MASARYKOVA
UNIVERZITA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA

# Nové potenciální inhibitory hCA – Set 1

Diplomová práce

VERONIKA ŠPAČKOVÁ

Vedoucí práce: RNDr. Eva Havránková, Ph.D.

Ústav chemických léčiv
Program Farmacie

Brno 2026

MUNI
PHARM

# Bibliografický záznam

**Autor:** Veronika Špačková
Farmaceutická fakulta
Masarykova univerzita
Ústav chemických léčiv

**Název práce:** Nové potenciální inhibitory hCA – Set 1

**Studijní program:** Farmacie

**Vedoucí práce:** RNDr. Eva Havránková, Ph.D.

**Rok:** 2026

**Počet stran:** 114

**Klíčová slova:** Karboanhydráza IX, isozymová selektivita, 2,4,6-trichlor-1,3,5-triazin, protinádorová léčiva, cílená terapie

# Bibliographic record

**Author:** Veronika Špačková
Faculty of Pharmacy
Masaryk University
Department of Chemical Drugs

**Title of Thesis:** New potential inhibitors of hCA – Set 1

**Degree Programme:** Pharmacy

**Supervisor:** RNDr. Eva Havránková, Ph.D.

**Year:** 2026

**Number of Pages:** 114

**Keywords:** Carbonic anhydrase IX, isozyme selectivity, 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine, anticancer drugs, targeted therapy

# Anotace

Cílem práce je syntéza selektivních inhibitorů karboanhydrázy IX (CA IX), zinkového metaloenzymu regulujícího pH, pro cílenou protinádorovou terapii. Výchozí látkou byl 2,4,6-trichlor-1,3,5-triazin. Teplotně řízenou nukleofilní aromatickou substitucí byly na skelet nejprve navázány vybrané aminy. Následně byly inkorporovány strukturně rozmanité dusíkaté nukleofily. Bylo připraveno 11 monosubstituovaných a 14 nových disubstituovaných derivátů. Struktura a čistota látek byla ověřena prostřednictvím NMR a teplotou tání. Tyto deriváty představují perspektivní kandidáty pro biologické testování inhibiční aktivity vůči lidské CA IX.

# Abstract

This work aims to synthesize selective inhibitors of carbonic anhydrase IX (CA IX) for targeted anticancer therapy. Starting from 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine, temperature-controlled nucleophilic aromatic substitution was used to incorporate selected amines and diverse nitrogen nucleophiles. In total, 11 monosubstituted and 14 novel disubstituted derivatives were prepared. Structure and purity were verified by NMR and melting point analysis. These derivatives represent promising candidates for biological testing of inhibitory activity against human CA IX.

# Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma **Nové potenciální inhibitory hCA – Set 1** zpracovala sama**.** Veškeré prameny a zdroje informací, které jsem použila k sepsání této práce, byly citovány v textu a jsou uvedeny v seznamu použitých pramenů a literatury. Prohlašuji, že jsem nástroje AI (DeepL, Gemini) využila v souladu s pravidly akademické etiky a to pouze k formálním jazykovým úpravám.

V Brně 2. dubna 2026

.....
Veronika Špačková

# Poděkování

Ráda bych poděkovala RNDr. Evě Havránkové, Ph.D., za odborné vedení mé diplomové práce, cenné připomínky k textu a čas věnovaný konzultacím. Rovněž jí děkuji za odborné rady a zkušenosti předané v rámci laboratorní praxe. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a blízkým za podporu po celou dobu studia.

# Obsah

**Seznam obrázků** 13

**Seznam tabulek** 15

**Seznam pojmů a zkratek** 16

**1 Úvod** 19

**2 Teoretická část** 21

2.1 Karboanhydrázy (CA) ..... 21

2.2 Mechanismy inhibice karboanhydráz ..... 30

2.3 Modulace nádorového mikroprostředí prostřednictvím inhibice CA IX ..... 37

2.4 Nové potenciální inhibitory CA IX ..... 40

2.5 Nové netriazinové skelety v designu inhibitorů CA IX ..... 45

**3 Experimentální část** 49

3.1 Cíl práce ..... 49

3.2 Obecné informace ..... 50

3.3 Seznam použitých chemikálií ..... 51

3.4 Syntéza monosubstituovaných derivátů trichlortriazinu ..... 52

3.5 Syntéza disubstituovaných derivátů trichlortriazinu ..... 67

**4 Diskuze** 85

4.1 Syntéza monosubstituovaných derivátů trichlortriazinu ..... 86

4.2 Syntéza disubstituovaných derivátů 2,4,6-trichlor-1,3,5-triazinu ..... 90

**5 Závěr** 93

**Použité zdroje** 95

# Seznam obrázků

Obr. 1: 3D struktura lidského izoenzymu CA II, sloužící jako referenční model pro ...27
Obr. 2: Model znázorňující uspořádání dimeru CA IX na buněčné membráně.....28
Obr. 3: Rovnice popisující katalytický mechanismus. Převzato z: [46] .....30
Obr. 4: Schématické znázornění katalytického mechanismu hydratace $CO_2$ katalyzované α-karboanhydrázami. Převzato z: [46] .....30
Obr. 5: Inhibice CAs zprostředkovaná inhibitory interagující s kovovým iontem ($Zn^{2+}$). Převzato z: [52].....32
Obr. 6: Inhibice CAs zprostředkovaná inhibitory ukotvené k molekule vody/hydroxidu. Převzato z: [52].....33
Obr. 7: Inhibice zprostředkovaná inhibitory blokujícími vstup do aktivního místa. Převzato z: [52] .....34
Obr. 8: Inhibice CAs zprostředkovaná inhibitory vážící se mimo aktivní místo. Převzato z: [52] .....35
Obr. 9: Halogenované deriváty sekundárních a terciárních sulfonamidů. Převzato z: [53] .....36
Obr. 10: Karboanhydráza IX jako spojnice mezi energetickým metabolismem nádoru a regulací pH. Převzato z: [100].....39
Obr. 11: Základní skelet 1,2,3-triazinu, 1,2,4-triazinu a 1,3,5-triazinu, vlastní tvorba41
Obr. 12: Struktura kyanurchloridu (2,4,6-trichlor-1,3,5-triazin), vlastní tvorba .....42
Obr. 13: Struktura SLC-0111, vlastní tvorba .....44
Obr. 14: : Znázornění klíčových vztahů mezi strukturou a aktivitou pro dvojitou inhibici PDGFR a CA IX/XII. Převzato z: [132] .....46
Obr. 15: Struktura sloučenin: 9d - 5-(3-(4-((6,7-dimethoxychinolin-4-yl)amino)-fenyl)ureido)-2-methylbenzensulfonamid; 9f - 4-(3-(4-((6,7-dimethoxychinolin-4-yl)amino)fenyl)ureido)benzensulfonamid; 9h - 4-(2-(3-(4-((6,7-dimethoxychinolin-4-yl)amino)fenyl)ureido)ethyl)benzensulfonamid, vlastní tvorba.....46
Obr. 16: Struktura 4h - (4-(5-chlor-1H-benzoimidazol-2-yl)-N′-(4-(2,4-dimethoxyfenyl)thiazol-2-yl)benzhydrazid), vlastní tvorba.....47
Obr. 17: Struktura derivátů 3-(azepan-1-ylsulfonyl)-N-arylbenzamidu (8, 26), vlastní tvorba.....48
Obr. 18: Schéma syntézy monosubstituovaných derivátů trichlortriazinu , vlastní tvorba.....53
Obr. 19: Derivát 1, vlastní tvorba.....56
Obr. 20: Derivát 2, vlastní tvorba.....57
Obr. 21: Derivát 3, vlastní tvorba.....58
Obr. 22: Derivát 4, vlastní tvorba.....59
Obr. 23: Derivát 5, vlastní tvorba.....60
Obr. 24: Derivát 6, vlastní tvorba.....61
Obr. 25: Derivát 7, vlastní tvorba.....62
Obr. 26: Derivát 8, vlastní tvorba.....63

Obr. 27: Derivát 9, vlastní tvorba....64
Obr. 28: Derivát 10, vlastní tvorba....65
Obr. 29: Derivát 11, vlastní tvorba....66
Obr. 30: Schéma syntézy disubstituovaných derivátů trichlortriazinu, vlastní tvorba ....68
Obr. 31: Derivát 3a, vlastní tvorba....71
Obr. 32: Derivát 3b, vlastní tvorba....72
Obr. 33: Derivát 5c, vlastní tvorba....73
Obr. 34: Derivát 2d, vlastní tvorba....74
Obr. 35: Derivát 10e, vlastní tvorba....75
Obr. 36: Derivát 10f, vlastní tvorba....76
Obr. 37: Derivát 10g, vlastní tvorba....77
Obr. 38: Derivát 10h, vlastní tvorba....78
Obr. 39: Derivát 10i, vlastní tvorba....79
Obr. 40: Derivát 11e, vlastní tvorba....80
Obr. 41: Derivát 11f, vlastní tvorba....81
Obr. 42: Derivát 11g, vlastní tvorba....82
Obr. 43: Derivát 11h, vlastní tvorba....83
Obr. 44: Derivát 11i, vlastní tvorba....84

# Seznam tabulek

Tab. 1: Lokalizace lidských izoforem CA. Převzato z: [30, 36] ..... 25
Tab. 2: Navážky nukleofilů pro přípravu monosubstituovaných 1,3,5-triazinových derivátů ..... 54
Tab. 3: Navážky trichlotriazinu a typy rozpouštědel ..... 55
Tab. 4: Typ báze a její navážky ..... 55
Tab. 5: Kombinace monosubstituovaných derivátů triazinů (meziproduktů) a nových nukleofilů ..... 69
Tab. 6: Navážky nukleofilu pro substituci druhého stupně ..... 69
Tab. 7: Navážky báze ($K_2CO_3$) ..... 70
Tab. 8: Typy mobilních fází použitých při kolonové chromatografii ..... 70
Tab. 9: Výtěžky surových monosubstituovaných produktů ..... 88
Tab. 10: Výtěžky surových disubstituovaných produktů ..... 91

# Seznam pojmů a zkratek

| | |
|---|---|
| $^{13}$C-NMR | uhlíková nukleární magnetická rezonance |
| $^{1}$H-NMR | protonová nukleární magnetická rezonance |
| AG | anchor group/kotevní skupina |
| AMK | aminokyselina |
| Arg | arginin |
| Asn | asparagin |
| BAX | proapoptotický gen |
| BCL-2 | B-cell lymphoma 2/antiapoptotický gen |
| C6 | buněčná linie gliomu |
| CA | karboanhydráza |
| CAIs | inhibitory karboanhydrázy |
| CNS | centrální nervová soustava |
| $CO_2$ | oxid uhličitý |
| Cys | cystein |
| DMF | dimethylformamid |
| DMSO | dimethylsulfoxid |
| EC | Enzyme Commission number/číslo komise pro enzymy |
| Glu | kyselina glutamová |
| GLUT | glukózový transportér |
| Gly | glycin |
| $HCO_3^-$ | hydrogenuhličitanový aniont |
| HIF-1 | hypoxia-inducible factor/hypoxií indukovaný faktor |
| His | histidin |
| HT-29 | buněčná linie lidského kolorektálního karcinomu |
| IC | intracelulární cytosolický segment |
| $IC_{50}$ | poloviční maximální inhibiční koncentrace |

| | |
|---|---|
| $K_i$ | inhibiční konstanta |
| Ki-67 | marker buněčné proliferace |
| L929 | buněčná linie zdravých myších fibroblastů |
| MCF-7 | buněčná linie lidského karcinomu prsu |
| MCT | monokarboxylátový transportér |
| $OH^-$ | hydroxidový aniont |
| PDGFR | platelet-derived growth factor receptor/leukemická kináza |
| PG | proteoglykan |
| Phe | fenylalanin |
| $pH_e$ | extracelulární pH |
| $pH_i$ | intracelulární pH |
| pKa | záporný dekadický logaritmus disociační konstanty kyseliny |
| RT-PCR | reverzní transkripční polymerázová řetězová reakce |
| SAR | studie vztahů mezi strukturou a aktivitou |
| SG | sticky group/lepivá skupina |
| Thr | threonin |
| TLC | tenkovrstevná chromatografie |
| TM | transmembránový segment |
| TRP5 | přechodný receptorový potenciálový kanál 5 |
| Tyr | tyrosin |
| UV | ultrafialové záření |
| ZBG | zinc binding group/zinek vázající skupina |

# 1 Úvod

Nádorová onemocnění představují navzdory medicínskému pokroku jednu z nejvýznamnějších globálních zdravotních výzev. Vzhledem k limitům léčby a časté rezistenci vůči standardní chemoterapii se současný výzkum intenzivně zaměřuje na vývoj cílených terapií. Jedním z nejperspektivnějších cílů tohoto přístupu je transmembránový enzym karboanhydráz IX (CA IX). Tento metaloenzym hraje klíčovou roli v adaptaci solidních nádorů na hypoxii tím, že reguluje buněčné pH. Nádorovým buňkám tak umožňuje přežít v nepříznivém kyselém mikroprostředí a přímo usnadňuje jejich další metastazování. Nadměrná exprese CA IX navíc úzce koreluje s vysokou agresivitou nádoru a horší prognózou pacientů.

Cílená inhibice aktivity CA IX proto představuje vysoce racionální strategii pro vývoj nových protinádorových léčiv, na niž přímo navazuje i předkládaná diplomová práce. Její literární část si klade za cíl poskytnout ucelený přehled o molekulárních mechanismech, strukturních specifikách a farmakologickém potenciálu inhibitorů tohoto enzymu. Praktická část je pak plně věnována experimentální práci – konkrétně racionálnímu designu, syntéze a strukturní charakterizaci série zcela nových sloučenin, které byly navrženy s cílem dosáhnout vysoké inhibiční aktivity a izozymové selektivity právě vůči nádorově asociované CA IX.

# 2 Teoretická část

## 2.1 Karboanhydrázy (CA)

### 2.1.1 Charakteristika a funkce enzymů

Karboanhydráz (uhličité anhydrázy) představují rozsáhlou skupinu metaloenzymů, jejichž charakteristickým znakem je přítomnost jednoho nebo více atomů kovu v aktivním centru, nejčastěji ve formě zinečnatého iontu. Enzymy z rodiny karboanhydráz (CA, EC 4.2.1.1) jsou v přírodě široce rozšířeny a vyskytují se u většiny dosud studovaných živočichů, fotosyntetizujících organismů i u řady bakteriálních kmenů, kde katalyzují reverzibilní hydrataci oxidu uhličitého za vzniku hydrogenuhličitanových iontů a protonů. [1, 2]

Tato katalytická funkce je nezbytná vzhledem k rozdílným fyzikálně-chemickým vlastnostem reaktantů. Zatímco oxid uhličitý ($CO_2$) je lipofilní a může biologickými membránami volně difundovat, hydrogenuhličitanový aniont ($HCO_3^-$) je pro lipidovou dvojvrstvu nepropustný a jeho přesun vyžaduje přítomnost specifických transportních proteinů. [2, 3] Karboanhydrázy urychlením vzájemné přeměny těchto forem (viz rovnice 1) hrají klíčovou roli v transportu $CO_2$ a protonů přes membrány a podílejí se tak na udržování pH homeostázy v intra- i extracelulárním prostoru. [2–6]

$$CO_2 + H_2O \leftrightarrow HCO_3^- + H^+ \quad (1)$$

Z enzymologického hlediska patří karboanhydrázy k nejefektivnějším známým biokatalyzátorům. Ačkoliv reverzibilní hydratace oxidu uhličitého probíhá i spontánně, bez katalytického působení by byla její rychlost pro pokrytí metabolických nároků organismu zcela nedostatečná. [2, 5] To by vedlo k nebezpečné akumulaci plynného $CO_2$ v tkáních, což by mělo za následek závažné narušení acidobazické rovnováhy a poškození buněčného prostředí. [2, 7]

Vzhledem k všudypřítomnosti substrátů karboanhydráz ($CO_2$, $HCO_3^-$ a protonů) jsou tyto enzymy nezbytné pro udržení celkové homeostázy organismu. Podílejí se na širokém spektru fyziologických i patofyziologických procesů, mezi něž patří zejména: [2, 8, 9]

- **respirace a transport krevních plynů** $CO_2$, $HCO_3^-$,
- **regulace pH** v intra- i extracelulárním prostoru,
- **sekrece elektrolytů** v různých tkáních (např. žaludeční sliznice, ledviny, oko),
- **biosyntetické dráhy** vyžadující bikarbonát (glukoneogeneze, lipogeneze, ureogeneze),
- **kostní metabolismus** (resorpce a kalcifikace),
- **patogeneze nádorových onemocnění** (proliferace a metastazování).

Mimo živočišnou říši se karboanhydrázy uplatňují také u rostlin, kde se podílejí na fotosyntetické fixaci $CO_2$, a u prokaryotických organismů, kde zajišťují řadu metabolických procesů včetně degradace kyanátu. [1, 2]

Přestože byly tyto enzymy objeveny před více než 85 lety [4], zájem o jejich studium stále trvá. Důvodem je nejen významný potenciál jejich inhibitorů v medicíně, ale i zajímavý evoluční aspekt. Karboanhydrázy představují významný příklad tzv. konvergentní evoluce, neboť enzymové rodiny bez genetické příbuznosti se vyvinuly ke katalýze téže chemické reakce. [4]

### 2.1.2 Klasifikace karboanhydráz

Přestože všechny karboanhydrázy katalyzují identickou základní reakci, reverzibilní interkonverzi mezi oxidem uhličitým a hydrogenuhličitanem, tvoří několik evolučně nezávislých rodin, které se vyvinuly u organismů napříč celým fylogenetickým stromem. V současné době je známo již osm geneticky odlišných rodin těchto enzymů, které jsou označovány řeckými písmeny (α, β, γ, δ, ζ, η, θ a ι). Tyto třídy se od sebe liší fylogenetickým původem, biologickou distribucí i samotnou architekturou aktivního místa. Zatímco rodiny α až θ patří mezi klasické metaloenzymy, které ve svém aktivním centru využívají ionty kovů (především zinek, ale také kadmium, železo či kobalt), nejnověji objevená rodina ι-CA (iota) představuje unikátní výjimku, neboť ke své katalytické aktivitě žádný kovový kofaktor nepotřebuje. [10, 11]

#### 2.1.2.1 Evoluční rodiny

***Rodina α-karboanhydráz***

Třída α-karboanhydráz zahrnuje všechny izoformy tohoto enzymu, které byly dosud identifikovány v živočišné říši. [12] V současné době je u savců popsáno celkem 16 různých izoforem (izoenzymů) z rodiny α-karboanhydráz, které se navzájem významně liší svou tkáňovou distribucí, buněčnou lokalizací a specifickými biofyzikálními vlastnostmi. [2] U člověka je však tento počet snížen na 15, neboť příslušný gen pro CA XV představuje nefunkční pseudogen. [13] Tři z těchto lidských izoforem (CA VIII, X a XI) navíc v průběhu evoluce ztratily svou katalytickou aktivitu a plní v těle jiné biologické funkce. [2, 14]

Historicky byla první α-karboanhydráza izolována z hovězích erytrocytů. [15, 16] Následné analýzy lidských červených krvinek pomocí elektroforézy vedly k identifikaci tří proteinových frakcí, původně označených jako izoformy A, B a C. [16, 17] Zatímco varianty A a B vykazovaly velmi podobné aminokyselinové složení, izoforma C se zásadně odlišovala unikátní sekvencí a výrazně vyšší katalytickou aktivitou. [16, 18] Později byla zavedena dodnes platná nomenklatura pro lidské izoenzymy CA. V rámci ní bylo zjištěno, že historické izoformy A a B tvoří z chemického hlediska totožný izoenzym, nově označený jako CA I, zatímco izoforma C představuje CA II. [16]

Tato rodina enzymů má klíčový význam v humánní medicíně, neboť řada lidských izoforem představuje atraktivní terapeutické cíle. Vývoj nových, vysoce selektivních inhibitorů směřujících proti konkrétním izoformám by mohl vést k zavedení inovativních léčiv s přesně definovaným mechanismem účinku a minimalizovanými vedlejšími efekty. Lze tak cílit na široké spektrum onemocnění zahrnující glaukom, obezitu, osteoporózu, epilepsii či výškovou nemoc. V poslední době je navíc kladen velký důraz na studium transmembránových izoforem spojených s nádorovým bujením (zejména CA IX). [2, 16, 19, 20]

***Rodina β-karboanhydráz***

První zástupci třídy β byli identifikováni v chloroplastech špenátu a hrachu. [12, 21, 22] Následně byla jejich přítomnost potvrzena u řady dalších vyšších rostlin, a to jak u jednoděložných, tak dvouděložných druhů, včetně rostlin využívajících metabolismus typu C3 i C4. [12, 23] Mimo rostlinnou říši byly β-karboanhydrázy nalezeny také v mitochondriích řas (Chlamydomonas reinhardtii) [12, 24], u kyanobakterií [12, 25] či u bakterií, jako je Escherichia coli, kde je jejich exprese indukována přítomností kyanátu. [12, 26] Analýzy genomu rovněž potvrdily výskyt genu pro β-CA u patogenní bakterie Haemophilus influenzae. [12, 27]

***Rodina γ-karboanhydráz***

Tato třída je typická především pro doménu Archaea. Nejlépe charakterizovaným zástupcem je γ-karboanhydráza izolovaná z metanogenní archebakterie *Methanosarcina thermophila*, u níž je produkce enzymu spojena s růstem na acetátu. [12, 28] Přestože byly homologní sekvence identifikovány i u dalších eubakterií a v genomu modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* [12, 29], funkční význam těchto sekvencí zůstává v mnoha případech předmětem dalšího výzkumu. [12]

#### 2.1.2.2 Izoformy lidských α-karboanhydráz

V současné době je u člověka popsáno 15 izoforem, které se dělí do skupin dle rozdílného umístěním v buněčných strukturách: [2, 16]

1. **Cytosolické:** CA I, CA II, CA III, CA VII a CA XIII [16, 30]
   Tato skupina zahrnuje enzymy volně rozpuštěné v cytoplazmě buněk. Nejrozšířenější a nejvíce prostudovanou izoformou je **CA II**, která se vyznačuje mimořádně vysokým katalytickým číslem a slouží jako fyziologický standard pro studium katalytické efektivity. Ostatní izoformy, jako například CA III, vykazují nižší aktivitu a jejich výskyt je omezen na specifické tkáně. [2, 31]

2. **Membránově vázané:** CA IV, **CA IX**, CA XII, CA XIV a CA XV [16, 30]
Tyto izoformy jsou ukotveny v plazmatické membráně, přičemž jejich katalytické domény jsou orientovány do extracelulárního prostoru. Tato lokalizace jim umožňuje efektivně regulovat pH v bezprostředním okolí buňky. Mezi nejvýznamnější zástupce patří izoformy **CA IX** a **CA XII**, které jsou spojeny s adaptací nádorových buněk na hypoxické podmínky a acidózu mikroprostředí, což z nich činí důležité biomarkery v onkologii. [2, 19]

3. **Mitochondriální**: CA VA a CA VB [16, 30]
Obě izoformy jsou lokalizovány v mitochondriální matrix, kde hrají nezastupitelnou roli v poskytování bikarbonátových iontů pro metabolické dráhy. Podílejí se zejména na regulaci glukoneogeneze, lipogeneze a cyklu močoviny. Jejich absence je spojována s vážnými poruchami metabolismu amoniaku. [2, 32] Je však nutné podotknout, že rozdíly v expresi CA VA a CA VB napříč tkáněmi naznačují jejich mírně odlišné fyziologické role v intermediárním metabolismu, ačkoliv přesné vysvětlení těchto odlišností zůstává předmětem dalšího zkoumání. [2, 33]

4. **Sekretované**: CA VI [16, 30]
Tato karboanhydráza je jedinou známou izoformou, která je aktivně vylučována do exokrinních sekretů, zejména do slin a mateřského mléka. Její přítomnost v dutině ústní je spojována s ochranou zubní skloviny a regulací vnímání chuti. [2, 34]

5. **Akatolytické formy** (CA-RP): CA VIII, CA X, CA XI [2, 35]
Tyto proteiny (označované jako *Carbonic Anhydrase Related Proteins*) postrádají katalytickou aktivitu v důsledku nepřítomnosti jednoho či více histidinových zbytků v aktivním místě, což znemožňuje koordinaci zinečnatého iontu. Přesto hrají důležitou roli v organismu, především při vývoji centrální nervové soustavy a v procesech neurodegenerace. [2, 35]

Kromě rozdílného umístění v buněčných strukturách se jednotlivé izoformy karboanhydráz vyznačují také značnou variabilitou ve své orgánové expresi. Právě specifický výskyt v konkrétních tkáních úzce koreluje s jejich fyziologickou či patologickou rolí v organismu. Detailní přehled tkáňové distribuce lidských izoforem je znázorněn v následující tabulce č.1.

**Tab. 1: Lokalizace lidských izoforem CA. Převzato z: [30, 36]**

| izoforma CA | distribuce v orgánech, tkáních |
|---|---|
| **CA I** | erytrocyty, gastrointestinální trakt, oko |
| **CA II** | erytrocyty, gastrointestinální trakt, oko, Kost – osteoklasty, ledviny, plíce, varlata, mozek |
| **CA III** | kosterní svaly, adipocyty |
| **CA IV** | ledviny, plíce, pankreas, kapiláry mozku, tlusté střevo, srdeční sval, oko |
| **CA VA** | játra |
| **CA VB** | srdce a kosterní svaly, pankreas, ledviny, mícha, gastrointestinální trakt |
| **CA VI** | slinné a mléčné žlázy |
| **CA VII** | CNS |
| **CA VIII** | CNS |
| **CA IX** | nádory a gastrointestinální sliznice |
| **CA X** | CNS |
| **CA XI** | CNS |
| **CA XII** | ledviny, střevo, reprodukční epitel, oko, nádory, CNS |
| **CA XIII** | ledviny, mozek, plíce, střevo a pohlavní orgány |
| **CA XIV** | ledviny, mozek, játra, oko |

### 2.1.3 Struktura lidských karboanhydráz

#### 2.1.3.1 Obecná struktura

Prostorové uspořádání izoenzymů α-karboanhydráz je charakterizováno silně zachovanou terciární strukturou. Molekula enzymu tvoří nepravidelný elipsoid [2, 37], jehož celkovou architekturu lze rozdělit do několika klíčových oblastí. (viz obrázek 1)

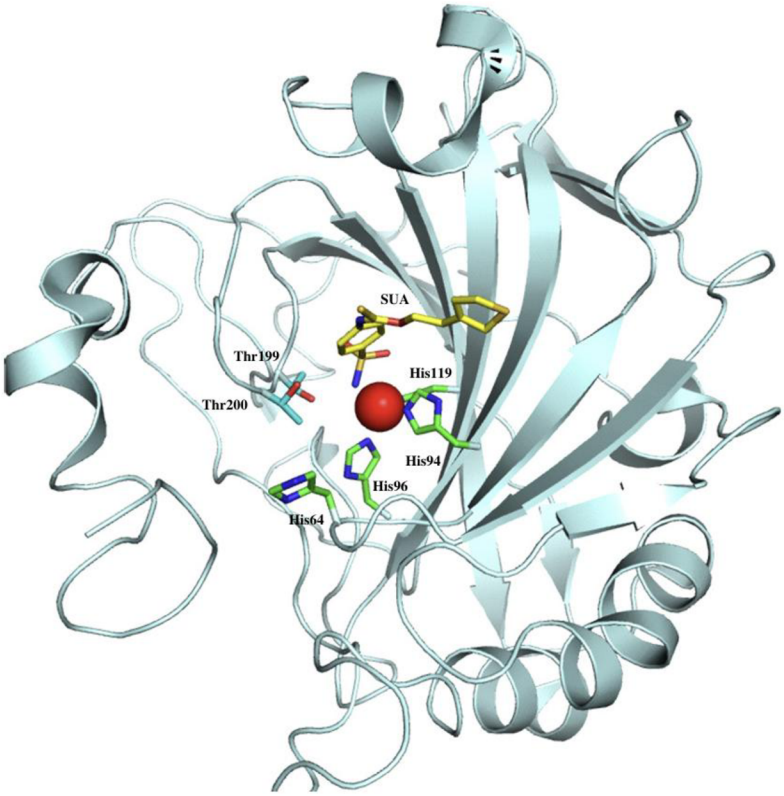
Jádro proteinu tvoří centrální β-skládaný list složený z deseti zkroucených β-vláken (převážně antiparalelních). Povrch molekuly je lemován šesti pravotočivými α-helixy a β-otáčkami [2, 38], které spolu se specifickými seskupeními aromatických reziduí zajišťují kompaktnost a stabilitu proteinu. [2, 38]

Aktivní katalytické centrum je uloženo v hluboké kuželovité dutině, která zasahuje do středu proteinu. Z hlediska fyzikálně-chemických vlastností aminokyselin vykazuje tento prostor výraznou dualitu – je striktně rozčleněn na dvě poloviny. [2, 12]

Jedna strana kavity vykazuje silně hydrofobní charakter. Naproti tomu druhou stěnu lemují polární hydrofilní rezidua. V této hydrofilní oblasti vynikají především zbytky Thr199 a Glu106, jejichž přítomnost je naprosto klíčová pro utváření a stabilizaci sítě vodíkových vazeb. [2, 39]

Na dně aktivního místa je pevně ukotven esenciální zinečnatý kation ($Zn^{2+}$). Ten zde zaujímá tetraedrické uspořádání se třemi histidinovými zbytky (His94, His96, His119) a molekulou vody, která obsazuje pozici čtvrtého ligandu. [2, 39]

Nezbytným předpokladem pro správnou funkci enzymu je strukturní propojení koordinované molekuly vody s hydrofilními zbytky, právě s Thr199 a Glu106. Prostřednictvím sítě vodíkových můstků vzniká funkční komplex ($Zn^{2+}$-$OH^-$/Thr199/Glu106), který efektivně stimuluje odštěpení protonu z molekuly vody. Výsledný hydroxidový ion, vázaný na zinek, nabývá silného nukleofilního charakteru. Ten v dalším kroku atakuje molekulu $CO_2$ lokalizovanou v sousední hydrofobní kapse, což vede k finální přeměně na hydrogenuhličitan. [2, 40]



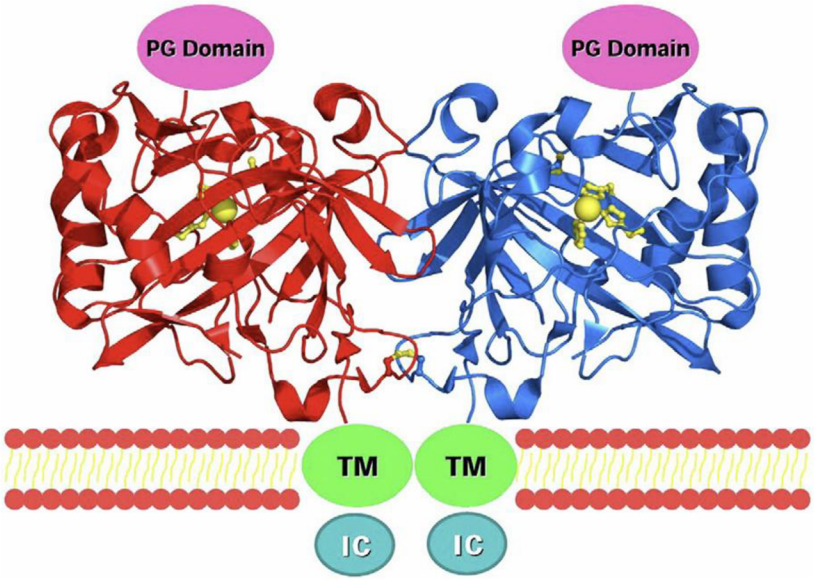

**Obr. 1: 3D struktura lidského izoenzymu CA II, sloužící jako referenční model pro α-karboanhydrázy. Převzato z: [2]**

Centrálně koordinovaný atom zinku je zobrazen jako červená koule. Zbytky His (zeleno-modře) a Thr (modro-červeně) přítomné v kapse aktivního místa jsou znázorněny tyčinkovým modelem. [2]

### 2.1.3.2 Specifika molekulární struktury CA IX

Karboanhydráza IX (CA IX) představuje mezi lidskými izoformami unikátní transmembránový protein, který se od ostatních zástupců α-rodiny odlišuje specifickým doménovým uspořádáním i kvartérní strukturou. Zatímco většina karboanhydráz vykazuje jednodušší stavbu, molekula CA IX je tvořena třemi funkčně odlišnými doménami. [41, 42] (viz obrázek 2)

1) ***Extracelulární doména*** (414 AMK): Nejrozsáhlejší oblast směřující do vnějšího prostředí buňky. Skládá se ze signálního peptidu (37 AMK), unikátní proteoglykanové domény (59 AMK), jež se podílí na buněčné adhezi, a samotné katalytické domény (257 AMK) nesoucí aktivní centrum enzymu.
2) ***Transmembránová doména*** (20 AMK): Hydrofobní α-helix, který kotví protein v lipidové dvouvrstvě.
3) ***Intracelulární doména*** (25 AMK): Krátký řetězec na C-konci zasahující do cytoplazmy, který hraje roli v buněčné signalizaci.




**Obr. 2: Model znázorňující uspořádání dimeru CA IX na buněčné membráně. Převzato z: [37, 41]**

TM=transmembránový segment, IC=intracelulární,cytosolický konec

Z hlediska **kvartérní struktury** se jedná o homodimer [41, 43], jehož monomery jsou k sobě pevně vázány mezimolekulárním disulfidickým můstkem (zprostředkovaným zbytky Cys41) a rozsáhlou sítí nekovalentních interakcí. Toto uspořádání orientuje N- i C-konce obou podjednotek tak, aby bylo zajištěno správné ukotvení proteinu v membráně a plná expozice aktivních center do extracelulárního prostoru. [37, 41]

Na úrovni **terciární struktury** je CA IX stabilizována intramolekulární disulfidickou vazbou (Cys23–Cys203), která přesně fixuje orientaci klíčového hydrofilního zbytku Thr199. [37, 41, 43] Zásadní odlišnost samotného katalytického centra pak představuje přítomnost tří nekonzervovaných bazických zbytků (Arg58, Arg60 a Arg130) lemujících jeho horní okraj. S těmito kladně nabitými argininy funkčně spolupracuje unikátní **proteoglykanová (PG) doména**, která je naopak bohatá na záporně nabité aminokyseliny (zejména kyseliny glutamové a aspartové). Lokalizace PG domény u samého vstupu do aktivního centra naznačuje, že může fungovat nejen jako flexibilní strukturní bariéra regulující přístup substrátu, ale především jako efektivní „rezervoár protonů" usnadňující jejich přenos. Přítomnost PG domény navíc prokazatelně posouvá optimální pKa enzymu z hodnoty 7,01 na 6,49. Tato adaptace umožňuje CA IX zachovat si maximální katalytickou účinnost i při nízkých hodnotách pH, které jsou typické pro kyselé mikroprostředí hypoxických nádorových tkání. Kromě této stěžejní enzymatické podpory má však PG doména i další biologické funkce, neboť se významně podílí na procesech buněčné adheze a mezibuněčné komunikace. [37, 41]

## 2.2 Mechanismy inhibice karboanhydráz

### 2.2.1 Katalytický mechanismus

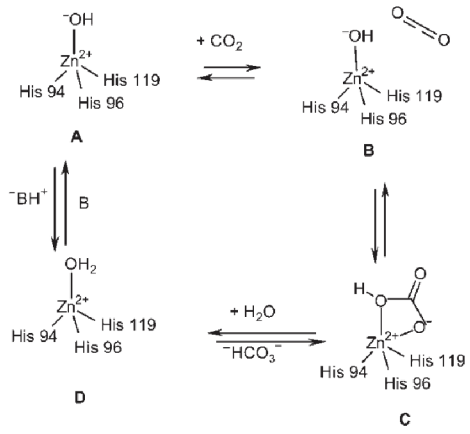
Katalytická aktivita karboanhydráz je striktně závislá na přítomnosti zinečnatého iontu ($Zn^{2+}$), který je lokalizován na dně hluboké dutiny aktivního místa. Zde je koordinován v tetraedrickém uspořádání třemi histidinovými zbytky (His94, His96 a His119) a jednou molekulou rozpouštědla – v závislosti na fázi katalytického cyklu se jedná o molekulu vody, respektive reaktivní hydroxidový ion. [12, 44] Základním předpokladem pro zahájení reakce je právě aktivace této koordinované vody. Vlastní katalýza totiž závisí na dvou klíčových ionizujících skupinách s hodnotou pKa blízkou 7: molekule vody vázanou na kov a reziduu His64. Zatímco pKa volné vody je přibližně 15,7, její koordinace na centrální zinečnatý iont vede k dramatickému poklesu pKa na zmíněnou hodnotu kolem 7. Tento posun umožňuje efektivní deprotonaci a tvorbu reaktivního hydroxidového iontu ($OH^-$) i při fyziologickém pH. [12, 45] Stabilita a správná orientace $OH^-$ je navíc zajištěna sítí vodíkových můstků, kde klíčovou roli hraje hydroxylová skupina Thr199, dále propojená s karboxylovou skupinou Glu106. Tato interakce významně zvyšuje nukleofilní charakter vznikajícího hydroxidu a připravuje enzym na atak substrátu. V momentě deprotonace vody se enzym nachází ve své plně aktivní, tzv. „zásadité formě“. Samotný katalytický mechanismus pak následně probíhá ve dvou oddělených krocích. [46–49] (viz obrázek 3 a 4)

$$EZn^{2+}\text{–}OH^- + CO_2 \Leftrightarrow EZn^{2+}\text{–}HCO_3^-$$

$$\Leftrightarrow EZn^{2+}\text{–}OH_2 + HCO_3^-$$

$$EZn^{2+}\text{–}OH_2 \Leftrightarrow EZn^{2+}\text{–}HO^- + H^+$$

**Obr. 3: Rovnice popisující katalytický mechanismus. Převzato z: [46]**




**Obr. 4: Schématické znázornění katalytického mechanismu hydratace $CO_2$ katalyzované α-karboanhydrázami. Převzato z: [46]**

**Nukleofilní atak a vznik bikarbonátu**

V první fázi katalytického cyklu atakuje hydroxid vázaný na zinek, jakožto silný nukleofil, molekulu $CO_2$ lokalizovanou v hydrofobní kapse aktivního místa. Výsledkem je vznik hydrogenuhličitanového iontu ($HCO_3^-$), který krátce setrvává v koordinační vazbě se $Zn^{2+}$. Následně je však bikarbonát vytěsněn novou molekulou vody a uvolněn do reakčního média. V této fázi se enzym nachází v katalyticky inaktivní, tzv. „kyselé formě“, v níž je na zinek koordinována molekula vody. [46, 49]

**Regenerace enzymu a protonový přenos**

Aby mohl být zahájen nový katalytický cyklus, musí dojít k deprotonaci vody vázané na zinek a návratu do zásadité formy. Tento proces, známý jako přenos protonů, představuje krok limitující rychlost celé katalýzy. Proton je z aktivního místa transportován do okolního prostředí, a to buď prostřednictvím pufračních složek roztoku, nebo pomocí specifických aminokyselinových reziduí, která fungují jako přenašeče. [46, 50]

U vysoce aktivního izoenzymu CA IX je tento proces mimořádně efektivní díky strategicky umístěnému histidinu His64 na vstupu do aktivního místa. Efektivitu odvodu protonů u CA IX navíc zvyšuje shluk histidinových zbytků vyčnívajících k povrchu enzymu. [46, 51]

Díky těmto mechanismům dosahují nejaktivnější izoformy karboanhydráz (z nichž typickým příkladem je ubikvitární CA II) tak vysoké katalytické účinnosti, že je jejich kinetika limitována pouze rychlostí difúze, tedy rychlostí, s jakou substrát $CO_2$ proniká k aktivnímu místu enzymu. [46, 47]

Problematika inhibice karboanhydráz představuje dynamicky se rozvíjející oblast medicinální chemie. Zatímco historicky nejstarší přístupy se soustředily na přímou blokaci katalytického zinečnatého iontu, moderní strategie vývoje léčiv cílí především na překonání vysoké strukturní homologie mezi jednotlivými izoformami. Následující text shrnuje klasifikaci inhibitorů na základě jejich molekulárního mechanismu účinku, od klasických koordinujících látek až po nově popsané mechanismy umožňující cílenou terapii. [52, 53]

### 2.2.2 Inhibitory interagující s kovovým iontem ($Zn^{2+}$)

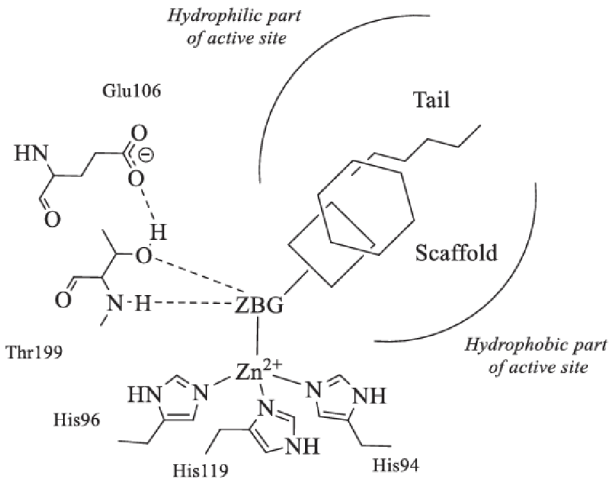
Inhibitory vázající se přímo na zinek (tzv. *zinc binders*) představují nejvýznamnější a historicky nejlépe prozkoumanou skupinu inhibitorů karboanhydráz (CAIs). Jejich mechanismus účinku spočívá v přímé interakci s katalyticky esenciálním iontem $Zn^{2+}$ lokalizovaným na dně v aktivním místě enzymu. Společným strukturním prvkem těchto molekul je přítomnost specifické funkční skupiny, označované jako zinc-binding group (ZBG), která je schopna efektivně koordinovat ion $Zn^{2+}$. [52–55] (viz obrázek 5)

Proces inhibice vyžaduje, aby se inhibitor vázal do aktivního místa ve své deprotonované formě (jako anion). ZBG přímo koordinuje ion $Zn^{2+}$, čímž dochází k vytěsnění

molekuly vody (respektive hydroxidového iontu) z koordinační sféry kovu. Tím je znemožněna tvorba katalyticky aktivního zinečnatého hydroxidu a následná hydratace $CO_2$. Komplex enzym-inhibitor je dále stabilizován sítí vodíkových vazeb s vysoce konzervovanými aminokyselinami aktivního místa, zejména s Thr199 a Glu106. Tato rezidua hrají roli tzv. „strážců" (*gatekeepers*), kteří zajišťují správnou orientaci inhibitoru v dutině aktivního místa. [53–55]

Tento mechanismus je charakteristický především pro primární sulfonamidy ($-SO_2NH_2$) a jejich strukturální analogy, jako jsou sulfamáty a sulfamidy [20, 52] . Do této kategorie však spadají i další chemické třídy, například dithiokarbamáty [52, 56], xantáty [52, 57], karboxyláty [52, 58], fosfonáty [52, 59] a hydroxamáty [52, 60].

Hlavním limitem této skupiny látek je vysoká strukturní podobnost (homologie) aktivních míst u většiny lidských izoforem CA. Tato konzervovaná architektura znemožňuje dosažení dostatečné izoformové selektivity pouze prostřednictvím interakcí v bezprostřední blízkosti zinku. [20, 53, 54] Moderní strategie proto využívají modifikace základního skeletu inhibitoru, jako je například přístup s ocasem (*tail approach*). Tato metoda spočívá v připojení variabilních postranních řetězců, které interagují s méně konzervovanými aminokyselinami ve střední části a u vstupu do katalytické dutiny. [20, 53, 54, 61] Tímto způsobem lze cíleně zvýšit afinitu ke specifickým izoformám, zejména k nádorově asociovaným CA IX a XII, a minimalizovat tak nežádoucí inhibici ubikvitární izoformy CA II. [53, 62]




**Obr. 5: Inhibice CAs zprostředkovaná inhibitory interagující s kovovým iontem ($Zn^{2+}$). Převzato z: [52]**

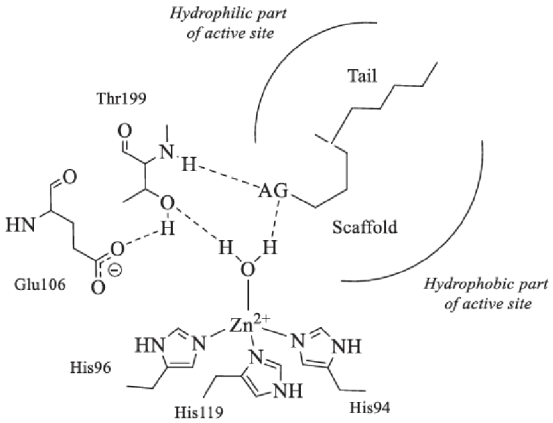
### 2.2.3 Inhibitory ukotvené k molekule vody/hydroxidu

Specifickou podskupinu inhibitorů představují látky, které neinteragují přímo s centrálním kovovým iontem, ale jejichž vazba je zprostředkována molekulou rozpouštědla (vodou nebo hydroxidovým aniontem) v koordinační sféře zinku. Charakteristickým rysem těchto molekul je přítomnost tzv. kotvící skupiny (AG-*anchor group*), která umožňuje tvorbu sítě vodíkových můstků s molekulou vody nebo hydroxidovým iontem koordinovaným k iontu zinku v aktivním místě enzymu. [36, 52–54] (obrázek 6)

Tímto mechanismem dochází ke stabilizaci enzymu v neaktivním stavu, aniž by došlo k přímému vytěsnění vody z aktivního místa. Výsledkem této interakce je narušení optimální prostorové orientace a reaktivity nukleofilního hydroxidu, což vede k efektivnímu zablokování katalytického cyklu.

Z hlediska strukturního designu jsou tyto inhibitory tvořeny třemi skupinami: **kotvící skupinou (AG)** – zajišťující klíčovou interakci s vodou/hydroxidem vázaným na zinek, **molekulovým skeletem** - může nabývat různého chemického charakteru (aromatický, alifatický, heterocyklický či sacharidový) a případnými **postranními řetězci („tails“)** – tyto volitelné substituce směřují do méně konzervovaných oblastí aktivního místa, čímž významně přispívají k izoformové selektivitě (např. vůči CA IX). [52, 53]

Tento inhibiční mechanismus byl primárně objasněn u fenolů [63], avšak pozdější rentgenostrukturní analýzy potvrdily analogický způsob vazby i u polyaminů [64], thioxokumarinů [65] a katecholů [66]. Specifický případ představují sulfokumariny, které se vážou až po hydrolýze na odpovídající sulfonáty [67]. U nově syntetizovaných derivátů, jako jsou benzoxafosfepin-2-oxidy („fosfokumariny“) [68] či 1,2,3-benzoxathiazin-2,2-dioxidy („aza-sulfokumariny“) [69], se předpokládá shodný mechanismus účinku, ačkoliv přímý krystalografický důkaz pro tyto nové skupiny látek v současné době (dle dostupné literatury) zatím chybí. [52]




**Obr. 6: Inhibice CAs zprostředkovaná inhibitory ukotvené k molekule vody/hydroxidu. Převzato z: [52]**

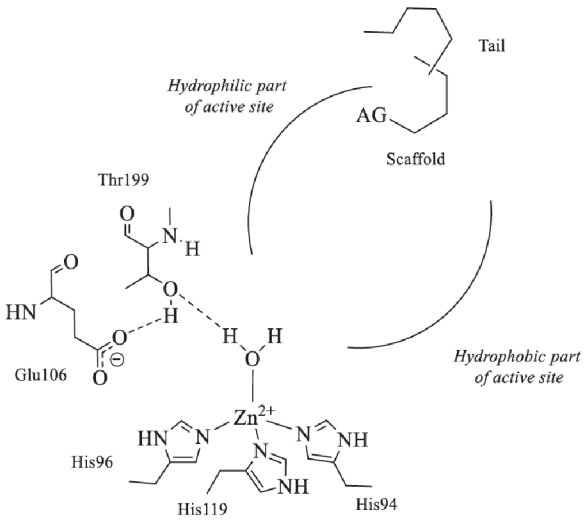
### 2.2.4 Sloučeniny blokující vstup do aktivního místa

Zcela odlišnou strategii v designu inhibitorů představují látky, které necílí na konzervované dno katalytické dutiny, ale vážou se v oblasti jejího vstupu. Tato povrchová část enzymu vykazuje u lidských α-CA nejvyšší variabilitu v aminokyselinové sekvenci, což z ní činí ideální cíl pro vývoj izoformově selektivních léčiv. [53, 70] (viz obrázek 7)

Tento mechanismus je typický pro kumariny a strukturálně příbuzné mono- a bicyklické laktony, které působí jako tzv. „suicide" (sebevražedné) inhibitory, respektive proléčiva (prodrug). Samotný proces začíná vstupem molekuly do aktivního místa, kde dochází k enzymatické hydrolýze jejího laktonového kruhu. Teprve tento hydrolyzovaný produkt - v případě kumarinů se jedná o stechiometricky odpovídající množství derivátu kyseliny cis-2-hydroxy-skořicové, u jiných laktonů o alifatické hydroxykyseliny – představuje skutečný inhibitor. [52, 71]

Zásadním zjištěním, které odlišuje tento mechanismus od klasických sulfonamidů, je způsob vazby vzniklého produktu. Kyselina *cis*-2-hydroxy-skořicová se orientuje do extended (rozvinuté) konformace a váže se na okraj aktivního místa (*active site entrance*), čímž jej fyzicky „ucpe" a stericky zamezí přístupu substrátu ($CO_2$). Krystalografické analýzy potvrdily, že tento inhibitor neinteraguje s centrálním iontem zinku a nachází se v dostatečné vzdálenosti od něj. Stabilizace komplexu enzym-inhibitor je zajištěna interakcemi s aminokyselinovými zbytky na vstupu do dutiny (u CA II byla popsána například interakce typu edge-to-face s Phe131). [71]

Právě skutečnost, že se tyto látky vážou v nejvíce variabilní části enzymu a nevyžadují koordinaci na konzervovaný zinek, vysvětluje jejich mimořádnou selektivitu vůči nádorově asociovaným izoformám (CA IX a XII), zatímco cytosolické formy (CA I a II) jsou jimi inhibovány v mnohem menší míře. [53, 71, 72]




**Obr. 7: Inhibice zprostředkovaná inhibitory blokujícími vstup do aktivního místa. Převzato z: [52]**

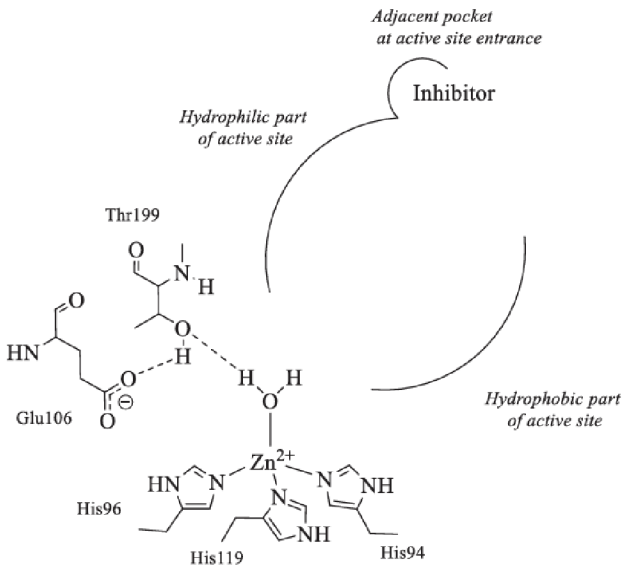
### 2.2.5 Inhibitory vážící se mimo aktivní místo

Zcela nový pohled na možnosti inhibice karboanhydráz přinesly studie popisující látky, které se nevážou přímo do katalytického centra, ale obsazují specifické kapsy na povrchu enzymu. Tento mechanismus byl prokázán rentgenostrukturní analýzou u kyseliny 2-(benzylsulfinyl)benzoové. [52, 53, 73] (viz obrázek 8)

Na rozdíl od klasických inhibitorů tato sloučenina neinteraguje s centrálním iontem zinku a dokonce ani nevytěsňuje molekulu vody (resp. hydroxid) z jeho koordinační sféry. Místo toho se váže do hydrofobní kapsy, která sousedí se vstupem do aktivního místa (*out of the active site pocket*). Tato kapsa je definována především aminokyselinovými zbytky Gly6, Tyr7, Gly8, Asn11, His64, Phe231, Asn232 a Glu239. [53, 73]

Podstata inhibičního účinku spočívá v narušení funkce histidinu 64 (His64), který u izoforem s vysokou katalytickou aktivitou (jako jsou CA II nebo CA IX) funguje jako „přenašeč protonů“ (*proton shuttle*). Aby enzym mohl efektivně pracovat, musí His64 oscilovat mezi polohou „in“ (směrem k zinku) a „out“ (směrem ven). [53, 73]

Inhibitor prostřednictvím sítě vodíkových vazeb a hydrofobních interakcí fixuje His64 v konformaci „out“ (směrem k povrchu). Tímto "uzamčením" protonového přenašeče dochází k zablokování kroku, který limituje rychlost celé reakce – tedy přenosu protonu z aktivního místa do okolního prostředí. Ačkoliv tedy katalytické centrum zůstává teoreticky přístupné pro substrát, enzym není schopen regenerovat svou aktivní formu a katalytický cyklus se zastaví. [53, 73]



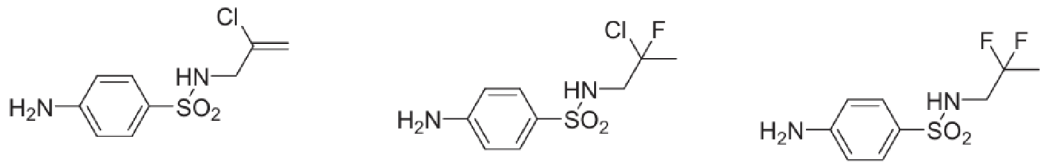

**Obr. 8: Inhibice CAs zprostředkovaná inhibitory vážící se mimo aktivní místo. Převzato z: [52]**

### 2.2.6 Inhibitory CA s neznámým mechanismem účinku

Zatímco mechanismus klasických inhibitorů karboanhydráz (CA) je detailně znám, u rostoucí skupiny nových látek zůstává neobjasněn. Chybí totiž krystalografická data komplexu, což je často způsobeno špatnou rozpustností těchto nově zkoumaných derivátů. [53, 74, 75]

Z pohledu vývoje protinádorových léčiv a cílení na izoformu CA IX je tato skupina látek mimořádně atraktivní. Typickými zástupci jsou objemné sekundární a terciární sulfonamidy (a příbuzné sulfamáty či sulfamidy). Tyto molekuly představují z chemického hlediska paradox – na rozdíl od klasických primárních sulfonamidů nesou na atomu dusíku objemné substituenty. Vzhledem k těmto sterickým nárokům a omezenému prostoru na dně aktivního místa enzymu je vysoce nepravděpodobné, že by mohly přímo koordinovat katalytický iont zinku. [53, 70, 74, 75] Předpokládá se proto, že by tyto látky mohly interagovat u samotného vstupu do enzymové kavity (obdobně jako kumariny), nicméně pro definitivní potvrzení této hypotézy chybí strukturní důkazy. [53, 72]

Zásadním objevem byla syntéza halogenovaných sekundárních a terciárních sulfonamidů (obrázek 9), připravovaných metodami superkyselinové chemie. Tyto látky prokázaly v *in vitro* studiích pozoruhodnou selektivitu právě vůči nádorovým izoformám CA IX a CA XII, zatímco jejich afinita k běžným cytosolickým formám (CA I a II) zůstala minimální. [53, 74, 75]




**Obr. 9: Halogenované deriváty sekundárních a terciárních sulfonamidů. Převzato z: [53]**

Další nadějnou skupinou pro inhibici CA IX jsou deriváty terciárních sulfonamidů odvozené od acesulfamu či probenecidu, u nichž byla karboxylová skupina modifikována různými alifatickými, aromatickými nebo aminokyselinovými zbytky. I u těchto látek byla pozorována významná inhibice CA IX, ačkoliv její přesný mechanismus teprve čeká na objasnění. [53, 76, 77]

Pro úplnost lze uvést, že efektivní nanomolární inhibiční aktivita (zahrnující i vliv na CA IX) byla naměřena rovněž u látek z naprosto odlišných strukturních tříd, jako jsou klinicky využívané inhibitory proteinkináz (imatinib, nilotinib) nebo deriváty fullerenů. Výzkum molekul s tímto atypickým a dosud neprobádaným vazebným mechanismem tak představuje velmi perspektivní cestu pro vývoj nových, vysoce selektivních inhibitorů nádorové CA IX. [53, 78, 79]

## 2.3 Modulace nádorového mikroprostředí prostřednictvím inhibice CA IX

### 2.3.1 Inverze pH gradientu

Pro pokrytí vysokých nároků na anabolické procesy, zahrnující biosyntézu proteinů, lipidů a nukleotidů, využívají maligní nádory specifickou přestavbu buněčného metabolismu. [80, 81] Tento posun v metabolismu glukózy byl poprvé popsán Ottem Warburgem, který pozoroval, že nádorové buňky i za přítomnosti kyslíku preferují energeticky méně efektivní laktátovou fermentaci před oxidativní fosforylací. [80, 82] Tento fenomén, dnes známý jako Warburgův efekt (nebo aerobní glykolýza), umožňuje nádorovým buňkám hromadit glykolytické meziprodukty potřebné pro rychlou proliferaci. [80]

Nevyhnutelným důsledkem tohoto metabolického obratu je však masivní nadprodukce laktátu a protonů ($H^+$). Aby nádorové buňky zabránily letálnímu okyselení vlastního vnitřního prostředí, aktivují transportní mechanismy pro export kyselin do okolí. Výsledkem je nastolení specifické protonové homeostázy, v odborné literatuře popisované jako inverze pH gradientu. [80]

Zatímco za fyziologických podmínek je extracelulární pH udržováno v mírně alkalických hodnotách (pH 7,3–7,4) a cytosol zůstává neutrální (pH 7,2) [80, 83], u nádorových buněk dochází k obrácení tohoto poměru. Nádory se stávají závislými na udržování acidifikovaného extracelulárního prostoru (pH 6,8) při současné alkalizaci cytosolu (pH v rozmezí 7,2–7,6). [80, 84, 85]

Udržování alkalického intracelulárního pH poskytuje nádorovým buňkám zásadní adaptační výhodu. Bylo prokázáno, že vyšší $pH_i$ přímo koreluje s maximalizací buněčné proliferace, zvýšeným příjmem glukózy a sníženou spotřebou kyslíku. [80, 86] Naopak acidifikace cytosolu by vedla ke zpomalení růstu a aktivaci programované buněčné smrti. Alkalické vnitřní prostředí tedy slouží jako klíčový mechanismus zajišťující rezistenci k apoptóze. [80, 86, 87]

Kromě výhod spojených s alkalickým cytosolem přináší inverze pH gradientu nádoru také zásadní benefity prostřednictvím extracelulární acidifikace. Kyselé extracelulární prostředí (nízké $pH_e$) poskytuje nádorovým buňkám znatelnou evoluční a kompetiční výhodu. Zvýšená kyselost omezuje růst okolních zdravých buněk, čímž nádor získává více prostoru a živin pro svou expanzi. Dále kyselé mikroprostředí tlumí protinádorovou imunitní odpověď a přímo podporuje invazivitu a metastazování. [88, 89] Významným klinickým důsledkem je také fakt, že nízké extracelulární pH ionizuje slabě bazická chemoterapeutika, což výrazně omezuje jejich prostup přes buněčné membrány a přispívá k lékové rezistenci nádorů. [88, 90]

V kontextu současné onkologie se proto tato dysregulace pH nepovažuje pouze za vedlejší projev pokročilé rakoviny, ale je naopak vnímána jako jeden z úplně prvních kroků, které vůbec umožňují vznik a agresivní rozvoj nádoru. [88]

### 2.3.2 Role CA IX (molekulární mechanismus acidifikace zprostředkovaný CA IX)

Rychlý růst solidních nádorů je často doprovázen vznikem oblastí s kritickým nedostatkem kyslíku. [91, 92] Hypoxie představuje pro nádorovou buňku výrazný stresový faktor, který spouští kaskádu buněčných adaptačních mechanismů. Klíčovou roli v tomto procesu hrají hypoxií indukované faktory (HIF, především komplex HIF-1), které fungují jako hlavní regulátory buněčné odpovědi na hypoxický stres. [92, 93] Při poklesu hladiny kyslíku dochází ke stabilizaci komplexu HIF-1 a k jeho translokaci do buněčného jádra. [92, 94] Zde působí jako transkripční faktor a spouští expresi velkého množství genů, které pomáhají nádorovým buňkám přežít, proliferovat a migrovat. [92, 95]

Jedním z hlavních genů, jehož exprese je v tomto prostředí masivně indukována, je gen kódující izoformu karboanhydrázy IX. Její přítomnost na membráně je tedy přímou součástí adaptační odpovědi nádoru na hypoxii. [92, 93, 96] Klinické studie prokazují, že nadměrná exprese CA IX v hypoxických nádorech přímo koreluje s celkově špatnou prognózou pacientů. Její přítomnost je spojena nejen s agresivnějším fenotypem a vyšším metastatickým potenciálem, ale především s výraznou rezistencí vůči klasické chemoterapii i radioterapii. [97]

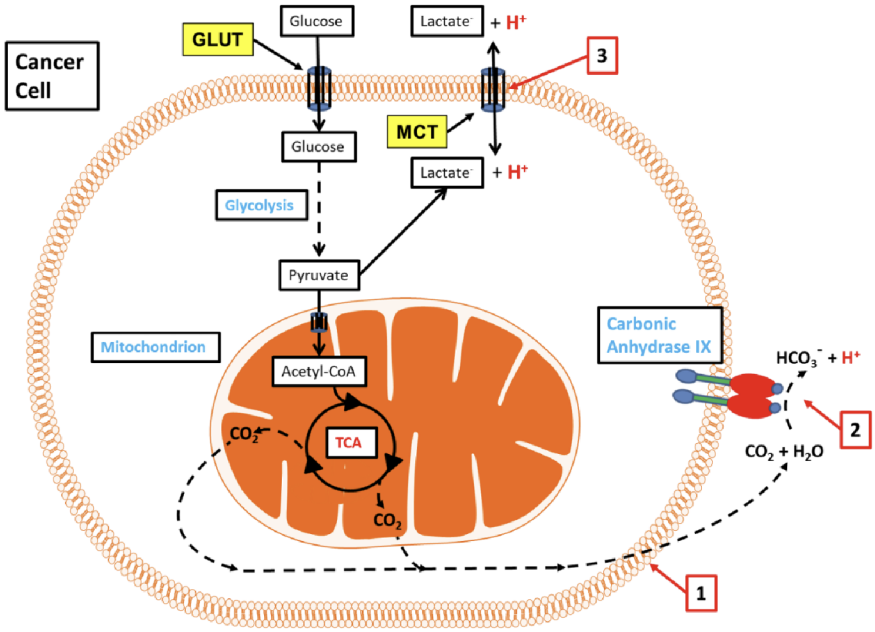
V hypoxickém prostředí jsou nádorové buňky nuceny spoléhat na glykolytický metabolismus, což vede k nadměrné produkci laktátu, oxidu uhličitého a protonů. Aby buňka předešla letálnímu hromadění těchto kyselých metabolitů v cytosolu, využívá k účinné regulaci pH právě enzym CA IX. [92, 98] Z hlediska struktury se jedná o transmembránový protein, jehož aktivní katalytická doména je orientována exofaciálně – směrem do extracelulárního prostoru. Díky tomuto prostorovému uspořádání funguje CA IX jako hlavní regulační prvek acidobazické rovnováhy v okolí nádoru. [92, 99] (viz obrázek 10)

Lipofilní oxid uhličitý ($CO_2$), vznikající jako odpadní produkt metabolismu, volně difunduje přes plazmatickou membránu ven z buňky. Jakmile se ocitne na jejím vnějším povrchu, je okamžitě zachycen extracelulární doménou CA IX a hydratován. Díky exofaciální lokalizaci této reakce dochází k okamžité prostorové separaci vzniklých iontů. [100]

Vzniklé protony ($H^+$) jsou uvolňovány přímo do vnějšího prostředí, kde zůstávají a lokálně ho okyselují – **extracelulární acidifikace**. Naopak hydrogenuhličitanové anionty ($HCO_3^-$) jsou obratem importovány zpět do cytosolu prostřednictvím specifických membránových transportérů (např. $Na^+/HCO_3^-$ kotransportérů a aniontových výměníků). Uvnitř buňky pak přispívají k pufrování intracelulárního prostoru a udržují bezpečné, mírně zásadité pH – **intracelulární alkalizace.** [100]

Kyselé extracelulární prostředí, kontinuálně generované činností CA IX, má zásadní dopad na progresi onemocnění. Nízké pH totiž slouží jako spouštěč pro aktivaci různých proteáz (např. lysozomálních katepsinů). Tyto enzymy následně degradují proteiny extracelulární matrix, čímž narušují okolní tkáň a umožňují nádorovým

buňkám lokální invazi. Tento mechanismus představuje první a nezbytný krok k šíření nádoru a tvorbě vzdálených metastáz. [100–103]




**Obr. 10: Karboanhydráza IX jako spojnice mezi energetickým metabolismem nádoru a regulací pH. Převzato z: [100]**

GLUT – glukózový transportér; MCT – monokarboxylátový transportér

1. Hlavní vedlejší produkt oxidačního energetického metabolismu, $CO_2$, difunduje přes lipidovou dvojvrstvu buněčné membrány do extracelulárního prostoru po svém koncentracím odpovídajícím gradientu.
2. Na extracelulární straně buněčné membrány katalyzuje exofaciální katalytická doména CA IX hydrataci $CO_2$ za vzniku $H^+$ a $HCO_3^-$.
3. Současně laktát, konečný produkt glykolýzy, opouští buňku prostřednictvím monokarboxylátového transportéru rychlostí, která je ovlivněna pH gradientem přes buněčnou membránu (gradient $pH_i$–$pH_e$).

## 2.4 Nové potenciální inhibitory CA IX

Inhibitory karboanhydráz (CAI) jsou v klinické praxi dlouhodobě využívány především jako diuretika a antiglaukomatika. Nedávné výzkumy však ukázaly, že farmakologický potenciál těchto látek je mnohem širší a zahrnuje i vývoj nových antiobezitik, antiinfektiv a zejména protinádorových léčiv. [104] Jak bylo popsáno v předchozích kapitolách, izoforma CA IX představuje klíčový marker a terapeutický cíl u mnoha typů hypoxických solidních nádorů. Cílená inhibice její katalytické aktivity dokáže účinně zvrátit procesy spojené s progresí onemocnění, jako je okyselování extracelulárního mikroprostředí, růst primárního nádoru, rozvoj chemorezistence a tvorba metastáz. Kromě terapeutického využití nacházejí specifické inhibitory CA IX uplatnění také v neinvazivním diagnostickém zobrazování hypoxických nádorů. [54, 104]

Zásadní překážkou při racionálním návrhu nových léčiv je však dosažení požadované izoformní selektivity. Dosud žádný z klasických, klinicky využívaných inhibitorů nevykazuje specifickou selektivitu vůči nádorově asociované CA IX. Tyto látky běžně inhibují i všudypřítomné cytosolické izoenzymy (zejména CA I a CA II), což by v onkologické léčbě vedlo k riziku závažných systémových vedlejších účinků. [54, 104] Vývoj zcela nových izoformně selektivních molekul je tak naprosto nezbytný pro získání bezpečných léčiv bez těchto nežádoucích účinků.

Významný milník ve vývoji selektivních inhibitorů zacílených na CA IX přineslo vyřešení rentgenové krystalografické struktury její katalytické domény, kterou v roce 2009 publikovala skupina G. De Simoneho. Znalost [105] přesné 3D struktury umožnila detailní zmapování strukturních podobností a rozdílů v architektuře aktivního místa mezi CA IX a ostatními členy této enzymové rodiny. Tento objev zásadně urychlil racionální design struktury potenciálních inhibitorů a brzy vedl k identifikaci vysoce selektivních inhibitorů napříč různými chemickými třídami, jako jsou sulfonamidy, sulfamáty, sulfamidy, kumariny či polyaminy. [105] Přestože bylo v literatuře následně popsáno obrovské množství vysoce účinných inhibitorů na bázi sulfonamidů, sulfamátů a sulfamidů, pouze zlomek z nich vykazuje klinicky přijatelnou míru selektivity vůči transmembránové CA IX oproti cytosolickým izoenzymům CA I a CA II. [104, 106]

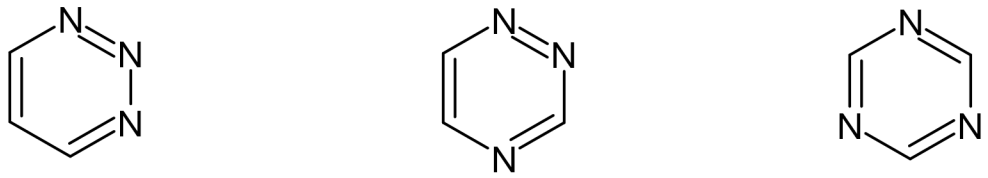
### 2.4.1 Triazinový skelet („tail approach“)

Během uplynulých deseti let se nejefektivnější metodou při vývoji izoformě specifických inhibitorů karboanhydrázy (CAI) stal tzv. přístup připojeného ocásku („tail approach“). [107] Základním principem tohoto racionálního návrhu léčiv je propojení zinkovazebného jádra (představujícího „hlavu“ molekuly) s vhodným periferním motivem (tzv. „ocasem“). [61, 107–109] Aplikace této metody vedla v nedávné době k syntéze širokého spektra vysoce aktivních látek, mezi něž patří nejen inovativní sulfonamidové deriváty, ale i neklasické inhibitory odvozené od karboxylových kyselin a jejich esterů. [107]

Efektivita této strategie spočívá v prodloužené struktuře inhibitorů. Zatímco vazebná „hlava“ blokuje katalytické centrum na dně kavity, objemný „ocas“ interaguje s variabilními aminokyselinami přítomnými na vnější-střední oblasti a na okraji kavity aktivního místa, což jsou oblasti s nejvyšší variabilitou mezi jednotlivými izoformami karboanhydrázy. [61, 107–109] Tím je dosaženo vysoké selektivity vůči nádorové izoformě CA IX a minimalizace nežádoucích účinků spojených s inhibicí běžných cytosolických izoforem. [107]

Aby však tento modulární design fungoval optimálně, je naprosto nezbytné zvolit odpovídající centrální skelet (scaffold), jenž zajistí správné prostorové nasměrování obou klíčových částí molekuly. Jako vysoce perspektivní se v tomto ohledu ukazuje právě využití 1,3,5-triazinového jádra.

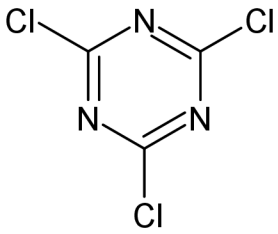
Z chemického hlediska představují triaziny šestičlenné heteroaromatické sloučeniny, jejichž cyklus je tvořen třemi atomy uhlíku a třemi atomy dusíku. Z možných izomerních forem znázorněných na obrázku 11, je právě symetrický 1,3,5-triazin historicky nejstarším a nejdetailněji prozkoumaným zástupcem. [110] Jeho deriváty nacházejí velmi široké uplatnění nejen v průmyslových aplikacích, ale představují především atraktivní farmakofor v medicinální chemii. [110–112] Odborná literatura u těchto látek popisuje mimořádně pestrou a multidimenzionální škálu biologických účinků. Zahrnuje mimo jiné aktivitu antibakteriální [110, 113], antifungální [110, 114], antivirotickou (včetně anti-HIV) [110, 115], antimalarickou [110, 116], herbicidní [110, 117] a v neposlední řadě také významnou aktivitu protinádorovou. [110, 118]



**Obr. 11: Základní skelet 1,2,3-triazinu, 1,2,4-triazinu a 1,3,5-triazinu, vlastní tvorba**

Klíčovým meziproduktem pro syntézu většiny těchto derivátů je kyanurchlorid (2,4,6-trichlor-1,3,5-triazin, viz obrázek 12). Tato výchozí látka se vyznačuje unikátní vlastností – její tři atomy chloru vykazují při nukleofilní aromatické substituci silnou teplotní závislost. Obecně platí, že k náhradě prvního atomu chloru příslušným

nukleofilem dochází již při teplotách kolem 0 °C. Druhá substituce probíhá za laboratorní teploty a k nahrazení třetího chloru je obvykle nutné reakční směs zahřívat (v rozmezí 70–100 °C), přičemž přesné reakční podmínky se vždy odvíjí od reaktivity konkrétního nukleofilu. Právě tato specifičnost umožňuje vysoce kontrolovanou a postupnou substituci. Na jedno triazinové jádro tak lze cíleně a s minimálním rizikem vzniku složitých reakčních směsí vnést až tři zcela odlišné substituenty. [110, 119]




**Obr. 12: Struktura kyanurchloridu (2,4,6-trichlor-1,3,5-triazin), vlastní tvorba**

Díky této syntetické variabilitě a výhodným strukturním vlastnostem se 1,3,5-triazinový skelet ukázal jako naprosto ideální platforma pro racionální design inhibitorů karboanhydráz. Jak doložili Garaj a kol. (2011), z hlediska prostorového uspořádání je pro triazinové jádro typická vysoká rigidita a planarita. Tyto strukturní rysy garantují, že si inhibitor po koordinaci na katalytický iont zinku zachová definovanou konformaci. Periferní objemné substituenty jsou tak striktně orientovány do vnější části aktivního místa, což hraje klíčovou roli v dosažení vysoké izoformní selektivity zacílené specificky na nádorovou izoformu CA IX. [119]

Praktické využití těchto strukturních předpokladů demonstruje studie, ve které 1,3,5-triazinový skelet posloužil jako ideální rigidní platforma pro konstrukci vysoce selektivních inhibitorů. V této práci byl centrální heterocyklus využit k propojení zinek vázající primární sulfonamidové skupiny s objemnými substituenty na bázi piperazinu či aminoalkoholů. Výsledky biologického hodnocení jasně prokázaly, že zatímco benzensulfonamidový fragment ukotvuje molekulu na dně aktivního místa, triazinové jádro efektivně směruje připojené bazické aminy do vnější části enzymové kavity. Zde tyto periferní skupiny interagují s povrchovými aminokyselinovými zbytky, což vede k výraznému nárůstu celkové inhibiční aktivity a především k vynikající izoformní selektivitě vůči nádorové CA IX v porovnání s cytosolickými izoenzymy CA I a CA II. [120]

Právě tento úspěšný a racionálně zdůvodněný design se stal přímou inspirací pro návrh a syntézu nových cílových struktur v rámci této diplomové práce.

### 2.4.2 Sulfonamidy (vazba na zinek)

Primární sulfonamidová skupina (-$SO_2NH_2$) představuje nejvýznamnější a nejčastěji využívaný farmakofor pro ukotvení molekuly k iontu zinku při návrhu inhibitorů karboanhydráz. Většina klinicky schválených léčiv z této indikační skupiny proto vychází právě z tohoto strukturního motivu. Krystalografické studie mnoha komplexů CA [54, 121, 122] odhalily, proč je tato skupina v aktivním místě tak výjimečně efektivní. Vazba sulfonamidů je primárně řízena deprotonací sulfonamidového dusíku. Vzniklý záporně nabitý aniont se přímo koordinuje na katalytický kationt zinku ($Zn^{2+}$) [54, 123], čímž z aktivního centra vytěsní molekulu vody. Tento koordinační mechanismus je dále zásadně stabilizován vznikem vodíkových vazeb. [48, 54, 124]

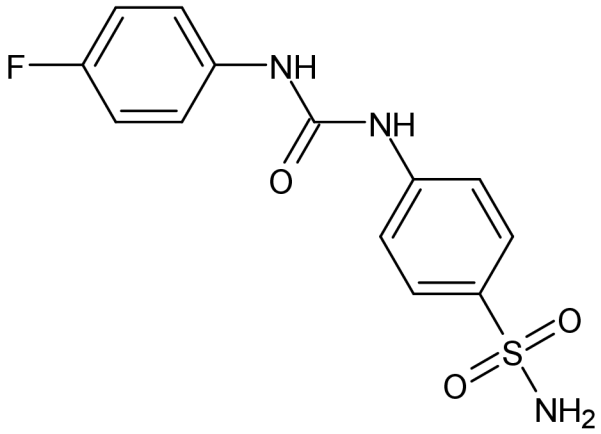
Jak uvádí strukturální analýzy, sulfonamidová skupina se ukazuje jako ideální ligand ze dvou hlavních důvodů: na jedné straně dokonale kombinuje elektrostatickou interakci mezi svým záporně nabitým dusíkem a kladně nabitým zinkem, a na straně druhé si deprotonovaný dusík zachovává jeden proton, který slouží jako silný donor pro vznik vodíkové vazby s aminokyselinou Thr199. [54, 125, 126] Tato kombinace interakcí zajišťuje neobyčejně pevnou a stabilní vazbu hluboko uvnitř enzymové kavity. [54]

Ačkoliv je tato vazba velmi silná, samotný sulfonamidový farmakofor je příliš malý a strukturně jednoduchý na to, aby dokázal rozlišit jemné odlišnosti v aktivních místech jednotlivých karboanhydráz. [127] Neselektivní inhibice nádorových i všudypřítomných fyziologických izoforem (zejména CA I a CA II) tak u pacientů vede k řadě systémových nežádoucích účinků. Z tohoto důvodu se v moderním designu léčiv od jednoduše substituovaných sulfonamidů upouští.

Úspěšným příkladem moderního přístupu, který tento problém překonává, je inhibitor SLC-0111 (ureido-substituovaný benzensulfonamid, viz obrázek 13). V současné době představuje nejvýznamnější molekulu v oblasti cílené inhibice nádorově asociované CA IX. Efektivně narušuje regulaci pH v nádorových buňkách, čímž snižuje jejich přežívání i invazivitu, a zároveň prokazatelně zvyšuje účinnost klasické chemoterapie. [128, 129] Díky těmto slibným výsledkům již SLC-0111 úspěšně postoupil do klinického testování u pacientů s pokročilými solidními nádory. [129, 130] Jeho úspěšný farmakologický profil navíc slouží jako klíčový model pro design dalších strukturních analogů s cílem maximalizovat isozymovou selektivitu. [129, 131]

Dalším vysoce efektivním řešením problému selektivity, které bylo aplikováno i při návrhu látek v rámci této diplomové práce, je inkorporace sulfonamidu na objemný 1,3,5-triazinový skelet. V takovém uspořádání slouží primární sulfonamidová skupina výhradně jako kotva na dně enzymové kavity, zatímco připojené substituenty interagují s vnější částí aktivního místa. Tyto objemné substituenty radikálně potlačují afinitu k fyziologickým izoformám (CA I, II a IV) a naopak extrémně zvyšují selektivitu vůči nádorově asociované izoformě CA IX. [127] Tento racionální předpoklad byl potvrzen rentgenovou krystalografií, která jednoznačně prokázala, že i přes přítomnost objemného triazinového substituentu zůstává vazba sulfonamidové skupiny k iontu

zinku a aminokyselině Thr199 naprosto nedotčena, čímž sulfonamid v těchto molekulách spolehlivě plní svou primární kotevní funkci. [119]




**Obr. 13: Struktura SLC-0111, vlastní tvorba**

## 2.5 Nové netriazinové skelety v designu inhibitorů CA IX

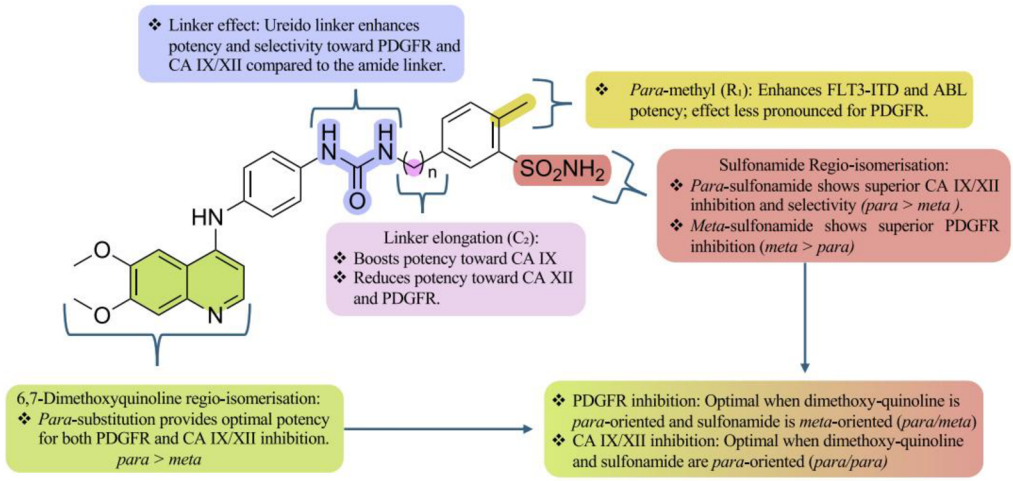
### 2.5.1 Chinolinsulfonamidy

Výrazným současným trendem v medicinální chemii je design tzv. duálních inhibitorů, které kromě nádorových izoforem karboanhydráz (CA IX a XII) cílí současně i na další onkogenní dráhy. Příkladem tohoto inovativního přístupu je využití objemného 6,7-dimethoxychinolinového skeletu. V rámci strategie „ocásku" (*tail approach*) je tento masivní heterocyklus propojen s klasickým benzen-sulfonamidovým farmakoforem prostřednictvím flexibilních spojovacích řetězců (linkerů). [132]

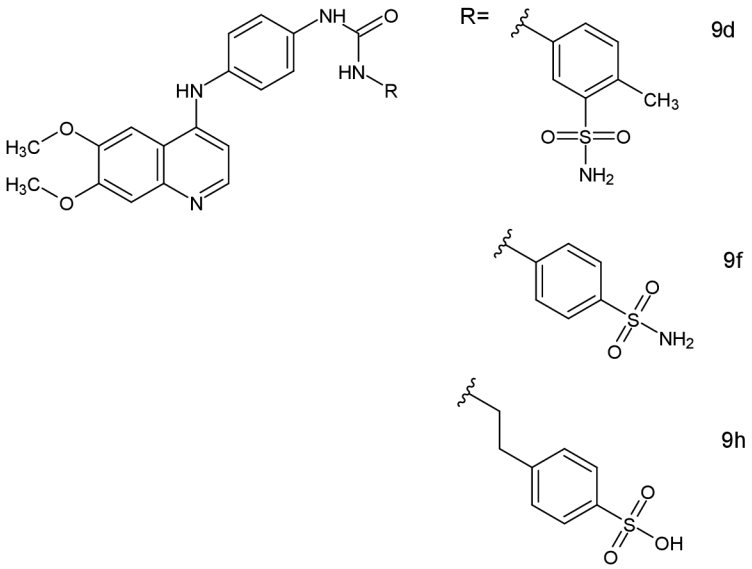
Studie vztahů mezi strukturou a aktivitou (SAR) u těchto derivátů odhalila několik klíčových faktorů nezbytných pro silnou a selektivní inhibici nádorové CA IX (viz obrázek 14). Zásadní roli hraje volba spojovacího řetězce – deriváty obsahující ureidový (močovinový) linker vykazovaly systematicky vyšší afinitu a selektivitu k CA IX než jejich amidové analogy. Ureidová skupina totiž poskytuje optimální geometrii a umožňuje tvorbu dodatečných vodíkových můstků v aktivním místě enzymu. [132]

Druhým kritickým parametrem je vzájemná orientace substituentů. Krystalografické a výpočetní modely potvrdily, že deprotonovaný dusík sulfonamidu klasicky chelatuje katalytický iont $Zn^{2+}$, zatímco objemný chinolinový kruh směřuje ven k ústí kavity, kde tvoří silné π-π interakce s aminokyselinou His94. Nejsilnější inhibice CA IX bylo proto dosaženo u derivátů, kde byl sulfonamidový motiv vázán v *para*-poloze. Tato orientace totiž ideálně navádí molekulu k zinečnatému kationtu. [132]

Vynikajících inhibičních vlastností dosáhla v této sérii sloučenina označená jako **9h** (s ureidovým linkerem a *para*-orientací obou hlavních motivů, obrázek 15), u níž byla stanovena inhibiční konstanta ($K_i$) pro CA IX rovna pouhým 6,3 nM. Tímto výsledkem látka výrazně překonala klinicky používaný standard acetazolamid ($K_i$ = 25,0 nM). Velmi vysokou aktivitu si zachoval i zkrácený analog **9f** (obrázek 15) s $K_i$ = 8,5 nM. Ačkoliv nejsilnějším inhibitorem samotné CA IX byl derivát **9h**, jako celkově nejlepší kandidát pro další testování byla vybrána sloučenina **9d** (obrázek 15). Ta představuje ideální strukturní kompromis nezbytný pro polyfarmakologický účinek – zachovává si stále velmi slibnou afinitu k CA IX ($K_i$ = 93,3 nM), ale současně vykazuje silnou inhibici druhého cílového receptoru, leukemické kinázy PDGFR. Tyto výsledky jednoznačně potvrzují, že i vysoce objemné heterocyklické struktury mohou při vhodném propojení sloužit jako excelentní inhibitory nádorových karboanhydráz s možným přesahem do duální terapie. [132]




**Obr. 14: : Znázornění klíčových vztahů mezi strukturou a aktivitou pro dvojitou inhibici PDGFR a CA IX/XII. Převzato z: [132]**



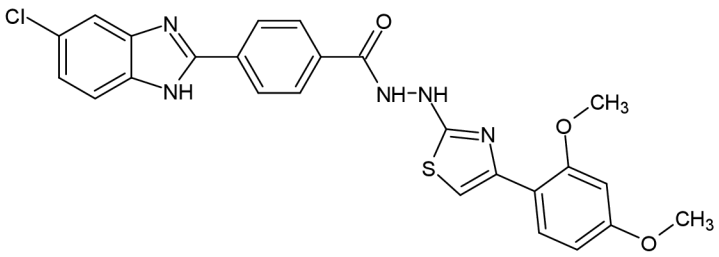

**Obr. 15: Struktura sloučenin:**
**9d -** 5-(3-(4-((6,7-dimethoxychinolin-4-yl)amino)-fenyl)ureido)-2-methylbenzensulfonamid**;**
**9f -** 4-(3-(4-((6,7-dimethoxychinolin-4-yl)amino)fenyl)ureido)benzensulfonamid**;**
**9h -** 4-(2-(3-(4-((6,7-dimethoxychinolin-4-yl)amino)fenyl)ureido)ethyl)benzensulfonamid,
**vlastní tvorba**

### 2.5.2 Benzimidazol-thiazoly

Nedávná studie [133] se zabývá syntézou hybridních molekul, ve kterých byl centrální 5-chlorbenzimidazolový farmakofor propojen přes benzhydrazidovou spojku s thiazolovým kruhem. Právě na tento thiazolový cyklus byly následně vnášeny různé substituenty s cílem zjistit, jak jejich sterické a elektronové vlastnosti ovlivní finální afinitu k enzymu a protinádorový účinek.

Z provedené analýzy SAR jednoznačně vyplynulo, že povaha substituentu na periferní části molekuly hraje významnou roli. Jako absolutně nejúčinnější se v celé sérii ukázal derivát označený jako **4h** (viz obrázek 16), který nese 2,4-dimethoxyfenylový zbytek. Přítomnost dvou objemných methoxyskupin, plnících funkci jako donory elektronů, ve specifických polohách 2 (*ortho*) a 4 (*para*) fenylového kruhu poskytuje molekule ideální elektronovou hustotu a sterické uspořádání pro interakci s kavitou cílového enzymu. Tento jev se potvrdil pomocí metody ELISA - sloučenina **4h** vykazovala nejsilnější inhibici CA IX. Absence těchto skupin, případně substituce v jiných polohách, pak vedla k výraznému poklesu inhibiční aktivity. [133]

Tato vysoká enzymatická afinita, způsobená optimální 2,4-dimethoxy substitucí, se následně projevila i ve vynikajícím profilu cytotoxicity na komplexních buněčných modelech. Látka **4h** prokázala významný protinádorový efekt s hodnotami $IC_{50}$ v mikromolárním rozmezí: 36,6 ± 11,98 µM pro buňky kolorektálního karcinomu (HT-29), 22,8 ± 5,18 µM pro buňky karcinomu prsu (MCF-7) a 42,06 ± 6,58 µM pro buňky gliomu (C6). Kromě vysoké účinnosti zajistilo toto specifické strukturní uspořádání látce i výborný bezpečnostní profil. Na linii zdravých myších fibroblastů (L929) vykazoval derivát **4h** minimální toxicitu ($IC_{50}$ > 100 µM), čímž se strukturně odlišil od běžně používané cisplatiny (toxicita 83,7 µM) jako bezpečnější alternativa. [133]
Detailní zkoumání mechanismu účinku prokázalo, že sloučenina **4h** cíleně indukuje apoptózu (nikoliv nekrózu). Podle analýzy RT-PCR k tomu dochází prostřednictvím zvýšené exprese proapoptotických genů (kaspázy-3, BAX) a současného potlačení antiapoptotického BCL-2, což bylo podpořeno i znatelným snížením proliferačního markeru Ki-67. Výsledky tak jasně demonstrují, že racionální vnesení elektronově bohatých skupin (jako je 2,4-dimethoxy motiv) na masivní kondenzovaný heterocyklus představuje vysoce efektivní strategii pro design selektivních inhibitorů hypoxických nádorů. [133]




**Obr. 16: Struktura 4h -** (4-(5-chlor-1H-benzoimidazol-2-yl)-N′-(4-(2,4-dimethoxyfenyl)thiazol-2-yl)benzhydrazid), **vlastní tvorba**

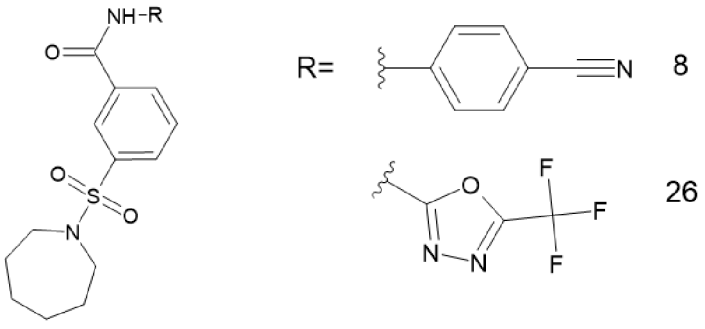
### 2.5.3 Azepansulfonamidy

Zcela novým a inovativním přístupem v designu inhibitorů CA IX je začlenění sedmičlenného azepanového kruhu do sulfonamidového farmakoforu. V nedávné studii byla navržena série derivátů 3-(azepan-1-ylsulfonyl)-N-arylbenzamidu, u kterých byla detailně zkoumána přímá spojitost mezi jejich chemickou strukturou a mechanismem inhibice cílového enzymu. [134]

Z analýzy SAR jasně vyplynulo, že pro vysokou afinitu k enzymu je klíčová volba a umístění arylamidového kruhu. Nejvyšších inhibičních aktivit dosahovaly analogy s π-deficitními arylovými kruhy (např. s pyridinem nebo fenylem substituovaným elektrony-odčerpávajícími skupinami). Vzhledem k tomu, že aromatická kavita aktivního místa CA IX je sama o sobě silně π-bohatá (tvořená zbytky TRP5 a His64), umožňují právě π -deficitní ligandy tvorbu optimálních a velmi pevných π-π interakcí. K dalšímu zesílení účinku přispělo methylenové prodloužení arylového řetězce, které molekulu ideálně polohuje v kavitě, a rovněž substituce v *para*-poloze, jež se ukázala jako stericky výhodnější než v *meta*-poloze. [134]

Tento mechanismus inhibice byl detailně potvrzen studiemi molekulárního dokování. U většiny vysoce aktivních derivátů, např. u sloučeniny **8** (obrázek 17), s nanomolární afinitou ($IC_{50}$ = 190 nM), byl pozorován klasický způsob vazby: primární sulfonamidová skupina silně koordinuje katalytický iont $Zn_{2+}$ a tvoří vodíkové vazby s threoninem (Thr199), zatímco objemný azepanový kruh směřuje do hydrofobní kapsy enzymu. [134]

Zcela unikátní a překvapivý mechanismus vazby však odhalila sloučenina **26**, která se s hodnotou $IC_{50}$= 19 nM stala absolutně nejsilnějším inhibitorem v testované sérii. Dokovací simulace u tohoto derivátu ukázala, že katalytický zinečnatý iont není výjimečně koordinován sulfonamidovou skupinou, nýbrž přímo oxadiazolovým kruhem. Tato alternativní koordinační strategie zřejmě zodpovídá za její mimořádně silnou inhibiční afinitu. Specifické strukturní uspořádání těchto derivátů navíc zajistilo látkám excelentní cytotoxický profil napříč širokým spektrem lidských nádorových linií, což z nich činí vysoce perspektivní kandidáty pro další testování. [134]




**Obr. 17: Struktura derivátů** 3-(azepan-1-ylsulfonyl)-N-arylbenzamidu **(8, 26), vlastní tvorba**

# 3 Experimentální část

## 3.1 Cíl práce

Hlavním cílem této diplomové práce byl racionální návrh a syntéza nových, v odborné literatuře dosud nepopsaných derivátů 1,3,5-triazinu, které by mohly sloužit jako potenciální selektivní inhibitory nádorově asociované izoformy karboanhydrázy IX (CA IX). Experimentální část se nejprve zaměřila na přípravu výchozích monosubstituovaných prekurzorů prostřednictvím nukleofilní substituce 2,4,6-trichlor-1,3,5-triazinu. Tímto způsobem bylo úspěšně nasyntetizováno 11 monosubstituovaných sloučenin.

Na tyto připravené prekurzory byla následně aplikována druhá fáze nukleofilní substituce s využitím široké palety strukturně odlišných nukleofilů, což vedlo k zisku 14 cílových disubstituovaných derivátů. Celkem tak bylo v rámci práce připraveno 25 nových, strukturně odlišných látek. Pro zjištění, jaký vliv mají jednotlivé strukturní obměny na vazbu v enzymu (tzv. *tail approach*), byly jako sekundární substituenty záměrně zvoleny velmi různorodé funkční skupiny. Ty zahrnovaly široké spektrum primárních a sekundárních aminů, dusíkatých heterocyklů, karboxylových kyselin, esterů a specifických ketonů, jako jsou deriváty aminoacetofenonu.

Nedílnou součástí práce byla strukturní charakterizace všech nově připravených meziproduktů i finálních produktů. Jejich chemická struktura byla potvrzena pomocí analytických metod, a to především $^{1}$H-NMR a $^{13}$C-NMR spektroskopií. Dále byly popsány jejich fyzikální vlastnosti včetně stanovení teploty tání. Závěrečným cílem experimentální práce bylo finální zpracování a příprava syntetizovaných látek k odeslání na specializované externí pracoviště pro následné hodnocení jejich biologické aktivity.

## 3.2 Obecné informace

Pro sledování průběhu jednotlivých reakčních kroků byla využita tenkovrstvá chromatografie (TLC). Jako stacionární fáze posloužily komerčně dostupné silikagelové desky (DC-Alufolien Kieselgel 60 F254, Merck). Samotné vyvíjení probíhalo v nasycených komorách s použitím specifických soustav mobilních fází, které jsou specifikovány v rámci postupů jednotlivých syntéz. Vizualizace látek probíhala pod UV lampou při vlnových délkách 254 a 356 nm, případně chemickou detekcí pomocí par elementárního jódu a ninhydrinovým činidlem. Bod tání byl u všech připravených meziproduktů i cílových sloučenin zjišťován na bodotávku typu Koflerův blok (HMK Franz, Küstner, Německo).

Strukturní charakterizace syntetizovaných látek byla provedena pomocí nukleární magnetické rezonance (NMR). Spektra $^{1}H$ a $^{13}C$ byla zaznamenána FT NMR spektrometrem JEOL EZCR 400 (JEOL, Japonsko) s využitím 5mm sondy High Sensitivity PulseField Gradient AutotuneTM. Přístroj pracoval při rezonančních frekvencích 400 MHz (pro $^{1}H$) a 100 MHz (pro $^{13}C$). Vzorky byly měřeny při konstantní teplotě 30 °C v prostředí deuterovaného dimethylsulfoxidu (DMSO-$d_6$). Hodnoty chemických posunů ($\delta$) jsou uváděny v jednotkách ppm a byly kalibrovány vůči signálu tetramethylsilanu jakožto vnitřnímu standardu. Signály použitého rozpouštědla vykazovaly posuny 2,5 ppm pro $^{1}H$ a 39,5 ppm pro $^{13}C$. Ke zpracování a vyhodnocení naměřených spekter posloužil program Delta 5.2.1 (Jeol Resonance, Tokio, Japonsko). Míra čistoty připravených sloučenin byla následně určována na základě integrálních intenzit příslušných signálů v $^{1}H$-NMR spektrech.

## 3.3 Seznam použitých chemikálií

- Trichlor-1,3,5-triazin 99%, Sigma-Aldrich
- Piperazin 99%, Sigma-Aldrich
- Piperidin ≥99%, Sigma-Aldrich
- 2,2,2-Trifluoroethylamin 99,5%, Sigma-Aldrich
- Diethylamin ≥99%, Sigma-Aldrich
- 3-Aminopyridin 99%, Sigma-Aldrich
- 1-Adamantylamin, 97%, Sigma-Aldrich
- 2-Amino-5-methylbenzenkarboxylová kys. 99%, Sigma-Aldrich
- 3-methyl-5-nitro-pyridin ≥96.0%, Sigma-Aldrich
- 2-amino-5-methylbenzenkarboxylová kyselina 99%, Sigma-Aldrich
- 2-Aminopyridin-3-karboxylová kyselina 98%, Sigma-Aldrich
- 2-Amino-4-chlorbenzenkarboxylová kyselina 98%, Sigma-Aldrich
- methyl 2-amino-5-chlorbenzoát 95%, Sigma-Aldrich
- 3-Aminoacetofenon 97%, Sigma-Aldrich
- 2-aminoacetofenon 98%, Sigma-Aldrich
- Sulfanilamid ≥98%, Sigma-Aldrich
- 4-Aminomethylbenzensulfonamid hydrochlorid ≥95%, Sigma-Aldrich
- 4-(2-Aminoethyl)benzensulfonamid 99%, Sigma-Aldrich
- 2,2,2-Trifluoroethylamin hydrochlorid 98%, Sigma-Aldrich
- 4-(Trifluoromethyl)anilin 99%, Sigma-Aldrich
- Dichlormethan 99,8%, Sigma-Aldrich
- Aceton ≥99.5%, Sigma-Aldrich
- Dimethylformamid 99,8%, Sigma-Aldrich
- Diethylether ≥99.0%, Sigma-Aldrich
- Ethanol ≥99.5%, Sigma-Aldrich
- Acetonitril ≥99.9%, Sigma-Aldrich
- Methanol ≥99.85%, Sigma-Aldrich
- Ethylacetát ≥99.5%, Sigma-Aldrich
- Uhličitan draselný 99%, Sigma-Aldrich
- Hydrogen uhličitan sodný 99,7%, Sigma-Aldrich
- N,N-diisopropylethylamin 99%, Sigma-Aldrich
- Silikagel, Sigma-Aldrich

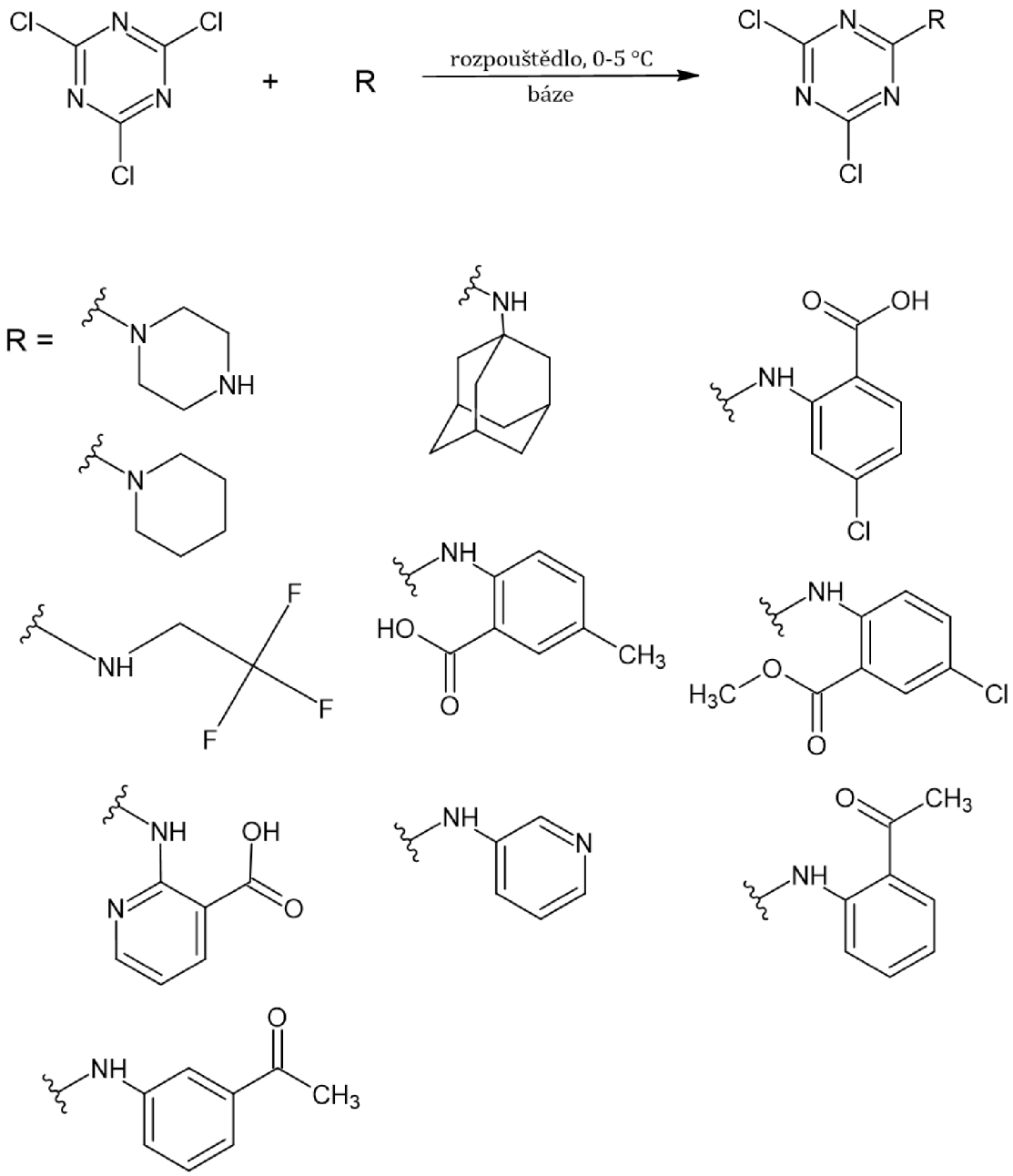
## 3.4 Syntéza monosubstituovaných derivátů trichlortriazinu

### 3.4.1 Obecný postup syntézy

Obecné schéma syntézy je znázorněno na obrázku 18. V trojhrdlé baňce s kulatým dnem byl za stálého míchání rozpuštěn 1 ekvivalent **2,4,6-trichlor-1,3,5-triazinu** (pro navážky viz tabulka 3) ve vhodném rozpouštědle. Směs byla vychlazena pomocí ledové lázně na teplotu v rozmezí 0-5 °C. Po ochlazení byla přidána **báze**, také 1 ekvivalent (pro navážky viz tabulka 4).

Jeden ekvivalent **nukleofilu** (pro navážky viz tabulka 2) byl nejprve rozpuštěn ve vhodném rozpouštědle (viz tabulka 3) a poté postupně přikapáván k reakční směsi za stálého chlazení v ledové lázni. Po dokapání byla směs míchána po dobu alespoň jedné hodiny do maximální konverze výchozích látek, přičemž průběh reakce byl průběžně monitorován pomocí metody tenkovrstvé chromatografie (TLC). Jako mobilní fáze byl použitý dichlormethan. K detekci skvrn bylo použito UV světlo, ninhydrinové činidlo a páry jodu.

Po dokončení reakce bylo rozpouštědlo odstraněno za sníženého tlaku a produkt byl vysrážen na ledu. Výsledná sraženina byla umístěna do exsikátoru a vysušena do konstantní hmotnosti.




**Obr. 18: Schéma syntézy monosubstituovaných derivátů trichlortriazinu , vlastní tvorba**

**Tab. 2: Navážky nukleofilů pro přípravu monosubstituovaných 1,3,5-triazinových derivátů**

| sloučenina | nukleofil | m (g) | M (g/mol) | n (mol) |
|---|---|---|---|---|
| **1.1** | piperazin | 1,000 | 86,14 | 0,0116 |
| **1.2** | piperazin | 2,326 | 86,14 | 0,0270 |
| **2** | piperidin | 1,000 | 85,15 | 0,0117 |
| **3** | 2,2,2-trifluoroethylamin | 1,000 | 99,06 | 0,0101 |
| **4** | 3-aminopyridin | 2,552 | 94,11 | 0,0271 |
| **5** | 1-adamantylamin | 2,000 | 151,14 | 0,0132 |
| **6** | 2-amino-5-methylbenzen karboxylová k. | 3,000 | 151,60 | 0,0198 |
| **7** | 2-aminopyridin-3-karboxylová k. | 2,000 | 138,12 | 0,0145 |
| **8** | 2-amino-4-chlorbenzen karboxylová k. | 0,466 | 171,58 | 0,0027 |
| **9** | methyl 2-amino-5-chlorbenzoát | 0,300 | 185,61 | 0,0016 |
| **10** | 3-aminoacetofenon | 0,733 | 135,16 | 0,0054 |
| **11** | 2-aminoacetofenon | 0,733 | 135,16 | 0,0054 |

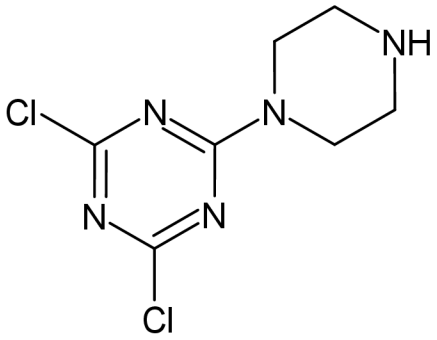
**Tab. 3: Navážky trichlotriazinu a typy rozpouštědel**

| 2,4,6-trichlor-1,3,5-triazin (M=184,41 g/mol) | m (g) | n (mol) | rozpouštědlo | V rozpouštědla (ml) |
|---|---|---|---|---|
| **1.1** | 2,139 | 0,0116 | dichlormethan | 130,00 |
| **1.2** | 5,000 | 0,0270 | dichlormethan | 150,00 |
| **2** | 2,166 | 0,0117 | dichlormethan | 130,00 |
| **3** | 1,862 | 0,0101 | aceton | 100,00 |
| **4** | 5,000 | 0,0271 | dichlormethan | 150,00 |
| **5** | 2,440 | 0,0132 | diethylether | 150,00 |
| **6** | 3,660 | 0,0198 | aceton | 150,00 |
| **7** | 2,670 | 0,0145 | acetonitril | 70,00 |
| **8** | 0,500 | 0,0027 | aceton | 25,00 |
| **9** | 0,298 | 0,0016 | dichlormethan | 15,00 |
| **10** | 1,000 | 0,0054 | aceton | 40,00 |
| **11** | 1,000 | 0,0054 | aceton | 40,00 |

**Tab. 4: Typ báze a její navážky**

| sloučenina | báze | m (g) | M ($g/mol^{-1}$) | n (mol) |
|---|---|---|---|---|
| **1.1** | $K_2CO_3$ | 1,603 | 138,21 | 0,0116 |
| **1.2** | $NaHCO_3$ | 2,268 | 84,01 | 0,0270 |
| **2** | $K_2CO_3$ | 1,623 | 138,21 | 0,0117 |
| **3** | $K_2CO_3$ | 1,395 | 138,21 | 0,0101 |
| **4** | $K_2CO_3$ | 3,747 | 138,21 | 0,0271 |
| **5** | N,N-diisopropylethyl amin | 1,707 | 129,25 | 0,0132 |
| **6** | $K_2CO_3$ | 2,740 | 138,21 | 0,0198 |
| **7** | N,N-diisopropylethyl amin | 1,872 | 129,25 | 0,0145 |
| **8** | $K_2CO_3$ | 0,375 | 138,21 | 0,0027 |
| **9** | $K_2CO_3$ | 0,223 | 138,21 | 0,0016 |
| **10** | $K_2CO_3$ | 0,749 | 138,21 | 0,0054 |
| **11** | $K_2CO_3$ | 0,749 | 138,21 | 0,0054 |

### 3.4.2 Charakteristika monosubstituovaných produktů

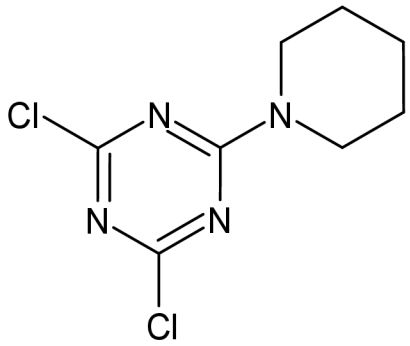



**Obr. 19: Derivát 1, vlastní tvorba**

***(1.1, 1.2)*** **2,4-dichlor-6-(piperazin-1-yl)-1,3,5-triazin**

**Specifika syntézy**: Při syntéze derivátu 1.1 došlo k odchylce od standardního experimentálního postupu. Namísto postupného přikapávání roztoku nukleofilu (piperazinu) do roztoku triazinu v přítomnosti bezvodého uhličitanu draselného byl piperazin nejprve rozpuštěn v dichlormethanu, následně byla přidána báze a do této směsi byl přikapáván roztok triazinu. Tento postup vedl k výrazně exotermičtějšímu průběhu reakce. Během přikapávání docházelo k rychlému nárůstu teploty reakční směsi. Z tohoto důvodu bylo nutné přikapávání roztoku triazinu výrazně zpomalit a reakci provádět za intenzivního chlazení.
**Mr:** 234,08 g/mol
**Sumární vzorec:** $C_7H_9Cl_2N_5$
**Výtěžek:** 1.1 46 %; 1.2 78 %
**Skupenský stav:** bílá pevná látka
**Teplota tání:** >220 °C (limit přístroje) pro produkty 1.1; 1.2

**$^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 2,16 (1H, br s, NH), 2,68–2,75 (4H, m, $CH_2$), 3,71–3,73 (4H, m, $CH_2$).
**$^{13}$C-NMR (101 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 169,8, 165,5, 47,4, 45,5.

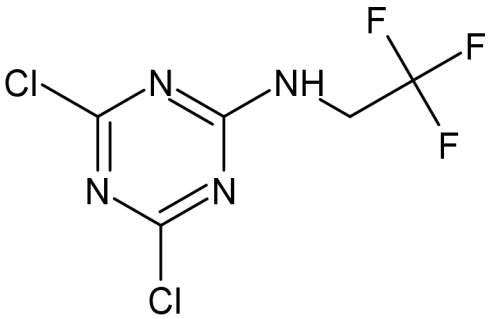



**Obr. 20: Derivát 2, vlastní tvorba**

### *(2)* 2,4-dichlor-6-(piperidin-1-yl)-1,3,5-triazin

**Specifika syntézy:** Při izolaci produktu se derivát 2 na ledu nesrážel a jako vhodný se ukázal aceton. Následně byl roztok odpařen na rotační odparce, zfiltrován přes fritu a produkt vysušen do konstantní hmotnosti.
**Mr:** 233,10 g/mol
**Sumární vzorec:** $C_8H_{10}Cl_2N_4$
**Výtěžek:** 29 %
**Skupenský stav:** bílá pevná látka
**Teplota tání:** 83-85°C

**$^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 1,70–1,53 (6H, m, $CH_2$), 3,72–3,70 (4H, m, $CH_2$).
**$^{13}$C-NMR (101 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 169,9, 165,3, 44,2, 25,9, 24,8.

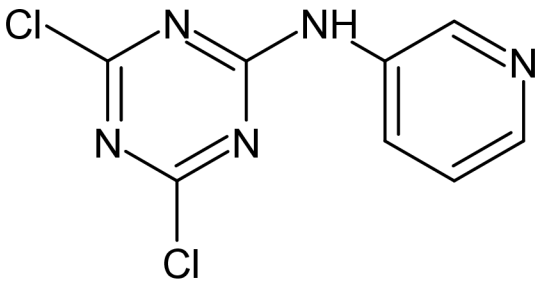



**Obr. 21: Derivát 3, vlastní tvorba**

### *(3)* 4,6-dichlor-N-(2,2,2-trifluoroethyl)-1,3,5-triazin-2-amin

**Specifika syntézy**: Nukleofil 2,2,2-trifluorethylamin se ukázal jako nerozpustný ve zkoušených rozpouštědlech (aceton, dichlormethan, voda). Z tohoto důvodu nebylo možné nukleofil přikapávat, a byl tak přidán po částech do roztoku triazinu. Reakce vykazovala silně exotermický charakter. I přes omezenou rozpustnost reagoval trifluoroethyl rychle po kontaktu s triazinem, což umožnilo dokončit substituční reakci.
**Mr:** 247,00 g/mol
**Sumární vzorec:** $C_5H_3Cl_2F_3N_4$
**Výtěžek:** 46 %
**Skupenský stav:** bílá pevná látka
**Teplota tání:** >220 °C (limit přístroje)

**$^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 6,91 (1H, br s, NH), 4,48–4,32 (2H, m, $CH_2$).
**$^{13}$C-NMR (101 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 171,0, 167,5, 129,5, 44,2.

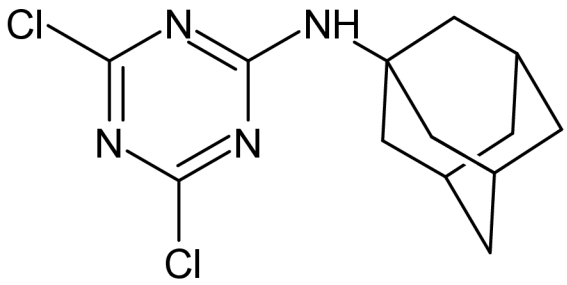



**Obr. 22: Derivát 4, vlastní tvorba**

### *(4)* 4,6-dichlor-N-(pyridin-3-yl)-1,3,5-triazin-2-amin

**Specifika syntézy**: Po ukončení reakce byl produkt promyt vodou a následně acetonem za využití filtrace na fritě, aby došlo k odstranění případných anorganických a organických nečistot. Izolovaná látka však vykazovala značnou nerozpustnost v běžně dostupných deuterovaných rozpouštědlech a nebylo tak možné připravit roztok pro NMR analýzu.
**Mr:** 242,06 g/mol
**Sumární vzorec**: $C_8H_5Cl_2N_5$
**Výtěžek:** 2 %
**Skupenský stav:** hnědá pevná látka
**Teplota tání:** 152-155 °C

**$^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** nebylo možné změřit
**$^{13}$C-NMR (101 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** nebylo možné změřit



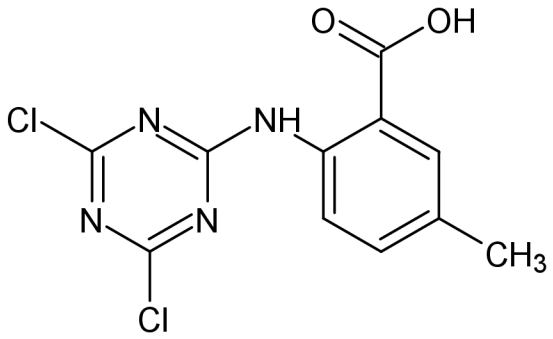

**Obr. 23: Derivát 5, vlastní tvorba**

## *(5)* N-(adamantan-1-yl)-4,6-dichlor-1,3,5-triazin-2-amin

**Specifika syntézy**: Při syntéze docházelo k výrazně exotermickému průběhu reakce. I přes intenzivní chlazení nebylo možné udržet požadovanou teplotu kolem 0 °C, což si vyžádalo extrémně pomalé přidávání nukleofilu.

Po ukončení reakce byla vzniklá sraženina izolována filtrací. Vzhledem k nerozpustnosti výchozí látky i produktu ve vodě byla pro jejich vysrážení testována organická rozpouštědla (aceton, ethanol, dichlormethan); na základě rozdílné rozpustnosti produktu a výchozí látky byl zvolen dichlormethan. Získaná pevná látka byla dále třikrát překrystalizována v isopropanolu, přičemž krystalizace probíhala přes noc za snížené teploty. Následující den byl produkt přefiltrován a vysušen.
**Mr:** 299,20 g/mol
**Sumární vzorec:** $C_{13}H_{16}Cl_2N_4$
**Výtěžek:** 29 %
**Skupenský stav:** bílá pevná látka
**Teplota tání:** 163-165 °C

**$^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 5,81 (1H, br s, NH), 2,09–2,06 (3H, m, CH), 1,73–1,62 (12H, m, $CH_2$).
**$^{13}$C-NMR (101 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 169,4, 166,0, 51,3, 41,9, 36,3, 29,1.




**Obr. 24: Derivát 6, vlastní tvorba**

***(6)*** **2-[(4,6-dichlor-1,3,5-triazin-2-yl)amino]-5-methylbenzenkarboxylová kyselina**

**Specifika syntézy**: Po ukončení syntézy byla vzniklá sraženina izolována filtrací a filtrát byl následně ponechán přes noc v lednici, přičemž došlo k dodatečné tvorbě sraženiny. Tato sekundárně vzniklá sraženina byla zfiltrována, promyta etherem za účelem odstranění zbytků triazinu a opět přefiltrována. V rámci této syntézy tak byly získány dvě pevné frakce produktu.

**Mr:** 299,11 g/mol

**Sumární vzorec:** $C_{11}H_8Cl_2N_4O_2$

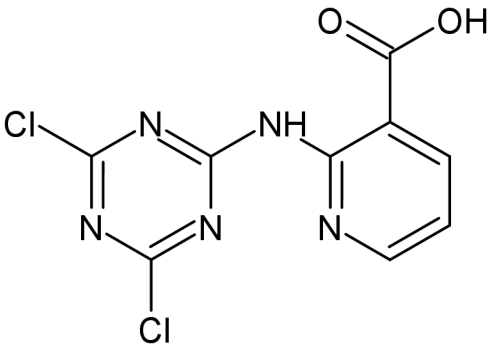
**Výtěžek:** 98 %

**Skupenský stav:** bílá pevná látka

**Teplota tání:** >220 °C (limit přístroje)

**$^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 10,07 (1H, br s, NH), 7,82 (1H, s, $CH_{Ar}$), 7,33 (1H, d, *J* = 6,8 Hz, $CH_{Ar}$), 7,21 (1H, d, *J* = 6,8 Hz, $CH_{Ar}$), 2,43 (3H, s, $CH_3$).

**$^{13}$C-NMR (101 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 171,1, 169,8, 164,2, 142,6, 131,8, 126,3, 118,3, 114,0, 20,6.

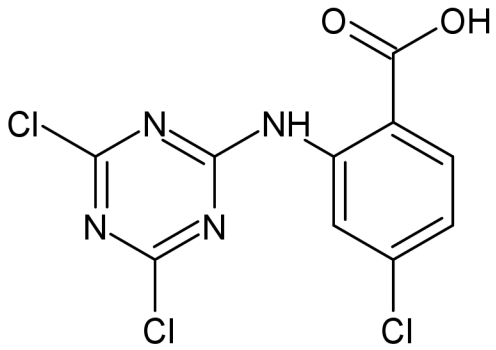



**Obr. 25: Derivát 7, vlastní tvorba**

### *(7)* 2-[(4,6-dichlor-1,3,5-triazin-2-yl)amino]pyridin-3-karboxylová kyselina

**Specifika syntézy:** Nukleofil, 2-aminopyridin-3- karboxylová kyselina, se ukázal jako nerozpustný ve zkoušených rozpouštědlech (aceton, dichlormethan, acetonitril). Z tohoto důvodu nebylo možné nukleofil přikapávat, ale byl tedy přidáván po částech do roztoku triazinu.
**Mr:** 286,07 g/mol
**Sumární vzorec:** $C_8H_4Cl_2N_5O_2$
**Výtěžek:** 48 %
**Skupenský stav:** bílá pevná látka
**Teplota tání:** 201-204 °C

**$^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 10,02 (1H, br s, NH), 8,42–8,40 (1H, m, $CH_{Ar}$), 8,00–7,98 (1H, m, $CH_{Ar}$), 6,97–6,94 (1H, m, $CH_{Ar}$)
**$^{13}$C-NMR (101 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 170,8, 169,6, 163,4, 155,0, 151,8, 140,8, 115,0, 110,0.

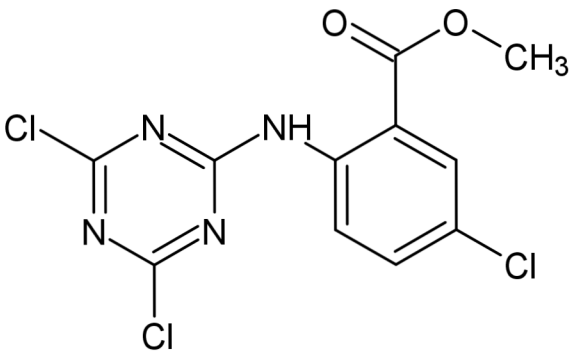



**Obr. 26: Derivát 8, vlastní tvorba**

### *(8)* 4-chlor-2-[(4,6-dichlor-1,3,5-triazin-2-yl)amino]benzenkarboxylová kyselina

**Specifika reakce:** Při syntéze došlo k drobné teplotní odchylce, jelikož reakční směs dosáhla bodu mrazu netypicky až v samotném průběhu substituce. Pro TLC byl jako mobilní fáze použit ethylacetát.
**Mr:** 319,53 g/mol
**Sumární vzorec:** $C_{10}H_5Cl_3N_4O_2$
**Výtěžek:** 92 %
**Skupenský stav:** bílá pevná látka
**Teplota tání:** >220 °C (limit přístroje)

**$^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 10,11 (1H, br s, NH), 8,01–8,03 (1H, m, $CH_{Ar}$), 7,44–7,41 (2H, m, $CH_{Ar}$).
**$^{13}$C-NMR (101 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 171,0, 169,2, 164,0, 142,9, 133,7, 131,3, 125,4, 120,5, 117,6.

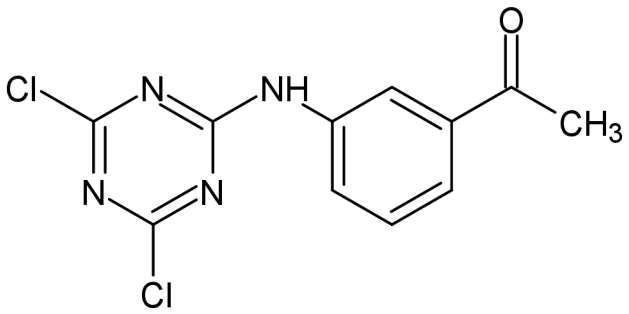



**Obr. 27: Derivát 9, vlastní tvorba**

## *(9)* methyl 5-chlor-2-[(4,6-dichlor-1,3,5-triazin-2-yl)amino]benzoát

**Mr:** 333,55 g/mol
**Sumární vzorec:** $C_{11}H_7Cl_3N_4O_2$
**Výtěžek:** 126 %
**Skupenský stav**: bílá pevná látka
**Teplota tání:** 208-210 °C

**$^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 7,80–7,81 (1H, m, $CH_{Ar}$), 7,30–7,27 (2H, m, $CH_{Ar}$), 3,91 (3H, s, $CH_3$).
**$^{13}$C-NMR (101 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 171,0, 167,5, 164,1, 142,3, 133,1, 131,3, 124,0, 120,9, 118,5, 52,0.

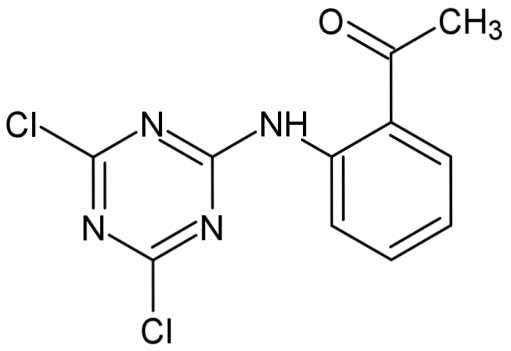



**Obr. 28: Derivát 10, vlastní tvorba**

### *(10)* 1-{3-[(4,6-dichlor-1,3,5-triazin-2-yl)amino]fenyl}ethan-1-on

**Specifika syntézy**: Produkt byl izolován vysrážením do ledové vody a následnou filtrací přes fritu.
**Mr:** 283,11 g/mol
**Sumární vzorec:** $C_{11}H_8Cl_2N_4O$
**Výtěžek:** 89 %
**Skupenský stav:** bílá pevná látka
**Teplota tání:** 164-166 °C

**$^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 9,23 (1H, br s, NH), 7,71–6,53 (4H, m, $CH_{Ar}$), 2,70 (3H, s, $CH_3$).
**$^{13}$C-NMR (101 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 198,6, 168,3, 164,2, 140,7, 130,3, 130,1, 129,8, 125,7, 119,0, 29,4.




**Obr. 29: Derivát 11, vlastní tvorba**

***(11)*** **1-{2-[(4,6-dichlor-1,3,5-triazin-2-yl)amino]fenyl}ethan-1-on**
**Specifika syntézy**: Produkt byl izolován vysrážením do ledové vody a následnou filtrací přes fritu.
**Mr:** 283,11 g/mol
**Sumární vzorec:** $C_{11}H_8Cl_2N_4O$
**Výtěžek:** 94 %
**Skupenský stav:** bílá pevná látka
**Teplota tání:** 193-196 °C

**$^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 9,20 (1H, br s, NH), 7,74–7,72 (1H, m, $CH_{Ar}$), 7,36–7,28 (3H, m, $CH_{Ar}$), 2,63 (3H, s, $CH_3$).
**$^{13}$C-NMR (101 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 201,3, 171,0, 164,5, 142,0, 131,7, 131,2, 129,9, 124,5, 119,4, 28,8.

## 3.5 Syntéza disubstituovaných derivátů trichlortriazinu

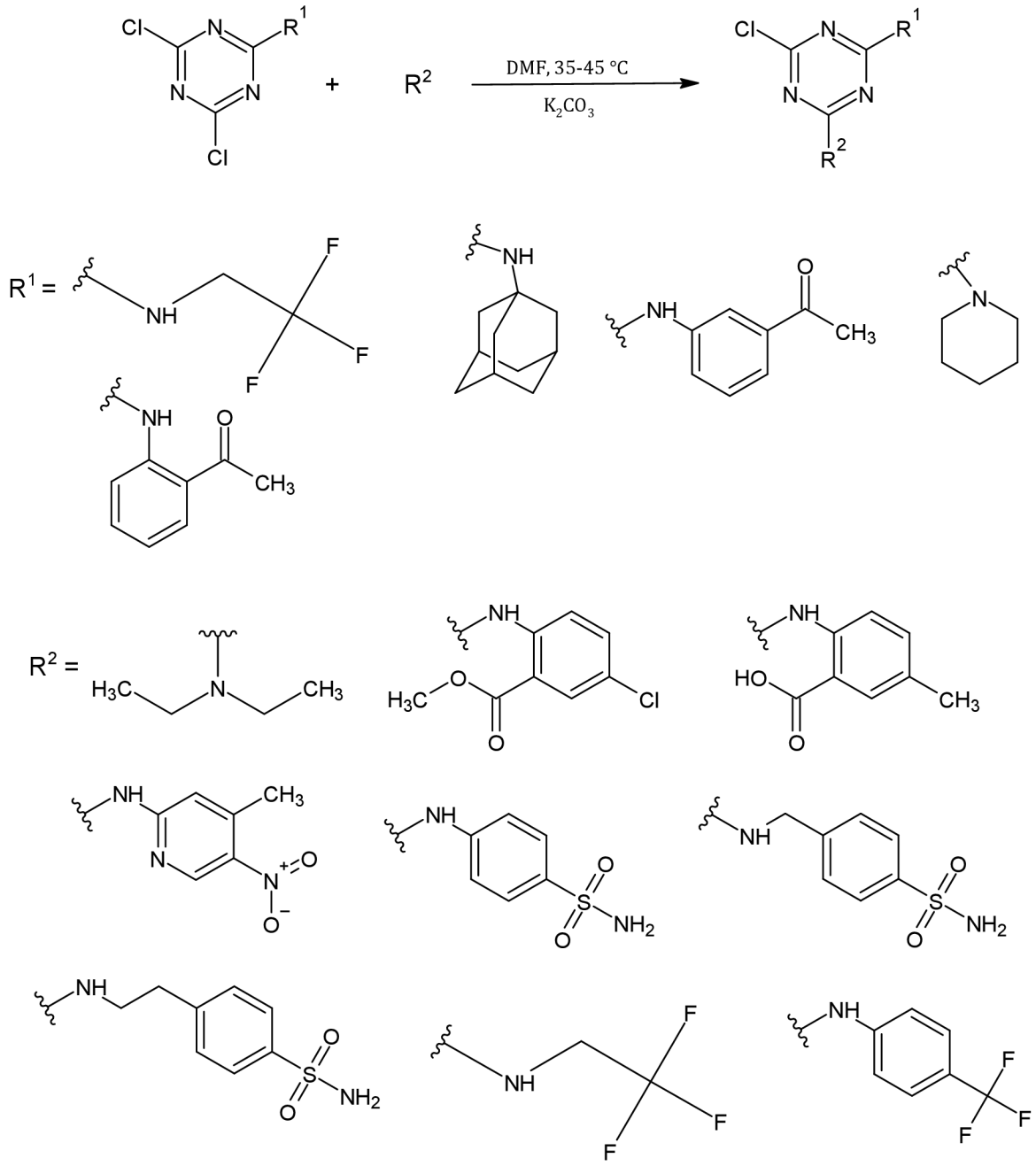
### 3.5.1 Obecný postup syntézy

Obecné schéma syntézy je znázorněno na obrázku 30. Do tlustostěnné zkumavky s teflonovým uzávěrem bylo naváženo 0,2 g **monosubstituovaného derivátu trichlortriazinu**. Poté byl přidán 1 ekvivalent **nukleofilu** (pro navážky viz tabulka 6) a 1 ekvivalent **bezvodého uhličitanu draselného** (viz tabulka 7) jako báze. Nakonec byly přidány 2-3ml N,N-dimethylformamidu (DMF) jako rozpouštědla. V případě, že byl použit nukleofil v formě hydrochloridu, byla hmotnost uhličitanu draselného zdvojnásobena, aby došlo k úplné neutralizaci vznikající kyseliny chlorovodíkové.

Reakční směs byla ponechána na termostatu s kontinuálním mícháním po dobu 1 týdne při teplotě 35-45 °C. Průběh reakce byl monitorován metodou tenkovrstevné chromatografie (TLC). Jako mobilní fáze byl použitý dichlormethan a ethylacetát pro každou zkumavku. Skvrny byly detekovány pomocí UV světla, ninhydrinového činidla a par jódu.

Po uplynutí reakční doby byla směs přidána do ledové vody, čímž došlo k vysrážení produktu. Vzniklá sraženina byla odfiltrována přes fritu, promyta vodou a následně sušena v exsikátoru do konstantní hmotnosti.

Některé produkty pak byly přečištěny pomocí kolonové chromatografie.




**Obr. 30: Schéma syntézy disubstituovaných derivátů trichlortriazinu, vlastní tvorba**

**Tab. 5: Kombinace monosubstituovaných derivátů triazinů (meziproduktů) a nových nukleofilů**

| meziprodukt | nukleofil pro substituci druhého stupně | |
|---|---|---|
| **3** | **a** | diethylamin |
| **3** | **b** | methyl 2-amino-5-chlorbenzoát |
| **5** | **c** | 2-amino-5-methylbenzen karboxylová kyselina |
| **2** | **d** | 2-amino-4-methyl-5-nitropyridin |
| **10** | **e** | sulfanilamid |
| **10** | **f** | 4-aminomethylbenzensulfonamid hydrochlorid |
| **10** | **g** | 4-(2-aminoethyl)benzensulfonamid |
| **10** | **h** | 2,2,2-trifluoroethylamin hydrochlorid |
| **10** | **i** | 4-(trifluoromethyl)anilin |
| **11** | **e** | sulfanilamid |
| **11** | **f** | 4-aminomethylbenzensulfonamid hydrochlorid |
| **11** | **g** | 4-(2-aminoethyl)benzensulfonamid |
| **11** | **h** | 2,2,2-trifluoroethylamin hydrochlorid |
| **11** | **i** | 4-(trifluoromethyl)anilin |

**Tab. 6: Navážky nukleofilu pro substituci druhého stupně**

| nukleofil | m (g) | M (g/mol) | n (mol) |
|---|---|---|---|
| **a** | 0,074 | 74,14 | 0,0010 |
| **b** | 0,150 | 185,61 | 0,0008 |
| **c** | 0,101 | 151,16 | 0,0007 |
| **d** | 0,132 | 153,14 | 0,0009 |
| **e** | 0,122 | 172, 20 | 0,0007 |
| **f** | 0,157 | 222,69 | 0,0007 |
| **g** | 0,141 | 200,26 | 0,0007 |
| **h** | 0,096 | 135,52 | 0,0007 |
| **i** | 0,114 | 161,12 | 0,0007 |
| **e** | 0,146 | 172, 20 | 0,0008 |
| **f** | 0,188 | 222,69 | 0,0008 |
| **g** | 0,169 | 200,26 | 0,0008 |
| **h** | 0,115 | 135,52 | 0,0008 |
| **i** | 0,136 | 161,12 | 0,0008 |

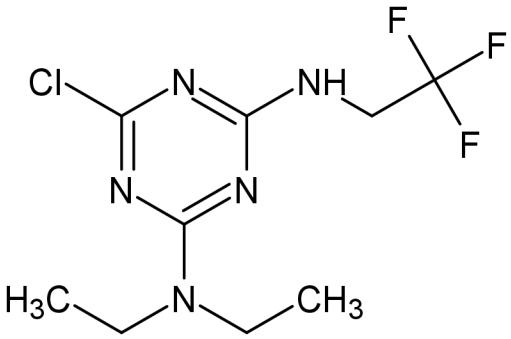
**Tab. 7: Navážky báze ($K_2CO_3$)**

| $K_2CO_3$ (M=138,21 g/mol) | m (g) | n (mol) |
|---|---|---|
| **3a** | 0,140 | 0,0010 |
| **3b** | 0,112 | 0,0008 |
| **5c** | 0,092 | 0,0007 |
| **2d** | 0,119 | 0,0009 |
| **10e** | 0,098 | 0,0007 |
| **10f** | 0,195 | 0,0007 |
| **10g** | 0,098 | 0,0007 |
| **10h** | 0,195 | 0,0007 |
| **10i** | 0,098 | 0,0007 |
| **11e** | 0,117 | 0,0008 |
| **11f** | 0,234 | 0,0008 |
| **11g** | 0,117 | 0,0008 |
| **11h** | 0,234 | 0,0008 |
| **11i** | 0,117 | 0,0008 |

**Tab. 8: Typy mobilních fází použitých při kolonové chromatografii**

| produkt | mobilní fáze pro kolonovou chromatografii |
|---|---|
| **3a** | neprováděla se |
| **3b** | dichlormethan |
| **5c** | neprováděla se |
| **2d** | neprováděla se |
| **10e** | dichlormethan:ethylacetát = 1:1 |
| **10f** | dichlormethan:ethylacetát = 1:1 |
| **10g** | neprováděla se |
| **10h** | dichlormethan:ethylacetát = 1:1 |
| **10i** | dichlormethan:ethylacetát = 95:5 |
| **11e** | neprováděla se |
| **11f** | neprováděla se |
| **11g** | neprováděla se |
| **11h** | dichlormethan:ethylacetát = 1:1 |
| **11i** | dichlormethan:ethylacetát = 95:5 |

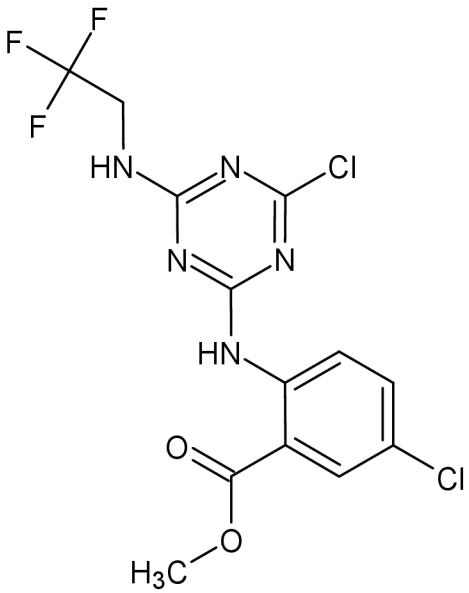
### 3.5.2 Charakteristika disubstituovaných produktů




**Obr. 31: Derivát 3a, vlastní tvorba**

***(3a)*** **6-chlor-N²,N²-diethyl-N⁴-(2,2,2-trifluoroethyl)-1,3,5-triazin-2,4-diamin**
**Specifika syntézy**: Při zpracování reakční směsi nedošlo po přidání vody k vysrážení produktu, jak bylo pozorováno u ostatních disubstituovaných sloučenin připravovaných stejným postupem. Z tohoto důvodu byly testovány alternativní srážecí kapaliny (aceton, dichlormethan, diethylether), přičemž jako nejvhodnější se ukázal aceton, jehož přidáním došlo k tvorbě sraženiny. Produkt byl následně izolován filtrací.
**Mr:** 283,68 g/mol
**Sumární vzorec:** $C_9H_{13}ClF_3N_5$
**Výtěžek:** 53 %
**Skupenský stav**: bílá pevná látka
**Teplota tání:** 70-72 °C

**$^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 6,92 (1H, br s, NH), 4,32–4,27 (2H, m, $CH_2$-$CF_3$), 3,74–3,71 (4H, m, $CH_2$), 1,21–1,18 (6H, m, $CH_3$).
**$^{13}$C-NMR (101 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 168,5, 167,9, 166,4, 129,5, 127,1, 124,8, 122,4, 43,1, 41,4, 12,9.

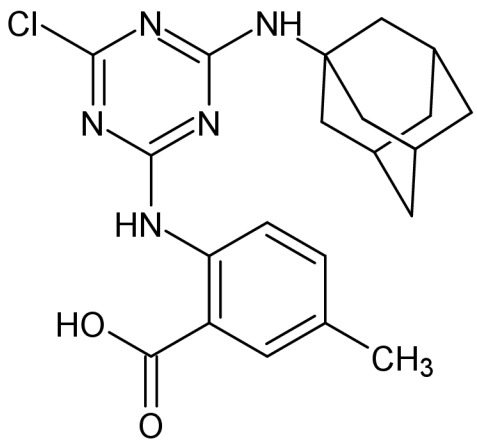



**Obr. 32: Derivát 3b, vlastní tvorba**

***(3b)*** **methyl 5-chlor-2-({4-chlor-6-[(2,2,2-trifluoroethyl)amin]-1,3,5-triazin -2-yl}amin)benzoát**

**Specifika reakce:** Po ukončení reakce byla reakční směs přefiltrována; získané množství pevné látky bylo zanedbatelné (0,11 g) a pravděpodobně neobsahovalo cílový produkt. Filtrát byl následně odpařen na rotační vakuové odparce, přičemž úplné odstranění rozpouštědla nebylo možné a vznikla olejovitá fáze. Byl proveden pokus o izolaci produktu srážením přídavkem diethyletheru (cca 25 ml) a malého množství acetonu, avšak ani za použití ultrazvuku nedošlo k tvorbě sraženiny. Směs byla ponechána přes noc v chladničce a následující den byla odpařena do formy vhodné pro měření NMR spektra.
**Mr:** 396,15 g/mol
**Sumární vzorec**: $C_{13}H_{10}Cl_2F_3N_5O_2$
**Výtěžek:** 30 %
**Skupenský stav:** žlutá olejovitá kapalná látka
**Teplota tání:** 155-158 °C

**$^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 10,63 (1H, br s, NH), 7,94 (1H, s, $CH_{Ar}$), 7,43–7,40 (2H, m, $CH_{Ar}$), 6,88 (1H, br s, NH), 4,34–4,31 (2H, m, $CH_2$-$CF_3$), 3,81 (3H, s, $CH_3$).
**$^{13}$C-NMR (101 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 167,5, 166,8, 165,4, 162,7, 142,3, 133,1, 131,3, 129,5, 127,1, 124,8, 124,0, 122,4, 121,0, 118,1, 52,0, 43,3.

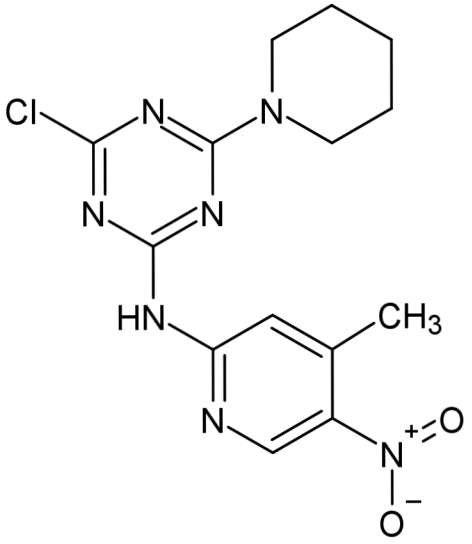



**Obr. 33: Derivát 5c, vlastní tvorba**

***(5c)*** **2-{[4-N-(adamantan-1-yl)-6-chlor-1,3,5-triazin-2-yl]amin}-5-methylbenzenkarboxylová kyselina**

**Mr:** 413,91 g/mol
**Sumární vzorec:** $C_{21}H_{24}ClN_5O_2$
**Výtěžek:** 53 %
**Skupenský stav:** bílá pevná látka
**Teplota tání:** >220 °C (limit přístroje)

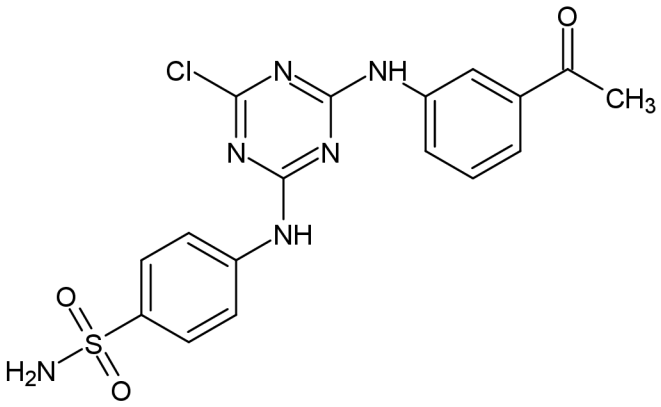
**$^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 9,74 (2H, br s, NH), 7,91 (1H, s, $CH_{Ar}$), 7,32–7,30 (2H, m, $CH_{Ar}$), 2,42 (3H, s, $CH_3$), 2,08 – 1,96 (15H, m, $CH_{Adam}$ + $CH_{2Adam}$).
**$^{13}$C-NMR (101 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 169,8, 167,0, 165,3, 162,6, 142,6, 131,8, 126,3, 118,3, 114,0, 51,3, 41,9, 36,3, 24,1, 20,6.




**Obr. 34: Derivát 2d, vlastní tvorba**

***(2d)*** **4-chlor-N-(4-methyl-5-nitropyridin-2-yl)-6-(piperidin-1-yl)-1,3,5-triazin-2-amin**
**Mr:** 349,78 g/mol
**Sumární vzorec:** $C_{14}H_{16}ClN_7O_2$
**Výtěžek:** 46 %
**Skupenský stav:** bílá pevná látka
**Teplota tání:** 188-190 °C

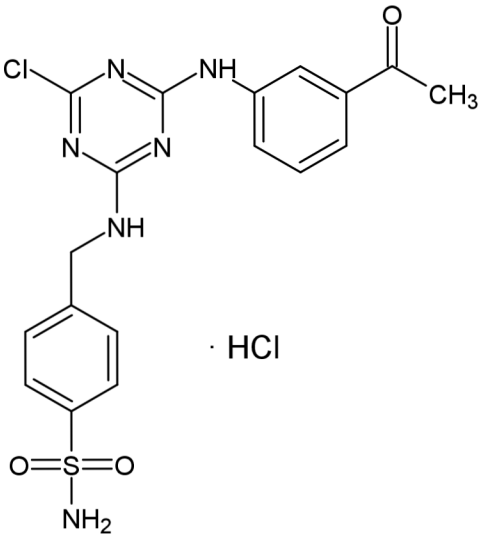
**$^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 8,63 (1H, s, $CH_{Ar}$), 8,33 (1H, br s, NH), 7,52 (1H, s, $CH_{Ar}$), 3,70–3,68 (4H, m, $CH_2$), 2,59 (3H, s, $CH_3$), 1,74–1,56 (6H, m, $CH_2$).
**$^{13}$C-NMR (101 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 166,7, 165,2, 162,6, 159,5, 145,8, 143,4, 137,3, 112,5, 44,2, 25,9, 24,9, 19,7.




**Obr. 35: Derivát 10e, vlastní tvorba**

***(10e)*** **4-{[4-(3-acetylanilin)-6-chlor-1,3,5-triazin-2-yl]amin}benzen-1-sulfonamid**
**Mr:** 418,86 g/mol
**Sumární vzorec:** $C_{17}H_{15}ClN_6O_3S$
**Výtěžek:** 72 %
**Skupenský stav:** bílá pevná látka
**Teplota tání:** 190-192 °C

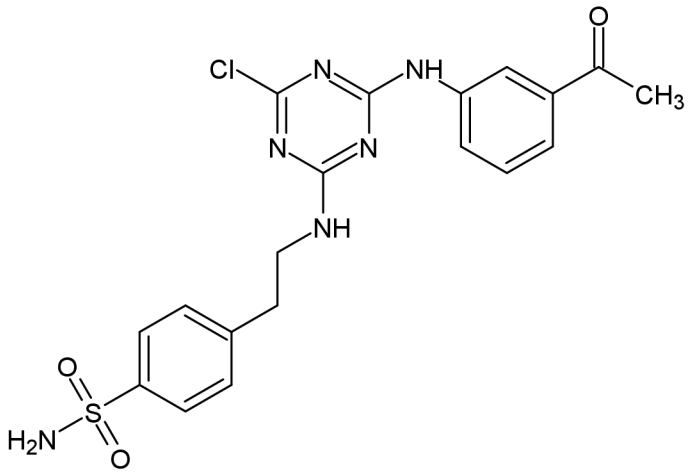
**$^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 9,14 (2H, br s, NH), 8,48 (2H, br s, $NH_2$), 7,69 – 7,58 (6H, m, $CH_{Ar}$), 7,30–7,27 (2H, m, $CH_{Ar}$), 2,58 (3H, s, $CH_3$).
**$^{13}$C-NMR (101 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 201,3, 166,3, 163,3, 162,5, 142,6, 142,0, 135,6, 131,7, 130,2, 124,5, 119,4, 28,8.




**Obr. 36: Derivát 10f, vlastní tvorba**

**(10f) Hydrochlorid 4-(1-{[4-(3-acetylanilin)-6-chlor-1,3,5-triazin-2-yl]amin}methyl)benzen-1-sulfonamidu**
**Mr:** 469,35 g/mol
**Sumární vzorec:** $C_{18}H_{17}ClN_6O_3S{\cdot}HCl$
**Výtěžek:** 75 %
**Skupenský stav:** bílá pevná látka
**Teplota tání:** >220 °C (limit přístroje)

**$^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 8,21 (1H, br s, NH), 7,83–7,79 (2H, m, $CH_{Ar}$), 7,76–7,72 (2H, m, $CH_{Ar}$), 7,46–7,44 (2H, m, $CH_{Ar}$), 7,22–7,16 (2H, m, $CH_{Ar}$), 6,67–6,51 (3H, br s, NH+$NH_2$), 4,87 (2H, s, $CH_2$), 2,66 (3H, s, $CH_3$).
**$^{13}$C-NMR (101 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 199,2, 166,9, 165,7, 163,6, 142,8, 142,2, 140,7, 138,9, 128,8, 128,0, 124,6, 119,3, 44,9, 26,5.




**Obr. 37: Derivát 10g, vlastní tvorba**

***(10g)*** **4-(2-{[4-(3-acetylanilin)-6-chlor-1,3,5-triazin-2-yl]amin}ethyl)benzen -1-sulfonamid**

**Mr:** 446,91 g/mol

**Sumární vzorec:** $C_{19}H_{19}ClN_6O_3S$

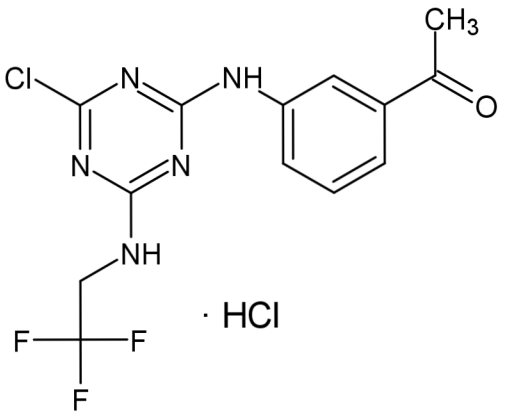
**Výtěžek:** 69 %

**Skupenský stav:** bílá pevná látka

**Teplota tání:** 183-185 °C

**$^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 8,23 (2H, br s, NH), 7,73–6,84 (4H, m, $CH_{Ar}$), 7,42–7,36 (4H, m, $CH_{Ar}$), 5,96 (2H, br s, $NH_2$), 3,65–3,63 (2H, m, $CH_2$), 2,96–2,91 (2H, m, $CH_2$), 2,50 (3H, s, $CH_3$).

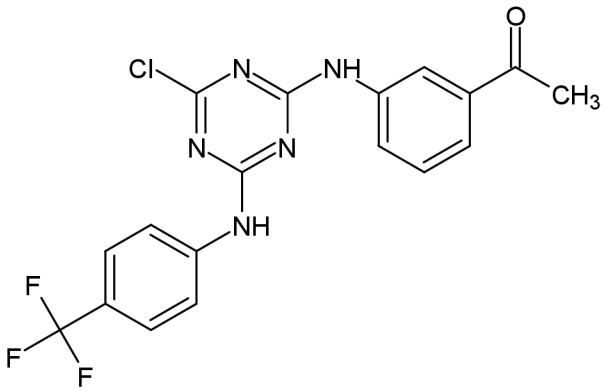
**$^{13}$C-NMR (101 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 199,2, 167,0, 166,2, 163,6, 145,0, 142,6, 140,7, 138,9, 129,4, 128,8, 126,0, 124,6, 123,2, 119,1, 42,4, 34,6, 27,9.




**Obr. 38: Derivát 10h, vlastní tvorba**

***(10h)*** **Hydrochlorid 1-(3-{[4-chlor-6-((2,2,2-trifluorethyl)amino)-1,3,5-triazin-2-yl]amino}fenyl)ethan-1-on**
**Mr:** 382,17 g/mol
**Sumární vzorec:** $C_{13}H_{11}ClF_3N_5O{\cdot}HCl$
**Výtěžek:** 67 %
**Skupenský stav:** bílá pevná látka
**Teplota tání:** 208-210 °C

**$^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 8,18 (2H, br s, NH), 8,00 (1H, br s, HCl), 7,71–7,48 (4H, m, $CH_{Ar}$), 4,23 (2H, s, $CH_2$), 2,63 (3H, s, $CH_3$).
**$^{13}$C-NMR (101 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 224,6, 199,2, 166,9, 165,2, 163,6, 140,7, 138,9, 129,5, 128,8, 127,1, 123,2, 122,4, 120,2, 44,1, 26,5.




**Obr. 39: Derivát 10i, vlastní tvorba**

***(10i)*** **1-[3-({4-chlor-6-[4-(trifluoromethyl)anilin]-1,3,5-triazin-2-yl}amin) fenyl]ethan-1-on**

**Specifika reakce:** Pro špatnou rozpustnost produktu byla k separaci úspěšně využita metoda suchého nanášení, při níž byl vzorek z roztoku v DMF naadsorbován přímo na silikagel.

**Mr:** 407,78 g/mol

**Sumární vzorec:** $C_{18}H_{13}ClF_3N_5O$

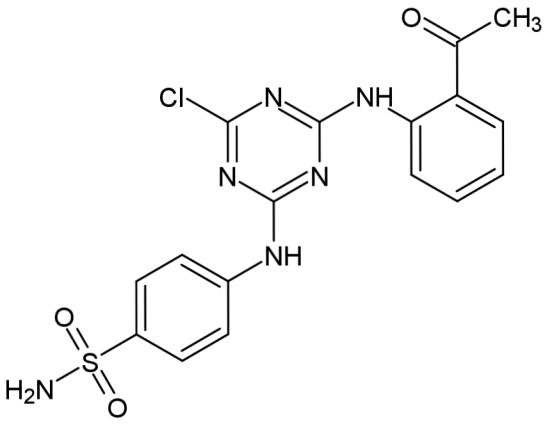
**Výtěžek:** 46 %

**Skupenský stav:** bílá pevná látka

**Teplota tání:** 183-185 °C

**$^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 8,06 (2H, br s, NH), 7,70–7,19 (8H, m, $CH_{Ar}$), 2,64 (3H, s, $CH_3$)

**$^{13}$C-NMR (101 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 199,2, 166,3, 163,5, 140,6, 138,9, 128,7, 127,0, 123,7, 120,5, 119,3 23,5

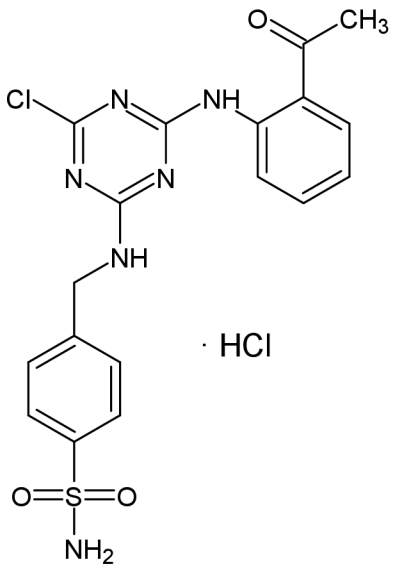



**Obr. 40: Derivát 11e, vlastní tvorba**

***(11e)* 4-{[4-(2-acetylanilin)-6-chlor-1,3,5-triazin-2-yl]amin}benzen-1-sulfonamid**

**Specifika reakce:** Produkt byl izolován v dostatečné čistotě a nebylo nutné dalšího čištění.
**Mr:** 418,86 g/mol
**Sumární vzorec:** $C_{17}H_{15}ClN_6O_3S$
**Výtěžek:** 65 %
**Skupenský stav:** růžová pevná látka
**Teplota tání:** 205-207 °C

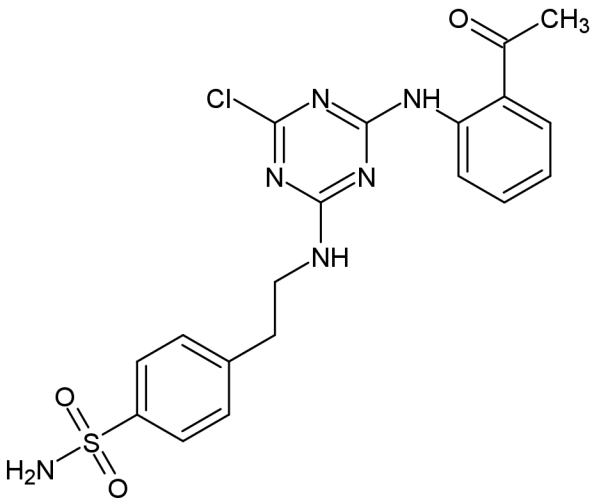
**$^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 8,41 (1H, br s, NH), 8,32 (1H, br s, NH), 7,69–7,58 (2H, m, $CH_{Ar}$), 7,54–7,44 (2H, m, $CH_{Ar}$), 7,41–7,28 (4H, m, $CH_{Ar}$+$NH_2$), 2,63 (3H, s, $CH_3$).
**$^{13}$C-NMR (101 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 199,2, 166,3, 163,7, 142,6, 140,7, 138,9, 135,6, 130,7, 128,9, 124,6, 123,2, 119,1, 26,5.




**Obr. 41: Derivát 11f, vlastní tvorba**

***(11f)*** **Hydrochlorid 4-(1-{[4-(2-acetylanilin)-6-chlor-1,3,5-triazin-2-yl]amin} methyl)benzen-1-sulfonamidu**
**Mr:** 469,35 g/mol
**Sumární vzorec:** $C_{18}H_{17}ClN_6O_3S{\cdot}HCl$
**Výtěžek:** 67 %
**Skupenský stav:** růžová pevná látka
**Teplota tání:** 208-210 °C

**$^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 9,13 (2H, br s, NH), 8,19 (1H, br s, HCl), 7,86–7,80 (2H, m, $CH_{Ar}$), 7,43–7,36 (6H, m, $CH_{Ar}$), 4,87 (2H, s, $CH_2$), 2,71 (3H, s, $CH_3$).
**$^{13}$C-NMR (101 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 201,3, 166,9, 165,9, 162,8, 142,8, 142,0, 131,7, 131,2, 129,9, 128,0, 126,1, 124,5, 119,4, 44,9, 28,8.




**Obr. 42: Derivát 11g, vlastní tvorba**

***(11g)*** **4-(2-{[4-(2-acetylanilin)-6-chlor-1,3,5-triazin-2-yl]amin}ethyl)benzen-1-sulfonamid**

**Specifika reakce:** Produkt byl izolován v dostatečné čistotě a nebylo nutné dalšího čištění.

**Mr:** 446,91 g/mol

**Sumární vzorec:** $C_{19}H_{19}ClN_6O_3S$

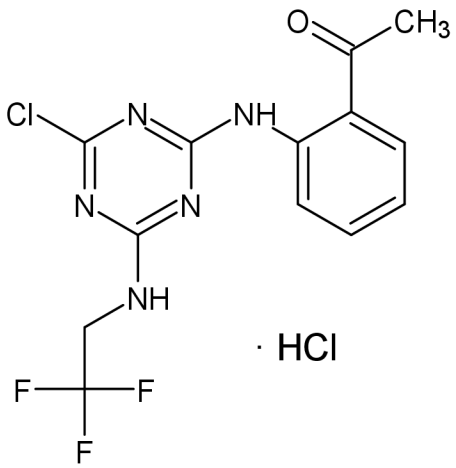
**Výtěžek:** 57 %

**Skupenský stav:** zelená pevná látka

**Teplota tání:** 139-142 °C

**$^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 9,21 (2H, br s, NH), 7,98–7,26 (10H, n, $NH_2$+$CH_{Ar}$), 3,64–3,62 (2H, m, $CH_2$), 2,94–2,92 (2H, m, $CH_2$), 2,58 (3H, s, $CH_3$).

**$^{13}$C-NMR (101 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 201,3, 167,0, 166,2, 162,9, 145,0, 142,6, 142,0, 131,7, 129,9, 126,0, 124,5, 119,4, 42,4, 34,6, 28,8.




**Obr. 43: Derivát 11h, vlastní tvorba**

***(11h)*** **Hydrochlorid 1-(2-{[4-chlor-6-((2,2,2-trifluorethyl)amino)-1,3,5-triazin-2-yl] amino}fenyl)ethan-1-on**

**Mr:** 382,17 g/mol

**Sumární vzorec:** $C_{13}H_{11}ClF_3N_5O{\cdot}HCl$

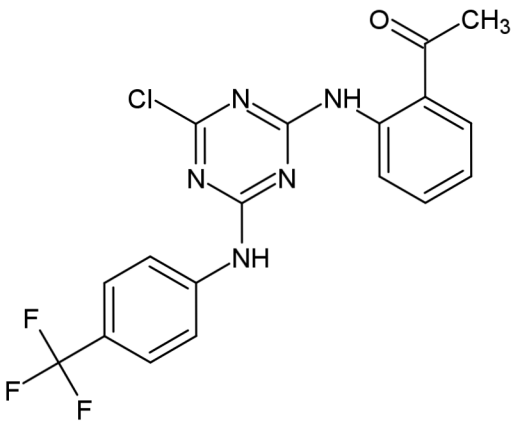
**Výtěžek:** 66 %

**Skupenský stav:** sytě růžová pevná látka

**Teplota tání:** 170-172 °C

**$^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 9,16 (1H, br s, NH), 8,92 (1H, br s, HCl), 8,07 (1H, br s, NH), 7,76–7,71 (4H, m, $CH_{Ar}$), 4,36–4,34 (2H, m, $CH_2$-$CF_3$), 2,47 (3H, s, $CH_3$).

**$^{13}$C-NMR (101 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 201,3, 166,8, 165,4, 162,7, 142,0, 131,7, 129,9, 127,9, 124,5, 122,4, 119,7, 44,1, 28,8.




**Obr. 44: Derivát 11i, vlastní tvorba**

***(11i)*** **1-[2-({4-chlor-6-[4-(trifluoromethyl)anilin]-1,3,5-triazin-2-yl}amin)fenyl] ethan-1-on**
**Mr:** 407,78 g/mol
**Sumární vzorec:** $C_{18}H_{13}ClF_3N_5O$
**Výtěžek:** 45 %
**Skupenský stav:** růžová pevná látka
**Teplota tání:** 168-170 °C

**$^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 9,02 (2H, br s, NH), 7,68–7,24 (8H, m, $CH_{Ar}$), 2,51 (3H, s, $CH_3$).
**$^{13}$C-NMR (101 MHz, DMSO-d$_6$) *δ ppm*:** 201,3, 166,3, 164,3, 162,5, 142,0, 131,7, 129,9, 127,1, 125,0, 122,6, 119,2, 28,8.

# 4 Diskuze

Jako základní strukturní skelet pro syntézu cílových sloučenin byl zvolen kyanurchlorid (2,4,6-trichlor-1,3,5-triazin). Tato volba byla motivována jednak jeho vlivem na biologickou aktivitu struktur (viz předchozí kapitoly) a jednak jeho výbornou reaktivitou vůči širokému spektru nukleofilů. Samotná příprava potenciálních inhibitorů probíhala formou postupné aromatické nukleofilní substituce atomů chloru na triazinovém jádře. Reakční postupy vycházely z osvědčených literárních metodik, které byly následně modifikovány s ohledem na specifika konkrétních výchozích látek. [135]

V prvním syntetickém kroku byly připraveny monosubstituované meziprodukty. Jako nukleofily zde posloužila řada komerčně dostupných aminů (např. piperazin, deriváty aminobenzoových kyselin či polohové izomery aminoacetofenonu), které představují výhodné strukturní motivy pro inhibici karboanhydráz. Vzhledem k vysoké reaktivitě výchozího kyanurchloridu musela tato substituce probíhat striktně za chlazení (0-5 °C).

Následná syntéza finálních disubstituovaných derivátů spočívala v zavedení dalšího nukleofilu, v podobě různých derivátů aminů nebo benzensulfonamidů.

Náhrada prvního atomu chloru vede k elektronové deaktivaci triazinového cyklu, což snižuje reaktivitu zbývajících pozic. Z tohoto důvodu bylo nutné ve druhém kroku přistoupit ke zvýšení reakční teploty, a to na 35-45 °C.

Prostřednictvím této reakční sekvence se celkově podařilo připravit 11 monosubstituovaných meziproduktů a sérii 14 zcela nových, v literatuře dosud nepopsaných finálních sloučenin. Ověření jejich struktury a čistoty bylo provedeno pomocí $^{1}$H a $^{13}$CNMR spektroskopie a stanovením teplot tání. Následně byly finální produkty předány spolupracujícímu pracovišti (CEITEC MU, skupina doc. Hritze) ke stanovení inhibiční aktivity. Bohužel v době odevzdání práce nebyly výsledky ještě k dispozici.

## 4.1 Syntéza monosubstituovaných derivátů trichlortriazinu

Příprava monosubstituovaných derivátů probíhala formou aromatické nukleofilní substituce prvního atomu chloru na 2,4,6-trichlor-1,3,5-triazinu vybranými aminy v souladu s optimalizovanými literárními postupy. [135] Volba reakčního rozpouštědla byla vždy individuálně přizpůsobena rozpustnosti příslušného nukleofilu. Standardní postup spočíval v pozvolném přikapávání roztoku aminu k roztoku trichlortriazinu, přičemž pro obě výchozí látky bylo ve většině případů využito totožné rozpouštědlo. Vzhledem k extrémní reaktivitě výchozího trichlortriazinu musela být reakční směs po celou dobu striktně temperována na 0-5 °C pomocí ledové lázně. Překročení této teploty by mohlo zapříčinit ztrátu selektivity reakce a vznik nežádoucích vícenásobně substituovaných produktů.

I přes snahu o unifikaci syntetického postupu si některé reaktanty vyžádaly experimentální úpravy. Zásadní komplikací byla u některých látek omezená rozpustnost. Nukleofily 2,2,2-trifluorethylamin (**3**) a 2-aminopyridin-3-karboxylová kyselina (**7**) byly v běžně používaných rozpouštědlech prakticky nerozpustné. Z tohoto důvodu nebylo možné připravit jejich roztoky a do reakční směsi byly přidávány po částech přímo v pevné fázi. V případě derivátu **3** (reakce v acetonu) reagoval amin i přes svou nerozpustnost okamžitě po kontaktu s triazinovým jádrem, což se projevilo silně exotermním průběhem. Pro kyselinu **7** se jako nejvhodnější reakční médium nakonec ukázal acetonitril. Zajímavostí u derivátu **3** byla také nutnost prodloužení reakční doby a mírném zvýšení teploty, kdy po hodině chlazení byla směs míchána dalších 90 minut při laboratorní teplotě pro dosažení maximální konverze.

Významné odchylky byly zaznamenány i v teplotním průběhu některých reakcí. Výrazně exotermní charakter vykazovala syntéza derivátu **5**. I přes intenzivní chlazení bylo velmi obtížné udržet požadovanou teplotu kolem 0 °C. Přikapávání nukleofilu probíhalo velice pomalu a teplota kolísala mezi 3 až 4 °C. Tyto podmínky bylo nutné akceptovat, aby bylo možné syntézu dokončit.

Při syntéze derivátu **1.1** došlo k odchylce od standardního experimentálního postupu. Namísto přikapávání nukleofilu do roztoku kyanurchloridu byl v tomto případě roztok kyanurchloridu přikapáván do směsi piperazinu a bezvodého uhličitanu draselného v dichlormethanu. Tento postup vedl k velmi prudké exotermní reakci, což opět vyžadovalo striktní kontrolu rychlosti přikapávání a masivní chlazení.

Drobná anomálie s udržením teploty se objevila i při syntéze derivátu **8**, kdy minimální dosažitelná teplota roztoku před přídavkem nukleofilu neklesla pod 1 °C a ustálila se na bodu mrazu až během samotného průběhu substituce.

Samotná izolace produktů z reakční směsi probíhala u většiny derivátů standardním způsobem. Standardní zpracování spočívalo v odsátí vzniklé sraženiny na fritě a jejím vysrážením na ledu. Výsledný produkt byl dále vysušen v exsikátoru do konstantní hmotnosti. U látek s nižší čistotou (ověřeno pomocí NMR spektroskopie) byla následně zařazena kolonová chromatografie nebo rekrystalizace. Sloučeniny **10** a **11** byly například úspěšně izolovány pouhým vysrážením do ledové vody.

Nicméně řada produktů vyžadovala individuální izolační metody. Například derivát **2** se na ledu nesrážel a byla proto testována různá srážecí činidla (hexan, aceton, heptan). Nejlepších výsledků bylo dosaženo v acetonu, načež byl roztok odpařen na rotační vakuové odparce, zbytek přefiltrován přes fritu a produkt vysušen v exsikátoru do konstantní hmotnosti.

Zcela specifický postup izolace si vyžádal derivát **5**. Po ukončení reakce byla směs nejprve zfiltrována, čímž byla ve formě sraženiny odstraněna anorganická báze, zatímco cílový produkt zůstal rozpuštěn ve filtrátu. Odpařením tohoto filtrátu byla získána pevná směs obsahující produkt a nezreagovanou výchozí látku. Vzhledem k nerozpustnosti obou těchto složek ve vodě byla testována jejich selektivní rozpustnost v organických rozpouštědlech (aceton, ethanol, dichlormethan) s cílem obě látky od sebe oddělit. Na základě těchto zkoušek byl jako ideální separační médium zvolen dichlormethan, ve kterém se cílový produkt beze zbytku rozpustil, zatímco výchozí látka zůstala v pevné fázi a mohla být snadno odsáta na fritě. Získaný filtrát (roztok produktu v dichlormethanu) byl následně odpařen a surový produkt byl pro dosažení maximální čistoty třikrát překrystalizován z isopropanolu, přičemž poslední krystalizační krok probíhal přes noc za snížené teploty. Následující den byl čistý produkt odfiltrován a vysušen do konstantní hmotnosti.

Dvojitá izolace byla nutná u derivátu **6**. Po prvotním odsátí sraženiny byl matečný louh ponechán přes noc v lednici, čímž vznikla druhá frakce produktu. Následná NMR analýza potvrdila, že čistý cílový produkt se nachází v obou frakcích.

U derivátu **3** byla sraženina po filtraci dodatečně dvakrát promyta dichlormethanem. Zkoumání filtrátu pomocí NMR ukázalo, že produkt byl primárně obsažen již ve výchozí sraženině, která byla finálně dočištěna kolonovou chromatografií.

Zcela výjimečným případem byl derivát **4**, který byl sice po promytí vodou a acetonem úspěšně izolován, nicméně vykazoval tak extrémní nerozpustnost v běžně dostupných deuterizovaných rozpouštědlech, že u něj nebylo možné provést standardní NMR analýzu.

Po provedení výše popsaných izolačních kroků byla u připravených meziproduktů ověřována jejich struktura a čistota pomocí $_{1}$H a $_{13}$C-NMR spektroskopie. Mezi úspěšně syntetizované látky, jejichž spektra potvrdila vysokou čistotu bez nutnosti dodatečného přečištění, a které tak mohly být přímo využity jako prekurzory pro následnou disubstituci, patřily deriváty: **2**, **5**, **10** a **11**.

U derivátu **3** ukázala prvotní NMR analýza surové sraženiny nutnost dodatečného přečištění. Tento meziprodukt byl proto úspěšně zbaven příměsí pomocí sloupcové chromatografie, čímž bylo dosaženo optimální čistoty pro jeho využití v dalším syntetickém kroku. Při přečištění derivátu **9** došlo k reakci se silikagelem použitým pro sloupcovou chromatografii a jeho rozkladu na koloně. Izolace čistého meziproduktu **9** pro další syntézu tak nebyla možná.

**Tab. 9: Výtěžky surových monosubstituovaných produktů**

| Označení produktu | Výtěžek v % |
|---|---|
| **1a** | 46 |
| **1b** | 78 |
| **2** | 29 |
| **3** | 46 (přečištěný produkt) |
| **4** | 2 |
| **5** | 29 |
| **6** | 45 |
| **7** | 48 |
| **8** | 92 |
| **9** | 126 (degradace produktu) |
| **10** | 89 |
| **11** | 94 |

Výtěžky připravených monosubstituovaných derivátů se pohybovaly v poměrně širokém rozmezí 29% až 126% (viz tabulka 9). Tyto rozdíly velmi úzce korelují s reaktivitou jednotlivých nukleofilů a především s náročností zvolených izolačních postupů.

Nejvyšších výtěžků, přesahujících hranici 90 %, bylo plně v souladu s předpoklady dosaženo u derivátů **10, 11**. V případě těchto látek probíhala substituce velmi ochotně a produkt se vysrážel v dostatečné čistotě přímo z reakční směsi. Absence nutnosti dodatečného přečišťování, tak minimalizovala mechanické i fyzikálně-chemické ztráty produktu během izolace.

Naopak u derivátů vyžadujících komplexnější přečištění byl zaznamenán pokles finálního výtěžku. Typickým příkladem je derivát **5**, u něhož finální izolovaný výtěžek činil pouze 29 %. Tento výsledek je přímým důsledkem nutnosti selektivního rozpouštění a následné trojnásobné krystalizace z isopropanolu, při níž nevyhnutelně docházelo k částečným ztrátám produktu v matečných louzích.

Podobný trend byl pozorován i u derivátu **3** (výtěžek 46 %) kde se na snížení celkové výtěžnosti projevilo jak obtížnější potlačení exotermního průběhu reakce, tak i zařazení sloupcové chromatografie jakožto finálního čistícího kroku.

V případě derivátu **9**, jehož výtěžek surového produktu dosáhl 126 %, byla tato nereálná hodnota s největší pravděpodobností způsobena inkorporací zbytkového rozpouštědla do krystalů a přítomností nezreagovaných výchozích látek či dalších příměsí. Přítomnost silně znečištěné směsi jednoznačně potvrdila i NMR analýza. Z tohoto důvodu bylo přistoupeno k přečištění látky pomocí sloupcové chromatografie. Během tohoto kroku však derivát na silikagelu podlehl kompletní degradaci a skutečný výtěžek čisté cílové sloučeniny tak nebylo možné stanovit.

Celkový výtěžek u derivát **4** byl pouze 2 % produktu. Tuto minimální výtěžnost lze s největší pravděpodobností přičíst ztrátám cílové látky během promývání organickým rozpouštědlem (acetonem), ve kterém se produkt mohl částečně rozpouštět. Získaný pevný podíl navíc vykazoval extrémní nerozpustnost ve všech běžně dostupných rozpouštědlech, což zcela znemožnilo provedení standardní NMR analýzy.

## 4.2 Syntéza disubstituovaných derivátů 2,4,6-trichlor-1,3,5-triazinu

Závěrečný krok syntézy spočíval v přípravě disubstituovaných derivátů 1,3,5-triazinu formou nukleofilní aromatické substituce druhého atomu chloru. Jako výchozí látky posloužily dříve připravené monosubstituované meziprodukty, které reagovaly se sérií strukturně rozmanitých dusíkatých nukleofilů (zahrnující alifatické, aromatické i heterocyklické aminy a sulfonamidy).

Reakce probíhaly v polárním rozpouštědle (DMF) v poměru výchozích látek 1:1:1. Jako akceptor chlorovodíku sloužil bezvodý uhličitan draselný (1 ekvivalent). Zásadní úpravu bylo nutné provést u reakce s nukleofily ve formě hydrochloridových solí (např. 2,2,2-trifluorethylamin hydrochlorid). U nich bylo nutné množství báze zdvojnásobit, aby se zajistilo uvolnění reaktivního aminu z jeho soli a zároveň zneutralizovala kyselina vznikající během substituce.

Vzhledem k tomu, že první substituent částečně snižuje reaktivitu zbývajících atomů chloru na triazinovém jádře, probíhal tento krok za zvýšené teploty (35-45 °C). Průběh reakce byl vždy průběžně monitorován pomocí TLC. Po 168 hodinách byla reakce ukončena a směs byla nalita do ledové tříště. Vzniklá sraženina produktu byla odsáta na fritě, důkladně promyta vodou pro odstranění zbytků DMF a anorganických solí a vysušena do konstantní hmotnosti. V případě nedostatečné čistoty po srážení bylo zařazeno dočištění pomocí sloupcové chromatografie.

Samotný průběh reakce nevyžadoval u žádného z derivátů další modifikace optimalizovaných podmínek. Výrazné rozdíly v chování jednotlivých látek však byly pozorovány během zpracování reakčních směsí.

Například při izolaci derivátu **3a** nedošlo po nalití do ledové tříště k očekávanému vysrážení produktu. Z tohoto důvodu byly testovány alternativní srážecí kapaliny (aceton, dichlormethan, diethylether). Jako nejvhodnější se ukázal aceton, po jehož přídavku produkt ochotně vypadl v pevné fázi a mohl být následně izolován standardní filtrací přes fritu.

Komplikovanější průběh izolace nastal u derivátu **3b.** Prvotní filtrace zředěné reakční směsi poskytla pouze zanedbatelné množství pevné látky (0,11 g). Filtrát byl následně zahuštěn na rotační vakuové odparce, přičemž úplné odstranění rozpouštědla nebylo možné a vznikla olejovitá fáze. Byl proveden pokus o izolaci produktu srážením přídavkem diethyletheru (cca 25 ml) a malého množství acetonu, avšak ani za použití ultrazvuku nedošlo k tvorbě sraženiny. Směs navíc neposkytla sraženinu ani po dlouhodobém stání přes noc v chladničce. Z tohoto důvodu musel být zbytek rozpouštědel finálně odpařen na viskózní reziduum, které bylo v tomto stavu, bez další krystalizace, rovnou podrobeno NMR analýze k ověření přítomnosti produktu.

Podle výsledků NMR spekter bylo u vybraných sraženin zařazeno chromatografické dočištění. Zatímco deriváty **11f** a **11g** vykazovaly dostatečnou čistotu již po samotném vysrážení, u vybraných látek bylo nutné přistoupit ke sloupcové chromatografii. Úspěšnost tohoto kroku se ovšem lišila: u derivátu **10e** bylo dosaženo vysoké čistoty, zatímco derivát **10f** se dostatečně dočistit nepodařilo a látka **3b** se na stacionární fázi dokonce zcela rozložila.

Z chromatografického hlediska byla velmi problematická série **10h, 11h a 11i**, u které se projevila extrémní afinita k silikagelu. Vzorky zůstávaly trvale zachyceny na počátku kolony, což si vyžádalo zvýšení polarity mobilní fáze přídavkem methanolu (s prokazatelným úspěchem u **11h**). Zcela individuální přístup pak vyžadoval derivát **10i**. Po standardním zpracování reakční směsi se ukázalo, že kvůli jeho extrémně špatné rozpustnosti není možné produkt převést do roztoku v mobilní fázi vhodné pro klasickou kolonovou chromatografii. Postup čištění byl proto upraven na metodu suchého nanášení (tzv. *dry loading*). Látka byla nejprve rozpuštěna v minimálním množství dimethylformamidu a následně smísena se silikagelem. Po úplném odpaření rozpouštědla za sníženého tlaku došlo k rovnoměrnému navázání vzorku na stacionární fázi.

**Tab. 10: Výtěžky surových disubstituovaných produktů**

| Označení produktu | Výtěžek v % |
|---|---|
| **3a** | 53 |
| **3b** | 30 |
| **5c** | 53 |
| **2d** | 46 |
| **10e** | 72 |
| **10f** | 75 |
| **10g** | 69 |
| **10h** | 67 |
| **10i** | 46 |
| **11e** | 65 |
| **11f** | 67 |
| **11g** | 57 |
| **11h** | 66 |
| **11i** | 45 |

Celkové výtěžky izolovaných disubstituovaných derivátů se pohybovaly v poměrně širokém rozmezí 30 až 75 % (viz tabulka 10). V návaznosti na výše diskutované komplikace během zpracování byl nejnižší výtěžek (30 %) zaznamenán u derivátu **3b**. Významné ztráty v tomto případě prokazatelně souvisely s nemožností standardního

vysrážení produktu a nutností izolovat produkt ve formě viskózního olejovitého zbytku.

Nižší výtěžnost (46 %) byla pozorována také při syntéze derivátu **2d**. Vzhledem k tomu, že samotný průběh reakce monitorovaný pomocí TLC nevykazoval žádné zjevné anomálie a výchozí látky se ochotně spotřebovávaly, lze tento pokles finální výtěžnosti přisoudit s největší pravděpodobností mechanickým ztrátám během filtrace a částečnému vymytí produktu při promývání sraženiny.

Zajímavý trend z hlediska reaktivity byl pozorován u série derivátů, kde jako první substituent figurovaly izomery aminoacetofenonu. Zatímco u většiny látek z této skupiny bylo po zavedení druhého nukleofilu dosahováno velmi dobrých výtěžků v rozmezí 57–75 %, zřetelný pokles byl zaznamenán u derivátů **10i** a **11i**. U obou těchto látek výtěžek shodně klesl na 46 a 45 %. Jako možné vysvětlení tohoto jevu je vliv elektronových efektů. Společným strukturním rysem obou látek je zavádění 4-(trifluormethyl)anilinu ve druhém reakčním kroku. Přítomnost silně elektronakceptorní trifluormethylové skupiny (-$CF_3$) výrazně snižuje elektronovou hustotu na dusíku aminoskupiny. Lze se proto domnívat, že právě snížená nukleofilita tohoto reagentu zapříčinila jeho zhoršenou ochotu vstupovat do substituční reakce, což se následně odrazilo v nižším konečném výtěžku obou produktů.

# 5 Závěr

Hlavním cílem této diplomové práce byl návrh a syntéza nových, vysoce selektivních inhibitorů nádorově asociované izoformy karboanhydrázy IX (CA IX). Jako výchozí strukturní platforma byl zvolen 2,4,6-trichlor-1,3,5-triazinový skelet. Pomocí teplotně řízené nukleofilní aromatické substituce byla do molekul nejprve inkorporována série vybraných aminů za vzniku monosubstituovaných meziproduktů. A na tyto prekuzory byly následně navázány další strukturně rozmanité dusíkaté nukleofily (zahrnující alifatické, aromatické i heterocyklické aminy a sulfonamidy), čímž byla získána cílová řada disubstituovaných derivátů.

Tímto optimalizovaným postupem se podařilo úspěšně připravit celkem 11 monosubstituovaných meziproduktů a sérii 14 zcela nových, v literatuře dosud nepopsaných finálních sloučenin. Chemická struktura a čistota všech syntetizovaných látek byla jednoznačně potvrzena pomocí $^{1}$H-NMR a $^{13}$C-NMR spektroskopie a stanovením teploty tání.

Syntéza a následná strukturní charakterizace této série nových derivátů představuje úspěšné naplnění cílů, které si tato práce kladla. Připravené sloučeniny nyní představují perspektivní kandidáty pro následné *in vitro* biologické testování, které zhodnotí jejich skutečný inhibiční potenciál a možnosti využití v rámci cílené protinádorové terapie.

# Použité zdroje

[1] SUPURAN, Claudiu T. Carbonic Anhydrases - An Overview. *Current Pharmaceutical Design* [online]. 2008, **14**(7), 603–614. Dostupné z: doi:10.2174/138161208783877884

[2] IMTAIYAZ HASSAN, Md., Bushra SHAJEE, Abdul WAHEED, Faizan AHMAD a William S. SLY. Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* [online]. 2013, **21**(6), Carbonic Anhydrase, 1570–1582 [vid. 2026-03-12]. ISSN 0968-0896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2012.04.044

[3] GEERS, Cornelia a Gerolf GROS. Carbon Dioxide Transport and Carbonic Anhydrase in Blood and Muscle. *Physiological Reviews* [online]. 2000, **80**(2), 681–715 [vid. 2026-03-16]. ISSN 0031-9333. Dostupné z: doi:10.1152/physrev.2000.80.2.681

[4] SUPURAN, Claudiu T. Carbonic Anhydrases and Metabolism. *Metabolites* [online]. 2018, **8**(2) [vid. 2026-03-12]. ISSN 2218-1989. Dostupné z: doi:10.3390/metabo8020025

[5] STEWARD, Martin C., Hiroshi ISHIGURO a R. Maynard CASE. MECHANISMS OF BICARBONATE SECRETION IN THE PANCREATIC DUCT. *Annual Review of Physiology* [online]. 2005, **67**(Volume 67, 2005), 377–409 [vid. 2026-03-16]. ISSN 0066-4278, 1545-1585. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.physiol.67.031103.153247

[6] PARKKILA, Seppo, Anna-Kaisa PARKKILA, Hannu RAJANIEMI, Gul N. SHAH, Jeffrey H. GRUBB, Abdul WAHEED a William S. SLY. Expression of membrane-associated carbonic anhydrase XIV on neurons and axons in mouse and human brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2001, **98**(4), 1918–1923 [vid. 2026-03-16]. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.98.4.1918

[7] HARITOS, Victoria S. a Greg DOJCHINOV. Carbonic anhydrase metabolism is a key factor in the toxicity of CO2 and COS but not CS2 toward the flour beetle *Tribolium castaneum* [Coleoptera: Tenebrionidae]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* [online]. 2005, **140**(1), 139–147 [vid. 2026-03-16]. ISSN 1532-0456. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2005.01.012

[8] CHEGWIDDEN, W. Richard, Susanna J. DODGSON a Ian M. SPENCER. The roles of carbonic anhydrase in metabolism, cell growth and cancer in animals. In: W. Richard CHEGWIDDEN, Nicholas D. CARTER a Yvonne H. EDWARDS, ed. *The Carbonic Anhydrases: New Horizons* [online]. Basel: Birkhäuser, 2000 [vid. 2026-03-16], s. 343–363. ISBN 978-3-0348-8446-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-0348-8446-4_16

[9] DODGSON, S. J. a R. E. FORSTER. Carbonic anhydrase: inhibition results in decreased urea production by hepatocytes. *Journal of Applied Physiology* [online]. 1986, **60**(2), 646–652 [vid. 2026-03-16]. ISSN 8750-7587. Dostupné z: doi:10.1152/jappl.1986.60.2.646

[10] HIRAKAWA, Yoshihisa, Miki SENDA, Kodai FUKUDA, Hong Yang YU, Masaki ISHIDA, Masafumi TAIRA, Kazushi KINBARA a Toshiya SENDA. Characterization of a novel type of carbonic anhydrase that acts without metal cofactors. *BMC Biology* [online]. 2021, **19**(1), 105 [vid. 2026-03-16]. ISSN 1741-7007. Dostupné z: doi:10.1186/s12915-021-01039-8

[11] SUPURAN, Claudiu T. Carbonic anhydrase versatility: from pH regulation to CO2 sensing and metabolism. *Frontiers in Molecular Biosciences* [online]. 2023, **10**, 1326633 [vid. 2026-03-16]. ISSN 2296-889X. Dostupné z: doi:10.3389/fmolb.2023.1326633

[12] LINDSKOG, Sven. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. 1997, **74**(1), 1–20 [vid. 2026-03-12]. ISSN 0163-7258. Dostupné z: doi:10.1016/S0163-7258(96)00198-2

[13] HILVO, Mika, Martti TOLVANEN, Amy CLARK, Bairong SHEN, Gul N. SHAH, Abdul WAHEED, Piia HALMI, Milla HÄNNINEN, Jonna M. HÄMÄLÄINEN, Mauno VIHINEN, William S. SLY a Seppo PARKKILA. Characterization of CA XV, a new GPI-anchored form of carbonic anhydrase. *Biochemical Journal* [online]. 2005, **392**(1), 83–92 [vid. 2026-03-17]. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/BJ20051102

[14] OKAMOTO, Nobuto, Kiyomi FUJIKAWA-ADACHI, Isao NISHIMORI, Keisuke TANIUCHI a Saburo ONISHI. cDNA sequence of human carbonic anhydrase-related protein, CA-RP X: mRNA expressions of CA-RP X and XI in human brain1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* [online]. 2001, **1518**(3), 311–316 [vid. 2026-03-17]. ISSN 0167-4781. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-4781(01)00193-2

[15] LINDSKOG, Sven. Purification and properties of bovine erythrocyte carbonic anhydrase. *Biochimica et Biophysica Acta* [online]. 1960, **39**(2), 218–226 [vid. 2026-03-16]. ISSN 0006-3002. Dostupné z: doi:10.1016/0006-3002(60)90156-6

[16] OZENSOY GULER, Ozen, Clemente CAPASSO a Claudiu T. SUPURAN. A magnificent enzyme superfamily: carbonic anhydrases, their purification and characterization. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [online]. 2016, **31**(5), 689–694 [vid. 2026-03-12]. ISSN 1475-6366. Dostupné z: doi:10.3109/14756366.2015.1059333

[17] RICKLI, Egon E., S.A.S. GHAZANFAR, Barbara H. GIBBONS a John T. EDSALL. Carbonic Anhydrases from Human Erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1964, **239**(4), 1065–1078 [vid. 2026-03-16]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(18)91392-X

[18] NYMAN, Per-Olof a Sven LINDSKOG. Amino acid composition of various forms of bovine and human erythrocyte carbonic anhydrase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Enzymological Subjects* [online]. 1964, **85**(1), 141–151 [vid. 2026-03-16]. ISSN 0926-6569. Dostupné z: doi:10.1016/0926-6569(64)90174-9

[19] LI, Ying, Hai WANG, Egbert OOSTERWIJK, Chingkuang TU, Kathleen T. SHIVERICK, David N. SILVERMAN a Susan C. FROST. Expression and Activity of Carbonic Anhydrase IX Is Associated With Metabolic Dysfunction in MDA-MB-231 Breast Cancer Cells. *Cancer Investigation* [online]. 2009, **27**(6), 613–623 [vid. 2026-03-16]. ISSN 0735-7907. Dostupné z: doi:10.1080/07357900802653464

[20] SUPURAN, Claudiu T. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature Reviews Drug Discovery* [online]. 2008, **7**(2), 168–181 [vid. 2026-03-15]. ISSN 1474-1784. Dostupné z: doi:10.1038/nrd2467

[21] BURNELL, James N., Mark J. GIBBS a John G. MASON. Spinach Chloroplastic Carbonic Anhydrase: Nucleotide Sequence Analysis of cDNA. *Plant Physiology* [online]. 1990, **92**(1), 37–40 [vid. 2026-03-17]. ISSN 0032-0889. Dostupné z: doi:10.1104/pp.92.1.37

[22] ROESKE, C A a W L OGREN. Nucleotide sequence of pea cDNA encoding chloroplast carbonic anhydrase. *Nucleic Acids Research* [online]. 1990, **18**(11), 3413 [vid. 2026-03-17]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/18.11.3413

[23] BADGER, M R a G D PRICE. The Role of Carbonic Anhydrase in Photosynthesis. nedatováno.

[24] ERIKSSON, M, J KARLSSON, Z RAMAZANOV, P GARDESTRÖM a G SAMUELSSON. Discovery of an algal mitochondrial carbonic anhydrase: molecular cloning and characterization of a low-CO2-induced polypeptide in Chlamydomonas reinhardtii. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1996, **93**(21), 12031–12034 [vid. 2026-03-17]. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.93.21.12031

[25] FUKUZAWA, H, E SUZUKI, Y KOMUKAI a S MIYACHI. A gene homologous to chloroplast carbonic anhydrase (icfA) is essential to photosynthetic carbon dioxide fixation by Synechococcus PCC7942. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1992, **89**(10), 4437–4441 [vid. 2026-03-17]. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.89.10.4437

[26] GUILLOTON, M. B., J. J. KORTE, A. F. LAMBLIN, J. A. FUCHS a P. M. ANDERSON. Carbonic anhydrase in Escherichia coli. A product of the cyn operon. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1992, **267**(6), 3731–3734 [vid. 2026-03-17]. ISSN 0021-9258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(19)50586-5

[27] CASARI, G., M. A. ANDRADE, P. BORK, J. BOYLE, A. DARUVAR, C. OUZOUNIS, R. SCHNEIDER, J. TAMAMES, A. VALENCIA a C. SANDER. Challenging times for bioinformatics. *Nature* [online]. 1995, **376**(6542), 647–648 [vid. 2026-03-17]. ISSN 1476-4687. Dostupné z: doi:10.1038/376647a0

[28] ALBER, B E a J G FERRY. A carbonic anhydrase from the archaeon Methanosarcina thermophila. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1994, **91**(15), 6909–6913 [vid. 2026-03-17]. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.91.15.6909

[29] HEWETT-EMMETT, David a Richard E. TASHIAN. Functional Diversity, Conservation, and Convergence in the Evolution of the α-, β-, and γ-Carbonic Anhydrase Gene Families. *Molecular Phylogenetics and Evolution* [online]. 1996, **5**(1), 50–77 [vid. 2026-03-17]. ISSN 1055-7903. Dostupné z: doi:10.1006/mpev.1996.0006

[30] SUPURAN, Claudiu T. Structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [online]. 2012, **27**(6), 759–772 [vid. 2026-03-14]. ISSN 1475-6366. Dostupné z: doi:10.3109/14756366.2012.672983

[31] SUPURAN, Claudiu T., Angela CASINI a Andrea SCOZZAFAVA. Protease inhibitors of the sulfonamide type: Anticancer, antiinflammatory, and antiviral agents. *Medicinal Research Reviews* [online]. 2003, **23**(5), 535–558 [vid. 2026-03-25]. ISSN 1098-1128. Dostupné z: doi:10.1002/med.10047

[32] NAGAO, Y, M SRINIVASAN, J S PLATERO, M SVENDROWSKI, A WAHEED a W S SLY. Mitochondrial carbonic anhydrase (isozyme V) in mouse and rat: cDNA cloning, expression, subcellular localization, processing, and tissue distribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1994, **91**(22), 10330–10334 [vid. 2026-03-25]. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.91.22.10330

[33] FUJIKAWA-ADACHI, Kiyomi, Isao NISHIMORI, Takahiro TAGUCHI a Saburo ONISHI. Human Mitochondrial Carbonic Anhydrase VB: cDNA CLONING, mRNA EXPRESSION, SUBCELLULAR LOCALIZATION, AND MAPPING TO CHROMOSOME X *. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 1999, **274**(30), 21228–21233 [vid. 2026-03-25]. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.274.30.21228

[34] SMITH, Charles E., Antonio NANCI a Pierre MOFFATT. Evidence by signal peptide trap technology for the expression of carbonic anhydrase 6 in rat incisor enamel organs. *European Journal of Oral Sciences* [online]. 2006, **114**(s1), 147–153 [vid. 2026-03-25]. ISSN 1600-0722. Dostupné z: doi:10.1111/j.1600-0722.2006.00273.x

[35] ASPATWAR, Ashok, Martti EE TOLVANEN a Seppo PARKKILA. Phylogeny and expression of carbonic anhydrase-related proteins. *BMC Molecular Biology* [online]. 2010, **11**(1), 25 [vid. 2026-03-25]. ISSN 1471-2199. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2199-11-25

[36] MISHRA, Chandra B., Manisha TIWARI a Claudiu T. SUPURAN. Progress in the development of human carbonic anhydrase inhibitors and their pharmacological applications: Where are we today? *Medicinal Research Reviews* [online]. 2020, **40**(6), 2485–2565 [vid. 2026-03-14]. ISSN 1098-1128. Dostupné z: doi:10.1002/med.21713

[37] ALTERIO, Vincenzo, Mika HILVO, Anna DI FIORE, Claudiu T. SUPURAN, Peiwen PAN, Seppo PARKKILA, Andrea SCALONI, Jaromir PASTOREK, Silvia PASTOREKOVA, Carlo PEDONE, Andrea SCOZZAFAVA, Simona Maria MONTI a Giuseppina DE SIMONE. Crystal structure of the catalytic domain of the tumor-associated human carbonic anhydrase IX. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2009, **106**(38), 16233–16238 [vid. 2026-03-13]. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0908301106

[38] CRAWFORD, James L., William N. LIPSCOMB a Charlotte G. SCHELLMAN. The Reverse Turn as a Polypeptide Conformation in Globular Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1973, **70**(2), 538–542 [vid. 2026-03-24]. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.70.2.538

[39] AVVARU, Balendu Sankara, Chae Un KIM, Katherine H. SIPPEL, Sol M. GRUNER, Mavis AGBANDJE-MCKENNA, David N. SILVERMAN a Robert MCKENNA. A Short, Strong Hydrogen Bond in the Active Site of Human Carbonic Anhydrase II. *Biochemistry* [online]. 2010, **49**(2), 249–251 [vid. 2026-03-24]. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi902007b

[40] SLY, W S a P Y HU. Human carbonic anhydrases and carbonic anhydrase deficiencies. *Annual review of biochemistry* [online]. 1995, **64**, 375–401 [vid. 2026-03-24]. ISSN 1545-4509. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.bi.64.070195.002111

[41] DE SIMONE, Giuseppina a Claudiu T. SUPURAN. Carbonic anhydrase IX: Biochemical and crystallographic characterization of a novel antitumor target. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* [online]. 2010, **1804**(2), Carbonic Anhydrase and Superoxide Dismutase, 404–409 [vid. 2026-03-12]. ISSN 1570-9639. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbapap.2009.07.027

[42] PASTOREK, J, S PASTOREKOVÁ, I CALLEBAUT, J P MORNON, V ZELNÍK, R OPAVSKÝ, M ZAT'OVICOVÁ, S LIAO, D PORTETELLE a E J STANBRIDGE. Cloning and characterization of MN, a human tumor-associated protein with a domain homologous to carbonic anhydrase and a putative helix-loop-helix DNA binding segment. *Oncogene*. 1994, **9**(10), 2877–2888. ISSN 1476-5594.

[43] HILVO, Mika, Lina BARANAUSKIENE, Anna Maria SALZANO, Andrea SCALONI, Daumantas MATULIS, Alessio INNOCENTI, Andrea SCOZZAFAVA, Simona Maria MONTI, Anna Di FIORE, Giuseppina De SIMONE, Mikaela LINDFORS, Janne JÄNIS, Jarkko VALJAKKA, Silvia PASTOREKOVÁ, Jaromir PASTOREK, Markku S. KULOMAA, Henri R. NORDLUND, Claudiu T. SUPURAN a Seppo PARKKILA. Biochemical Characterization of CA IX, One of the Most Active Carbonic Anhydrase Isozymes *. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2008, **283**(41), 27799–27809 [vid. 2026-03-24]. ISSN 0021-9258, 1083-351X. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M800938200

[44] LESBURG, Charles A. a David W. CHRISTIANSON. X-ray crystallographic studies of engineered hydrogen bond networks in a protein-zinc binding site. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 1995, **117**(26), 6838–6844 [vid. 2026-03-15]. ISSN 0002-7863, 1520-5126. Dostupné z: doi:10.1021/ja00131a005

[45] STEINER, Håkan, Bengt-Harald JONSSON a Sven LINDSKOG. The Catalytic Mechanism of Carbonic Anhydrase. *European Journal of Biochemistry* [online]. 1975, **59**(1), 253–259 [vid. 2026-03-15]. ISSN 1432-1033. Dostupné z: doi:10.1111/j.1432-1033.1975.tb02449.x

[46] PASTOREKOVA, Silvia, Seppo PARKKILA, Jaromir PASTOREK a Claudiu T. SUPURAN. Review Article. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [online]. 2004, **19**(3), 199–229 [vid. 2026-03-12]. ISSN 1475-6366. Dostupné z: doi:10.1080/14756360410001689540

[47] CHRISTIANSON, David W. a Carol A. FIERKE. Carbonic Anhydrase: Evolution of the Zinc Binding Site by Nature and by Design. *Accounts of Chemical Research* [online]. 1996, **29**(7), 331–339 [vid. 2026-03-15]. ISSN 0001-4842. Dostupné z: doi:10.1021/ar9501232

[48] SUPURAN, Claudiu T., Andrea SCOZZAFAVA a Angela CASINI. Carbonic anhydrase inhibitors. *Medicinal Research Reviews* [online]. 2003, **23**(2), 146–189 [vid. 2026-03-13]. ISSN 1098-1128. Dostupné z: doi:10.1002/med.10025

[49] SUPURAN, Claudiu T a Andrea SCOZZAFAVA. Carbonic anhydrase inhibitors and their therapeutic potential. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* [online]. 2000, **10**(5), 575–600 [vid. 2026-03-15]. ISSN 1354-3776. Dostupné z: doi:10.1517/13543776.10.5.575

[50] LINDSKOG, Sven a David N. SILVERMAN. The catalytic mechanism of mammalian carbonic anhydrases. In: W. Richard CHEGWIDDEN, Nicholas D. CARTER a Yvonne H. EDWARDS, ed. *The Carbonic Anhydrases: New Horizons* [online]. Basel: Birkhäuser, 2000 [vid. 2026-03-15], s. 175–195. ISBN 978-3-0348-8446-4. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-0348-8446-4_10

[51] BRIGANTI, Fabrizio, Stefano MANGANI, Pierluigi ORIOLI, Andrea SCOZZAFAVA, Guido VERNAGLIONE a Claudiu T. SUPURAN. Carbonic Anhydrase Activators: X-ray Crystallographic and Spectroscopic Investigations for the Interaction of Isozymes I and II with Histamine,. *Biochemistry* [online]. 1997, **36**(34), 10384–10392 [vid. 2026-03-15]. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi970760v

[52] SUPURAN, Claudiu T. A simple yet multifaceted 90 years old, evergreen enzyme: Carbonic anhydrase, its inhibition and activation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [online]. 2023, **93**, 129411 [vid. 2026-03-12]. ISSN 0960-894X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmcl.2023.129411

[53] SUPURAN, Claudiu T. How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist? *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [online]. 2016, **31**(3), 345–360 [vid. 2026-03-12]. ISSN 1475-6366. Dostupné z: doi:10.3109/14756366.2015.1122001

[54] ALTERIO, Vincenzo, Anna DI FIORE, Katia D'AMBROSIO, Claudiu T. SUPURAN a Giuseppina DE SIMONE. Multiple Binding Modes of Inhibitors to Carbonic Anhydrases: How to Design Specific Drugs Targeting 15 Different Isoforms? *Chemical Reviews* [online]. 2012, **112**(8), 4421–4468 [vid. 2026-03-12]. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr200176r

[55] ALTERIO, Vincenzo, Rosa Maria VITALE, Simona Maria MONTI, Carlo PEDONE, Andrea SCOZZAFAVA, Alessandro CECCHI, Giuseppina DE SIMONE a Claudiu T. SUPURAN. Carbonic Anhydrase Inhibitors: X-ray and Molecular Modeling Study for the Interaction of a Fluorescent Antitumor Sulfonamide with Isozyme II and IX. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2006, **128**(25), 8329–8335 [vid. 2026-03-15]. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja061574s

[56] CARTA, Fabrizio, Mayank AGGARWAL, Alfonso MARESCA, Andrea SCOZZAFAVA, Robert MCKENNA a Claudiu T. SUPURAN. Dithiocarbamates: a new class of carbonic anhydrase inhibitors. Crystallographic and kinetic investigations. *Chemical Communications* [online]. 2012, **48**(13), 1868 [vid. 2026-03-15]. ISSN 1359-7345, 1364-548X. Dostupné z: doi:10.1039/c2cc16395k

[57] CARTA, Fabrizio, Atilla AKDEMIR, Andrea SCOZZAFAVA, Emanuela MASINI a Claudiu T. SUPURAN. Xanthates and Trithiocarbonates Strongly Inhibit Carbonic Anhydrases and Show Antiglaucoma Effects in Vivo. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2013, **56**(11), 4691–4700 [vid. 2026-03-15]. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm400414j

[58] LANGELLA, Emma, Katia D'AMBROSIO, Melissa D'ASCENZIO, Simone CARRADORI, Simona M. MONTI, Claudiu T. SUPURAN a Giuseppina DE SIMONE. A Combined Crystallographic and Theoretical Study Explains the Capability of Carboxylic Acids to Adopt Multiple Binding Modes in the Active Site of Carbonic Anhydrases. *Chemistry – A European Journal* [online]. 2016, **22**(1), 97–100 [vid. 2026-03-15]. ISSN 1521-3765. Dostupné z: doi:10.1002/chem.201503748

[59] NOCENTINI, Alessio, Paola GRATTERI a Claudiu T. SUPURAN. Phosphorus versus Sulfur: Discovery of Benzenephosphonamidates as Versatile Sulfonamide-Mimic Chemotypes Acting as Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Chemistry – A European Journal* [online]. 2019, **25**(5), 1188–1192 [vid. 2026-03-15]. ISSN 1521-3765. Dostupné z: doi:10.1002/chem.201805039

[60] FIORE, Anna Di, Alfonso MARESCA, Claudiu T. SUPURAN a Giuseppina De SIMONE. Hydroxamate represents a versatile zinc binding group for the development of new carbonic anhydrase inhibitors. *Chemical Communications* [online]. 2012, **48**(70), 8838–8840 [vid. 2026-03-15]. ISSN 1364-548X. Dostupné z: doi:10.1039/C2CC34275H

[61] SCOZZAFAVA, Andrea, Luca MENABUONI, Francesco MINCIONE, Fabrizio BRIGANTI, Giovanna MINCIONE a Claudiu T. SUPURAN. Carbonic Anhydrase Inhibitors. Synthesis of Water-Soluble, Topically Effective, Intraocular Pressure-Lowering Aromatic/Heterocyclic Sulfonamides Containing Cationic or Anionic Moieties: Is the Tail More Important than the Ring? *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 1999, **42**(14), 2641–2650 [vid. 2026-03-12]. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm9900523

[62] PACCHIANO, Fabio, Fabrizio CARTA, Paul C. MCDONALD, Yuanmei LOU, Daniela VULLO, Andrea SCOZZAFAVA, Shoukat DEDHAR a Claudiu T. SUPURAN. Ureido-Substituted Benzenesulfonamides Potently Inhibit Carbonic Anhydrase IX and Show Antimetastatic Activity in a Model of Breast Cancer Metastasis. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2011, **54**(6), 1896–1902 [vid. 2026-03-15]. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm101541x

[63] NAIR, Satish K., Peter A. LUDWIG a David W. CHRISTIANSON. Two-Site Binding of Phenol in the Active Site of Human Carbonic Anhydrase II: Structural Implications for Substrate Association. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 1994, **116**(8), 3659–3660 [vid. 2026-03-14]. ISSN 0002-7863, 1520-5126. Dostupné z: doi:10.1021/ja00087a086

[64] CARTA, Fabrizio, Claudia TEMPERINI, Alessio INNOCENTI, Andrea SCOZZAFAVA, Kai KAILA a Claudiu T. SUPURAN. Polyamines Inhibit Carbonic Anhydrases by Anchoring to the Zinc-Coordinated Water Molecule. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2010, **53**(15), 5511–5522 [vid. 2026-03-14]. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm1003667

[65] FERRARONI, Marta, Fabrizio CARTA, Andrea SCOZZAFAVA a Claudiu T. SUPURAN. Thioxocoumarins Show an Alternative Carbonic Anhydrase Inhibition Mechanism Compared to Coumarins. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2016, **59**(1), 462–473 [vid. 2026-03-14]. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01720

[66] D'AMBROSIO, Katia, Simone CARRADORI, Stefania CESA, Andrea ANGELI, Simona M. MONTI, Claudiu T. SUPURAN a Giuseppina De SIMONE. Catechols: a new class of carbonic anhydrase inhibitors. *Chemical Communications* [online]. 2020, **56**(85), 13033–13036 [vid. 2026-03-14]. Dostupné z: doi:10.1039/D0CC05172A

[67] GRANDANE, Aiga, Muhammet TANC, Raivis ŽALUBOVSKIS a Claudiu T. SUPURAN. Synthesis of 6-aryl-substituted sulfocoumarins and investigation of their carbonic anhydrase inhibitory action. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* [online]. 2015, **23**(7), 1430–1436 [vid. 2026-03-14]. ISSN 0968-0896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2015.02.023

[68] PUSTENKO, Aleksandrs, Anastasija BALAŠOVA, Alessio NOCENTINI, Claudiu T. SUPURAN a Raivis ŽALUBOVSKIS. 3H-1,2-Benzoxaphosphepine 2-oxides as selective inhibitors of carbonic anhydrase IX and XII. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [online]. 2023, **38**(1), 216–224 [vid. 2026-03-14]. ISSN 1475-6366. Dostupné z: doi:10.1080/14756366.2022.2143496

[69] IVANOVA, Jekaterina, Morteza ABDOLI, Alessio NOCENTINI, Raivis ŽALUBOVSKIS a Claudiu T. SUPURAN. 1,2,3-Benzoxathiazine-2,2-dioxides – effective inhibitors of human carbonic anhydrases. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [online]. 2023, **38**(1), 225–238 [vid. 2026-03-14]. ISSN 1475-6366. Dostupné z: doi:10.1080/14756366.2022.2142787

[70] SUPURAN, Claudiu T. Structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [online]. 2012, **27**(6), 759–772 [vid. 2026-03-14]. ISSN 1475-6366. Dostupné z: doi:10.3109/14756366.2012.672983

[71] *Non-Zinc Mediated Inhibition of Carbonic Anhydrases: Coumarins Are a New Class of Suicide Inhibitors | Journal of the American Chemical Society* [online]. [vid. 2026-03-12]. Dostupné z: https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ja809683v

[72] MARESCA, Alfonso, Claudia TEMPERINI, Lionel POCHET, Bernard MASEREEL, Andrea SCOZZAFAVA a Claudiu T. SUPURAN. Deciphering the Mechanism of Carbonic Anhydrase Inhibition with Coumarins and Thiocoumarins. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2010, **53**(1), 335–344 [vid. 2026-03-14]. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm901287j

[73] D'AMBROSIO, Katia, Simone CARRADORI, Simona M. MONTI, Martina BUONANNO, Daniela SECCI, Daniela VULLO, Claudiu T. SUPURAN a Giuseppina De SIMONE. Out of the active site binding pocket for carbonic anhydrase inhibitors. *Chemical Communications* [online]. 2014, **51**(2), 302–305 [vid. 2026-03-12]. ISSN 1364-548X. Dostupné z: doi:10.1039/C4CC07320G

[74] COMPAIN, Guillaume, Agnès MARTIN-MINGOT, Alfonso MARESCA, Sebastien THIBAUDEAU a Claudiu T. SUPURAN. Superacid synthesis of halogen containing N-substituted-4-aminobenzene sulfonamides: New selective tumor-associated carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* [online]. 2013, **21**(6), Carbonic Anhydrase, 1555–1563 [vid. 2026-03-14]. ISSN 0968-0896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2012.05.037

[75] LIU, Fei, Agnès MARTIN-MINGOT, F. LECORNUÉ, Marie-Paule JOUANNETAUD, Alfonso MARESCA, Sebastien THIBAUDEAU a Claudiu T. SUPURAN. Carbonic Anhydrases inhibitory effects of new benzenesulfonamides synthesized by using superacid chemistry. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [online]. 2012, **27**(6), 886–891 [vid. 2026-03-14]. ISSN 1475-6366. Dostupné z: doi:10.3109/14756366.2011.638921

[76] DE MONTE, Celeste, Simone CARRADORI, Daniela SECCI, Melissa D'ASCENZIO, Daniela VULLO, Mariangela CERUSO a Claudiu T. SUPURAN. Cyclic tertiary sulfamates: Selective inhibition of the tumor-associated carbonic anhydrases IX and XII by *N*- and *O*-substituted acesulfame derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2014, **84**, 240–246 [vid. 2026-03-14]. ISSN 0223-5234. Dostupné z: doi:10.1016/j.ejmech.2014.07.014

[77] MOLLICA, Adriano, Roberto COSTANTE, Atilla AKDEMIR, Simone CARRADORI, Azzurra STEFANUCCI, Giorgia MACEDONIO, Mariangela CERUSO a Claudiu T. SUPURAN. Exploring new Probenecid-based carbonic anhydrase inhibitors: Synthesis, biological evaluation and docking studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* [online]. 2015, **23**(17), 5311–5318 [vid. 2026-03-14]. ISSN 0968-0896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2015.07.066

[78] PARKKILA, Seppo, Alessio INNOCENTI, Heini KALLIO, Mika HILVO, Andrea SCOZZAFAVA a Claudiu T. SUPURAN. The protein tyrosine kinase inhibitors imatinib and nilotinib strongly inhibit several mammalian α-carbonic anhydrase isoforms. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [online]. 2009, **19**(15), 4102–4106 [vid. 2026-03-14]. ISSN 0960-894X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmcl.2009.06.002

[79] INNOCENTI, Alessio, Serdar DURDAGI, Nadjmeh DOOSTDAR, T. AMANDA STROM, Andrew R. BARRON a Claudiu T. SUPURAN. Nanoscale enzyme inhibitors: Fullerenes inhibit carbonic anhydrase by occluding the active site entrance. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* [online]. 2010, **18**(8), 2822–2828 [vid. 2026-03-14]. ISSN 0968-0896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2010.03.026

[80] ZHENG, Tianyu, Marja JÄÄTTELÄ a Bin LIU. pH gradient reversal fuels cancer progression. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* [online]. 2020, **125**, 105796 [vid. 2026-03-12]. ISSN 1357-2725. Dostupné z: doi:10.1016/j.biocel.2020.105796

[81] VANDER HEIDEN, Matthew G., Lewis C. CANTLEY a Craig B. THOMPSON. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* [online]. 2009, **324**(5930), 1029–1033 [vid. 2026-03-13]. Dostupné z: doi:10.1126/science.1160809

[82] WARBURG, Otto. On Respiratory Impairment in Cancer Cells. Science [online]. 1956, 124(3215), 269–270 [vid. 2026-03-13]. Dostupné z: doi:10.1126/science.124.3215.269

[83] CASEY, Joseph R., Sergio GRINSTEIN a John ORLOWSKI. Sensors and regulators of intracellular pH. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* [online]. 2010, **11**(1), 50–61 [vid. 2026-03-13]. ISSN 1471-0080. Dostupné z: doi:10.1038/nrm2820

[84] SHARMA, Mohit, Madhusudan ASTEKAR, Sonal SOI, Bhari S. MANJUNATHA, Devi C. SHETTY a Raghu RADHAKRISHNAN. pH Gradient Reversal: An Emerging Hallmark of Cancers. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery* [online]. nedatováno, **10**(3), 244–258 [vid. 2026-03-13]. Dostupné z: doi:10.2174/1574892810666150708110608

[85] WEBB, Bradley A., Michael CHIMENTI, Matthew P. JACOBSON a Diane L. BARBER. Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression. *Nature Reviews Cancer* [online]. 2011, **11**(9), 671–677 [vid. 2026-03-13]. ISSN 1474-1768. Dostupné z: doi:10.1038/nrc3110

[86] PERSI, Erez, Miquel DURAN-FRIGOLA, Mehdi DAMAGHI, William R. ROUSH, Patrick ALOY, John L. CLEVELAND, Robert J. GILLIES a Eytan RUPPIN. Systems analysis of intracellular pH vulnerabilities for cancer therapy. *Nature Communications* [online]. 2018, **9**(1), 2997 [vid. 2026-03-13]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-018-05261-x

[87] BARRY, Michael A. a Alan EASTMAN. Endonuclease activation during apoptosis: The role of cytosolic Ca2+ and pH. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 1992, **186**(2), 782–789 [vid. 2026-03-13]. ISSN 0006-291X. Dostupné z: doi:10.1016/0006-291X(92)90814-2

[88] ALFAROUK, Khalid O., Samrein B. M. AHMED, Ahmed AHMED, Robert L. ELLIOTT, Muntaser E. IBRAHIM, Heyam S. ALI, Christian C. WALES, Ibrahim NOURWALI, Ahmed N. ALJARBOU, Adil H. H. BASHIR, Sari T. S. ALHOUFIE, Saad Saeed ALQAHTANI, Rosa A. CARDONE, Stefano FAIS, Salvador HARGUINDEY a Stephan J. RESHKIN. The Interplay of Dysregulated pH and Electrolyte Imbalance in Cancer. *Cancers* [online]. 2020, **12**(4) [vid. 2026-03-12]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers12040898

[89] ALFAROUK, Khalid O., Abdel Khalig MUDDATHIR a Mohammed E. A. SHAYOUB. Tumor Acidity as Evolutionary Spite. *Cancers* [online]. 2011, **3**(1), 408–414 [vid. 2026-03-13]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers3010408

[90] ALFAROUK, Khalid O., Christian-Martin STOCK, Sophie TAYLOR, Megan WALSH, Abdel Khalig MUDDATHIR, Daniel VERDUZCO, Adil H. H. BASHIR, Osama Y. MOHAMMED, Gamal O. ELHASSAN, Salvador HARGUINDEY, Stephan J. RESHKIN, Muntaser E. IBRAHIM a Cyril RAUCH. Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp. *Cancer Cell International* [online]. 2015, **15**(1), 71 [vid. 2026-03-13]. ISSN 1475-2867. Dostupné z: doi:10.1186/s12935-015-0221-1

[91] PESKIN, Brian S. a Marissa J. CARTER. Chronic cellular hypoxia as the prime cause of cancer: What is the de-oxygenating role of adulterated and improper ratios of polyunsaturated fatty acids when incorporated into cell membranes? *Medical Hypotheses* [online]. 2008, **70**(2), 298–304 [vid. 2026-03-13]. ISSN 0306-9877. Dostupné z: doi:10.1016/j.mehy.2007.05.033

[92] MAHON, Brian P., Melissa A. PINARD a Robert MCKENNA. Targeting Carbonic Anhydrase IX Activity and Expression. *Molecules* [online]. 2015, **20**(2), 2323–2348 [vid. 2026-03-12]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules20022323

[93] WYKOFF, Charles C., Nigel J. P. BEASLEY, Peter H. WATSON, Kevin J. TURNER, Jaromir PASTOREK, Amen SIBTAIN, George D. WILSON, Helen TURLEY, Kate L. TALKS, Patrick H. MAXWELL, Christopher W. PUGH, Peter J. RATCLIFFE a Adrian L. HARRIS. Hypoxia-inducible Expression of Tumor-associated Carbonic Anhydrases1. *Cancer Research*. 2000, **60**(24), 7075–7083. ISSN 0008-5472.

[94] WANG, G L a G L SEMENZA. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1993, **90**(9), 4304–4308 [vid. 2026-03-14]. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.90.9.4304

[95] LUO, Dongjun, Zhongxia WANG, Junyi WU, Chunping JIANG a Junhua WU. The Role of Hypoxia Inducible Factor-1 in Hepatocellular Carcinoma. *BioMed Research International* [online]. 2014, **2014**(1), 409272 [vid. 2026-03-14]. ISSN 2314-6141. Dostupné z: doi:10.1155/2014/409272

[96] LIAO, Shu-Yuan, Michael I. LERMAN a Eric J. STANBRIDGE. Expression of transmembrane carbonic anhydrases, CAIX and CAXII, in human development. *BMC Developmental Biology* [online]. 2009, **9**(1), 22 [vid. 2026-03-14]. ISSN 1471-213X. Dostupné z: doi:10.1186/1471-213X-9-22

[97] THIRY, Anne, Jean-Michel DOGNÉ, Bernard MASEREEL a Claudiu T. SUPURAN. Targeting tumor-associated carbonic anhydrase IX in cancer therapy. *Trends in Pharmacological Sciences* [online]. 2006, **27**(11), 566–573 [vid. 2026-03-12]. ISSN 0165-6147. Dostupné z: doi:10.1016/j.tips.2006.09.002

[98] BENEJ, Martin, Silvia PASTOREKOVA a Jaromir PASTOREK. Carbonic Anhydrase IX: Regulation and Role in Cancer. In: Susan C. FROST a Robert MCKENNA, ed. *Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014 [vid. 2026-03-14], s. 199–219. ISBN 978-94-007-7359-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-007-7359-2_11

[99] FROST, Susan C. Physiological Functions of the Alpha Class of Carbonic Anhydrases. In: Susan C. FROST a Robert MCKENNA, ed. *Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications* [online]. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014 [vid. 2026-03-14], s. 9–30. ISBN 978-94-007-7359-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-007-7359-2_2

[100] LEE, Shen-Han a John R. GRIFFITHS. How and Why Are Cancers Acidic? Carbonic Anhydrase IX and the Homeostatic Control of Tumour Extracellular pH. *Cancers* [online]. 2020, **12**(6) [vid. 2026-03-12]. ISSN 2072-6694. Dostupné z: doi:10.3390/cancers12061616

[101] CSADEROVA, Lucia, Michaela DEBREOVA, Peter RADVAK, Matej STANO, Magdalena VRESTIAKOVA, Juraj KOPACEK, Silvia PASTOREKOVA a Eliska SVASTOVA. The effect of carbonic anhydrase IX on focal contacts during cell spreading and migration. *Frontiers in Physiology* [online]. 2013, **4** [vid. 2026-03-14]. ISSN 1664-042X. Dostupné z: doi:10.3389/fphys.2013.00271

[102] ROZHIN, Jurij, Mansoureh SAMENI, Grace ZIEGLER a Bonnie F. SLOANE. Pericellular pH Affects Distribution and Secretion of Cathepsin B in Malignant Cells1. *Cancer Research*. 1994, **54**(24), 6517–6525. ISSN 0008-5472.

[103] BOEDTKJER, Ebbe a Stine F. PEDERSEN. The Acidic Tumor Microenvironment as a Driver of Cancer. *Annual Review of Physiology* [online]. 2020, **82**(Volume 82, 2020), 103–126 [vid. 2026-03-14]. ISSN 0066-4278, 1545-1585. Dostupné z: doi:10.1146/annurev-physiol-021119-034627

[104] STITI, Maamar, Alessandro CECCHI, Marouan RAMI, Mohamed ABDAOUI, Véronique BARRAGAN-MONTERO, Andrea SCOZZAFAVA, Yannick GUARI, Jean-Yves WINUM a Claudiu T. SUPURAN. Carbonic Anhydrase Inhibitor Coated Gold Nanoparticles Selectively Inhibit the Tumor-Associated Isoform IX over the Cytosolic Isozymes I and II. *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2008, **130**(48), 16130–16131 [vid. 2026-03-12]. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja805558k

[105] ANGELI, Andrea, Fabrizio CARTA, Alessio NOCENTINI, Jean-Yves WINUM, Raivis ZALUBOVSKIS, Atilla AKDEMIR, Valentina ONNIS, Wagdy M. ELDEHNA, Clemente CAPASSO, Giuseppina De SIMONE, Simona Maria MONTI, Simone CARRADORI, William A. DONALD, Shoukat DEDHAR a Claudiu T. SUPURAN. Carbonic Anhydrase Inhibitors Targeting Metabolism and Tumor Microenvironment. *Metabolites* [online]. 2020, **10**(10) [vid. 2026-03-12]. ISSN 2218-1989. Dostupné z: doi:10.3390/metabo10100412

[106] SUPURAN, Claudiu T., Vincenzo ALTERIO, Anna DI FIORE, Katia D' AMBROSIO, Fabrizio CARTA, Simona Maria MONTI a Giuseppina DE SIMONE. Inhibition of carbonic anhydrase IX targets primary tumors, metastases, and cancer stem cells: Three for the price of one. *Medicinal Research Reviews* [online]. 2018, **38**(6), 1799–1836 [vid. 2026-03-12]. ISSN 1098-1128. Dostupné z: doi:10.1002/med.21497

[107] KUMAR, Amit, Kiran SIWACH, Claudiu T. SUPURAN a Pawan K. SHARMA. A decade of tail-approach based design of selective as well as potent tumor associated carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorganic Chemistry* [online]. 2022, **126**, 105920 [vid. 2026-03-12]. ISSN 0045-2068. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioorg.2022.105920

[108] NOCENTINI, Alessio, Silvia BUA, Carrie L. LOMELINO, Robert MCKENNA, Marta MENICATTI, Gianluca BARTOLUCCI, Barbara TENCI, Lorenzo DI CESARE MANNELLI, Carla GHELARDINI, Paola GRATTERI a Claudiu T. SUPURAN. Discovery of New Sulfonamide Carbonic Anhydrase IX Inhibitors Incorporating Nitrogenous Bases. *ACS Medicinal Chemistry Letters* [online]. 2017, **8**(12), 1314–1319 [vid. 2026-03-12]. Dostupné z: doi:10.1021/acsmedchemlett.7b00399

[109] BUABENG, Emmanuel Ramsey a Maged HENARY. Developments of small molecules as inhibitors for carbonic anhydrase isoforms. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* [online]. 2021, **39**, 116140 [vid. 2026-03-12]. ISSN 0968-0896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2021.116140

[110] SINGH, Saumya, Milan K. MANDAL, Anup MASIH, Ashmita SAHA, Surajit K. GHOSH, Hans R. BHAT a Udaya P. SINGH. 1,3,5-Triazine: A versatile pharmacophore with diverse biological activities. *Archiv der Pharmazie* [online]. 2021, **354**(6), 2000363 [vid. 2026-03-12]. ISSN 1521-4184. Dostupné z: doi:10.1002/ardp.202000363

[111] PATEL, Rahul V., Premlata KUMARI, Dhanji. P. RAJANI a Kishor H. CHIKHALIA. Synthesis, characterization and pharmacological activities of 2-[4-cyano-(3-trifluoromethyl)phenyl amino)]-4-(4-quinoline/coumarin-4-yloxy)-6-(fluoropiperazinyl)-*s*-triazines. *Journal of Fluorine Chemistry* [online]. 2011, **132**(9), 617–627 [vid. 2026-03-12]. ISSN 0022-1139. Dostupné z: doi:10.1016/j.jfluchem.2011.06.021

[112] SHAH, Dhruvin R, Rahul P MODH a Kishor H CHIKHALIA. Privileged S-Triazines: Structure and Pharmacological Applications. *Future Medicinal Chemistry* [online]. 2014, **6**(4), 463–477 [vid. 2026-03-12]. ISSN 1756-8919. Dostupné z: doi:10.4155/fmc.13.212

[113] SILEN, Joy L., Amy T. LU, Dennis W. SOLAS, Medini A. GORE, Derek MACLEAN, Nikil H. SHAH, Jill M. COFFIN, Naseema S. BHINDERWALA, Yongwen WANG, Ken T. TSUTSUI, Gary C. LOOK, David A. CAMPBELL, Ron L. HALE, Marc NAVRE a Camille R. DELUCA-FLAHERTY. Screening for Novel Antimicrobials from Encoded Combinatorial Libraries by Using a Two-Dimensional Agar Format. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 1998, **42**(6), 1447–1453 [vid. 2026-03-12]. Dostupné z: doi:10.1128/aac.42.6.1447

[114] SINGH, H, L DS YADAV, KN SHUKLA a R DWIVEDI. Synthesis of new 1, 3, 4-oxadiazolo [3, 2-a]-s-triazine-5, 7-dithiones and the - dithionone analogues as potential antifungal agents. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1992, **54**(1).

[115] PATEL, Rahul V, Premlata KUMARI, Dhanji P RAJANI, Christophe PANNECOUQUE, Erik DE CLERCQ a Kishor H CHIKHALIA. Antimicrobial, Anti-TB, Anticancer and Anti-HIV Evaluation of New s-Triazine-Based Heterocycles. *Future Medicinal Chemistry* [online]. 2012, **4**(9), 1053–1065 [vid. 2026-03-12]. ISSN 1756-8919. Dostupné z: doi:10.4155/fmc.12.57

[116] AGARWAL, Anu, Kumkum SRIVASTAVA, S. K. PURI a Prem M. S. CHAUHAN. Syntheses of 2,4,6-trisubstituted triazines as antimalarial agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [online]. 2005, **15**(3), 531–533 [vid. 2026-03-12]. ISSN 0960-894X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmcl.2004.11.052

[117] BEHKI, R, E TOPP, W DICK a P GERMON. Metabolism of the herbicide atrazine by Rhodococcus strains. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1993, **59**(6), 1955–1959 [vid. 2026-03-12]. Dostupné z: doi:10.1128/aem.59.6.1955-1959.1993

[118] BRZOZOWSKI, Z., F. SĄCZEWSKI a M. GDANIEC. Synthesis, structural characterization and antitumor activity of novel 2,4-diamino-1,3,5-triazine derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2000, **35**(12), 1053–1064 [vid. 2026-03-12]. ISSN 0223-5234. Dostupné z: doi:10.1016/S0223-5234(00)01194-6

[119] CARTA, Fabrizio, Vladimir GARAJ, Alfonso MARESCA, Jason WAGNER, Balendu Sankara AVVARU, Arthur H. ROBBINS, Andrea SCOZZAFAVA, Robert MCKENNA a Claudiu T. SUPURAN. Sulfonamides incorporating 1,3,5-triazine moieties selectively and potently inhibit carbonic anhydrase transmembrane isoforms IX, XII and XIV over cytosolic isoforms I and II: Solution and X-ray crystallographic studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* [online]. 2011, **19**(10), 3105–3119 [vid. 2026-03-12]. ISSN 0968-0896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2011.04.005

[120] HAVRÁNKOVÁ, Eva, Jozef CSÖLLEI, Daniela VULLO, Vladimír GARAJ, Pavel PAZDERA a Claudiu T. SUPURAN. Novel sulfonamide incorporating piperazine, aminoalcohol and 1,3,5-triazine structural motifs with carbonic anhydrase I, II and IX inhibitory action. *Bioorganic Chemistry* [online]. 2018, **77**, 25–37 [vid. 2026-03-12]. ISSN 0045-2068. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioorg.2017.12.034

[121] DI FIORE, Anna, Emanuela TRUPPO, Claudiu T. SUPURAN, Vincenzo ALTERIO, Nina DATHAN, Fatemeh BOOTORABI, Seppo PARKKILA, Simona Maria MONTI a Giuseppina De SIMONE. Crystal structure of the C183S/C217S mutant of human CA VII in complex with acetazolamide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* [online]. 2010, **20**(17), 5023–5026 [vid. 2026-03-13]. ISSN 0960-894X. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmcl.2010.07.051

[122] ALTERIO, Vincenzo, Mika HILVO, Anna DI FIORE, Claudiu T. SUPURAN, Peiwen PAN, Seppo PARKKILA, Andrea SCALONI, Jaromir PASTOREK, Silvia PASTOREKOVA, Carlo PEDONE, Andrea SCOZZAFAVA, Simona Maria MONTI a Giuseppina DE SIMONE. Crystal structure of the catalytic domain of the tumor-associated human carbonic anhydrase IX. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2009, **106**(38), 16233–16238 [vid. 2026-03-12]. ISSN 0027-8424, 1091-6490. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0908301106

[123] KING, R. W. a A. S. V. BURGEN. Sulphonamide complexes of human carbonic anhydrases ultraviolet difference spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* [online]. 1970, **207**(2), 278–285 [vid. 2026-03-13]. ISSN 0005-2795. Dostupné z: doi:10.1016/0005-2795(70)90020-6

[124] ABBATE, Francesco, Claudiu T. SUPURAN, Andrea SCOZZAFAVA, Pierluigi ORIOLI, Milton T. STUBBS a Gerhard KLEBE. Nonaromatic Sulfonamide Group as an Ideal Anchor for Potent Human Carbonic Anhydrase Inhibitors: Role of Hydrogen-Bonding Networks in Ligand Binding and Drug Design. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2002, **45**(17), 3583–3587 [vid. 2026-03-13]. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/jm011131t

[125] SUPURAN, Claudiu T., Andrea SCOZZAFAVA a Janet CONWAY. *Carbonic Anhydrase: Its Inhibitors and Activators*. B.m.: CRC Press, 2004. ISBN 978-0-203-47530-0.

[126] SUPURAN, Claudiu T. a Jean-Yves WINUM. *Drug Design of Zinc-Enzyme Inhibitors: Functional, Structural, and Disease Applications*. B.m.: John Wiley & Sons, 2009. ISBN 978-0-470-50815-2.

[127] MIKUŠ, Peter, Dominika KRAJČIOVÁ, Mária MIKULOVÁ, Branislav HORVÁTH, Daniel PECHER, Vladimír GARAJ, Silvia BUA, Andrea ANGELI a Claudiu T. SUPURAN. Novel sulfonamides incorporating 1,3,5-triazine and amino acid structural motifs as inhibitors of the physiological carbonic anhydrase isozymes I, II and IV and tumor-associated isozyme IX. *Bioorganic Chemistry* [online]. 2018, **81**, 241–252 [vid. 2026-03-12]. ISSN 0045-2068. Dostupné z:doi:10.1016/j.bioorg.2018.08.005

[128] U-104 (SLC-0111) | CA IX/XII Inhibitor | MedChemExpress. *MedchemExpress.com* [online]. [vid. 2026-03-25]. Dostupné z: https://www.medchemexpress.com/U-104.html

[129] HASHEM, Hamada, Shadwa ABDELFATTAH, Hesham M. HASSAN, Ahmed ALEMAM, Mohammed ALQARNI, Ghallab ALOTAIBI, Ibrahim Taha RADWAN, Kirandeep KAUR, Devendra Pratap RAO, Stefan BRÄSE a Abdullah ALKHAMMASH. Discovery of a novel 4-pyridyl SLC-0111 analog targeting tumor-associated carbonic anhydrase isoform IX through tail-based design approach with potent anticancer activity. *Frontiers in Chemistry* [online]. 2025, **13** [vid. 2026-03-25]. ISSN 2296-2646. Dostupné z: doi:10.3389/fchem.2025.1571646

[130] MCDONALD, Paul C., Stephen CHIA, Philippe L. BEDARD, Quincy CHU, Michael LYLE, Liren TANG, Madhu SINGH, Zaihui ZHANG, Claudiu T. SUPURAN, Daniel J. RENOUF a Shoukat DEDHAR. A Phase 1 Study of SLC-0111, a Novel Inhibitor of Carbonic Anhydrase IX, in Patients With Advanced Solid Tumors. *American Journal of Clinical Oncology* [online]. 2020, **43**(7), 484 [vid. 2026-03-25]. ISSN 0277-3732. Dostupné z: doi:10.1097/COC.0000000000000691

[131] ANGELI, Andrea, Niccolò PAOLETTI a Claudiu T. SUPURAN. Five-Membered Heterocyclic Sulfonamides as Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Molecules* [online]. 2023, **28**(7) [vid. 2026-03-25]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules28073220

[132] ROSHDY, Eslam, Eva ŘEZNÍČKOVÁ, Mostafa M. ELBADAWI, Ismail CELIK, Simone GIOVANNUZZI, Denisa VESELÁ, Veronika VOJÁČKOVÁ, Petra KRŇÁVKOVÁ, Alessio NOCENTINI, Claudiu T. SUPURAN, Vladimír KRYŠTOF, Wagdy M. ELDEHNA a Manabu ABE. First-in-Class Dual PDGFR/Carbonic Anhydrase IX/XII Inhibitors: 6,7-Dimethoxyquinoline-Sulfonamides as Promising Antileukemic Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2026, **69**(3), 3115–3137 [vid. 2026-03-12]. ISSN 0022-2623. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jmedchem.5c03037

[133] ŞAHIN INAN, Zeynep Deniz, Hayrani Eren BOSTANCI, Serkan KAPANCIK, Ayşen IŞIK, Hacı Ahmet KILIÇ, Ulviye ACAR ÇEVIK, Özen Özensoy GÜLER, Yusuf ÖZKAY a Zafer Asım KAPLANCIKLI. Synthesis of Novel Benzimidazole Derivatives as a Carbonic Anhydrase IX (Ca IX) Inhibitor With Anticancer Potential. *Journal of Heterocyclic Chemistry* [online]. 2026, **63**(3), 418–431 [vid. 2026-03-12]. ISSN 1943-5193. Dostupné z: doi:10.1002/jhet.70138

[134] KHANFAR, Mohammad A. a Mohammad SALEH. Design and synthesis of 3-(azepan-1-ylsulfonyl)-N-aryl benzamide derivatives as potent carbonic anhydrase IX inhibitors with anticancer activities. *Zeitschrift für Naturforschung C* [online]. 2025, **80**(11–12), 763–767 [vid. 2026-03-12]. ISSN 1865-7125. Dostupné z: doi:12.03.2026

[135] VARECKA, Vojtech, Karolina SELIGOVA, Alena HOFROVA, Karin RAVASZOVA, Petr MOKRY, Miroslava BITTOVA, Jozef HRITZ a Eva HAVRANKOVA. Triazinyl-benzenesulfonamide derivatives as hCA IX inhibitors: Design, synthesis, and activity determination using an optimized stop-flow methodology. *Bioorganic Chemistry* [online]. 2026, **170**, 109524 [vid. 2026-03-19]. ISSN 0045-2068. Dostupné z: doi:10.1016/j.bioorg.2026.109524