onto the clickable platform **4**. Conditions for oxime ligation: H_2O with 0.1% TFA, for acylhydrazone ligation: acetate buffer (100 mM, pH 5.0).

In conclusion, we reported here the straightforward synthesis in three steps with simple purification that enables the effective preparation, with an overall yield of 83%, of a functionalized T_8-POSS bearing eight reactive glyoxylic aldehyde groups. We demonstrated the structural integrity of the COSS platform throughout the synthesis. All the COSS-based nanostructures were extensively and unambiguously characterized via multinuclear magnetic resonance (^1H, ^{13}C and ^{29}Si NMR), as well as mass spectrometry. Finally, we have shown, as proof-of-principle, that oxime and acylhydrazone ligations reactions can be effectively conducted in order to generate multivalent bioconjugates. The ease of synthesis of this novel clickable platform, coupled with the wide variety and availability of functionalized aminooxy and hydrazide derivatives provide an easy entry to elaborate multivalent systems based on a biocompatible COSS core.

Acknowledgements

We acknowledge La Ligue contre le Cancer (comité des Pyrénées-Orientales) and the LabEx CheMISyst (ANR-10-LABX-05-01) for funding. N.K. thanks the French Ministère de la Recherche for a doctoral fellowship.

Keywords: silsesquioxane • multivalent platform • oxyamine • hydrazone • ligations

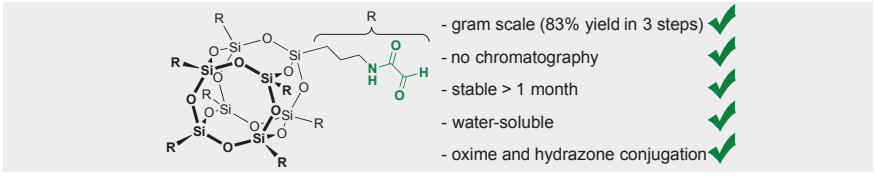
[1] J. Livage, *New J. Chem.*, **2001**, *25*, 1-1.
[2] a) Q. Ye, H. Zhou and J. W. Xu, *Chem. Asian J.*, **2016**, *11*, 1322-1337; b) D. B. Cordes, P. D. Lickiss and F. Rataboul, *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, 2081-2173.
[3] S. Fabritz, S. Horner, O. Avrutina and H. Kolmar, *Org. Biomol. Chem.*, **2013**, *11*, 2224-2236.
[4] P. Sangtrirutnugul, T. Chaiprasert, W. Hunsiri, T. Jitjaroendee, P. Songkhum, K. Laohhasurayotin, T. Osotchan and V. Ervithayasuporn, *ACS Appl. Mater. Interf.*, **2017**, *9*, 12812-12822.
[5] a) T. Ishii, T. Enoki, T. Mizumo, J. Ohshita and Y. Kaneko, *RSC Adv.*, **2015**, *5*, 15226-15232; b) K. Tanaka, F. Ishiguro and Y. Chujo, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 17649-17651.
[6] G. J. Chen, Y. Zhou, X. C. Wang, J. Li, S. Xue, Y. Q. Liu, Q. Wang and J. Wang, *Sci Rep-Uk*, **2015**, *5*, 11236.
[7] M. Bahrami, X. Zhang, M. Ehsani, Y. Jahani and R. M. Laine, *Dalton Trans.*, **2017**, *46*, 8797-8808.
[8] a) D. Voisin, D. Flot, A. Van der Lee, O. J. Dautel and J. J. E. Moreau, *CrystEngComm*, **2017**, *19*, 492-502; b) A. Boullanger, G. Gracy, N. Bibent, S. Devautour-Vinot, S. Clement and A. Mehdi, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2012**, 143-150.
[9] W. H. Siddiqui and R. G. York, *Fundam. Appl. Toxicol.*, **1993**, *21*, 66-70.
[10] a) S. Horner, S. Knauer, C. Uth, M. Jost, V. Schmidts, H. Frauendorf, C. M. Thiele, O. Avrutina and H. Kolmar, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, *55*, 14842-14846; b) C. McCusker, J. B. Carroll and V. M. Rotello, *Chem. Commun.*, **2005**, 996-998.
[11] X. Zhang, Z. Zhang, X. Xu, Y. Li, Y. Li, Y. Jian and Z. Gu, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, 4289-4294.
[12] a) H. Strauch, J. Engelmann, K. Scheffler and H. A. Mayer, *Dalton Trans.*, **2016**, *45*, 15104-15113; b) J. Henig, E. Toth, J. Engelmann, S. Gottschalk and H. A. Mayer, *Inorg. Chem.*, **2010**, *49*, 6124-6138.
[13] a) E. Mahon and M. Barboiu, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 10590-10599; b) C. Fasting, C. A. Schalley, M. Weber, O. Seitz, S. Hecht, B. Koksch, J. Dernedde, C. Graf, E. W. Knapp and R. Haag, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2012**, *51*, 10472-10498; c) M. Mammen, S. K. Choi and G. M. Whitesides, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, *37*, 2755-2794.
[14] a) N. Kanfar, M. Tanc, P. Dumy, C. T. Supuran, S. Ulrich and J. Y. Winum, *Chem. Eur. J.*, **2017**, *23*, 6788-6794; b) N. Kanfar, E. Bartolami, R. Zelli, A. Marra, J.-Y. Winum, S. Ulrich and P. Dumy, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 9894-9906; c) N. Touisni, N. Kanfar, S. Ulrich, P. Dumy, C. T. Supuran, A. Mehdi and J.-Y. Winum, *Chem. Eur. J.*, **2015**, *21*, 10306-10309.
[15] Z. P. Zhang, G. Z. Liang and T. L. Lu, J. *Appl. Polym. Sci.*, **2007**, *103*, 2608-2614.
[16] M. Janeta, L. John, J. Ejfler and S. Szafert, Chem. Eur. J., 2014, 20, 15966-15974.
[17] S. Fabritz, D. Heyl, V. Bagutski, M. Empting, E. Rikowski, H. Frauendorf, I. Balog, W. D. Fessner, J. J. Schneider, O. Avrutina and H. Kolmar, *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, *8*, 2212-2218.
[18] a) M. L. Conte, S. Staderini, A. Chambery, N. Berthet, P. Dumy, O. Renaudet, A. Marra and A. Dondoni, *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, *10*, 3269-3277; b) B. Trastoy, D. A. Bonsor, M. E. Perez-Ojeda, M. L. Jimeno, A. Mendez-Ardoy, J. M. G. Fernandez, E. J. Sundberg and J. L. Chiara, *Adv. Funct. Mat.*, **2012**, *22*, 3191-3201; c) Y. C. Lin and S. W. Kuo, *Polym. Chem.*, **2012**, *3*, 162-171; d) D. Heyl, E. Rikowski, R. C. Hoffmann, J. J. Schneider and W. D. Fessner, *Chem. Eur. J.*, **2010**, *16*, 5544-5548; e) B. Trastoy, M. E. Perez-Ojeda, R. Sastre and J. L. Chiara, *Chem. Eur. J.*, **2010**, *16*, 3833-3841.
[19] a) D. K. Kölmel and E. T. Kool, *Chem. Rev.*, **2017**, DOI: 10.1021/acs.chemrev.1027b00090; b) S. Ulrich, D. Boturyn, A. Marra, O. Renaudet and P. Dumy, *Chem. Eur. J.*, **2014**, *20*, 34-41.
[20] S. Fabritz, S. Horner, D. Konning, M. Empting, M. Reinwarth, C. Dietz, B. Glotzbach, H. Frauendorf, H. Kolmar and O. Avrutina, *Org. Biomol. Chem.*, **2012**, *10*, 6287-6293.
[21] F. J. Feher, K. D. Wyndham, D. Soulivong and F. Nguyen, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **1999**, 1491-1497.
[22] a) S. Chimjarn, R. Kunthom, P. Chancharone, R. Sodkhomkhum, P. Sangtrirutnugul and V. Ervithayasuporn, *Dalton Trans.*, **2015**, *44*, 916-919; b) B. W. Manson, J. J. Morrison, P. I. Coupar, P. A. Jaffres and R. E. Morris, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **2001**, 1123-1127.
[23] O. El-Mahdi and O. Melnyk, *Bioconjugate Chem.*, **2013**, *24*, 735-765.
[24] a) E. Bartolami, Y. Bessin, N. Bettache, M. Gary-Bobo, M. Garcia, P. Dumy and S. Ulrich, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *13*, 9427-9438; b) E. Bartolami, Y. Bessin, V. Gervais, P. Dumy and S. Ulrich, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, 10183-10187.

WILEY-VCH

Entry for the Table of Contents (Please choose one layout)

Layout 2:

COMMUNICATION



Clickable “cubic“ silsesquioxane platform with glyoxylic aldehydes offers effective access to new multivalent systems via chemoselective oxime or hydrazone conjugation.

Nasreddine Kanfar, Ahmad Mehdi, Pascal Dumy, Sébastien Ulrich and Jean-Yves Winum**

Page No. – Page No.

Polyhedral oligomeric silsesquioxane (POSS) bearing glyoxylic aldehyde as clickable platform towards multivalent conjugates.

WILEY-VCH