

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2023

Margaréta Volníková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Identifikácia nízkomolekulových inhibítorov
karboanhydrázy IX

Diplomová práce

Bc. Margaréta Volníková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: prezenční

Olomouc 2023

Vedoucí práce: Ing. Soňa Gurská, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Margaréta VOLNÍKOVÁ**
Osobní číslo: **R210609**
Studijní program: **N0511A030046 Molekulární a buněčná biologie**
Téma práce: **Identifikácia nízkomolekulových inhibítorov karboanhydrázy IX**
Zadávací katedra: **Katedra buněčné biologie a genetiky**

Zásady pro vypracování

1. Vypracovanie rešerše na tému DP
2. Oboznámenie sa s metódou na stanovenie inhibítorov CA IX
3. Práca s hardware-om a software-om prístroja FLIPR
4. Otestovanie aktivity enzýmu CA IX, pozitívnej kontroly a zavedenie metódy do HTS podmienok
5. Screening chemickej knižnice a identifikácia inhibítorov CA IX

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Jazyk zpracování: **Slovenština**

Seznam doporučené literatury:

- Angeli, A., Carta, F., Nocentini, A., Winum, J.-Y., Zalubovskis, R., Akdemir, A., Onnis, V., Eldehna, W. M., Capasso, C., Simone, G. D., Monti, S. M., Carradori, S., Donald, W. A., Dedhar, S., Supuran, C. T. (2020). Carbonic Anhydrase Inhibitors Targeting Metabolism and Tumor Microenvironment. *Metabolites*, 10(10), 412. <https://doi.org/10.3390/metabo10100412>
- Becker, H. M. (2020). Carbonic anhydrase IX and acid transport in cancer. *British Journal of Cancer*, 122(2), 157–167. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0642-z>
- Brynda, J., Mader, P., Šícha, V., Fábry, M., Poncová, K., Bakardiev, M., Grüner, B., Cígler, P., Řezáčová, P. (2013). Carborane-Based Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(51), 13760–13763. <https://doi.org/10.1002/anie.201307583>
- Dvořanová, J., Kugler, M., Holub, J., Šícha, V., Das, V., Nektivinda, J., El Anwar, S., Havránek, M., Pospíšilová, K., Fábry, M., Král, V., Medvedíková, M., Matějková, S., Lišková, B., Gurská, S., Džubák, P., Brynda, J., Hajdúch, M., Grüner, B., Řezáčová, P. (2020). Sulfonamido carboranes as highly selective inhibitors of cancer-specific carbonic anhydrase IX. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 200, 112460. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112460>
- Pastorekova, S., Gillies, R. J. (2019). The role of carbonic anhydrase IX in cancer development: Links to hypoxia, acidosis, and beyond. *Cancer and Metastasis Reviews*, 38(1–2), 65–77. <https://doi.org/10.1007/s10555-019-09799-0>

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Soňa Gurská, PhD.

Ústav molekulární a translační medicíny

Datum zadání diplomové práce: 3. března 2022
Termín odevzdání diplomové práce: 31. července 2023

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubalá, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 3. března 2022

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora: Bc. Margaréta Volníková

Názov práce: Identifikácia nízkomolekulových inhibítorov karboanhydrázy IX

Typ práce: Diplomová práca

Pracovisko: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

Vedúci práce: Ing. Soňa Gurská, Ph.D. (Ústav molekulární a translační medicíny, LF UP v Olomouci)

Rok obhajoby práce: 2023

Kľúčové slová: karboanhydrázy, karboanhydráza IX, nízkomolekulové inhibítory, vysokokapacitný skrining

Abstrakt:

Karboanhydrázy (CA) sú metaloproteíny, ktoré katalyzujú reverzibilnú premenu oxidu uhličitého na hydrogénuhličitan za súčasného uvoľnenia protónu. Sú nevyhnutné pre biologické systémy a podieľajú sa na mnohých dôležitých fyziologických a patofyziologických procesoch. Ľudská karboanhydráza IX (CA IX) je jednou z 15 ľudských izoforiem. Jej expresia je indukovaná hypoxiou v rôznych nádoroch. Je spojená s malígnou progresiou a rezistenciou na liečbu, čo z nej robí dôležitý terapeutický cieľ. V tejto práci bola použitá fluorescenčná metóda na identifikáciu nových špecifických inhibítorov CA IX v podmienkach vysokokapacitného skriningu. Bola meraná rýchlosť zmeny pH a ako fluorescenčný indikátor pH bol použitý pyranín. Test bol validovaný pomocou komerčnej chemickej knižnice Prestwick, ktorá obsahuje rôzne liečivá, vrátane známych inhibítorov CA. Následne bolo otestovaných 10204 látok z unikátnej chemickej knižnice ÚMTM na inhibičnú aktivitu voči CA IX. Primárnym skriningom bolo nájdených 178 hitov. V sekundárnom skriningu bolo ďalej testovaných 174 látok. Na základe hodnôt IC_{50} bolo zistené, že 25 látok z testovaných by mohli byť silnými inhibítormi CA IX.

Počet strán: 57

Počet príloh: 0

Jazyk: Slovenský

Bibliographic identification

Author's first name and surname: Bc. Margaréta Volníková

Title: Identification of small-molecule inhibitors of carbonic anhydrase IX

Type of thesis: Master's thesis

Department: Department of Cell Biology and Genetics, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc

Supervisor: Ing. Soňa Gurská, Ph.D. (Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacký University in Olomouc)

The year of presentation: 2023

Keywords: carbonic anhydrases, carbonic anhydrase IX, small-molecule inhibitors, high-throughput screening

Abstract:

Carbonic anhydrases (CAs) are metalloproteins that catalyze the reversible conversion of carbon dioxide to bicarbonate and release proton. They are essential for biological systems and are involved in several important physiological and pathophysiological processes. Human carbonic anhydrase IX (CA IX) (one of the 15 human isoforms) is a cancer-associated enzyme that is induced and activated by hypoxia in different tumors. It is associated with malignant progression and poor treatment outcome. That makes CA IX an important therapeutic target. In this thesis project, the fluorescent assay was used for the identification of new specific inhibitors of CA IX in high-throughput screening conditions. The rate of pH change was measured and pyranine was used as a fluorescent pH indicator. Assay was validated by using Prestwick Chemical Library which contains diverse drugs, including known CA inhibitors. Then 10204 compounds of IMTM Proprietary Library were tested for CA IX inhibitory activity. 178 hits were found by primary screening. After that, 174 compounds were tested in secondary screening. According to their IC_{50} values, 25 of these compounds may be strong CA IX inhibitors.

Number of pages: 57

Number of appendices: 0

Language: Slovak

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne pod vedením Ing. Soni Gurskej, Ph.D. s použitím uvedených literárnych zdrojov.

V Olomouci dňa

.....

Margaréta Volníková

Pod'akovanie

Rada by som sa poďakovala Ing. Soni Gurskej, Ph.D. za jej odborné vedenie, rady a pripomienky pri spracovávaní diplomovej práce, za trpezlivosť, ochotu a čas, ktorý mi venovala.

Experimentálna časť práce bola podporená Európskou úniou – Program EXCELES, projekt č. LX22NPO5102, Ministerstvom školstva, mládeže a telovýchovy ČR (CZ-OPENSSCREEN – LM2018130, EATRIS-CZ – LM2018133), interným grantom Univerzity Palackého v Olomouci (IGA_LF_2022_033) a Európskym fondom pre regionálny rozvoj – projekt ENOCH (č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868).

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	CIELE PRÁCE	2
3	LITERÁRNY PREHLAD	3
3.1	Karboanhydrázy	3
3.1.1	Typy karboanhydráz.....	3
3.1.2	Ľudské karboanhydrázy	4
3.1.3	Mechanizmus katalýzy	6
3.1.4	Karboanhydráza IX	7
3.2	Regulácia pH v nádoroch	9
3.2.1	Systém regulujúci pH.....	9
3.2.2	Expresia proteínov v hypoxických podmienkach	11
3.3	Inhibítory karboanhydráz	13
3.3.1	Mechanizmy pôsobenia inhibítorov karboanhydráz	14
3.3.2	Inhibícia karboanhydráz asociovaných s tumormi.....	15
3.4	Objavovanie liečiv.....	17
3.4.1	Vysokokapacitný skríning.....	18
4	MATERIÁL A METÓDY	20
4.1	Použité chemikálie	20
4.2	Použité roztoky.....	20
4.3	Použité prístroje a zariadenia	21
4.4	Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy.....	22
4.4.1	Optimalizácia koncentrácie enzýmu CA IX a podmienok experimentu pre testovanie inhibítorov CA IX.....	22
4.4.2	Validácia metódy použitím komerčnej chemickej knižnice Prestwick.....	23
4.4.3	Analýza inhibítorov CA IX v chemickej knižnici ÚMTM	25
4.4.4	Sekundárny skríning.....	25
5	VÝSLEDKY	28
5.1	Optimalizácia koncentrácie enzýmu CA IX a podmienok experimentu pre testovanie inhibítorov CA IX	28
5.2	Validácia metódy použitím komerčnej chemickej knižnice Prestwick.....	31

5.3	Analýza inhibítorov CA IX v chemickej knižnici ÚMTM	35
5.4	Sekundárny skríning	38
6	DISKUSIA.....	44
7	ZÁVER.....	47
8	LITERATÚRA	48

ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

ADME	absorpcia, distribúcia, metabolizmus a eliminácia
AE	aniónový výmenníkový transportér
ATP	adenozíntrifosfát
AUC	plocha pod krivkou
AV ČR	Akadémia vied Českej republiky
AZA	acetazolamid
BSA	bovinný sérový albumín
CA	karboanhydráza
CARP	proteín príbuzný karboanhydráze
ddH ₂ O	destilovaná voda
DDM	n-dodecyl- β -D-maltopyranozid
DMSO	dimetylsulfoxid
GLUT	glukózový transportér
hCA	ľudská karboanhydráza
HEPES	4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazínétánsulfónová kyselina
HIF	hypoxiou indukovateľný faktor
His	histidín
HRE	elementy odpovede na hypoxiu
HTS	vysokokapacitný skríning
IC ₅₀	polovičná maximálna inhibičná koncentrácia
Lac	laktát
mAb	monoklonálna protilátka
MCT	monokarboxylátový transportér
NBC	sodíkovo hydrogénuhličitanový kotransportér
NHE	sodíkovo vodíkový výmenníkový transportér
PHD	prolylhydroxyláza
PG	proteoglykánová doména
PI	percento inhibície
RNA	ribonukleová kyselina
Ub	ubikvitín
ÚMTM	Ústav molekulárnej a translačnej medicíny

ÚOCHB	Ústav organickej chémie a biochémie
VEGF	vaskulárny endotelový rastový faktor
VHL	von Hippel-Lindau nádorový supresor

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obr. 1: Mechanizmus katalýzy α -CA.

Obr. 2: Schéma štruktúry karboanhydrázy IX.

Obr. 3: Vybrané proteíny zapojené do regulácie pH a metabolizmu nádorových buniek.

Obr. 4: Regulácia HIF závislá na prítomnosti kyslíka.

Obr. 5: Chemická štruktúra acetazolamidu.

Obr. 6: Chemická štruktúra SLC-0111.

Obr. 7: Pásma variability dát kontrol a separačné pásmo testu.

Obr. 8: Schéma rozloženia roztokov v jamkách doštičky pre optimalizáciu koncentrácie CA IX a podmienok experimentu.

Obr. 9: Schéma rozloženia roztokov v jamkách doštičky pre validáciu fluorescenčnej metódy použitím komerčnej chemickej knižnice Prestwick.

Obr. 10: Schéma rozloženia roztokov v jamkách doštičky pre sekundárny skrining.

Obr. 11: Reprezentatívne krivky zobrazujúce priebeh reakcie katalyzovanej CA IX s rôznymi koncentraciami.

Obr. 12: Reprezentatívne krivky priebehu reakcie katalyzovanej CA IX bez inhibítora a s inhibítorom AZA.

Obr. 13: Závislosť AUC na koncentrácii enzýmu a prítomnosti inhibítora.

Obr. 14: Distribúcia látok a aktívne látky z komerčnej chemickej knižnice Prestwick v závislosti od hodnôt PI.

Obr. 15: Reprezentatívne krivky zobrazujúce priebeh reakcie s vybranými látkami z komerčnej chemickej knižnice Prestwick.

Obr. 16: Hodnoty Z-faktora doštičiek s testovanými látkami unikátnej chemickej knižnice ÚMTM.

Obr. 17: Distribúcia testovaných látok unikátnej chemickej knižnice ÚMTM v závislosti od hodnôt PI.

Obr. 18: Distribúcia aktívnych látok z unikátnej chemickej knižnice ÚMTM v závislosti od hodnôt PI.

Obr. 19: Grafické zobrazenie zastúpenia aktívnych látok v jednotlivých kategóriách.

Obr. 20: Hodnoty PI aktívnych látok z unikátnej chemickej knižnice ÚMTM rozdelených do jednotlivých kategórií.

Obr. 21: Reprezentatívne krivky priebehu reakcie pri sekundárnom skríningu látky LEM00017808.

Obr. 22: Hodnoty Z-faktora doštičiek s látkami testovanými v sekundárnom skríningu.

Obr. 23: Grafické zobrazenie rozdelenia látok do skupín na základe hodnôt IC_{50} .

Obr. 24: Reprezentatívne zobrazenie kriviek závislosti odpovede na dávke vybraných látok zaradených do jednotlivých kategórií na základe hodnoty IC_{50} .

ZOZNAM TABULIEK

Tab. 1: Prehľad 15 izoforiem α -CA prítomných u človeka.

Tab. 2: Vybrané ochorenia a izoformy α -CA používané alebo študované ako cieľ liečby inhibítormi.

Tab. 3: Koncentrácie a objemy pipetovaných látok pre sekundárny skrining.

Tab. 4: Z-faktory reakcií katalyzovaných CA IX v rôznych časových intervaloch merania priebehu reakcie.

Tab. 5: Z-faktory pre jednotlivé doštičky s látkami z chemickej knižnice Prestwick.

Tab. 6: Aktívne látky z testovaných zlúčenín komerčnej chemickej knižnice Prestwick s hodnotou PI > 80 %.

Tab. 7: Rozdelenie látok na základe hodnôt IC₅₀.

Tab. 8: Látky s hodnotou IC₅₀ < 0,005 μ M a 0,005 – 0,1 μ M.

1 ÚVOD

Karboanhydrázy sú metaloproteíny, ktoré obsahujú vo svojom aktívnom mieste predovšetkým Zn^{2+} ión a katalyzujú reverzibilnú premenu CO_2 na HCO_3^- za súčasného uvoľnenia H^+ . V súčasnosti je známych niekoľko rodín CA, ktoré sa nachádzajú u mnohých organizmov. U človeka sa vyskytuje 15 izoformiem z rodiny α -CA s rôznymi fyziologickými funkciami, medzi ktoré patrí CA IX. Jedná sa o transmembránovú izoformu asociovanú s tumormi a jej nadmerná expresia je indukovaná hypoxiou v nádorových bunkách. Výrazne prispieva k oxysľovaniu extracelulárneho prostredia a k zmenám potrebným pre ich adaptáciu na vzniknuté podmienky. Je spájaná s rezistenciou na imuno-, chemo- a rádioterapiu a bolo zistené, že inhibícia CA IX vedie k zlepšeniu výsledkov liečby. V súčasnosti sú známe viaceré inhibítory CA a niektoré z nich sú klinicky používané v liečbe rôznych ochorení. Nie sú však špecifické voči izoformám CA prítomným v nádoroch. Pre minimalizáciu vedľajších účinkov prebieha testovanie nových látok, ktoré by mohli selektívne inhibovať CA IX a boli by vhodné pre použitie v liečbe nádorových ochorení.

2 CIELE PRÁCE

Cieľom teoretickej časti bolo vypracovanie rešerše na tému diplomovej práce. V prípade experimentálnej časti bolo potrebné sa najprv oboznámiť s fluorescenčnou metódou na stanovenie inhibítorov CA IX, ktorá zahŕňala prácu s hardvérom a softvérom prístroja FLIPR. Nasledujúcim z cieľov bolo otestovanie aktivity enzýmu CA IX, pozitívnej kontroly, optimalizácia podmienok experimentu a zavedenie metódy do HTS podmienok. Hlavným cieľom práce bol skrining chemickej knižnice pre identifikáciu nových nízkomolekulových inhibítorov CA IX.

3 LITERÁRNY PREHĽAD

3.1 Karboanhydrázy

Karboanhydrázy (EC 4.2.1.1.) sú enzýmy, ktoré katalyzujú reverzibilnú premenu oxidu uhličitého na hydrogénuhličitan, pričom dochádza k uvoľneniu protónu vodíka ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$) (Imtaiyaz Hassan *et al.*, 2013). Daná reakcia prebieha aj bez prítomnosti katalyzátora, avšak je príliš pomalá na to, aby vyhovovala metabolickým procesom organizmu. V dôsledku toho sa CA vyvinuli niekoľkokrát nezávisle na sebe a sú prítomné v rôznych skupinách organizmov ako stavovce, prvoky, riasy, cytoplazma zelených rastlín, baktérie a ďalšie. V organizmoch sú tieto enzýmy súčasťou fyziologických procesov spojených s homeostázou pH a CO_2 . Zúčastňujú sa biosyntetických reakcií ako glukoneogenéza, lipogenéza a ureagenéza, dýchanie a transport CO_2 a HCO_3^- , sekrécia elektrolytov v rôznych tkanivách a orgánoch, kostná resorpcia, kalcifikácia, tumorogenicita a iných (Maren, 1967; Supuran, 2016a).

3.1.1 Typy karboanhydráz

Karboanhydrázy sú metaloenzýmy prítomné vo väčšine živých organizmov, ktoré patria do doteraz známych ôsmich génových rodín: α - (stavovce, prvoky, riasy, koraly, cytoplazma zelených rastlín, baktérie), β - (baktérie, huby, archaea, riasy, chloroplasty jednoklíčnolistových a dvojklíčnolistových rastlín), γ - (archaea, baktérie, cyanobaktérie, rastliny), δ - (haptofyty, dinoflageláty, rozsievky, riasy), ζ - (morské rozsievky), η - (prvoky), θ - (morské rozsievky) a ι -CA (rozsievky, baktérie, cyanobaktérie, riasy) (Nocentini *et Supuran*, 2019; Nocentini *et al.*, 2021).

V aktívnom mieste obvykle obsahujú iónový kofaktor Zn^{2+} koordinovaný tromi aminokyselinovými zvyškami, pričom štvrtým ligandom je molekula vody alebo hydroxidový ión. Niektoré z rodín CA môžu koordinovať odlišný ión kovu (Nocentini *et al.*, 2021). Rodiny α -, β -, δ -, η - a pravdepodobne θ - ako kofaktor využívajú Zn^{2+} , γ -CA Fe^{2+} , ale aj Zn^{2+} a Co^{2+} . ζ -CA obsahujú Cd^{2+} a Zn^{2+} (Del Prete *et al.*, 2020), ι -CA Mn^{2+} a Zn^{2+} (Jensen *et al.*, 2019). Novo objavená ι -CA môže dokonca vykazovať katalytickú aktivitu bez potreby prítomnosti kovového iónu (Hirakawa *et al.*, 2021).

3.1.2 Ľudské karboanhydrázy

Všetky CA človeka patria do rodiny α -CA. Známých je 15 izoforiem s odlišnou subcelulárnou a tkanivovou lokalizáciou (Tab. 1), v rámci ktorej zohrávajú viaceré fyziologické úlohy. Izoformy sa medzi sebou líšia aj molekulárnymi vlastnosťami, oligomérom usporiadaním, úrovňami expzie, kinetickými vlastnosťami a odpoveďou na rôzne triedy inhibítorov. Z 15 ľudských izoforiem je 12 katalytických, pričom z nich je 5 cytosólických (CA I, II, III, VII a XIII), 4 membránovo viazané (CA IV, IX, XII a XIV), 2 mitochondriálne (CA VA a VB) a 1 izoforma je sekrétovaná (CA VI). Zvyšné 3 (CA VIII, X a XI) nemajú katalytickú aktivitu a bývajú označené ako CARP (Supuran, 2008a; Alterio *et al.*, 2012).

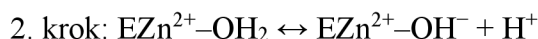
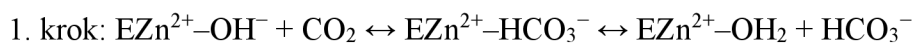
hCA obsahujú kovový ión Zn^{2+} , ktorý je nevyhnutný pre katalýzu. Na základe údajov z röntgenovej kryštalografie bolo zistené, že kovový ión sa nachádza v spodnej časti 15 Å hlbkej štrbiny aktívneho miesta, pričom je koordinovaný tromi His zvyškami (His94, His96 a His119) a molekulou vody alebo hydroxidom (Supuran, 2008a). Väčšina ľudských izoforiem sú monoméry zložené zo 7 pravotočivých α -helixov a β -listu tvoreného 10 β -vláknami (2 paralelné a 8 antiparalelných). CA VI, IX a XII sa vyskytujú ako diméry (Aggarwal *et al.*, 2013; Lomelino *et al.*, 2018). CARP vykazujú vysoký stupeň sekvenčnej homológie s katalytickými izoformami hCA, ale v ich aktívnom mieste chýba jeden alebo viacero His koordinujúcich Zn^{2+} , čo je dôvodom absencie ich katalytických vlastností (Aggarwal *et al.*, 2013).

Tab. 1: Prehľad 15 izoforiem α -CA prítomných u človeka (Supuran, 2008a).

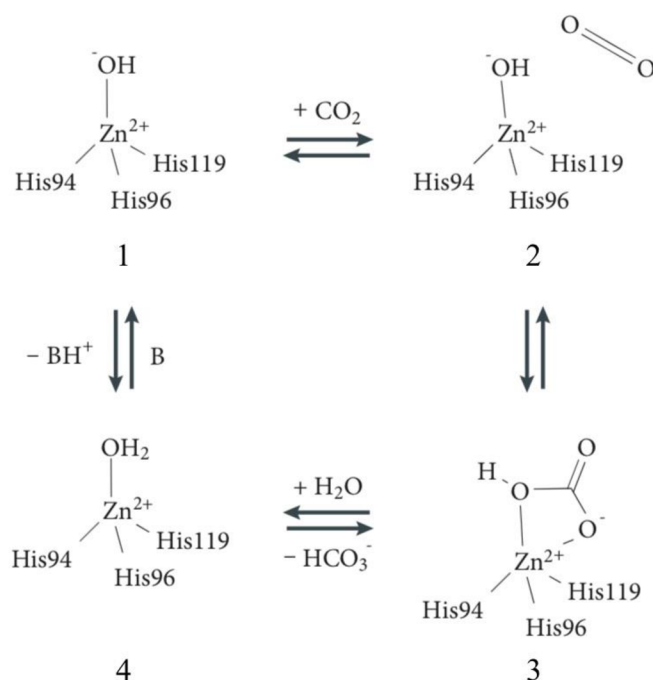
Izoforma	Subcelulárna lokalizácia	Tkanivová lokalizácia
CA I	cytosól	erytrocyty, gastrointestinálny trakt
CA II	cytosól	erytrocyty, oko, gastrointestinálny trakt, kostné osteoklasty, obličky, pľúca, semenníky, mozog
CA III	cytosól	kostrové svaly, adipocyty
CA IV	viazaná na membránu	obličky, pľúca, pankreas, mozgové kapiláry, hrubé črevo, srdcový sval
CA VA	mitochondrie	pečeň
CA VB	mitochondrie	srdce a kostrový sval pankreas, obličky, miecha, gastrointestinálny trakt
CA VI	vylučovaná (sliny, mlieko)	slinné a mliečne žľazy
CA VII	cytosól	centrálne nervová sústava
CA VIII	cytosól	centrálne nervová sústava
CA IX	transmembránová	nádory, sliznica gastrointestinálneho traktu
CA X	cytosól	centrálne nervová sústava
CA XI	cytosól	centrálne nervová sústava
CA XII	transmembránová	renálny, črevný a reprodukčný epitel, oko, nádory
CA XIII	cytosól	obličky, mozog, pľúca, črevá, reprodukčný trakt
CA XIV	transmembránová	obličky, mozog, pečeň

3.1.3 Mechanizmus katalýzy

Reakcia katalyzovaná CA je dvojkrokový cyklus, ktorý zahŕňa premenu oxidu uhličitého na hydrogénuhličitan a následne dochádza k regenerácii aktívneho enzýmu:



Aktívna forma enzýmu je zásaditá. Najprv hydroxid, ktorý je koordinovaný iónom zinku, nukleofilne atakuje uhlík CO_2 naviazaný v hydrofóbnom vrecku, čo vedie k vytvoreniu hydrogénuhličitanu viazaného na zinok. Molekula vody následne vytesňuje hydrogénuhličitan, ktorý ako prvý difunduje do rozpúšťadla. To vedie k vytvoreniu kyslej formy enzýmu s vodou koordinovanou zinkom, ktorá je katalyticky inaktívna. Na regeneráciu hydroxidu sa z vody viazanej na zinok prenáša protón (Obr. 1). To je dosiahnuté sieťou molekúl vody koordinovaných s aminokyselinami a následne dochádza k uvoľneniu prebytočného protónu do rozpúšťadla (Supuran, 2008b; Domsic *et McKenna*, 2010; Aggarwal *et al.*, 2013; Boone *et al.*, 2014; Supuran, 2018a).



Obr. 1: Mechanizmus katalýzy α -CA. 1 – aktívna forma enzýmu s hydroxidom koordinovaným Zn^{2+} , zásaditá; 2 – nukleofilný atak molekuly CO_2 ; 3 – enzým s hydrogénuhličitanom koordinovaným Zn^{2+} ; 4 – inaktívna forma enzýmu s molekulou vody koordinovanou Zn^{2+} , kyslá (upravené podľa Supuran, 2008b).

Limitujúcim krokom rýchlosti katalýzy je regenerácia neaktívnej formy na aktívnu, kedy dochádza k prenosu protónov. V prípade izoforiem s veľkou katalytickou aktivitou, ako CA II, IV, VII a IX, je tento proces uskutočňovaný prostredníctvom His64 umiestneného pri vstupe do aktívneho miesta, a ďalej zhľukom His vyčnievajúcich z okraja aktívneho miesta na povrch enzýmu. Na základe tohto efektívneho spôsobu transportu protónov, je CA II jedným z najaktívnejších známych enzýmov ($s \ k_{cat}/K_m = 1,5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) (Supuran, 2008a; Supuran, 2018a).

Okrem reverzibilnej hydratácie CO₂ na hydrogénuhličitan, katalyzujú α -CA aj ďalšie reakcie, ako napríklad hydratácia kyanamidu na močovinu, kyanidu na kyselinu karbamovú, aldehydu na gem-dioly, hydrolýza karboxylových alebo sulfónových kyselín a iné hydrolytické procesy, pričom však nie je známy ich fyziologický význam (Supuran, 2008a).

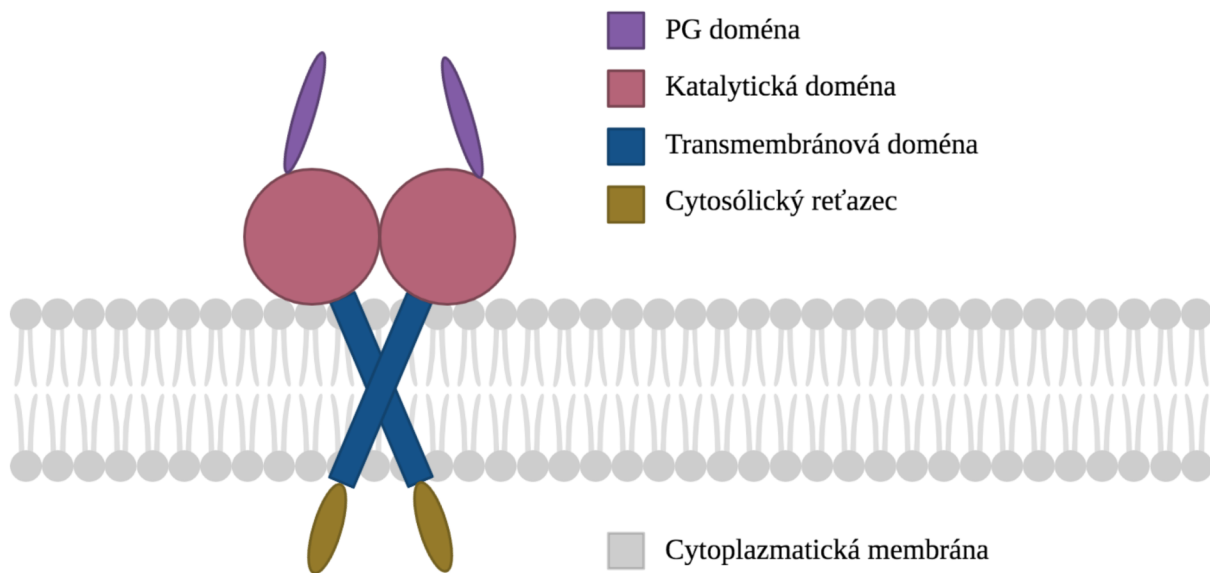
3.1.4 Karboanhydráza IX

Už od samotného objavu bol enzým CA IX spájaný s nádormi. Pomocou monoklonálnej protilátky bol prvýkrát identifikovaný v ľudskej HeLa bunkovej línii odvodenej od karcinómu krčka maternice a pôvodne bol pomenovaný ako MN proteín (Pastoreková *et al.*, 1992). Ďalším výskumom bola pozorovaná jeho expresia v rôznych nádorových bunkových líniiach a chirurgických vzorkách nádorov, ale nie v normálnych tkanivách (Závada *et al.*, 1993). Pastorek *et al.* (1994) zistili štruktúrnu homológiu s CA a potvrdili, že viaže zinok a má karboanhydrázovú aktivitu. Na základe týchto údajov bol objavený proteín považovaný za nový izoenzým α -CA. Neskôr bol izolovaný a charakterizovaný gén CA9, ktorý kóduje rôzne štruktúrne domény proteínu CA IX (Opavský *et al.*, 1996). Ďalej bola zistená prítomnosť CA IX za fyziologických podmienok v gastrointestinálnom trakte a bola potvrdená sekvenačnou analýzou (Pastoreková *et al.*, 1997). V nenádorových tkanivách ako v srdci, pľúcach, obličkách, prostate, periférnej krvi, mozgu, placente a svaloch expresia CA IX nebola pozorovaná (McKiernan *et al.*, 1997).

V súčasnosti je známe, že CA IX je glykoproteín vyskytujúci sa na povrchu buniek a je transmembránovou izoformou α -CA. Je asociovaný s nádormi a jeho expresia je indukovaná hypoxiou. Podieľa sa na adaptácii bunky na acidózu a na progresii nádoru. Expresia CA IX v nenádorových tkanivách je zriedkavá a obmedzená na epitel žalúdka, žľáz, pankreasu a čreva (Benej *et al.*, 2014; Pastoreková *et al.*, 2019). V nádorových tkanivách

je expresia naopak zvýšená a bola pozorovaná u rôznych typov, ako napríklad nádory mozgu, prsníka, pľúc, močového mechúra, krčka maternice, hrubého čreva alebo obličiek. Vďaka týmto skutočnostiam je CA IX vhodným terapeutickým cieľom a biomarkerom nádorových ochorení (Mishra *et al.*, 2020).

Štruktúrou je CA IX homodimér, ktorý je stabilizovaný medzimolekulovými disulfidovými väzbami. Každá podjednotka je tvorená zo 4 hlavných domén. Na N-terminálnej časti sa nachádza PG doména, ktorá vyčnieva z extracelulárnej katalytickej domény enzýmu ukotvenej v plazmatickej membráne transmembránovou kotvou. V intracelulárnom prostredí sa nachádza cytosólický reťazec (Obr. 2). Aktívne miesto enzýmu smeruje do extracelulárneho prostredia (Alterio *et al.*, 2009).



Obr. 2: Schéma štruktúry karboanhydrázy IX. Vytvorené prostredníctvom BioRender.com.

CA IX je aktívna pri nízkych hodnotách pH, pri ktorých by väčšina iných enzýmov nemala katalytické účinky. To je pripisované prítomnosti PG domény, ktorá je nevyhnutná pri modifikácii katalytickej aktivity (Hilvo *et al.*, 2008). PG doména je spomedzi všetkých izoformiem α -CA evolučne vyvinutým znakom iba u CA IX. Pôsobí ako vnútorný pufer (Innocenti *et al.*, 2009; De Simone *et al.*, 2010) a podieľa sa na adhézii buniek (Závada *et al.*, 2000, Csaderová *et al.*, 2013).

3.2 Regulácia pH v nádoroch

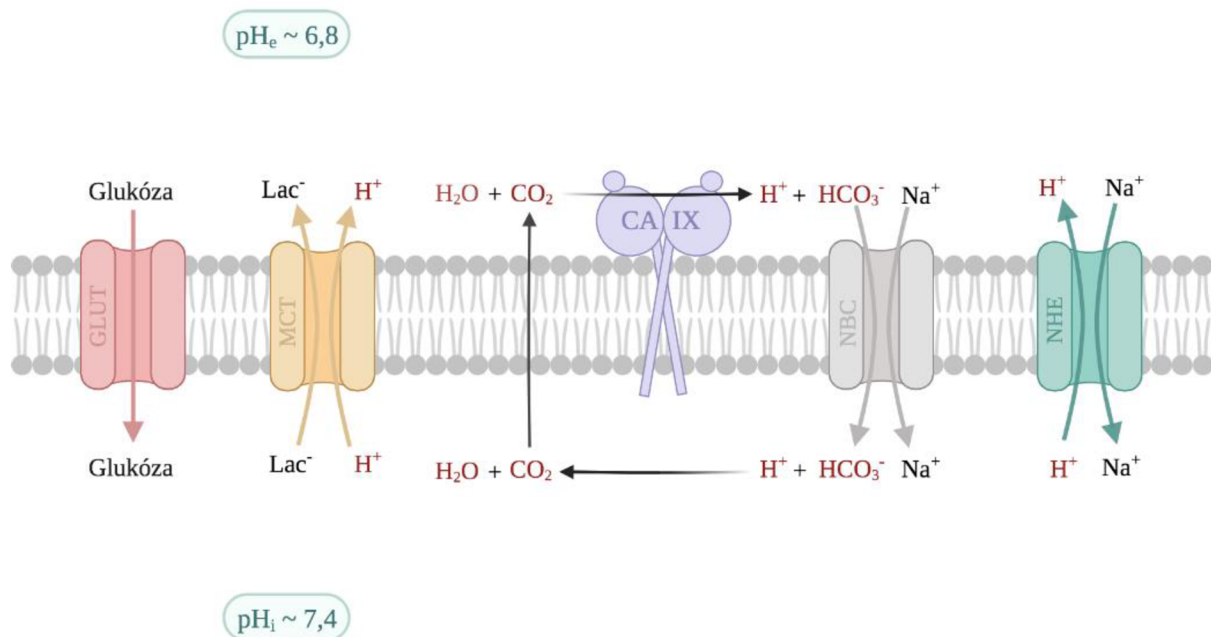
Vznik a vývoj rakoviny je zložitým procesom, ktorý zahŕňa sled rôznych selektívnych a adaptívnych krokov so zapojením rozsiahleho množstva signálnych molekúl a dráh. Nádor zo začiatku rastie ako zhhluk buniek bez cievneho systému, ktorý nesie onkogénne mutácie, až kým vzdialenosť buniek od najbližších ciev nezačne obmedzovať prísun kyslíka, živín a odvádzanie metabolitov. Tieto obmedzenia vedú k hypoxii a acidóze, ktoré selektujú adaptabilné nádorové bunky schopné aberantnej angiogenézy, remodelácie metabolizmu a majú schopnosť byť invazívne, rezistentné na terapiu a ľahko metastázujú (Pastoreková *et* Gillies, 2019).

Warburgov jav je efekt, kedy sa u nádorových buniek stáva preferovanou cestou metabolizmu glukózy anaeróbna glykolyza v dôsledku adaptácie na hypoxiu a vzniknuté podmienky (Vaupel *et* Multhoff, 2021). Zmeny metabolizmu vedú k tvorbe metabolických kyselín, buď vo forme CO₂, ktorý je hydratovaný na HCO₃⁻ a H⁺, alebo vo forme laktátu (Lac⁻) a H⁺. Kyslé metabolity je potrebné z bunky odstrániť, aby sa zabránilo intracelulárnej acidóze a dôjde k aktivácii molekulárneho mechanizmu, ktorý reguluje pH. CO₂ môže pasívne prešľapovať difúziou cez plazmatickú membránu, prípadne cez kanály, ako sú napríklad akvaporíny. Nabité ióny nemôžu voľne prechádzať membránou a sú transportované rôznymi transportérmi (Sedláková *et al.*, 2014; Becker, 2020).

3.2.1 Systém regulujúci pH

Acidobázická regulácia v nádorových bunkách je sprostredkovaná mechanizmami, do ktorých sú zapojené rôzne transportéry a CA. Systém regulujúci pH sa skladá z časti exportujúcej laktát a protóny von z bunky a časti importujúcej hydrogénuhličitan (Obr. 3). Udržiava tak intracelulárne prostredie na neutrálnych alebo mierne zásaditých hodnotách pH (pH_i ~ 7,4) a extracelulárne prostredie okysľuje (pH_e ~ 6,8). To tvorí zásadný rozdiel oproti normálnym bunkám, kde intracelulárne pH býva nižšie (pH_i ~ 7,2) ako extracelulárne (pH_e ~ 7,4) (Webb *et al.*, 2011; Becker *et* Deitmer, 2021). Exportná časť je zabezpečená prostredníctvom niekoľkých typov transmembránových iónových transportérov, predovšetkým MCT odstraňujúcich laktát, NHE1 transportujúcim Na⁺ a H⁺ a H⁺-ATPázou. Importná časť zahŕňa viaceré hydrogénuhličitanové transportéry, vrátane AE1-3, ďalej NBC, ktoré prenášajú Na⁺ a HCO₃⁻ a rôzne ďalšie (Chiche *et al.*, 2010; Sedláková *et al.*, 2014). Významnú úlohu v regulácii pH

hypoxických nádorov zohráva CA IX (Švastová *et al.*, 2004). Zrýchľuje hydratáciu CO_2 a funkčne spolupracuje s viacerými iónovými transportérmi, čím uľahčuje mobilitu CO_2 a H^+ v nádorovom tkanive. Dochádza k produkcii HCO_3^- spojenej s jeho priamym transportom do intracelulárneho prostredia a tým pádom k zrýchlenému toku iónov HCO_3^- cez membránu. Zlepšený tok predstavuje pre bunky výhodu v situáciách vyžadujúcich nadmernú reguláciu pH, akou je nádorová hypoxia (Morgan *et al.*, 2007; Pastoreková *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2020).



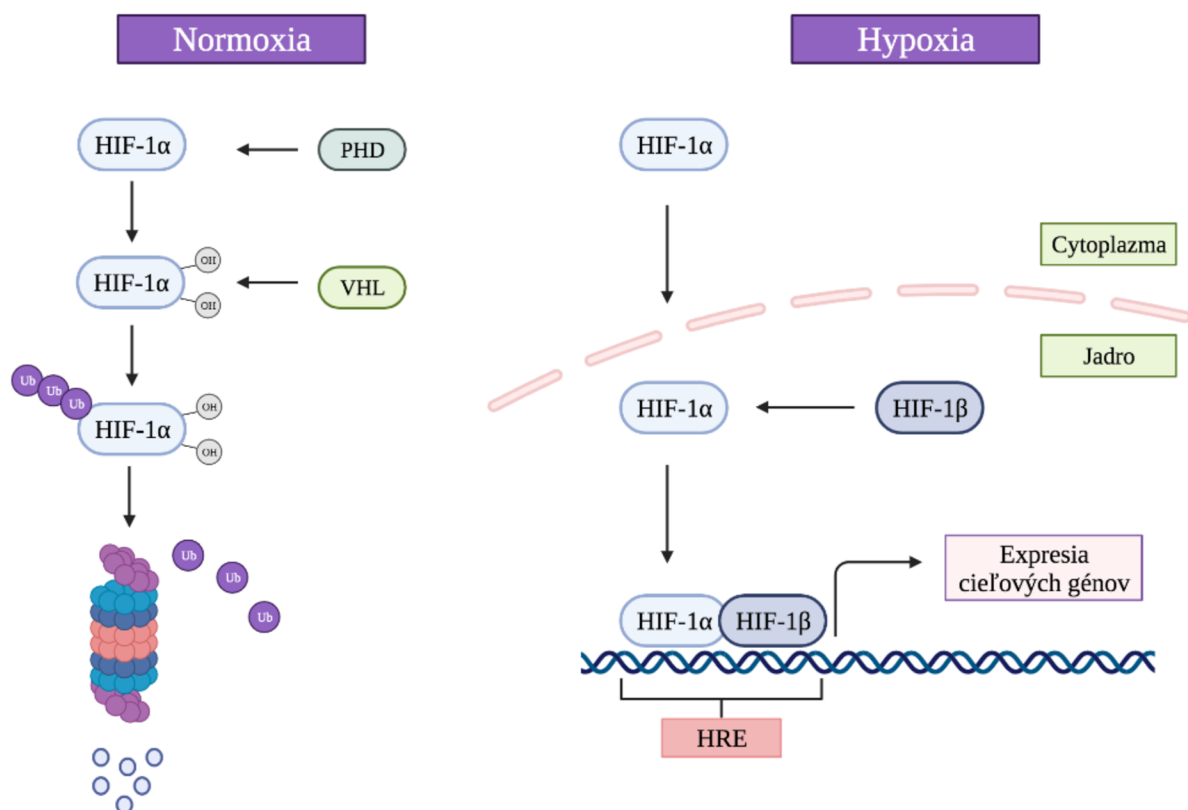
Obr. 3: Vybrané proteíny zapojené do regulácie pH a metabolizmu nádorových buniek. GLUT transportuje glukózu dovnútra bunky, MCT exportuje Lac^- a H^+ do extracelulárneho prostredia, CO_2 difunduje membránou, CA IX katalyzuje premenu CO_2 na HCO_3^- a H^+ , NBC importuje HCO_3^- a Na^+ dovnútra bunky, NHE transportuje H^+ do extracelulárneho a Na^+ do intracelulárneho prostredia. Vytvorené prostredníctvom BioRender.com.

3.2.2 Expresia proteínov v hypoxických podmienkach

Hypoxia stimuluje nadmernú expresiu viacerých proteínov, ktoré sú nevyhnutné pre prežitie nádorových buniek a vedie k acidifikácii extracelulárneho prostredia (Sedláková *et al.*, 2014). Má závažné klinické dôsledky a býva spájaná s progresiou nádoru a rezistenciou na chemo-, rádio- a imunoterapiu (Moeller *et al.*, 2007; Luo *et Wang*, 2019; Wu *et al.*, 2022).

V hypoxických oblastiach tumorov dochádza k aktivácii rodiny transkripčných faktorov HIF, predovšetkým HIF-1 a v menšej miere aj HIF-2. Sú nevyhnutné pre odpoveď bunky na hypoxické podmienky a sú hlavným mediátorom hypoxickej odozvy. Zohrávajú úlohu v expresii génov, angiogenéze a raste nádoru (Maxwell *et al.*, 1997, Carmeliet *et al.*, 1998; Ryan *et al.*, 1998; Rohwer *et Cramer*, 2011).

HIF-1 je heterodimér zložený z 2 podjednotiek (Wang *et al.*, 1995; Wang *et Semenza*, 1995). Podjednotka HIF-1 α je za normálnych podmienok v okysličených bunkách hydroxylovaná prostredníctvom PHD a rozpoznávaná nádorovým supresorom VHL, ktorý funguje ako ubikvitín E3 ligáza. Následne je degradovaná proteazómom (Maxwell *et al.*, 1999; Semenza, 2000; Supuran, 2017). V hypoxických podmienkach je podjednotka HIF-1 α stabilizovaná, nedochádza k jej degradácii a vstupuje do jadra, kde tvorí dimér s podjednotkou HIF-1 β . Vznikne tak aktívny transkripčný faktor, ktorý sa viaže do oblasti HRE a aktivuje expresiu génov (Obr. 4) (Semenza, 2003; Supuran, 2017). Promótor génu *CA9* obsahuje HRE v blízkosti miesta začiatku transkripcie (Wykoff *et al.*, 2000).



Obr. 4: Regulácia HIF závislá na prítomnosti kyslíka. V normoxických podmienkach je podjednotka HIF-1 α hydroxylovaná PHD, rozpoznávaná VHL, ubikvitinovaná (Ub) a degradovaná proteazómom. V hypoxických podmienkach je HIF-1 α stabilizovaná a translokovaná do jadra, tvorí heterodimér s podjednotkou HIF-1 β , ktorý sa viaže na HRE a spúšťa expresiu cieľových génov. Vytvorené prostredníctvom BioRender.com.

Expresia génov regulovaná HIF zahŕňa gény regulujúce erytropoézu, vaskulárnu remodeláciu a plasticitu, delenie a viabilitu, adhéziu a metabolizmus buniek, pH reguláciu a ďalšie procesy, ktoré sú dôležité pre progresiu nádoru (Pastoreková *et* Gillies, 2019). HIF spúšťa expresiu napríklad VEGF, ktorý je nevyhnutný pre angiogénu, VEGF receptorov, enzýmov potrebných pre glykolýzu ako hexokináza, laktát dehydrogenáza alebo transportéry GLUT a MCT (Semenza, 2012; Schito *et* Semenza, 2016). Spomedzi izoforiem karboanhydráz je týmto spôsobom regulovaná expresia CA IX a CA XII (Wykoff *et al.*, 2000).

3.3 Inhibítory karboanhydráz

Karboanhydrázy sú zapojené do mnohých fyziologických procesov a abnormálna hladina alebo aktivita týchto enzýmov býva spájaná s rôznymi ochoreniami. Inhibítory CA boli pôvodne používané ako diuretiká a lieky pri liečbe epilepsie a glaukómu. Postupne sa rôzne CA stali cieľom pre vývoj inhibítorov alebo aktivátorov s aplikáciou v biomedicíne aj v prípade ďalších patologických stavov (Supuran *et al.*, 2003; Mishra *et al.*, 2020).

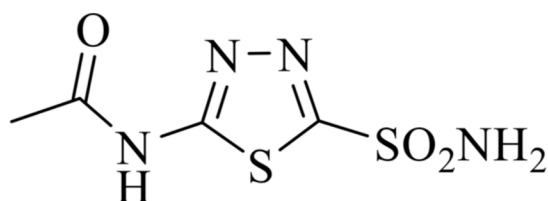
Inhibícia viacerých izoformiem α -CA je cieľom výskumu alebo liečby (Tab. 2). Príkladom môže byť CA II, ktorá sa nachádza v mnohých tkanivách a podieľa sa na patologických stavoch ako glaukóm, epilepsia alebo akútna výšková choroba. Pri liečbe glaukómu je dôležitá aj inhibícia CA IV a okrem toho má význam aj v prípade cievnej mozgovej príhody. Mitochondriálne izoformy, CA VA a CA VB, sú zásadné pri biosyntéze mastných kyselín a stali sa spolu s CA II cieľom liečby obezity. Inhibícia CA VII má význam taktiež v prípade epilepsie a aj neurologických ochorení. Inhibítory CA IX a v menšej miere CA XII sú študované pre použitie v liečbe hypoxických nádorov. CA XIV je cieľom v prípade epilepsie a niektorých typov retinopatie (Pastoreková *et al.*, 2004; Mishra *et al.*, 2020). Inhibícia ďalších rodín okrem α -CA môže mať fungicídne, antibakteriálne alebo antiparazitické využitie (Supuran, 2012).

Tab. 2: Vybrané ochorenia a izoformy α -CA používané alebo študované ako cieľ liečby inhibítormi (Pastoreková *et al.*, 2004; Mishra *et al.*, 2020).

Ochorenie	Izoforma ako terapeutický cieľ
Glaukóm	CA II, CA IV, CA XII
Epilepsia	CA II, CA IV, CA VII, CA XIV
Obezita	CA II, CA VA, CA VB
Neurologické ochorenia	CA II, CA IV, CA V, CA VII, CA XIV
Retinopatia	CA VII, CA XIV
Nádorové ochorenia	CA IX, CA XII

3.3.1 Mechanizmy pôsobenia inhibítorov karboanhydráz

Existuje niekoľko známych spôsobov inhibície CA. Jednou skupinou sú inhibítory viažuce sa priamo na Zn^{2+} ión v aktívnom mieste CA. Takto pôsobia predovšetkým primárne sulfónamidy, ich izoestery ako sulfamidy a sulfamáty a ďalej ditiokarbamáty. Najviac študovanou skupinou inhibítorov sú práve spomínané sulfónamidy, kam patria zlúčeniny ako acetazolamid, metazolamid, etoxzolamid, sultiam, dichlórfenamid, dorzolamid, brinzolamid, sulpirid alebo zonisamid. Acetazolamid (Obr. 5) je nešpecifický inhibítor, ktorý inhibuje mnoho izoform CA. V klinickej praxi je používaný od 50. rokov minulého storočia ako diuretikum a pri liečbe epilepsie a glaukómu (Supuran, 2008b; McKenna *et al.*, 2013).



Obr. 5: Chemická štruktúra acetazolamidu (Supuran, 2020b).

Ďalším mechanizmom inhibície je väzba inhibítora na zinok koordinovaný vodou alebo hydroxidom, a týmto mechanizmom pôsobia fenoly, polyamíny, sulfokumaríny a tioxokumaríny (Supuran, 2016b; Kciuk *et al.*, 2022). Kumaríny, chinolíny, laktóny alebo tiolaktóny sú látky, ktoré sa viažu v oblasti vstupu do aktívneho miesta enzýmu a zablokujú ho. Karboxylové kyseliny a rôzne deriváty karboxylových kyselín sa viažu mimo aktívne miesto CA (Supuran, 2020a; Kciuk *et al.*, 2022). Zablokujú proces prenosu protónov prostredníctvom His64 pri regenerácii neaktívnej formy enzýmu na aktívnu (D'Ambrosio *et al.*, 2015).

Spomenuté mechanizmy inhibície boli dôkladne študované predovšetkým röntgenovou kryštalografiou. Okrem toho existujú novo objavené inhibítory CA, v prípade ktorých doteraz nie je známy presný mechanizmus inhibície, nakoľko ešte neboli vykonané kryštalografické analýzy (Kciuk *et al.*, 2022). Novo vyvíjané a netradičné inhibítory CA zahŕňajú aj biologické látky, ako napríklad mAb a molekuly založené na RNA interferencii (Singh *et al.*, 2018).

3.3.2 Inhibícia karboanhydráz asociovaných s tumormi

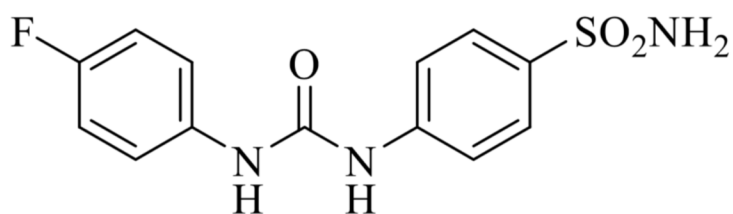
Dve z izoforiem α -CA, CA IX a CA XII, sú exprimované v hypoxických podmienkach, k akým dochádza v nádorových bunkách (Wykoff *et al.*, 2000). Bolo preukázané, že ich špecifická inhibícia má výrazné účinky na inhibíciu rastu primárneho nádoru, tvorbu metastáz, zníženie počtu rakovinových buniek a elimináciu rezistentných populácií, najmä v kombinácii s chemoterapiou, rádioterapiou a imunoterapiou (Supuran, 2018b; Angeli *et al.*, 2020). Zníženie extracelulárnej acidózy môže predovšetkým zvýšiť vychytávanie a cytotoxické účinky slabo zásaditých chemoterapeutík ako napríklad doxorubicín, a zlepšiť tak ich terapeutický účinok (Pastorek *et Pastoreková*, 2015).

Napriek tomu, že väčšinou sulfónamidy pôsobia ako silné inhibítory CA a sú klinicky používané už niekoľko desaťročí, problém ich používania spôsobuje fakt, že vykazujú širokú škálu vedľajších účinkov v dôsledku inhibície väčšiny katalyticky aktívnych izoforiem α -CA. Nakoľko používaním známych inhibítorov CA je ťažké dosiahnuť selektívnu inhibíciu CA asociovaných s tumormi, je potrebné vyvíjať nové látky pre zníženie vedľajších účinkov a aj potrebnej dávky liečiva (Supuran, 2016b; Kciuk *et al.*, 2022).

Vývoj špecifických mAb je prvým z aktuálne skúmaných prístupov, prostredníctvom ktorého je možné selektívne zacieliť na CA IX, prípadne aj CA XII v nádorových bunkách. mAb špecifická proti CA IX, ktorá bola hodnotená v tretej fáze klinických testov, je Girentuximab (Rencarex) (Supuran *et al.*, 2018). Napriek tomu, že sama nevykázala dostatočnú účinnosť pre klinické schválenie, našla využitie ako nosič rádioizotopov (McDonald *et al.*, 2022). Výskum je zameraný na vývoj aj ďalších konjugátov protilátky a liečiva (Testa *et al.*, 2022), špecifických protilátok, ktoré sú schopné detegovať a zabíjať nádorové bunky exprimujúce CA IX v spolupráci s imunitným systémom a na protilátky, ktoré môžu priamo inhibovať aktivitu CA IX. Funkčnú inhibíciu je možné dosiahnuť buď stérickým zabránením vstupu CO₂ do aktívneho miesta, alebo destabilizáciou štruktúrnych prvkov nevyhnutných pre katalytickú aktivitu enzýmu (Lenferink *et al.*, 2021; Sheff *et al.*, 2021; Zaťovičová *et al.*, 2022).

Druhým prístupom je zacielenie nádorových izoforiem prostredníctvom nízkomolekulových inhibítorov. Jednou z látok, ktorá bola klinicky skúšaná, je indisulam. Viaže sa na zinok sulfónamidovou skupinou a špecificky inhibuje izoformy CA IX a CA XII. Okrem toho inhibuje cyklín-dependentné kinázy, ktoré regulujú progresiu bunkového cyklu a bývajú nadmerne exprimované v nádorových bunkách. Ich inhibícia vedie k zastaveniu bunkového

cyklu a apoptóze (Singh *et al.*, 2018). SLC-0111 je ďalším nádejným sulfónamidovým inhibítorom (Obr. 6). Viaceré štúdie vďaka jeho špecifickej inhibícii CA IX a CA XII preukázali protinádorový účinok na modeloch *in vitro* aj *in vivo* a inhibítor SLC-0111 sa nachádza v klinickom testovaní. Bol dokázaný jeho synergický účinok v kombinácii s rôznymi liekmi a postupmi v protinádorovej terapii (Mishra *et al.*, 2020; Supuran, 2020b). Okrem spomínaných látok sú stále vyvíjané ďalšie nízkomolekulové inhibítory, rôzne deriváty známych inhibítorov a nové stratégie pre zlepšenie selektivity a inhibície CA asociovaných s tumormi (Kciuk *et al.*, 2022).



Obr. 6: Chemická štruktúra SLC-0111 (Supuran, 2020b).

Jednou zo stratégií pre zvýšenie selektivity sulfónamidov je pridávanie reťazcov interagujúcich v oblasti vstupu do aktívneho miesta, kde sa vyskytuje variabilita medzi izoformami α -CA (Bonardi *et al.*, 2022). Zaujímavou skupinou sú inhibítory na báze karboránov, ktoré kombinujú karboránové jadro a sulfónamidovú alebo sulfamidovú skupinu pripojenú linkerom. Ich selektivitu voči izoformám α -CA je možné dosiahnuť vďaka rozdielom v aminokyselinových zvyškoch v oblasti vstupu do aktívneho miesta a je možné navrhnuť tvarom a polaritou komplementárne zlúčeniny k jednotlivým izoformám. Bolo zistené, že selektivitu voči CA IX ovplyvňovala aj dĺžka linkeru (Brynda *et al.*, 2013; Kugler *et al.*, 2020; Kugler *et al.*, 2021). Niektoré zo sulfónamidových inhibítorov na báze karboránov sa ukázali ako vysoko selektívne inhibítory CA IX v testoch *in vitro* aj *in vivo* (Dvořanová *et al.*, 2020).

3.4 Objavovanie liečiv

Objavovanie liečiv je komplexný a časovo náročný proces zahŕňajúci niekoľko krokov, ktoré vedú od počiatočnej identifikácie a validácie cieľa, cez vývoj používaných metód, vysokokapacitný skrining, identifikáciu vhodných látok, ich následné testovanie, až po konečný výber molekuly pre jednotlivé fázy klinických testov a prípadné schválenie regulačnými orgánmi (Matthews *et al.*, 2016).

Prvým krokom vývoja nového liečiva je výber vhodného cieľa. Následne je *in vitro* testované veľké množstvo zlúčenín, väčšinou prostredníctvom HTS, s cieľom presne identifikovať látku, ktoré môžu byť potenciálnymi kandidátmi na nové liečivo. Na základe tohto primárneho skriningu sú vyhodnotené zlúčeniny aktívne voči danému cieľu (označené ako „hity“). Väčšina testovaných látok touto fázou neprejde a ďalej častokrát postupuje okolo 1 % z pôvodného počtu látok. Ďalšie vlastnosti hitov sú následne vyhodnocované v sekundárnom skriningu (Malo *et al.*, 2006).

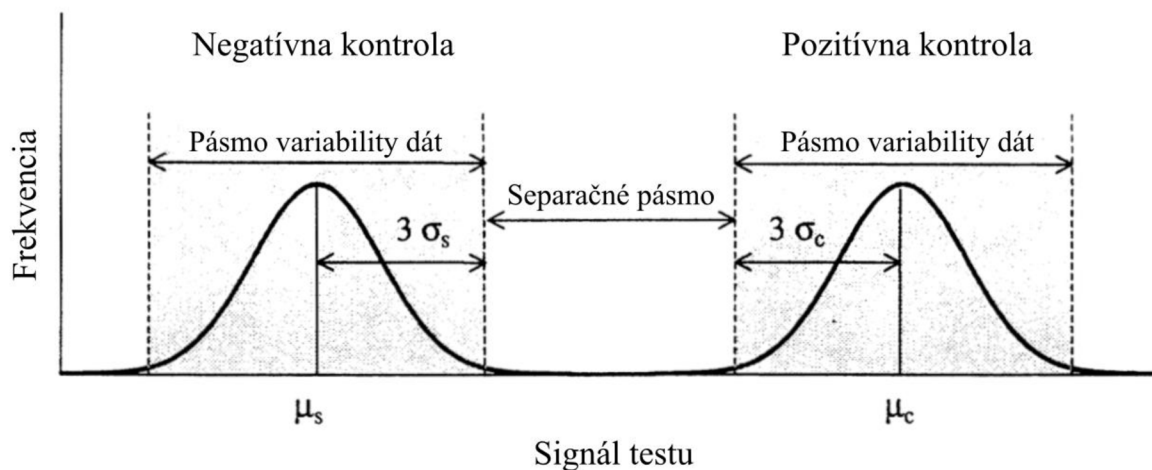
Pre každý z hitov sa vytvorí krivka závislosti odpovede na dávke, prostredníctvom ktorej je možné vyhodnotiť IC_{50} pre porovnanie ich účinnosti. Následne sú hity hodnotené aj z hľadiska biologickej relevantnosti. V tejto fáze je testovaná ich toxicita a ďalšie vlastnosti s použitím *in vitro* a *in vivo* testov. V predklinickom testovaní sú používané zvieracie modely a sledujú sa farmakodynamické vlastnosti, ako mechanizmus pôsobenia a vzťah medzi dávkou liečiva a klinickou odpoveďou. Dôraz je kladený aj na získanie farmakokinetických informácií o absorpcii, distribúcii, metabolizme a eliminácii (ADME). Látky, ktoré uspejú vo fáze predklinického testovania, sa dostanú do klinickej fázy (Wei *et al.*, 2007; Hughes *et al.*, 2011; Umscheid *et al.*, 2011).

Vo fáze I klinických testov sú látky prvýkrát testované na ľuďoch. Táto fáza slúži na testovanie bezpečnosti, farmakodynamického rozsahu dávkovania a sledovanie farmakokinetiky. Fáza II zahŕňa testy na väčšom množstve dobrovoľníkov a býva v nej potvrdená bezpečnosť, farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti. Vo fáze III prebiehajú štúdie už na významnom počte pacientov a účinok látok býva porovnaný s placebo. V prípade, že látka uspeje, je schválená pre klinické použitie a dostane sa do fázy IV, ktorá sleduje bezpečnosť a vlastnosti liečiva na trhu (Suchý *et al.*, 2009; Umscheid *et al.*, 2011).

3.4.1 Vysokokapacitný skrining

HTS je proces využívaný v prvej fáze objavovania liečiv farmaceutickými a biotechnologickými spoločnosťami a v rámci výskumu v akademickej sfére. Zahŕňa skrining chemických knižníc obsahujúcich látky, ktoré môžu byť potenciálnymi liečivami a sú testované na aktivitu voči rôznym biologickým extracelulárnym a intracelulárnym molekulárnym cieľom (Mayr *et Bojanic*, 2009). Je potreba, aby chemické knižnice obsahovali látky s vysokou diverzitou a odlišnou štruktúrou, čo maximalizuje šancu objavenia hitu. S postupným zväčšovaním chemických knižníc sa pri práci v HTS podmienkach začal dávať dôraz na miniaturizáciu. Testy prebiehajú najčastejšie v 384-, prípadne 1536-jamkových doštičkách a proces býva často automatizovaný (Mayr *et Fuerst*, 2008). Súčasťou HTS sú biochemické testy alebo testy na bunkách. Biochemický skrining využíva purifikovaný cieľový proteín a meria väzbu ligandov alebo inhibíciu enzymatickej aktivity *in vitro* (Blay *et al.*, 2020).

Vo väčšine HTS testov je každá látka testovaná v singletoch alebo duplikátoch. Metódy nevyžadujú teda len miniaturizáciu a automatizáciu, ale aj adekvátnu senzitivitu, reprodukovateľnosť a presnosť. Pre overenie kvality testu sa v HTS používa Z-faktor, kde je dynamický rozsah testu definovaný ako rozdiel stredných hodnôt signálov pozitívnej a negatívnej kontroly. Ak namerané signály pochádzajú z normálneho rozdelenia, pásmo variability dát je vyjadrené ako stredná hodnota \pm trojnásobok smerodajnej odchýlky (interval spoľahlivosti 99,73 %). Separačné pásmo sa nachádza medzi pásmami variability dát (Obr. 7). Porovnaním dynamického rozsahu testu a separačného pásma je možné určiť kvalitu testu (Zhang *et al.*, 1999).



Obr. 7: Pásmo variability dát kontrol a separačné pásmo testu. Os x zobrazuje signál testu, os y frekvenciu nameraných dát signálov pozitívnej a negatívnej kontroly. σ_s je smerodajná odchýlka signálov negatívnej kontroly, σ_c smerodajná odchýlka signálov pozitívnej kontroly, μ_s stredná hodnota signálov negatívnej kontroly a μ_c stredná hodnota signálov pozitívnej kontroly (upravené podľa Zhang *et al.*, 1999).

Ak je výsledná hodnota Z-faktora 1, ide o ideálne podmienky, ktoré nie sú experimentálne dosiahnuteľné. V prípade testu s veľkým dynamickým rozsahom a malými smerodajnými odchýlkami sa výsledná hodnota Z-faktora približuje 1. Pokiaľ sa hodnota Z-faktora pohybuje v rozmedzí 0,5 a 1,0, jedná sa o vynikajúci test. Testy s nižšími hodnotami je potreba optimalizovať (Zhang *et al.*, 1999).

4 MATERIÁL A METÓDY

4.1 Použité chemikálie

4-(2-hydroxyetyl)-1-piperazínétánsulfónová kyselina (Sigma-Aldrich)

8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfónová kyselina (pyranín) (Sigma-Aldrich)

Acetazolamid (Sigma-Aldrich)

Bovinný sérový albumín (Sigma-Aldrich)

Destilovaná voda

Dimetylsulfoxid (Sigma-Aldrich)

Hydroxid sodný (Penta)

Chemická knižnica Prestwick (Prestwick Chemical)

Karboanhydráza IX (ÚOCHB, AV ČR)

Kyselina chlorovodíková (Mikrochem)

Milli-Q voda

n-dodecyl- β -D-maltopyranozid (Avanti Polar Lipids)

Síran sodný (Lach-Ner)

Unikátna knižnica chemických látok ÚMTM

4.2 Použité roztoky

AZA

Bol pripravený 1 ml zásobného roztoku AZA v DMSO s koncentráciou 1 mM. Roztok bol rozdelený na alikvotné časti s objemom 100 μ l a bol uchovávaný pri teplote -20 °C. Pred experimentom bol nariedený na koncentráciu 100 μ M.

BSA

Bolo pripravených 10 ml 10% roztoku BSA v ddH₂O. Roztok bol rozdelený na alikvotné časti s objemom 1 ml a bol uchovávaný pri teplote -20 °C.

CA IX

Enzým bol purifikovaný na ÚOCHB AV ČR. Bol rozpustený a uchovávaný v pufrí zloženého z 20 mM HEPES (pH = 7,5) a 100 mM Na₂SO₄ pri teplote -80 °C. Pre merania bol použitý zásobný roztok s koncentráciou 1,4 mg/ml. Tesne pred experimentom bol enzým v pufrí pre

CA IX nariadený podľa potreby na výsledné koncentrácie 100 nM, 50 nM, 20 nM, 10 nM a 1 nM a bol ponechaný na ľade.

HEPES

Bolo pripravených 0,5 l roztoku HEPES s koncentráciou 0,5 M v ddH₂O a pH bolo upravené na hodnotu 7,5 pomocou HCl alebo NaOH. Roztok bol uchovávaný pri teplote 4 °C.

Na₂SO₄

Bolo pripravených 0,5 l roztoku Na₂SO₄ s koncentráciou 0,1 M v ddH₂O. Roztok bol uchovávaný pri teplote 4 °C.

Pufer pre CA IX

Tesne pred experimentom bol pripravený pufer pre CA IX v objeme podľa potreby, ktorý obsahoval 50 mM HEPES (pH 7,5), 40 mM Na₂SO₄, 4 μM pyranínu, 0,06 % BSA a 0,0025 % DDM. Doplnený ddH₂O.

Pyranín

Bolo pripravených 5 ml 1mM roztoku v ddH₂O. Roztok bol uskladnený pri teplote -20 °C maximálne 2 mesiace.

Testované látky z unikátnej chemickej knižnice ÚMTM

Testované látky boli rozpustené v DMSO alebo H₂O v koncentrácii 10 mM a uchovávané 384-jamkových doštičkách pri teplote 16 °C a vlhkosti 3 %. Látky pre sekundárny skrining boli rozpustené v DMSO v koncentráciách 10 mM, 1 mM, 0,1 mM a 0,01 mM a boli uchovávané v rovnakých podmienkach.

4.3 Použité prístroje a zariadenia

Analytické váhy (Scaltech)

Automatické mikropipety (Eppendorf)

Centrifúga 5810R (Eppendorf)

Echo 550 (LabCyte)

FLIPR Tetra High-Throughput Cellular Screening System (Molecular Devices)

Hlbokomraziaci box Innova U725 (New Brunswick)

Laminárny box FlowBox HeraSafe (Thermo Fisher Scientific)

Miešačka MR Hei-Tec (Heidolph Instruments GmbH)
 Milli-Q Direct 8 Water Purification System (Millipore SAS)
 Minicentrifúga Multispin PCV 600 (P-LAB)
 Multidrop Combi Reagent Dispenser (Thermo Fisher Scientific)
 pH meter Ultra Basic (P-LAB)
 PlateLoc Thermal Microplate Sealer (Agilent Technologies)
 Tundra Store Automated Low Temperature Freezer (HighResBiosolutions)
 Vortex IKA Genius 3 (P-LAB)

4.4 Použité experimentálne a vyhodnocovacie postupy

4.4.1 Optimalizácia koncentrácie enzýmu CA IX a podmienok experimentu pre testovanie inhibítorov CA IX

Tesne pred experimentom boli pripravené roztoky s rôznymi koncentraciami CA IX (1 nM, 10 nM, 20 nM, 50 nM a 100 nM). Pomocou prístroja Echo 550 (softvér Plate Reformat) bolo do 80 jamiek doštičky ViewPlate-384 napipetovaných 30 nl inhibítora CA IX AZA, pričom jeho výsledná koncentrácia v reakcii v jamke bola 100 nM. Prístrojom Multidrop Combi Reagent Dispenser bolo pridaných 15 µl pufru pre CA IX a jednotlivé roztoky s odlišnou koncentraciou CA IX (schéma rozloženia pipetovaných roztokov v jamkách doštičky je uvedená na Obr. 8). Následne bola doštička 1 min centrifugovaná pri laboratórnej teplote a 4 g.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
A																								
B																								
C																								
D																								
E				CA IX	CA IX	CA IX	CA IX	CA IX																
F				1 nM	10 nM	20 nM	50 nM	100 nM																
G																								
H																								
I		B																						
J																								
K				CA IX	CA IX	CA IX	CA IX	CA IX																
L				1 nM	10 nM	20 nM	50 nM	100 nM																
M				+	+	+	+	+																
N				AZA	AZA	AZA	AZA	AZA																
O																								
P																								

Obr. 8: Schéma rozloženia roztokov v jamkách doštičky pre optimalizáciu koncentrácie CA IX a podmienok experimentu. B – slepá vzorka (pufer pre CA IX); jamky: A3 – H12 – CA IX v rôznych koncentraciách (1 nM; 10 nM; 20 nM; 50 nM a 100 nM); I3 – P12 – CA IX (1 nM; 10 nM; 20 nM; 50 nM a 100 nM) s inhibítorm AZA (100 nM).

Pripravená doštička bola vložená do prístroja FLIPR, ktorý snímal fluorescenciu každú sekundu po dobu 70 sekúnd za použitia excitačného filtra 470 – 495 nm a emisného filtra 515 – 575 nm. Po 10 sekundách od začiatku merania pipetovací systém prístroja do jamiek napipetoval 15 µl Milli-Q H₂O sýtenej CO₂ a snímanie fluorescencie prebiehalo ďalších 60 sekúnd.

Zistené hodnoty fluorescencie boli vizualizované prostredníctvom softvéru ScreenWorks (Molecular Devices), kde boli zobrazené krivky priebehu reakcie. Z nich boli získané hodnoty AUC pre rôzne časové intervaly merania v prípade všetkých koncentrácií s použitím inhibítora a bez. Podľa týchto hodnôt boli programe MS Excel vyhodnotené priemerné hodnoty, smerodajné odchýlky a následne Z-faktory pre jednotlivé koncentrácie CA IX a časové intervaly podľa vzorca:

$$Z = 1 - \frac{(3\sigma_{c+} + 3\sigma_{c-})}{|\mu_{c+} - \mu_{c-}|},$$

kde σ_{c+} je smerodajná odchýlka hodnôt AUC pozitívnej kontroly, σ_{c-} smerodajná odchýlka hodnôt AUC negatívnej kontroly, μ_{c+} priemer hodnôt AUC pozitívnej kontroly a μ_{c-} priemer hodnôt AUC negatívnej kontroly.

Ako pozitívna kontrola bol použitý roztok obsahujúci AZA a CA IX v jednotlivých koncentráciách, ako negatívna kontrola roztok CA IX v daných koncentráciách. Na základe hodnôt Z-faktora bola zvolená vhodná koncentrácia enzýmu pre ďalšie merania a časový interval pre vyhodnocovanie následne získaných dát.

4.4.2 Validácia metódy použitím komerčnej chemickej knižnice Prestwick

Pre validáciu fluorescenčnej metódy v HTS podmienkach bolo testovaných 1280 látok z chemickej knižnice Prestwick v 4 doštičkách. Meranie bolo vykonané v 2 opakovaníach. Pred experimentom bol pripravený pufer s CA IX s koncentráciou 50 nM. Pomocou prístroja Echo 550 (softvér Plate Reformat) bolo do 16 jamiek každej doštičky (A2 – H2 a A23 – H23) napipetovaných 30 nl AZA ako pozitívnej kontroly. Jeho výsledná koncentrácia v reakcii bola 100 nM. Do jamiek A3 – P22 bolo napipetovaných 30 nl jednotlivých testovaných látok chemickej knižnice Prestwick. Koncentrácia látok z chemickej knižnice v reakcii bola 10 µM. Prístrojom Multidrop Combi Reagent Dispenser bolo následne pridaných 15 µl pufru bez CA IX (slepá vzorka) (jamky A1 – P1 a A24 – P24) a 15 µl 50nM roztoku CA IX (jamky A2 – P23). V jamkách I2 – P2 a I23 – P23 sa teda nachádzal samotný pufer s CA IX ako negatívna

kontrola. Rozloženie pipetovaných roztokov je schematicky uvedené na Obr. 9. Pred meraním boli doštičky 1 min centrifugované pri laboratórnej teplote a 4 g.



Obr. 9: Schéma rozloženia roztokov v jamkách doštičky pre validáciu fluorescenčnej metódy použitím komerčnej chemickej knižnice Prestwick. B – slepá vzorka (pufer pre CA IX); HC – pozitívna kontrola (50 nM CA IX a 100 nM AZA); LC – negatívna kontrola (50 nM CA IX); jamky A3 – P22 – testované látky z chemickej knižnice Prestwick a 50 nM roztok CA IX.

Pripravená doštička bola vložená do prístroja FLIPR a fluorescencia bola snímaná za rovnakých podmienok ako pri optimalizácii experimentu (viď kapitola 4.4.1). Meranie bolo opakované pre všetky doštičky s látkami chemickej knižnice Prestwick.

Zistené hodnoty fluorescencie boli vizualizované prostredníctvom softvéru ScreenWorks, kde boli zobrazené krivky priebehu reakcie. Z nich boli získané hodnoty AUC v časovom intervale 16 – 20 s pre jednotlivé merania, ktoré boli vyhodnocované softvérom Dotmatics. Pre každú doštičku boli v programe Dotmatics vypočítané hodnoty Z-faktora a pre všetky testované látky hodnoty PI nasledovne:

$$PI [\%] = \frac{x - c_n}{c_i - c_n} \times 100,$$

kde x je hodnota AUC testovanej zlúčeniny, c_i priemerná hodnota AUC inhibovanej reakcie (pozitívna kontrola) a c_n priemerná hodnota AUC neinhibovanej reakcie (negatívna kontrola).

Ako aktívne boli označené látky s $PI > 80 \%$. Následne boli výsledky vizualizované pomocou softvéru Vortex (Dotmatics).

4.4.3 Analýza inhibítorov CA IX v chemickej knižnici ÚMTM

Testovaných bolo 10204 látok chemickej knižnice ÚMTM. Meranie bolo vykonané v 2 opakovaníach. Pred experimentom bol pripravený pufer s CA IX s koncentráciou 50 nM. Jednotlivé látky a roztoky boli pipetované rovnako ako v prípade validácie fluorescenčnej metódy s použitím komerčnej chemickej knižnice Prestwick (viď kapitola 4.4.2 a Obr. 9), pričom namiesto látok z chemickej knižnice Prestwick bolo do jamiek doštičiek pipetovaných 30 nl látok z chemickej knižnice ÚMTM. Výsledná koncentrácia testovaných látok v reakcii bola 10 μ M, AZA ako pozitívnej kontroly 100 nM a CA IX v reakciách a aj ako negatívnej kontroly 50 nM. Následne boli doštičky 1 min centrifugované pri laboratórnej teplote a 4 g.

Pripravená doštička bola vložená do prístroja FLIPR a fluorescencia bola snímaná za rovnakých podmienok ako pri optimalizácii experimentu (viď kapitola 4.4.1). Meranie bolo opakované pre všetky doštičky s látkami unikátnej chemickej knižnice ÚMTM.

Dáta boli vyhodnocované rovnakým postupom ako pri meraní látok z chemickej knižnice Prestwick (viď kapitola 4.4.2) s rozdielom, že ako aktívne boli označené látky s PI > 70 %.

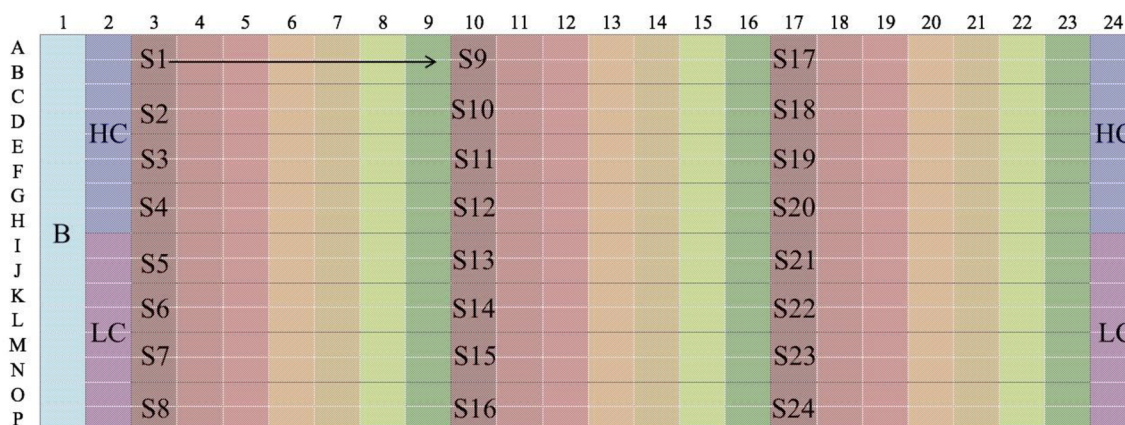
4.4.4 Sekundárny skríning

V sekundárnom skríningu bolo v 7 koncentráciách testovaných 169 látok, ktoré boli primárnym skríningom vyhodnotené ako hity a ďalších 5 látok zvolených na základe štruktúry. Pred experimentom bol pripravený pufer s CA IX s koncentráciou 50 nM. Pomocou prístroja Echo 550 (softvér Plate Reformat) bolo do 16 jamiek každej doštičky (A2 – H2 a A24 – H24) napipetovaných 30 nl AZA ako pozitívnej kontroly s výslednou koncentráciou v reakcii 100 nM. Následne boli opäť prístrojom Echo 550 (softvér Dose-Response) pipetované látky pre analýzu v koncentráciách a objemoch uvedených v Tab. 3 (jamky A3 – P23). Pre kontrolu bol otestovaný aj AZA v 5 koncentráciách (1,25 μ M, 0,33 μ M, 75 nM, 20 nM a 5 nM). Každá zlúčenina bola na jednej doštičke testovaná v duplikátoch a meranie bolo vykonané v 2 opakovaníach.

Tab. 3: Koncentrácie a objemy pipetovaných látok pre sekundárny skrining.

	Zdrojová koncentrácia [mM]	Objem [nl]	Konečná koncentrácia [μ M]
1.	10,00	60,0	20,000
2.	10,00	15,0	5,000
3.	1,00	37,5	1,250
4.	1,00	10,0	0,330
5.	0,10	22,5	0,075
6.	0,01	60,0	0,020
7.	0,01	15,0	0,005

Prístrojom Multidrop Combi Reagent Dispenser bolo pipetovaných 15 μ l pufru bez CA IX (slepá vzorka) (jamky A1 – P1) a 15 μ l pufru s 50 nM CA IX (jamky A2 – P24). V jamkách I2 – P2 a I24 – P24 sa teda nachádzal len samotný pufer s CA IX ako negatívna kontrola. Rozloženie pipetovaných roztokov je schematicky uvedené na Obr. 10. Pred meraním boli doštičky 1 min centrifugované pri laboratórnej teplote a 4 g.



Obr. 10: Schéma rozloženia roztokov v jamkách doštičky pre sekundárny skrining. B – slepá vzorka (pufer pre CA IX); HC – pozitívna kontrola (50 nM CA IX a 100 nM AZA); LC – negatívna kontrola (50 nM CA IX); A3 – P23 – testované látky a 50 nM roztok CA IX. V 7 stĺpcoch za sebou nasledovali jednotlivé koncentrácie testovaných látok (látky S1 – S24): 20 μ M (tmavohnedá); 5 μ M (tmavočervená); 1,25 μ M (červená); 0,33 μ M (oranžová); 75 nM (svetlohnedá); 20 nM (svetlozelená); 5 nM (tmavozelená). Každá látka bola pipetovaná do 2 riadkov doštičky pod sebou.

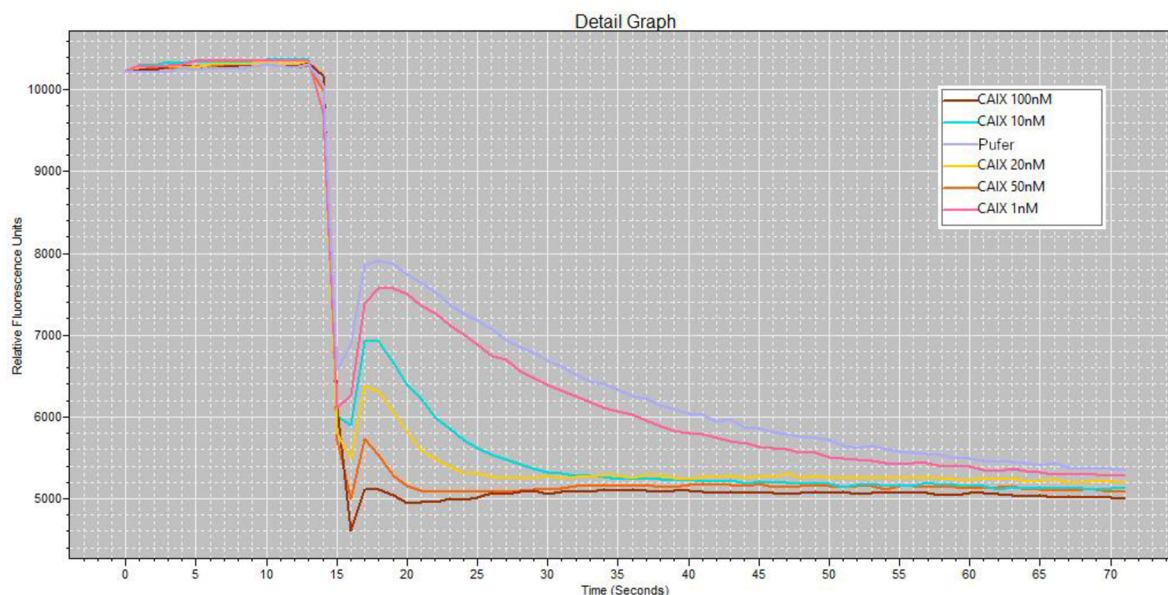
Pripravená doštička bola vložená do prístroja FLIPR a fluorescencia bola snímaná za rovnakých podmienok ako pri optimalizácii experimentu (viď kapitola 4.4.1). Meranie bolo opakované pre všetky doštičky s látkami v daných testovaných koncentráciách.

Zistené hodnoty fluorescencie boli vizualizované prostredníctvom softvéru ScreenWorks, kde boli z kriviek priebehu reakcie získané hodnoty AUC v časovom intervale 16 – 20 s pre jednotlivé merania a boli vyhodnocované softvérom Dotmatics. Pre každú doštičku boli vypočítané hodnoty Z-faktora a pre všetky testované koncentrácie látok hodnoty PI. Podľa závislosti hodnoty PI na koncentrácii látok bola pre každú látku vypočítaná hodnota IC_{50} .

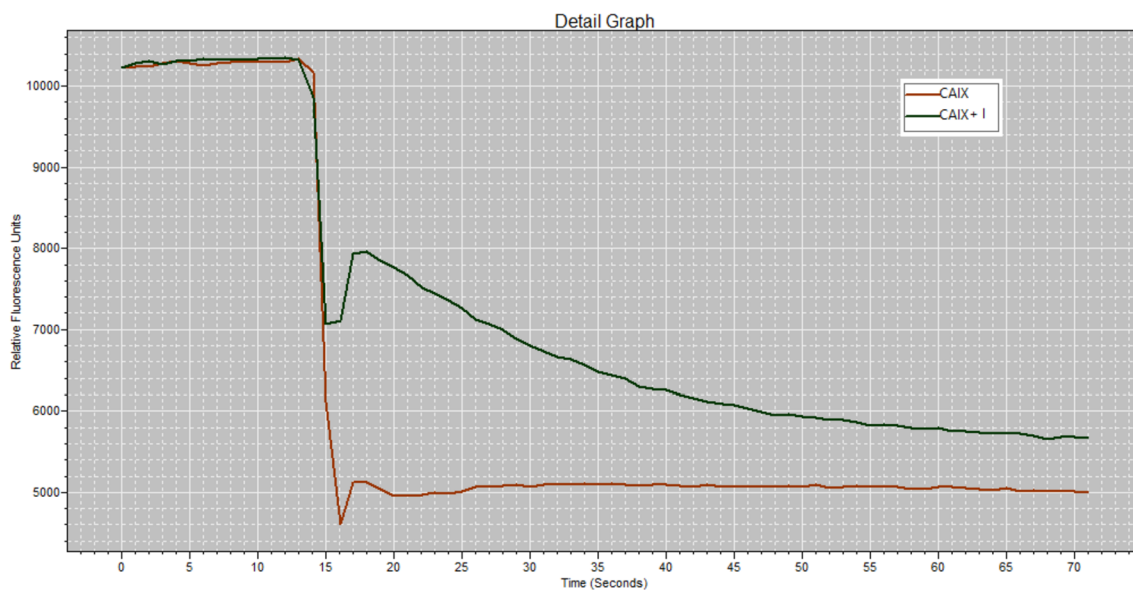
5 VÝSLEDKY

5.1 Optimalizácia koncentrácie enzýmu CA IX a podmienok experimentu pre testovanie inhibítorov CA IX

Prístrojom FLIPR bol zaznamenaný priebeh reakcie katalyzovanej enzýmom CA IX. Po pridaní vody sýtenej CO_2 k pufrovi obsahujúcemu CA IX bola meraná zmena pH spôsobená vznikom H^+ . Indikátorom tejto zmeny bol pyranín, ktorého fluorescencia je závislá na pH a v kyslom prostredí klesá. Obr. 11 zobrazuje krivky priebehu reakcie a pokles fluorescencie. Najmenej prudký pokles bolo možné pozorovať v prípade použitia CA IX s koncentráciou 1 nM, kedy zaznamenaná krivka bola podobná nekatalyzovanej reakcii so samotným pufrom bez enzýmu. So zvyšujúcou sa koncentráciou enzýmu bolo možné pozorovať prudší pokles fluorescencie pyranínu, a teda aj pH. Na Obr. 12 je zobrazený rozdiel v priebehu kriviek reakcie s inhibítorom a bez. Prudší pokles fluorescencie bol pozorovaný v reakcii bez inhibítora.



Obr. 11: Reprezentatívne krivky zobrazujúce priebeh reakcie katalyzovanej CA IX s rôznymi koncentraciami. CA IX: 1 nM (ružová); 10 nM (tyrkysová); 20 nM (žltá); 50 nM (oranžová) a 100 nM (tmavočervená). Pufer bez CA IX, slepá vzorka (fialová). Zobrazené softvérom ScreenWorks, zaznamenané prístrojom FLIPR, ako fluorescenčný indikátor bol použitý pyranín.



Obr. 12: Reprezentatívne krivky priebehu reakcie katalyzovanej CA IX bez inhibítora (hnedá) a s inhibítorom AZA (zelená). Zobrazené softvérom ScreenWorks, zaznamenané prístrojom FLIPR, ako fluorescenčný indikátor bol použitý pyranín.

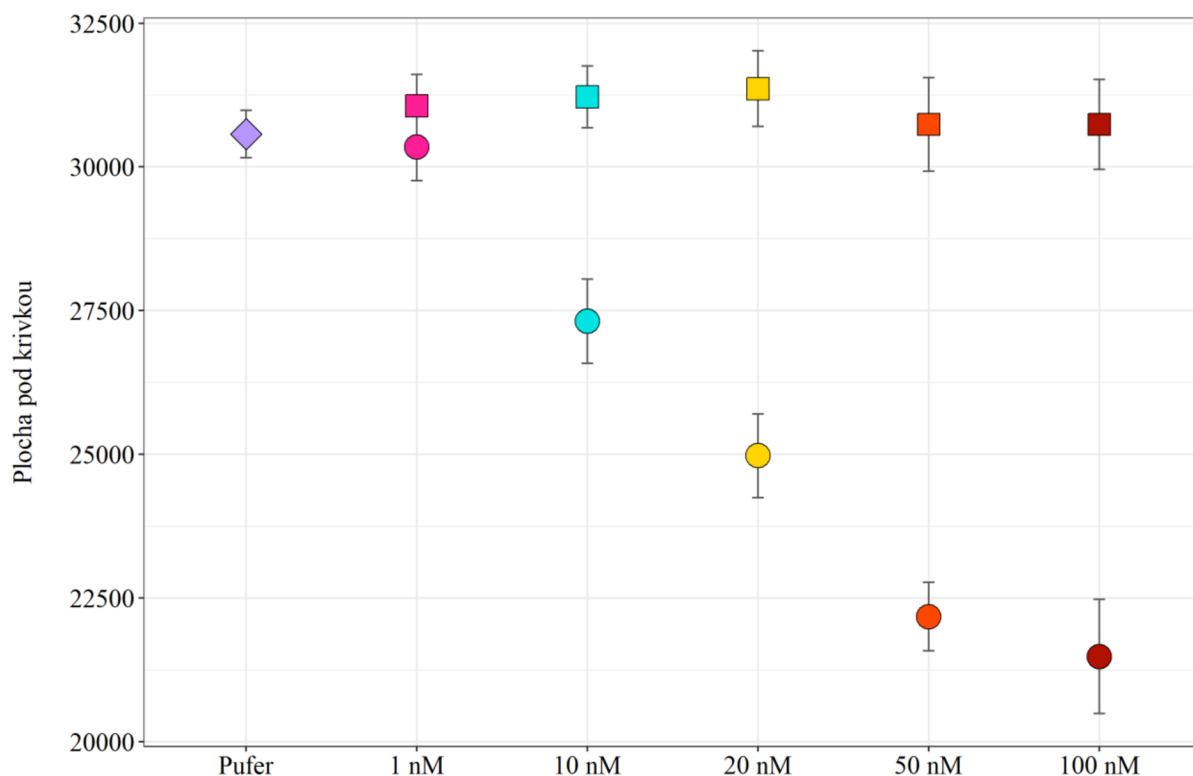
Každá z testovaných koncentrácií CA IX s inhibítorom a aj bez bola meraná v 16 jamkách doštičky. Prostredníctvom softvéru ScreenWorks boli pre každé meranie vypočítané hodnoty AUC v 4 rôznych časových intervaloch (13 – 25 s, 15 – 25 s, 16 – 21 s a 16 – 20 s). Následne boli pomocou MS Excel vypočítané priemerné hodnoty, smerodajné odchýlky pre jednotlivé koncentrácie enzýmu a časové intervaly, ktoré boli použité pre výpočet Z-faktora. Najvyšší Z-faktor bol dosiahnutý v prípade koncentrácie CA IX 50 nM v časovom intervale 16 – 20 s. Tieto hodnoty boli vyššie ako 0,5, čo značí dostatočný rozdiel medzi signálmi pozitívnej a negatívnej kontroly a vhodnosť použitia testu pre HTS. Tento časový interval a koncentrácia boli zvolené pre ďalšie merania (validácia s použitím chemickej knižnice Prestwick a testovanie látok unikátnej chemickej knižnice ÚMTM). V prípade dlhšieho časového intervalu a nižších koncentrácií CA IX klesala hodnota Z-faktora pod 0,5 až na mínusové hodnoty (Tab. 4).

Tab. 4: Z-faktory reakcií katalyzovaných CA IX v rôznych časových intervaloch merania priebehu reakcie.

Koncentrácia CA IX [nM]	Z-faktory pre časové intervaly			
	13 – 25 s	15 – 25 s	16 – 21 s	16 – 20 s
100	0,36	0,37	0,42	0,43
50	0,41	0,40	0,49	0,51*
20	0,33	0,32	0,36	0,35
10	0,02	0,14	0,10	0,02
1	-2,12	-2,23	-3,06	-3,71

* podmienky zvolené pre ďalšie experimenty

Závislosť AUC na koncentrácii enzýmu a prítomnosti 100 nM AZA v zvolenom časovom intervale 16 – 20 s je vizualizovaná na Obr. 13. So zvyšujúcou sa koncentráciou enzýmu dochádzalo k rýchlejšej zmene pH a k zmenšeniu hodnoty AUC. Medzi koncentráciami 50 nM a 100 nM nebol pozorovaný tak výrazný rozdiel v priebehu reakcie, ako v prípade ostatných testovaných koncentrácií. Okrem toho bol zaznamenaný väčší rozptyl hodnôt pri reakcii katalyzovanej CA IX v koncentrácii 100 nM, čo potvrdzoval priebeh kriviek a aj zistené hodnoty Z-faktora.



Obr. 13: Závislosť AUC na koncentrácii enzýmu a prítomnosti inhibítora. Každá z koncentrácií je zobrazená ako aritmetický priemer hodnôt zo 16 jamiek doštičky a smerodajné odchýlky sú vyjadrené chybovými úsečkami. Os x zobrazuje reakcie v prípade použitia rôznych roztokov (pufer a následne jednotlivé koncentrácie CA IX), os y zobrazuje namerané hodnoty AUC. Kosoštvorec vyjadruje pufer, kruh značí roztok s CA IX (neinhibovaná reakcia) a štvorec roztok s CA IX a 100nM AZA (inhibovaná reakcia).

5.2 Validácia metódy použitím komerčnej chemickej knižnice Prestwick

Pre validáciu metódy na identifikáciu inhibítorov CA IX bolo testovaných 1280 látok chemickej knižnice Prestwick v koncentrácii 10 μM v 2 opakovaníach. Prostredníctvom softvéru ScreenWorks boli vypočítané AUC v časovom intervale 16 – 20 s. Dáta boli vyhodnocované v programe Dotmatics, kde boli vypočítané Z-faktory pre každú doštičku (Tab. 5).

Tab. 5: Z-faktory pre jednotlivé doštičky s látkami z chemickej knižnice Prestwick.

	Z-faktor	
	1. opakovanie	2. opakovanie
Prestwick 1	0,51	0,52
Prestwick 2	0,52	0,55
Prestwick 3	0,53	0,56
Prestwick 4	0,50	0,54

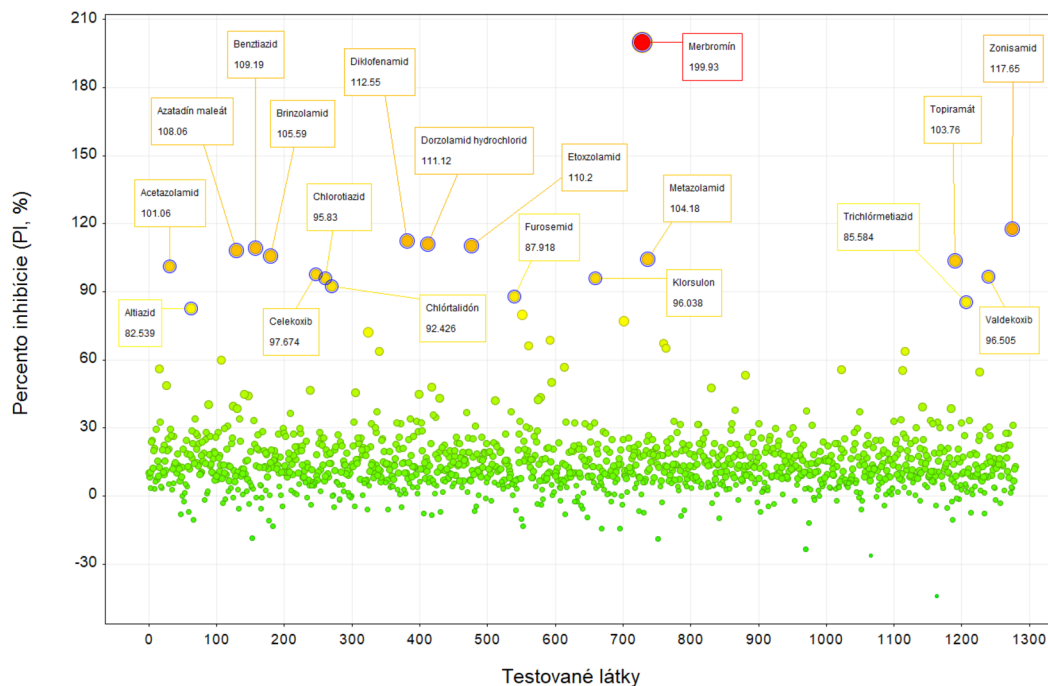
Softvérom Dotmatics boli vypočítané hodnoty PI pre jednotlivé látky. Hodnota PI vyjadruje schopnosť danej látky inhibovať priebeh reakcie katalyzovanej CA IX. Následne boli v programe MS Excel vypočítané priemerné hodnoty PI pre testované látky z 2 opakovaní a smerodajné odchýlky. Bola stanovená prahová hodnota $PI > 80 \%$ pre označenie aktívnych látok. Za týchto podmienok bolo 19 zlúčenín vyhodnotených ako aktívne (Tab. 6). Takmer všetky z nich sú známe silné alebo mierne nešpecifické inhibítory CA, predovšetkým sulfónamidy. Tým bola potvrdená vhodnosť danej metódy pre identifikáciu doteraz neznámych inhibítorov CA IX. Distribúcia látok v závislosti od hodnôt PI a aktívne látky vizualizované softvérom Vortex sú zobrazené na Obr. 14.

Po kontrole priebehu kriviek aktívnych látok ($PI > 80 \%$) bolo zistené, že 1 z látok (merbromín) je fluorescenčná a bola vyhodnotená ako falošne pozitívna, čomu nasvedčuje veľmi vysoká hodnota PI a priebeh krivky zobrazený na Obr. 15.

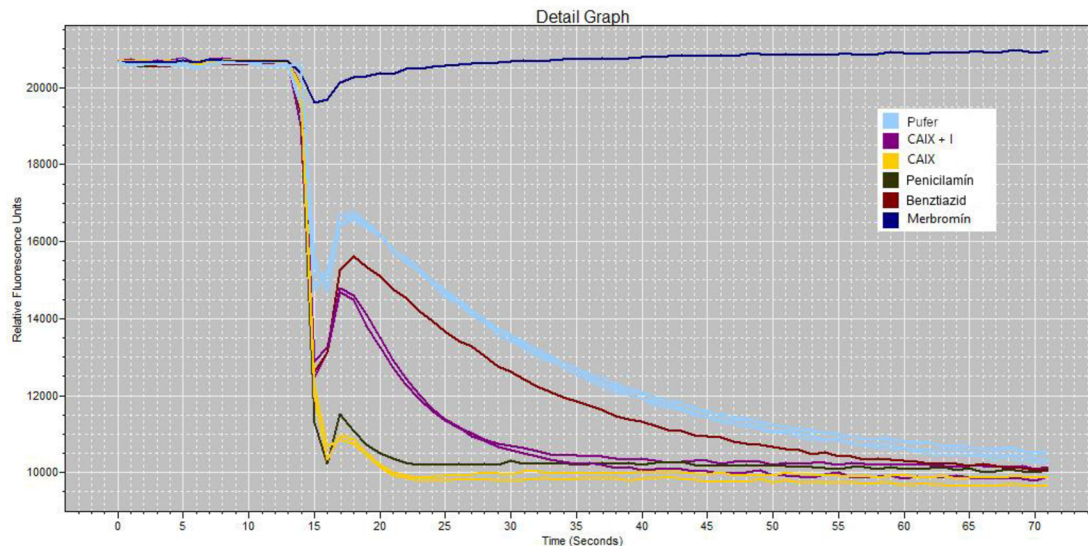
Tab. 6: Aktívne látky z testovaných zlúčenín komerčnej chemickej knižnice Prestwick s hodnotou PI > 80 %. Uvedené hodnoty sú aritmetickým priemerom hodnôt z 2 opakovaní ± smerodajná odchýlka.

Testovaná látka	PI [%]
Chlorotiazid	95,83 ± 9,03
Acetazolamid	101,06 ± 16,55
Furosemid	87,92 ± 2,92
Chlortalidón	92,43 ± 12,55
Brinzolamid	105,59 ± 5,13
Klorsulon	96,04 ± 4,06
Altiazid	82,54 ± 6,46
Metazolamid	104,18 ± 11,50
Benziazid	109,19 ± 16,86
Trichlormetiazid	85,58 ± 6,32
Merbromín*	199,93 ± 53,46
Diklofenamid	112,55 ± 9,36
Zonisamid	117,65 ± 3,29
Celecoxib	97,67 ± 6,09
Topiramát	103,76 ± 4,07
Dorzolamid hydrochlorid	111,12 ± 4,75
Valdecoxib	96,51 ± 3,19
Etozolamid	110,20 ± 3,29
Azatadín maleát	108,06 ± 1,65

* falošne pozitívna látka (fluorescenčná)



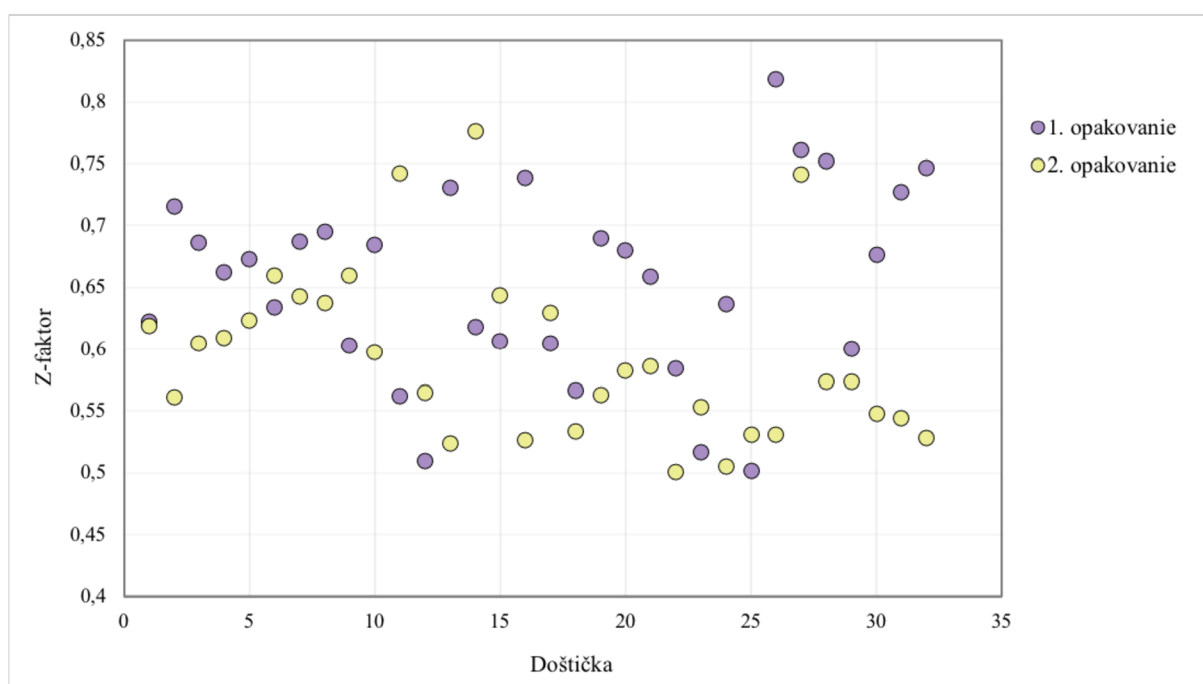
Obr. 14: Distribúcia látok a aktívne látky z komerčnej chemickej knižnice Prestwick v závislosti od hodnôt PI. Ako aktívne sú označené látky s hodnotou PI > 80 %. Zobrazená hodnota PI pre každú látku je priemernou hodnotou z 2 opakovaní.



Obr. 15: Reprezentatívne krivky zobrazujúce priebeh reakcie s vybranými látkami z komerčnej chemickej knižnice Prestwick. Pufer pre CA IX bol použitý ako slepá vzorka (svetlomodrá), pufer s 50nM CA IX ako negatívna kontrola (žltá); inhibitor AZA ako pozitívna kontrola (fialová), penicilamín je neaktívna látka (tmavozelená), benziazid je inhibitor CA (tmavočervená) a merbromín je falošne pozitívna, fluorescenčná látka (tmavomodrá). Zobrazené softvérom ScreenWorks, zaznamenané prístrojom FLIPR, ako fluorescenčný indikátor bol použitý pyranín.

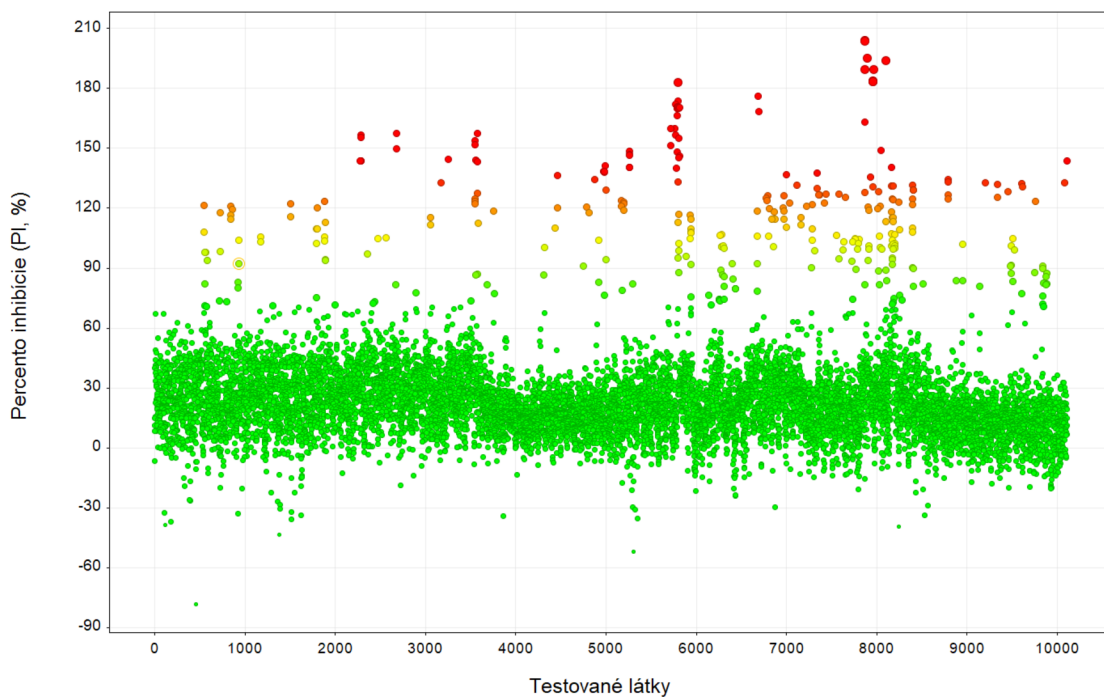
5.3 Analýza inhibítorov CA IX v chemickej knižnici ÚMTM

Testovaných bolo 10204 látok v koncentrácii 10 μM v 2 opakovaníach. Prostredníctvom softvéru ScreenWorks boli vypočítané AUC v časovom intervale 16 – 20 s. Dáta boli vyhodnocované v programe Dotmatics, kde boli zistené Z-faktory pre merané doštičky. Hodnoty Z-faktora doštičiek sa pohybovali v rozmedzí 0,50 – 0,82 (Obr. 16).

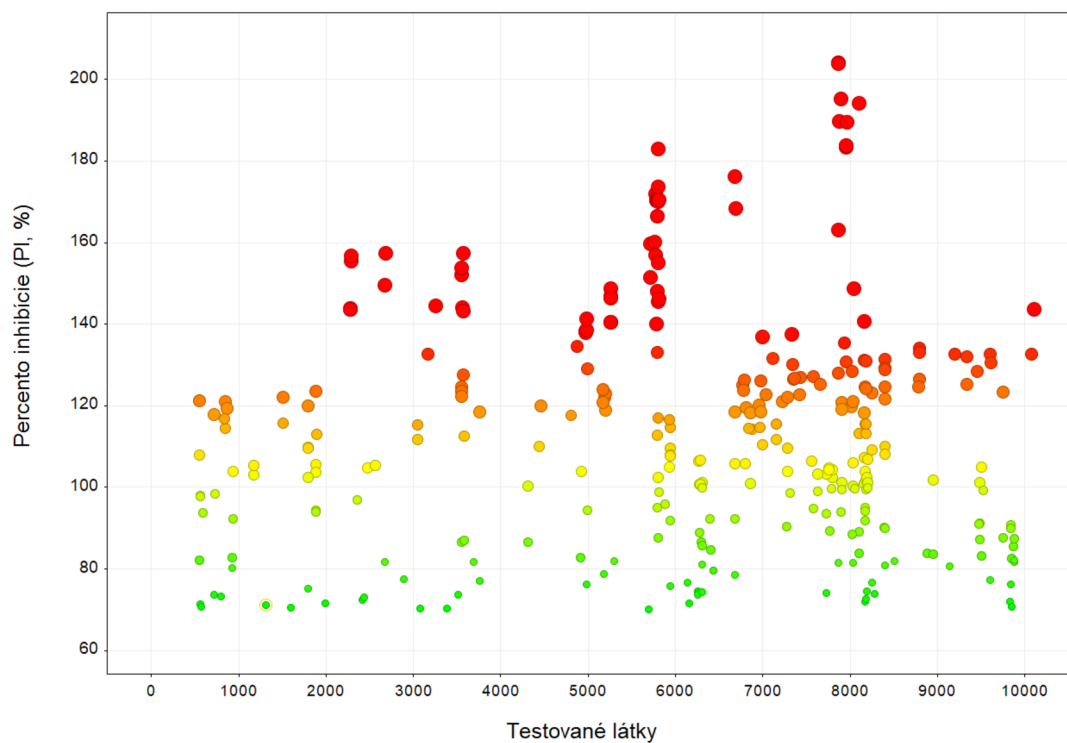


Obr. 16: Hodnoty Z-faktora doštičiek s testovanými látkami unikátnej chemickej knižnice ÚMTM.

Pre jednotlivé látky boli v programe Dotmatics vyhodnotené PI a následne v programe MS Excel vypočítané priemerné hodnoty PI a smerodajné odchýlky z 2 opakovaní pre každú testovanú zlúčeninu. Priemerné hodnoty PI sa pohybovali od -78,45 % do 204,07 %. Pre vyhodnotenie látky ako aktívna bola stanovená hodnota $PI > 70\%$, čo spĺňalo 316 látok z testovaných (3,10 %). Distribúcia látok v závislosti od hodnôt PI vizualizovaná softvérom Vortex je zobrazená na Obr. 17 a hodnoty PI aktívnych látok na Obr. 18.

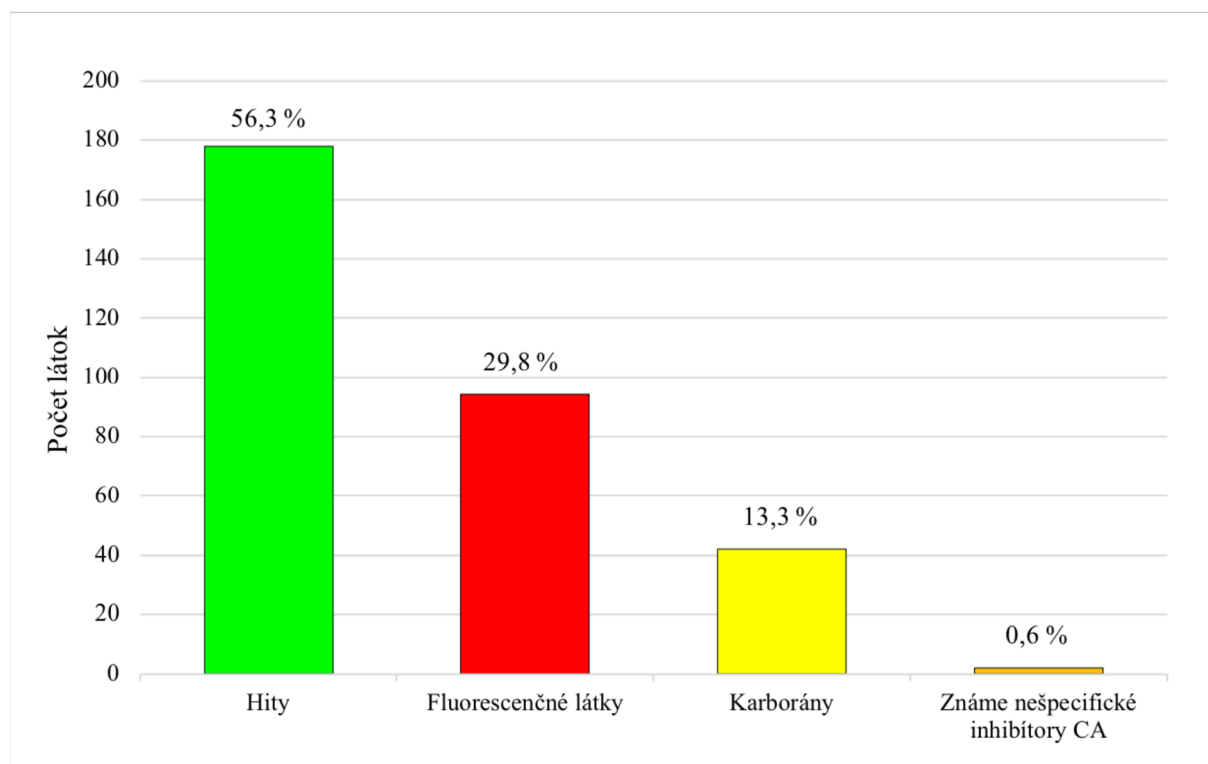


Obr. 17: Distribúcia testovaných látok unikátnej chemickej knižnice ÚMTM v závislosti od hodnôt PI. Zobrazená hodnota PI pre každú látku je priemernou hodnotou z 2 meraní.



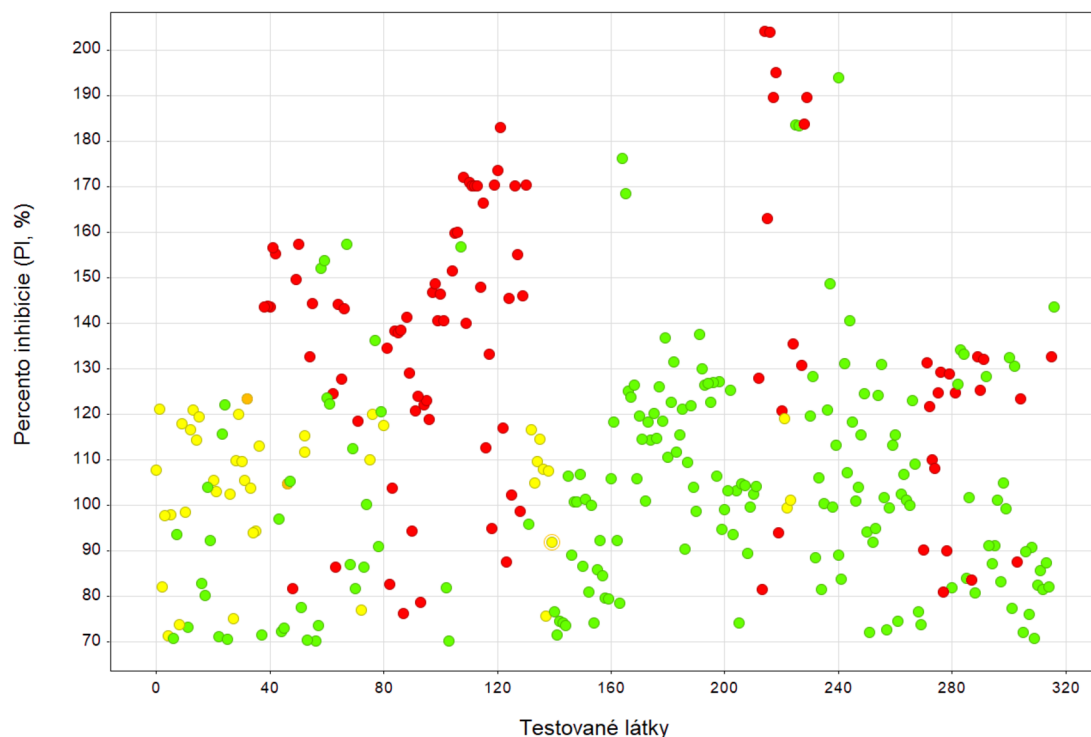
Obr. 18: Distribúcia aktívnych látok z unikátnej chemickej knižnice ÚMTM v závislosti od hodnôt PI. Ako aktívne sú označené látky s hodnotou PI > 70 %. Zobrazená hodnota PI pre každú látku je priemernou hodnotou z 2 meraní.

Aktívne látky boli ďalej pomocou softvéru Vortex triedené na základe štruktúry a ďalších dostupných informácií do 4 kategórií: hity (látky určené pre ďalšie testovanie v sekundárnom skríningu), fluorescenčné látky (falošne pozitívne), karborány a známe nešpecifické inhibítory CA. Spomedzi 316 aktívnych látok bolo ako hit určených 178 látok (56,33 %), 94 látok (29,75 %) bolo fluorescenčných, 42 látok (13,29 %) tvorili karborány a v prípade 2 látok (0,63 %) sa jednalo o známe nešpecifické inhibítory CA (Obr. 19).



Obr. 19: Grafické zobrazenie zastúpenia aktívnych látok v jednotlivých kategóriách.

Distribúcia látok v závislosti od hodnôt PI s rozdelením do jednotlivých kategórií je zobrazená na (Obr. 20). Látky s najvyššími hodnotami PI boli prevažne fluorescenčné, jednalo sa o 72,73 % látok s hodnotou PI nad 150 %.

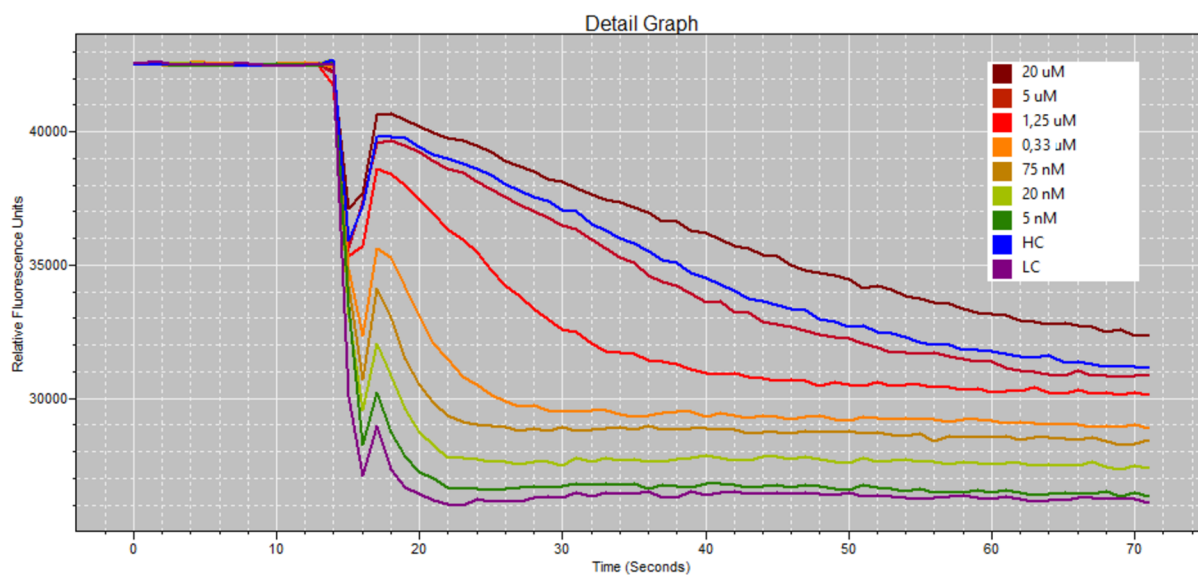


Obr. 20: Hodnoty PI aktívnych látok z unikátnej chemickej knižnice ÚMTM rozdelených do jednotlivých kategórií. Hity (zelená), fluorescenčné látky (červená), karborány (žltá), známe nešpecifické inhibitory CA (oranžová). Zobrazená hodnota PI pre každú látku je priemernou hodnotou z 2 meraní.

5.4 Sekundárny skríning

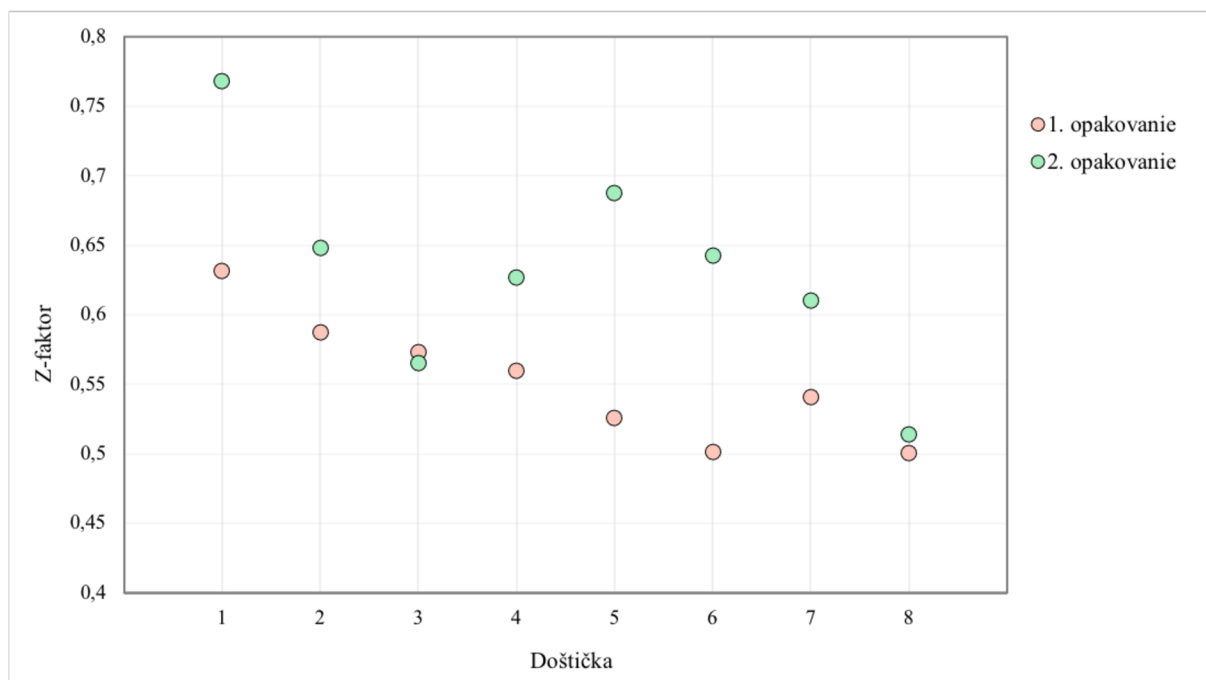
Testovaných bolo 174 látok v 7 koncentráciách (20 μM , 5 μM , 1,25 μM , 0,33 μM , 75 nM, 20 nM a 5 nM) a pre každú látku bola vypočítaná hodnota IC_{50} , ktorá vyjadruje koncentráciu látky potrebnú pre inhibíciu 50 % enzýmu. Každá zlúčenina bola na jednej doštičke testovaná v duplikátoch a meranie bolo vykonané v 2 opakovaníach. Celkovo tak boli získané 4 hodnoty pre každú látku v danej koncentrácii.

Na Obr. 21 je zobrazený reprezentatívny priebeh reakcie pri sekundárnom skríningu látky LEM00017808, kde je možné pozorovať závislosť rýchlosti priebehu reakcie na koncentrácii testovanej látky. Už na základe priebehu kriviek daných koncentrácií v porovnaní s pozitívnou kontrolou je možné predpokladať, že zobrazená látka bude slabším inhibítorom ako AZA.



Obr. 21: Reprezentatívne krivky priebehu reakcie pri sekundárnom skrýningu látky LEM00017808. Zobrazené sú krivky pre testované koncentrácie 20 μM (tmavohnedá); 5 μM (tmavočervená); 1,25 μM (červená); 0,33 μM (oranžová); 75 nM (svetlohnedá); 20 nM (svetlozelená); 5 nM (tmavozelená). HC – 100 nM AZA, pozitívna kontrola (modrá); LC – 50 nM CA IX, negatívna kontrola (fialová). Zobrazené softvérom ScreenWorks, zaznamenané prístrojom FLIPR, ako fluorescenčný indikátor bol použitý pyranín.

Prostredníctvom softvéru ScreenWorks boli z priebehu kriviek reakcie vypočítané AUC v časovom intervale 16 – 20 s. Dáta boli vyhodnocované v programe Dotmatics, kde boli vypočítané Z-faktory pre merané doštičky. Hodnoty sa pohybovali v rozmedzí 0,50 – 0,77 (Obr. 22).

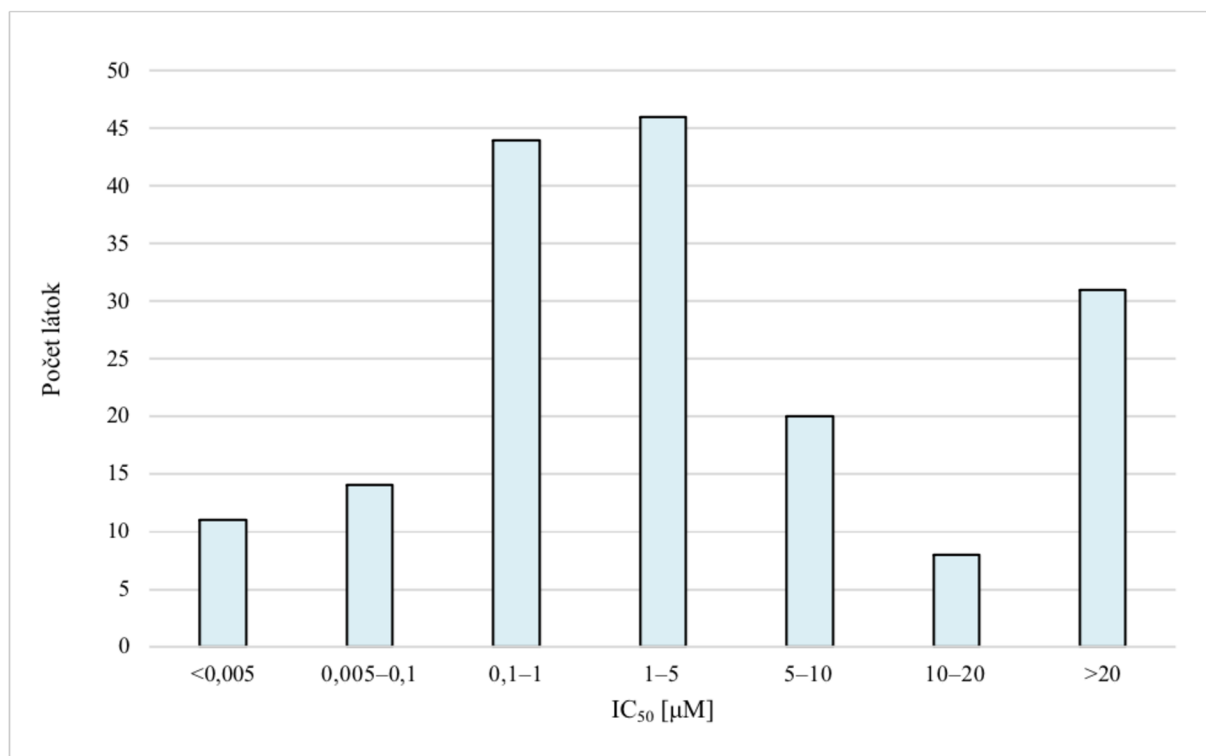


Obr. 22: Hodnoty Z-faktora doštičiek s látkami testovanými v sekundárnom skríningu.

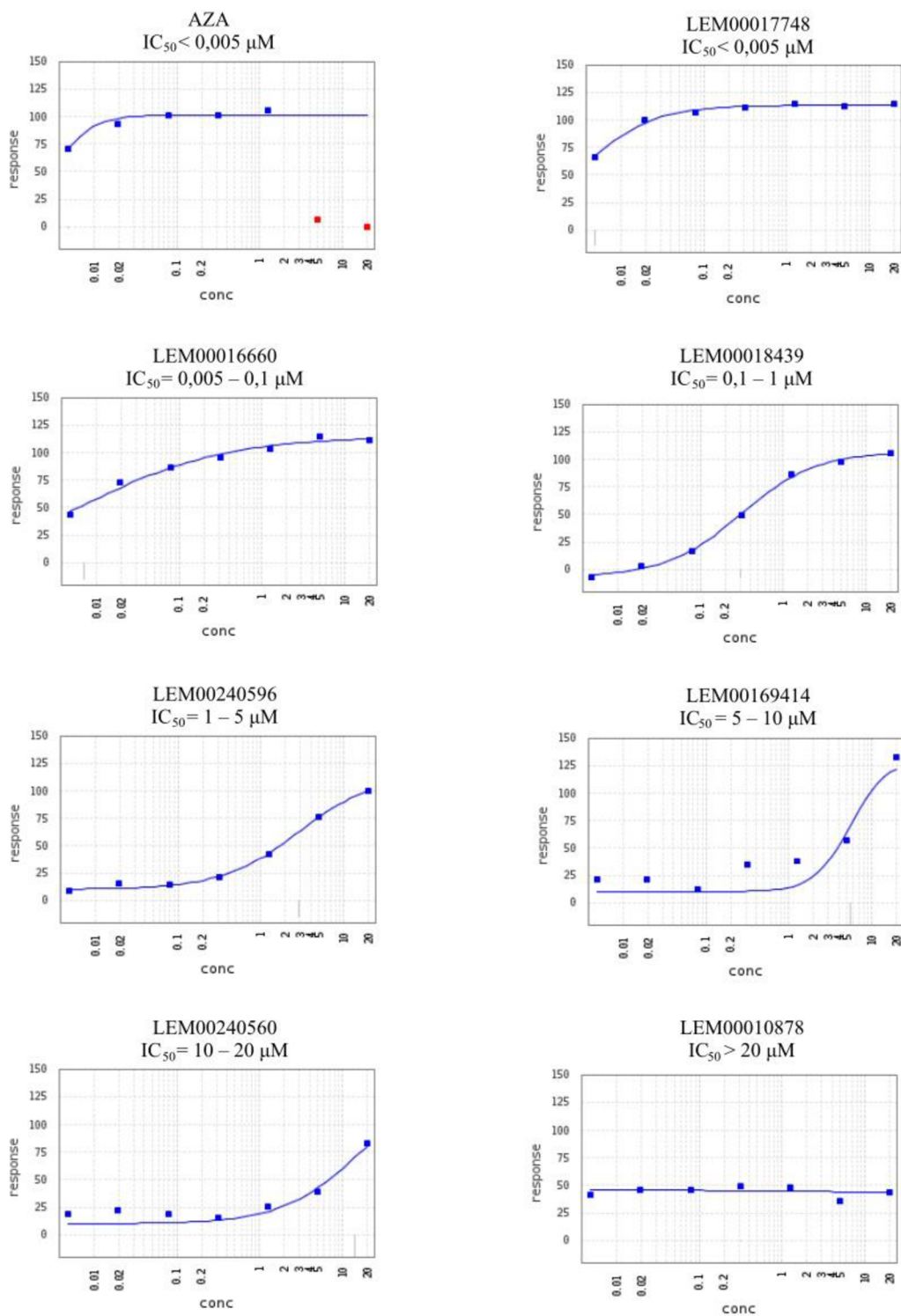
Následne boli programom Dotmatics vyhodnotené hodnoty IC_{50} pre každú testovanú látku. V programe MS Excel boli vypočítané priemerné hodnoty a smerodajné odchýlky zo 4 hodnôt získaných pre všetky látky. 11 látok malo hodnotu IC_{50} nižšiu než najnižšia testovaná koncentrácia a 31 látok vyššiu ako bola najvyššia testovaná koncentrácia. Presná hodnota IC_{50} pre ne z tohto dôvodu nebola stanovená. Látky boli na základe zistených hodnôt ďalej rozdelené do kategórií uvedených v Tab. 7 a v grafickom zobrazení na Obr. 23. Na Obr. 24 sú pre ukážku zobrazené reprezentatívne krivky závislosti odpovede na dávke pre vybrané látky z daných kategórií. V Tab. 8 sú ďalej uvedené látky, ktoré môžu byť silnými inhibítormi CA IX a boli zaradené do kategórií podľa hodnoty $IC_{50} < 0,005 \mu M$ a $0,005 - 0,1 \mu M$. V prípade jednej z nich (LEM0001122; 4-(3-(4-fluorofenyl)ureido)benzénesulfónamid) sa jedná o známy inhibítor CA IX.

Tab. 7: Rozdelenie látok do skupín na základe hodnôt IC_{50} .

IC_{50} [μM]	Počet látok
< 0,005	11
0,005 – 0,1	14
0,1 – 1	44
1 – 5	46
5 – 10	20
10 – 20	8
> 20	31



Obr. 23: Grafické zobrazenie rozdelenia látok do skupín na základe hodnôt IC_{50} .



Obr. 24: Reprezentatívne zobrazenie kriviek závislosti odpovede na dávke vybraných látok zaradených do jednotlivých kategórií na základe hodnoty IC_{50} . AZA bol testovaný v rozsahu koncentrácií 5 nM – 1,25 μM a ostatné látky v rozsahu 5 nM – 20 μM . Krivky sú zobrazené softvérom Dotmatics.

Tab. 8: Látky s hodnotou $IC_{50} < 0,005 \mu M$ a $0,005 - 0,1 \mu M$. Uvedené hodnoty sú aritmetickým priemerom 4 hodnôt \pm smerodajná odchýlka.

Látka	IC_{50} [μM]
LEM00016187	< 0,005
LEM00017748	< 0,005
LEM00017977	< 0,005
LEM00017979	< 0,005
LEM00018007	< 0,005
LEM00018011	< 0,005
LEM00011220*	< 0,005
LEM00015953	< 0,005
LEM00015971	< 0,005
LEM00016066	< 0,005
LEM00016179	< 0,005
LEM00016397	$0,005 \pm 0,0002$
LEM00016191	$0,008 \pm 0,0010$
LEM00016192	$0,008 \pm 0,0010$
LEM00016349	$0,008 \pm 0,0030$
LEM00001691	$0,008 \pm 0,0041$
LEM00016216	$0,009 \pm 0,0016$
LEM00016600	$0,012 \pm 0,0042$
LEM00169334	$0,014 \pm 0,0077$
LEM00169293	$0,014 \pm 0,0098$
LEM00016291	$0,020 \pm 0,0081$
LEM00016261	$0,022 \pm 0,0083$
LEM00016392	$0,023 \pm 0,0073$
LEM00018020	$0,027 \pm 0,0168$
LEM00016628	$0,042 \pm 0,0060$

* známy inhibítor CA IX

6 DISKUSIA

CA IX je jednou z 15 ľudských izoformiem α -CA. Jedná sa o transmembránovú izoformu, nadmerne exprimovanú v nádorových bunkách. Je indukovaná hypoxiou a býva spájaná s tvorbou metastáz a rezistenciou na rôzne typy terapie (Pastoreková *et* Gillies, 2019). Jej inhibícia má zásadné účinky na rast nádoru a zlepšuje terapeutický výsledok v kombinácii s ďalšími typmi liečby (Angeli *et al.*, 2020). Doteraz známe inhibítory CA však nie sú dostatočne špecifické pre nádorové izoformy a ich používanie pre liečbu nádorov by viedlo k širokej škále vedľajších účinkov inhibíciou ďalších izoformiem prítomných v mnohých tkanivách. Vývoj nízkomolekulových inhibítorov selektívnych voči nádorovým izoformám, predovšetkým CA IX, prípadne aj CA XII, je teda jedným z aktuálnych prístupov k danej problematike (Kciuk *et al.*, 2022).

Diplomová práca je zameraná na identifikáciu nových nízkomolekulových inhibítorov CA IX z unikátnej chemickej knižnice ÚMTM. Meranie prebiehalo v HTS podmienkach, nakoľko bolo potrebné otestovať veľké množstvo látok. Pre testy bola použitá fluorescenčná metóda, kedy prístrojom FLIPR bola v 384-jamkových doštičkách ViewPlate snímaná fluorescencia v závislosti na pH. Ako fluorescenčný indikátor bol použitý pyranín, ktorý je vysoko citlivý na zmeny pH v rozmedzí 5 – 8 (Han *et* Burgess, 2010). Shingles *et* Moroney (1997) potvrdili vhodnosť použitia pyranínu v prípade merania aktivity CA a sledovali aj vplyv sulfónamidových inhibítorov. Na rozdiel od tejto práce, merali nárast signálu spôsobeného zvýšením pH premenou HCO_3^- a H^+ na CO_2 a H_2O . V tejto práci bol pozorovaný pokles fluorescencie, nakoľko reakcia prebiehala opačným smerom a aktivitou CA IX dochádzalo k tvorbe H^+ a k zníženiu pH.

Prvým krokom postupu bola optimalizácia podmienok experimentu. Bol testovaný priebeh inhibovanej aj neinhibovanej reakcie s použitím 5 rôznych koncentrácií CA IX (1 nM, 10 nM, 20 nM, 50 nM a 100 nM). Ako inhibítor bol použitý AZA v koncentrácii 100 nM, ktorý je známym nešpecifickým inhibítorom CA (Supuran, 2008b). Na základe priebehu kriviek reakcie boli zvolené AUC v 4 rôznych časových intervaloch (13 – 25 s, 15 – 25 s, 16 – 21 s a 16 – 20 s) ako nástroj pre analýzu výsledkov. V týchto časových intervaloch bol rozdiel AUC medzi inhibovanou a neinhibovanou reakciou najväčší, čo značilo najväčšiu šancu, že neznáme inhibítory by boli identifikované správne. Pre každú koncentráciu a časový interval bol vypočítaný Z-faktor, ktorý je v HTS používaný na overenie kvality testu. Ak je hodnota Z-faktora aspoň 0,5, je vhodný pre použitie v HTS (Zhang *et al.*, 1999). Dané kritérium spĺňala

koncentrácia CA IX 50 nM a časový interval 16 – 20 s, a preto boli tieto podmienky zvolené pre ďalšie experimenty.

Ďalším krokom bola validácia testu použitím 1280 látok z chemickej knižnice Prestwick, ktorá obsahuje známe liečivá používané v klinickej praxi pre liečbu rôznych ochorení, vrátane známych inhibítorov CA. 19 z testovaných látok bolo vyhodnotených ako aktívne na základe ich hodnôt PI (PI > 80 %). Ako uvádza Supuran (2016b), látky chlórthiazid, acetazolamid, furosemid, brinzolamid, metazolamid, trichlorometiazid, zonisamid, celekoxib, topiramát, dorzolamid hydrochlorid a etoxozolamid, sú známymi inhibítormi CA. Potvrdením známych inhibítorov CA bolo dokázané, že daná fluorescenčná metóda a zvolené testovacie podmienky sú vhodné pre identifikáciu nových, doteraz neznámych inhibítorov CA. Jedna z aktívnych látok bola falošne pozitívna, fluorescenčná, čo bolo zistené na základe vysokých hodnôt PI a kontrolou priebehu kriviek reakcie. Jednalo sa o merbromín (sodná soľ 2,7-dibróm-4-hydroxymerkurifluoresceínu).

Následne bolo testovaných 10204 zlúčenín z unikátnej chemickej knižnice ÚMTM. 316 látok bolo vyhodnotených ako aktívne na základe hodnôt PI (PI > 70 %). Ďalej boli rozdelené podľa štruktúr a ďalších dostupných informácií do 4 skupín. Ako hit bolo určených 178 zlúčenín. 94 látok bolo fluorescenčných a použitie danej fluorescenčnej metódy pre ne nie je vhodné. Pre otestovanie fluorescenčných látok by bolo možné použiť metódu zastaveného toku s meraním zmeny absorbancie (Khalifah, 1971). Namiesto pyranínu by ako pH indikátor bolo možné zvoliť fenolovú červenú, ktorá je bežne používaná pre testovanie inhibítorov CA. V experimentoch tento postup použili napríklad Dvořanová *et al.* (2020), Onyılmaz *et al.* (2022) alebo Yusuf *et al.* (2022). Väčšina z identifikovaných fluorescenčných zlúčenín unikátnej chemickej knižnice ÚMTM však nesie fluorescenčnú značku napríklad pre možnosť sledovania ich lokalizácie v bunke. V chemickej knižnici sú často tieto látky prítomné aj bez fluorescenčnej značky a meranie pre ne nie je potrebné opakovať. Ďalších 42 z aktívnych látok tvorili karborány, ktoré už boli v minulosti testované a niektoré z nich sa ukázali ako selektívne inhibítory CA IX (Brynda *et al.*, 2013; Dvořanová *et al.*, 2020). Posledné 2 aktívne látky z testovaných boli známymi nešpecifickými inhibítormi CA, konkrétne sa v oboch prípadoch jednalo o acetazolamid.

169 hitov a ďalších 5 látok, ktoré boli pridané na základe štruktúry, bolo následne testovaných v sekundárnom skríningu. Zvyšných 9 látok určených ako hit nebolo v chemickej knižnici prítomných v dostatočnom množstve pre sekundárny skríning, a preto neboli ďalej testované. Každá látka bola meraná v 7 koncentráciách a na základe hodnôt PI bola zistená hodnota IC₅₀. Udáva koncentráciu inhibítora, ktorá je potrebná na polovičnú inhibíciu biologickej alebo

biochemickej funkcie. Vysoké hodnoty IC_{50} majú inhibítory, ktoré interagujú s enzýmom menej efektívne ako inhibítory s nízkymi hodnotami IC_{50} (Caldwell *et al.*, 2012). Podľa týchto hodnôt boli látky rozdelené do 7 kategórií. 11 látok malo hodnotu IC_{50} nižšiu ako bola najnižšia testovaná koncentrácia, podobne ako acetazolamid. Môžu byť silnými inhibítormi CA IX. Ďalších 14 látok malo hodnotu IC_{50} v rozmedzí 0,005 – 0,1 μ M a tieto látky tiež môžu silno inhibovať CA IX. Niektoré z nich však môžu byť látkami, ktoré ovplyvňujú hodnotu pH a aj v sekundárnom skríningu sa mohli ukázať ako falošne pozitívne. Preto bude vhodné látky vybrané ako hity overiť aj inou metódou.

V procese objavovania liečiv sú už od počiatkových fáz kľúčové vzťahy medzi štruktúrou a aktivitou molekuly. Je potrebné identifikovať, či tento vzťah skutočne existuje a vedie až k snahe o objasnenie detailov mechanizmu a následnému použitiu informácií na uskutočnenie štruktúrnych úprav a optimalizáciu určitej vlastnosti alebo aktivity (Guha, 2013). Porovnaním nameraných výsledkov so štruktúrami látok bolo zistené, že všetky z látok, ktoré boli identifikované ako potenciálne silné inhibítory CA IX, obsahujú sulfónamidovú skupinu. 20 látok z potenciálnych silných inhibítorov (všetky okrem známeho inhibítora a ďalších 4) boli aj tiazolidinónovými alebo tiazolidindiónovými derivátmi. U týchto derivátov bola pozorovaná schopnosť inhibície viacerých typov nádorov (Buzun *et al.*, 2021; Subtelna *et al.*, 2021). Řehulka *et al.* (2022) zistili, že niektoré tiazolidinónové a tiazolidindiónové deriváty pôsobia ako inhibítory polymerizácie tubulínu. Identifikácia týchto látok ako inhibítorov CA IX by tiež mohla byť zaujímavým zistením pre ich ďalší výskum. Zaujímavosťou je, že látka LEM00011220 (4-(3-(4-fluorofenyl)ureido)benzénosulfónamid) je už známym sulfónamidovým inhibítorom CA IX. Jedná sa o látku SLC-0111, ktorá sa nachádza v klinickom testovaní (Angeli *et al.*, 2020). V tejto práci bolo potvrdené, že je silným inhibítorom CA IX s $IC_{50} < 0,005 \mu$ M.

V ďalšom postupe budú vybrané látky, ktoré boli určené ako potenciálne silné inhibítory, testované röntgenovou kryštalografiou z dôvodu identifikácie prípadného miesta väzby a mechanizmu pôsobenia. Tým bude možné potvrdiť ich inhibičné vlastnosti voči CA IX a bude sa skúmať ich špecifita voči tomuto enzýmu.

7 ZÁVER

V teoretickej časti diplomovej práce boli charakterizované vlastnosti a funkcia karboanhydráz v organizmoch, izoformy prítomné u človeka s následným zameraním na CA IX, ktorá je asociovaná s tumormi. Podieľa sa na regulácii pH v nádorových bunkách. Regulácia pH a indukcia expresie proteínov, vrátane CA IX v hypoxických podmienkach nádorov, boli popísané v ďalšej časti práce. Následne boli charakterizované známe a používané inhibítory CA, ktoré sú však nešpecifické voči jednotlivým izoformám. V súčasnosti sú preto vyvíjané nové inhibítory, ktorými by bolo možné selektívne zacieliť izoformy asociované s tumormi. V diplomovej práci boli popísané aktuálne prístupy k danému výskumu. V závere teoretickej časti bol zhrnutý postup pri objavovaní nových liečiv a vysokokapacitný skrining, ktorý je nevyhnutný v jeho počiatkových fázach a bol aj súčasťou experimentálnej časti tejto práce.

V rámci experimentálnej časti boli najprv optimalizované podmienky fluorescenčnej metódy pre identifikáciu nových nízkomolekulových inhibítorov CA IX. Danou metódou bol sledovaný pokles fluorescencie v dôsledku zníženia pH tvorbou H^+ s použitím pyranínu ako fluorescenčného pH indikátora. Na základe hodnôt Z-faktora bola pre merania zvolená koncentrácia CA IX 50 nM a pre vyhodnocovanie výsledkov AUC z priebehu kriviek reakcie v časovom intervale 16 – 20 s. Metóda bola ďalej validovaná použitím komerčnej chemickej knižnice Prestwick, ktorá obsahuje klinicky používané liečivá, vrátane známych nešpecifických inhibítorov CA. Známe inhibítory CA boli vyhodnotené ako aktívne látky, čím bola potvrdená vhodnosť použitia testu pre identifikáciu neznámych inhibítorov pri zvolených podmienkach.

Hlavným cieľom diplomovej práce bol skrining unikátnej chemickej knižnice ÚMTM za účelom identifikácie nových nízkomolekulových inhibítorov CA IX. V primárnom skriningu bolo testovaných 10204 látok a medzi nimi bolo nájdených 178 hitov. 174 zlúčenín bolo ďalej testovaných v sekundárnom skriningu, v rámci ktorého boli určené hodnoty IC_{50} pre dané látky. Podľa týchto hodnôt bolo zistené, že 25 z testovaných látok by mohli byť silné inhibítory CA IX a na základe výsledkov tejto práce budú ďalej validované.

8 LITERATÚRA

Aggarwal, M., Boone, C. D., Kondeti, B., McKenna, R. (2013). Structural annotation of human carbonic anhydrases. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 28(2), 267–277.

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

Alterio, V., Hilvo, M., Di Fiore, A., Supuran, C. T., Pan, P., Parkkila, S., Scaloni, A., Pastorek, J., Pastorekova, S., Pedone, C., Scozzafava, A., Monti, S. M., De Simone, G. (2009). Crystal structure of the catalytic domain of the tumor-associated human carbonic anhydrase IX. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(38), 16233–16238.

Angeli, A., Carta, F., Nocentini, A., Winum, J.-Y., Zalubovskis, R., Akdemir, A., Onnis, V., Eldehna, W. M., Capasso, C., Simone, G. D., Monti, S. M., Carradori, S., Donald, W. A., Dedhar, S., Supuran, C. T. (2020). Carbonic Anhydrase Inhibitors Targeting Metabolism and Tumor Microenvironment. *Metabolites*, 10(10), 412.

Becker, H. M. (2020). Carbonic anhydrase IX and acid transport in cancer. *British Journal of Cancer*, 122(2), 157–167.

Becker, H. M., Deitmer, J. W. (2021). Proton Transport in Cancer Cells: The Role of Carbonic Anhydrases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3171.

Benej, M., Pastoreková, S., Pastorek, J. (2014). Carbonic Anhydrase IX: Regulation and Role in Cancer. In Frost, S. C., McKenna, R. (Ed.), *Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications*. *Subcellular Biochemistry*, (Roč. 75, s. 199–219). Springer, Dordrecht.

Blay, V., Tolani, B., Ho, S. P., Arkin, M. R. (2020). High-Throughput Screening: Today's biochemical and cell-based approaches. *Drug Discovery Today*, 25(10), 1807–1821.

Bonardi, A., Bua, S., Combs, J., Lomelino, C., Andring, J., Osman, S. M., Toti, A., Di Cesare Mannelli, L., Gratteri, P., Ghelardini, C., McKenna, R., Nocentini, A., Supuran, C. T. (2022). The three-tails approach as a new strategy to improve selectivity of action of sulphonamide inhibitors against tumour-associated carbonic anhydrase IX and XII. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 37(1), 930–939.

- Boone, C. D., Pinard, M., McKenna, R., Silverman, D. (2014). Catalytic Mechanism of α -Class Carbonic Anhydrases: CO₂ Hydration and Proton Transfer. In Frost, S. C., McKenna, R. (Ed.), *Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications. Subcellular Biochemistry*, (Roč. 75, s. 31–52). Springer, Dordrecht.
- Brynda, J., Mader, P., Šícha, V., Fábry, M., Poncová, K., Bakardiev, M., Grüner, B., Cígler, P., Řezáčová, P. (2013). Carborane-Based Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition*, 52(51), 13760–13763.
- Buzun, K., Kryshchshyn-Dylevych, A., Senkiv, J., Roman, O., Gzella, A., Bielawski, K., Bielawska, A., Lesyk, R. (2021). Synthesis and Anticancer Activity Evaluation of 5-[2-Chloro-3-(4-nitrophenyl)-2-propenylidene]-4-thiazolidinones. *Molecules*, 26(10), 3057.
- Caldwell, W. G., Yan, Z., Lang, W., A. Masucci, J. (2012). The IC₅₀ Concept Revisited. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 12(11), 1282–1290.
- Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J.-M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., Koch, C. J., Ratcliffe, P., Moons, L., Jain, R. K., Collen, D., Keshet, E. (1998). Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*, 394(6692), 485–490.
- Csaderová, L., Debreová, M., Radvak, P., Stano, M., Vreštiaková, M., Kopaček, J., Pastoreková, S., Švastová, E. (2013). The effect of carbonic anhydrase IX on focal contacts during cell spreading and migration. *Frontiers in Physiology*, 4.
- D'Ambrosio, K., Carradori, S., Monti, S. M., Buonanno, M., Secci, D., Vullo, D., Supuran, C. T., De Simone, G. (2015). Out of the active site binding pocket for carbonic anhydrase inhibitors. *Chemical Communications*, 51(2), 302–305.
- De Simone, G., Supuran, C. T. (2010). Carbonic anhydrase IX: Biochemical and crystallographic characterization of a novel antitumor target. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804(2), 404–409.
- Del Prete, S., Nocentini, A., Supuran, C. T., Capasso, C. (2020). Bacterial ι -carbonic anhydrase: A new active class of carbonic anhydrase identified in the genome of the Gram-negative bacterium *Burkholderia territorii*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 35(1), 1060–1068.

- Domsic, J. F., McKenna, R. (2010). Sequestration of carbon dioxide by the hydrophobic pocket of the carbonic anhydrases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1804(2), 326–331.
- Dvořanová, J., Kugler, M., Holub, J., Šícha, V., Das, V., Někvinďa, J., El Anwar, S., Havránek, M., Pospíšilová, K., Fábry, M., Král, V., Medvedíková, M., Matějková, S., Lišková, B., Gurská, S., Džubák, P., Brynda, J., Hajdúch, M., Grüner, B., Řezáčová, P. (2020). Sulfonamido carboranes as highly selective inhibitors of cancer-specific carbonic anhydrase IX. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 200, 112460.
- Guha, R. (2013). On Exploring Structure–Activity Relationships. In S. Kortagere (Ed.), *In Silico Models for Drug Discovery* (Roč. 993, s. 81–94). Humana Press.
- Han, J., Burgess, K. (2010). Fluorescent Indicators for Intracellular pH. *Chemical Reviews*, 110(5), 2709–2728.
- Hilvo, M., Baranauskiene, L., Salzano, A. M., Scaloni, A., Matulis, D., Innocenti, A., Scozzafava, A., Monti, S. M., Di Fiore, A., De Simone, G., Lindfors, M., Jānis, J., Valjakka, J., Pastoreková, S., Pastorek, J., Kulomaa, M. S., Nordlund, H. R., Supuran, C. T., Parkkila, S. (2008). Biochemical Characterization of CA IX, One of the Most Active Carbonic Anhydrase Isozymes. *Journal of Biological Chemistry*, 283(41), 27799–27809.
- Hirakawa, Y., Senda, M., Fukuda, K., Yu, H. Y., Ishida, M., Taira, M., Kinbara, K., Senda, T. (2021). Characterization of a novel type of carbonic anhydrase that acts without metal cofactors. *BMC Biology*, 19(1), 105.
- Hughes, J., Rees, S., Kalindjian, S., Philpott, K. (2011). Principles of early drug discovery: Principles of early drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, 162(6), 1239–1249.
- Chiche, J., Brahimi-Horn, M. C., Pouysségur, J. (2010). Tumour hypoxia induces a metabolic shift causing acidosis: A common feature in cancer. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(4), 771–794.
- Innocenti, A., Pastorekova, S., Pastorek, J., Scozzafava, A., Simone, G. D., Supuran, C. T. (2009). The proteoglycan region of the tumor-associated carbonic anhydrase isoform IX acts as an intrinsic buffer optimizing CO₂ hydration at acidic pH values characteristic of solid tumors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19(20), 5825–5828.

Imtaiyaz Hassan, Md., Shajee, B., Waheed, A., Ahmad, F., Sly, W. S. (2013). Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(6), 1570–1582.

Jensen, E. L., Clement, R., Kosta, A., Maberly, S. C., Gontero, B. (2019). A new widespread subclass of carbonic anhydrase in marine phytoplankton. *The ISME Journal*, 13(8), 2094–2106.

Khalifah, R. G. (1971). The carbon dioxide hydration activity of carbonic anhydrase. I. Stop-flow kinetic studies on the native human isoenzymes B and C. *The Journal of Biological Chemistry*, 246(8), 2561–2573.

Kciuk, M., Gielecińska, A., Mujwar, S., Mojzych, M., Marciniak, B., Drozda, R., Kontek, R. (2022). Targeting carbonic anhydrase IX and XII isoforms with small molecule inhibitors and monoclonal antibodies. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 37(1), 1278–1298.

Kugler, M., Holub, J., Brynda, J., Pospíšilová, K., Anwar, S. E., Bovol, D., Havránek, M., Král, V., Fábry, M., Grüner, B., Řezáčová, P. (2020). The structural basis for the selectivity of sulfonamido dicarbaboranes toward cancer-associated carbonic anhydrase IX. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 35(1), 1800–1810.

Kugler, M., Nekvinda, J., Holub, J., El Anwar, S., Das, V., Šícha, V., Pospíšilová, K., Fábry, M., Král, V., Brynda, J., Kašička, V., Hajdúch, M., Řezáčová, P., Grüner, B. (2021). Inhibitors of CA IX Enzyme Based on Polyhedral Boron Compounds. *ChemBioChem*, 22(18), 2741–2761.

Lee, S.-H., Griffiths, J. R. (2020). How and Why Are Cancers Acidic? Carbonic Anhydrase IX and the Homeostatic Control of Tumour Extracellular pH. *Cancers*, 12(6), 1616.

Lenferink, A. E. G., McDonald, P. C., Cantin, C., Grothé, S., Gosselin, M., Baardsnes, J., Banville, M., Lachance, P., Robert, A., Cepero-Donates, Y., Radinovic, S., Salois, P., Parat, M., Oamari, H., Dulude, A., Patel, M., Lafrance, M., Acel, A., Bousquet-Gagnon, N., L'Abbé, D., Pelletier, A., Malenfant, F., Jaramillo, M., O'Connor-Mccourt, M., Wu, C., Durocher, Y., Duchesne, M., Gadoury, C., Marcil, A., Fortin, Y., Paul-Roc, B., Acchione, M., Chafe, S. C., Nemirovsky, O., Lau, J., Bénard, F., Dedhar, S. (2021). Isolation and characterization of monoclonal antibodies against human carbonic anhydrase-IX. *mAbs*, 13(1), 1999194.

- Lomelino, C. L., Andring, J. T., McKenna, R. (2018). Crystallography and Its Impact on Carbonic Anhydrase Research. *International Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 1–21.
- Luo, W., Wang, Y. (2019). Hypoxia Mediates Tumor Malignancy and Therapy Resistance. In D. M. Gilkes (Ed.), *Hypoxia and Cancer Metastasis* (Roč. 1136, s. 1–18). Springer International Publishing.
- Malo, N., Hanley, J. A., Cerquozzi, S., Pelletier, J., Nadon, R. (2006). Statistical practice in high-throughput screening data analysis. *Nature Biotechnology*, 24(2), 167–175.
- Maren, T. H. (1967). Carbonic anhydrase: Chemistry, physiology, and inhibition. *Physiological Reviews*, 47(4), 595–781.
- Matthews, H., Hanison, J., Nirmalan, N. (2016). “Omics”-Informed Drug and Biomarker Discovery: Opportunities, Challenges and Future Perspectives. *Proteomes*, 4(3), 28.
- Maxwell, P. H., Dachs, G. U., Gleadle, J. M., Nicholls, L. G., Harris, A. L., Stratford, I. J., Hankinson, O., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J. (1997). Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(15), 8104–8109.
- Maxwell, P. H., Wiesener, M. S., Chang, G.-W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., Wykoff, C. C., Pugh, C. W., Maher, E. R., Ratcliffe, P. J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 399(6733), 271–275.
- Mayr, L. M., Bojanic, D. (2009). Novel trends in high-throughput screening. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(5), 580–588.
- Mayr, L. M., Fuerst, P. (2008). The Future of High-Throughput Screening. *SLAS Discovery*, 13(6), 443–448.
- McDonald, P. C., Chafe, S. C., Supuran, C. T., Dedhar, S. (2022). Cancer Therapeutic Targeting of Hypoxia Induced Carbonic Anhydrase IX: From Bench to Bedside. *Cancers*, 14(14), 3297.
- McKenna, R., Supuran, C. T. (2013). Carbonic Anhydrase Inhibitors Drug Design. *Carbonic Anhydrase: Mechanism, Regulation, Links to Disease, and Industrial Applications*, 291–323.
- McKiernan, J. M., Buttyan, R., Bander, N. H., Stifelman, M. D., Katz, A. E., Chen, M. W., Olsson C. A., Sawczuk, I. S. (1997). Expression of the tumor-associated gene MN: a potential biomarker for human renal cell carcinoma. *Cancer research*, 57(12), 2362-2365.

- Mishra, C. B., Tiwari, M., Supuran, C. T. (2020). Progress in the development of human carbonic anhydrase inhibitors and their pharmacological applications: Where are we today? *Medicinal Research Reviews*, 40(6), 2485–2565.
- Moeller, B. J., Richardson, R. A., Dewhirst, M. W. (2007). Hypoxia and radiotherapy: Opportunities for improved outcomes in cancer treatment. *Cancer and Metastasis Reviews*, 26(2), 241–248.
- Morgan, P. E., Pastoreková, S., Stuart-Tilley, A. K., Alper, S. L., Casey, J. R. (2007). Interactions of transmembrane carbonic anhydrase, CAIX, with bicarbonate transporters. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 293(2), C738–C748.
- Nocentini, A., Supuran, C. T. (2019). Carbonic anhydrases: an overview. In Nocentini, A., Supuran, C. T. (Ed.), *Carbonic Anhydrases* (s. 3–16). Elsevier.
- Nocentini, A., Supuran, C. T., Capasso, C. (2021). An overview on the recently discovered iotacarbonic anhydrases. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 36(1), 1988–1995.
- Onyılmaz, M., Koca, M., Bonardi, A., Degirmenci, M., Supuran, C. T. (2022). Isocoumarins: A new class of selective carbonic anhydrase IX and XII inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 37(1), 743–748.
- Opavský, R., Pastoreková, S., Zelník, V., Gibadulinová, A., Stanbridge, E. J., Závada, J., Kettmann, R., Pastorek, J. (1996). HumanMN/CA9Gene, a Novel Member of the Carbonic Anhydrase Family: Structure and Exon to Protein Domain Relationships. *Genomics*, 33(3), 480–487.
- Pastorek, J., Pastoreková, S. (2015). Hypoxia-induced carbonic anhydrase IX as a target for cancer therapy: From biology to clinical use. *Seminars in Cancer Biology*, 31, 52–64.
- Pastorek, J., Pastoreková, S., Callebaut, I., Mornon, J. P., Zelník, V., Opavský, R., Zaťovičová, M., Liao, S., Portetelle, D., Stanbridge, E. J. (1994). 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*, 9(10), 2877–2888.
- Pastoreková, S., Gillies, R. J. (2019). The role of carbonic anhydrase IX in cancer development: Links to hypoxia, acidosis, and beyond. *Cancer and Metastasis Reviews*, 38(1–2), 65–77.

- Pastoreková, S., Parkkila, S., Parkkila, A. K., Opavský, R., Zelník, V., Saarnio, J., Pastorek, J. (1997). Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts. *Gastroenterology*, 112, 398-408.
- Pastorekova, S., Parkkila, S., Pastorek, J., Supuran, C. T. (2004). Carbonic Anhydrases: Current State of the Art, Therapeutic Applications and Future Prospects. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 19(3), 199–229.
- Pastoreková, S., Ratcliffe, P. J., Pastorek, J. (2008). Molecular mechanisms of carbonic anhydrase IX-mediated pH regulation under hypoxia. *BJU International*, 101(s4), 8–15.
- Pastoreková, S., Zavadová, Z., Košťál, M., Babušíková, O., Závada, J. (1992). A novel quasi-viral agent, MaTu, is a two-component system. *Virology*, 187(2), 620–626.
- Rohwer, N., Cramer, T. (2011). Hypoxia-mediated drug resistance: Novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug Resistance Updates*, 14(3), 191–201.
- Ryan, H. E. (1998). HIF-1 α is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *The EMBO Journal*, 17(11), 3005–3015.
- Řehulka, J., Subtelna, I., Kryshchychyn-Dylevych, A., Cherniienko, A., Ivanová, A., Matveieva, M., Polishchuk, P., Gurská, S., Hajdúch, M., Zagrijtschuk, O., Džubák, P., Lesyk, R. (2022). Anticancer 5-arylidene-2-(4-hydroxyphenyl)aminothiazol-4(5 H)-ones as tubulin inhibitors. *Archiv Der Pharmazie*, 355(12), 2200419.
- Sedláková, O., Švastová E., Takáčová, M., Kopaček, J., Pastorek J., Pastoreková, S. (2014). Carbonic anhydrase IX, a hypoxia-induced catalytic component of the pH regulating machinery in tumors. *Frontiers in Physiology*, 4.
- Semenza, G. L. (2000). HIF-1: Mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *Journal of Applied Physiology*, 88(4), 1474–1480.
- Semenza, G. L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 3(10), 721–732.
- Semenza, G. L. (2012). Hypoxia-inducible factors: Mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends in Pharmacological Sciences*, 33(4), 207–214.
- Sheff, J. G., Kelly, J. F., Robotham, A., Sulea, T., Malenfant, F., L'Abbé, D., Duchesne, M., Pelletier, A., Lefebvre, J., Acel, A., Parat, M., Gosselin, M., Wu, C., Fortin, Y., Baardsnes, J.,

- Van Faassen, H., Awrey, S., Chafe, S. C., McDonald, P. C., Dedhar, S., Lenferink, A. E. G. (2021). Hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry reveals three unique binding responses of mAbs directed to the catalytic domain of hCAIX. *mAbs*, 13(1), 1997072.
- Shingles, R., Moroney, J. V. (1997). Measurement of Carbonic Anhydrase Activity Using a Sensitive Fluorometric Assay. *Analytical Biochemistry*, 252(1), 190–197.
- Schito, L., Semenza, G. L. (2016). Hypoxia-Inducible Factors: Master Regulators of Cancer Progression. *Trends in Cancer*, 2(12), 758–770.
- Singh, S., Lomelino, C., Mboge, M., Frost, S., McKenna, R. (2018). Cancer Drug Development of Carbonic Anhydrase Inhibitors beyond the Active Site. *Molecules*, 23(5), 1045.
- Subtelna, I., Kryshchychyn-Dylevych, A., Jia, R., Lelyukh, M., Ringler, A., Kubicek, S., Zagrijtschuk, O., Kralovics, R., Lesyk, R. (2021). 5-Arylidene-2-(4-hydroxyphenyl)aminothiazol-4(5 H)-ones with selective inhibitory activity against some leukemia cell lines. *Archiv Der Pharmazie*, 354(4), 2000342.
- Suchý, D., Hora, M., Fínek, J. (2009): Vývoj a klinické hodnocení nových léčiv, *Česká Urologie*, 13 (2), 141–148.
- Supuran, C. T., Scozzafava, A., Casini, A. (2003). Carbonic anhydrase inhibitors. *Medicinal Research Reviews*, 23(2), 146–189.
- Supuran, C. (2008a). Carbonic Anhydrases An Overview. *Current Pharmaceutical Design*, 14(7), 603–614.
- Supuran, C. T. (2008b). Carbonic anhydrases: Novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(2), 168–181.
- Supuran, C. T. (2012). Structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 27(6), 759–772.
- Supuran, C. T. (2016a). Structure and function of carbonic anhydrases. *Biochemical Journal*, 473(14), 2023–2032.
- Supuran, C. T. (2016b). How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist? *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(3), 345–360.
- Supuran, C. T. (2017). Carbonic Anhydrase Inhibition and the Management of Hypoxic Tumors. *Metabolites*, 7(3), 48.

- Supuran, C. T. (2018a). Carbonic anhydrase activators. *Future Medicinal Chemistry*, 10(5), 561–573.
- Supuran, C. T. (2018b). Carbonic anhydrase inhibitors and their potential in a range of therapeutic areas. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 28(10), 709–712.
- Supuran, C. T. (2020a). Coumarin carbonic anhydrase inhibitors from natural sources. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 35(1), 1462–1470.
- Supuran, C. T. (2020b). Experimental Carbonic Anhydrase Inhibitors for the Treatment of Hypoxic Tumors. *Journal of Experimental Pharmacology*, Volume 12, 603–617.
- Supuran, C. T., Alterio, V., Di Fiore, A., D' Ambrosio, K., Carta, F., Monti, S. M., De Simone, G. (2018). Inhibition of carbonic anhydrase IX targets primary tumors, metastases, and cancer stem cells: Three for the price of one. *Medicinal Research Reviews*, 38(6), 1799–1836.
- Švastová, E., Hulíková, A., Rafajová, M., Zat'ovičová, M., Gibadulinová, A., Casini, A., Cecchi, A., Scozzafava, A., Supuran, C. T., Pastorek, J., Pastoreková, S. (2004). Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Letters*, 577(3), 439–445.
- Testa, C., Papini, A. M., Zeidler, R., Vullo, D., Carta, F., Supuran, C. T., Rovero, P. (2022). First studies on tumor associated carbonic anhydrases IX and XII monoclonal antibodies conjugated to small molecule inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 37(1), 592–596.
- Umscheid, C. A., Margolis, D. J., Grossman, C. E. (2011). Key Concepts of Clinical Trials: A Narrative Review. *Postgraduate Medicine*, 123(5), 194–204.
- Vaupel, P., Multhoff, G. (2021). Revisiting the Warburg effect: Historical dogma versus current understanding. *The Journal of Physiology*, 599(6), 1745–1757.
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A., Semenza, G. L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(12), 5510–5514.
- Wang, G. L., Semenza, G. L. (1995). Purification and Characterization of Hypoxia-inducible Factor 1. *Journal of Biological Chemistry*, 270(3), 1230–1237.
- Webb, B. A., Chimenti, M., Jacobson, M. P., Barber, D. L. (2011). Dysregulated pH: A perfect storm for cancer progression. *Nature Reviews Cancer*, 11(9), 671–677.

- Wei, M., Wynn, R., Hollis, G., Liao, B., Margulis, A., Reid, B. G., Klabe, R., Liu, P. C. C., Becker-Pasha, M., Rupal, M., Burn, T. C., McCall, D. E., Li, Y. (2007). High-Throughput Determination of Mode of Inhibition in Lead Identification and Optimization. *SLAS Discovery*, 12(2), 220–228.
- Wu, Q., You, L., Nepovimova, E., Heger, Z., Wu, W., Kuca, K., Adam, V. (2022). Hypoxia-inducible factors: Master regulators of hypoxic tumor immune escape. *Journal of Hematology & Oncology*, 15(1), 77.
- Wykoff, C. C., Beasley, N. J., Watson, P. H., Turner, K. J., Pastorek, J., Sibtain, A., Wilson, G. D., Turley, H., Talks, K. L., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J., Harris, A. L. (2000). Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Research*, 60(24), 7075–7083.
- Yusuf, Z. S., Uysal, T. K., Simsek, E., Nocentini, A., Osman, S. M., Supuran, C. T., Özensoy Güler, Ö. (2022). The inhibitory effect of boric acid on hypoxia-regulated tumour-associated carbonic anhydrase IX. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 37(1), 1340–1345.
- Zaťovičová, M., Kajanová, I., Barathová, M., Takáčová, M., Labudová, M., Csaderová, L., Jelenská, L., Švastová, E., Pastoreková, S., Harris, A. L., Pastorek, J. (2022). Novel humanized monoclonal antibodies for targeting hypoxic human tumors via two distinct extracellular domains of carbonic anhydrase IX. *Cancer & Metabolism*, 10(1), 3.
- Závada, J., Zavadová, Z., Pastorek, J., Biesová, Z., Ježek, J., Velek, J. (2000). Human tumour-associated cell adhesion protein MN/CA IX: Identification of M75 epitope and of the region mediating cell adhesion. *British Journal of Cancer*, 82(11), 1808–1813.
- Závada, J., Zavadová, Z., Pastoreková, S., Čiampor, F., Pastorek, J., Zelník, V. (1993). Expression of MaTu-MN protein in human tumor cultures and in clinical specimens. *International Journal of Cancer*, 54(2), 268–274.
- Zhang, J.-H., Chung, T. D. Y., Oldenburg, K. R. (1999). A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *SLAS Discovery*, 4(2), 67–73.