

**YENİ KARBONİK ANHİDRAZ İNHİBİTÖRLERİNİN TASARIMI, SENTEZİ
VE BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI**

Yüksek Lisans Tezi

Delal ERZURUM

Eskişehir 2022

**YENİ KARBONİK ANHİDRAZ İNHİBİTÖRLERİNİN TASARIMI, SENTEZİ
VE BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI**

Delal ERZURUM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmasötik Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Zafer Asım KAPLANCIKLI

Eskişehir

Anadolu Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Haziran 2022

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Delal ERZURUM'un "Yeni karbonik anhidraz inhibitörlerinin tasarımı, sentezi ve biyolojik aktivite çalışmaları" başlıklı tezi 24. 06. 2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	<u>Unvanı-Adı Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof. Dr. Zafer Asım KAPLANCIKLI
Üye	: Prof. Dr. Yusuf ÖZKAY
Üye	: Doç. Dr. Kaan KÜÇÜKOĞLU

Prof. Dr. Gülşen AKALIN ÇİFTÇİ
Enstitü Müdürü

ÖZET

YENİ KARBONİK ANHİDRAZ İNHİBİTÖRLERİNİN TASARIMI, SENTEZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI

Delal ERZURUM

Farmasötik Kimya Anabilim Dalı

Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Haziran 2022

Danışman: Prof. Dr. Zafer Asım KAPLANCIKLI

Karbonik anhidraz (CA) enzimleri birçok organizmada yaygın olarak bulunan katalitik bir enzimdir. Omurgalı ve omurgasızlarda farklı izoformları bulunmaktadır. Omurgalılarda bulunan α -CA izoformunun şimdiye kadar 16 farklı izozimi tespit edilmiştir. Bu enzimin temel görevi vücutta karbondioksitin bikarbonat ve hidrojen iyonuna reversibl dönüşümünü katalizlemektir. Birçok organ ve dokuda yaygın bir dağılım gösterir. pH ve CO₂ homeostazisi, glukoneogenesis, lipogenesis, üregenezis gibi biyokimyasal reaksiyonlar, kemik rezorpsiyonu, kalsifikasyon, tümörjenisite, elektrolit sekresyonu gibi önemli fizyolojik süreçlerde yer alırlar.

Yapılan araştırmalar sonucu karbonik anhidraz enziminin en etkili inhibitörünün sülfonamid grubu bileşikler olduğu tespit edilmiştir. R-SO₂-NH₂ olarak ifade edilen sülfonamid grubu bileşiklerin genel molekül yapısında yer alan R grubu genellikle aromatik veya heteroaromatik halka sistemlerinden oluşmaktadır. Enzimin aktif bölgesinde bulunan Zn⁺² iyonu ile sülfonamidler güçlü etkileşimlerde bulunur.

Bu çalışmada; sülfonamid türevi 10 bileşik sentezlenmiştir. Elde edilen bileşiklerin analizi; ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve Mass spektroskopik yöntemleri analiz bulguları ile aydınlatılmıştır. Elde edilen bileşikler karbonik anhidraz enzimi üzerinde inhibitör etkisi araştırılmıştır. Yüksek aktivite gösteren bileşiklerin, *doking* çalışmaları ile enzim aktif bölgesi ile bağlanma noktaları tespit edilmiştir. CA enzim aktif bölgeleri ile en güçlü etkileşimin **2e** kodlu bileşik ile gözlemlendiği ortaya konmuştur.

Anahtar Sözcükler: Sülfonamid, Karbonik Anhidraz, Doking.

ABSTRACT

DESIGN, SYNTHESIS AND BIOLOGICAL ACTIVITY STUDIES OF NEW CARBONIC ANHYDRASE INHIBITORS

Delal ERZURUM

Department of Pharmaceutical Chemistry

Anadolu University, Graduate School of Health Sciences, June 2022

Supervisor: Prof. Dr. Zafer Asım KAPLANCIKLI

Carbonic anhydrase (CA) enzymes are a common catalytic enzyme in many organisms. Vertebrates and invertebrates have different isoforms. 16 different isozymes of the α -CA isoform found in vertebrates have been identified so far. The main task of this enzyme is to catalyze the reversible conversion of carbon dioxide into bicarbonate and hydrogen ions in the body. It is widely distributed in many organs and tissues. They are involved in important physiological processes such as pH and CO₂ homeostasis, biosynthetic reactions such as gluconeogenesis, lipogenesis, ureogenesis, bone resorption, calcification, tumorigenicity, and electrolyte secretion.

As a result of the researches, it has been determined that the most effective inhibitor of the carbonic anhydrase enzyme is sulfonamides. The R group in the general molecular structure of R-SO₂-NH₂ generally consists of aromatic or heteroaromatic ring systems. The sulfonamides interact strongly with the Zn⁺² ion in the active site of the enzyme. In this study; 10 sulfonamide derivative compounds were synthesized. Analysis of the obtained compounds; ¹H-NMR, ¹³C-NMR and Mass spectroscopic methods are illuminated by the analysis findings. The inhibition effect of the obtained compounds on the carbonic anhydrase enzyme was investigated. For the selected compounds, docking studies were performed and the enzyme active site and binding points were determined. It was revealed that the strongest interaction with CA enzyme active sites was observed with the **2e** coded compound.

Keywords: Sulfonamide, Carbonic Anhydrase, Docking.

TEŐEKKÖR

29/06/2022

Tez alıőamamda yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve yönlendirmeleriyle ufkumu aan, kimyayı daha çok sevmemi sağlayan, her açıdan örnek aldığım çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Zafer Asım KAPLANCIKLI'ya, her sıkıntıda kapısını çaldığım, sorularımı sabırla dinyelen, tez çalıőmam ile ilgili bütün aőamalarda yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Arő. Gör. Dr. Derya OSMANIYE'ye, analiz çalışmaları ile bana yardımcı olan değerli hocam Doç. Dr. Begüm Nurpelin SAĞLIK'a, öğrenim hayatım boyunca üzerimde emeği geçen, eczacılığa ve hayata dair birçok katkıda bulunan diğer tüm hocalarıma teőekkürlerimi sunarım.

Ecz. Delal ERZURUM

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

24.06.2022

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmanın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”nda tarandığını beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkabilecek tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.

Delal ERZURUM

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BAŞLIK SAYFASI	i
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
KISALTMALAR DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1. Karbonik Anhidrazların Katalitik Mekanizmaları	5
1.1.1. Karbonik anhidraz tarafından katalizlenen hidroliz reaksiyonları	6
1.1.2. Redüktaz enzimi olarak karbonik anhidrazlar	7
1.1.3. Oksidaz enzimi olarak karbonik anhidrazlar	7
1.2. Karbonik Anhidraz İnhibisyon Mekanizmaları	7
1.2.1. Çinko Bağlayıcı Karbonik Anhidraz İnhibisyonu	7
1.2.2. Çinko Koordineli Su/Hidroksit İyonuna Bağlanan Karbonik Anhidraz İnhibisyonu	8
1.2.3. Aktif Bölgenin Girişini Tıkayan Karbonik Anhidraz İnhibisyonu.....	8
1.2.4. Aktif Bölgenin Dışına Bağlanan Karbonik Anhidraz İnhibisyonu.....	9
1.3. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri.....	9
1.3.1. Diüretik CA inhibitörleri.....	14

1.3.2. Glokomda CA inhibitörleri.....	15
1.3.3. Obezitede CA inhibitörleri.....	17
1.3.4. Antikanser CA inhibitörleri.....	18
1.3.5. Osteoporozda potansiyel CA inhibitörleri.....	20
1.3.6. Omurgasızlarda CA ve inhibisyonu	21
2. KAYNAK BİLGİSİ	24
2.1. Karbonik Anhidraz Enzim İnhibitörü Çalışmalarına Konu Olmuş Sülfonamid Türevleri	24
3. GEREÇLER.....	33
3.1. Kullanılan Maddeler.....	33
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	34
4. YÖNTEMLER	35
4.1. Sentez Çalışmaları.....	35
4.1.1. 2-Kloro-N-(4-aminosülfonilfenil)asetamit (1) sentezi (Yöntem A) ...	35
4.1.2. 2-(4-Süstitüepiperazin-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit türevlerinin sentezi (Yöntem B)	35
4.2. İTK Çalışmaları ve R _f Değerlerinin Saptanması	35
4.3. Erime Noktası Tayini.....	36
4.4. ¹ H-NMR Spektrumlarının Alınması.....	36
4.5. ¹³ C-NMR Spektrumlarının Alınması.....	36
4.6. Kütle Spektrumlarının Alınması	36
4.7. Biyolojik Aktivite Çalışmaları	36
4.8. Moleküler Modelleme Çalışmaları	38
5. BULGULAR ve TARTIŞMALAR.....	39
5.1. Sentez Çalışmaları.....	39
5.1.1. 2-Kloro-N-(Aminosülfonilfenil)asetamit (1)	39

5.1.2. 2-(4-Sübstitüepiperazin-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit türevleri (2a-2j)	40
5.1.3. 2-(4-Metilpiperazin-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2a)	40
5.1.4. 2-(4-Etilpiperazin-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2b).....	43
5.1.5. 2-(4-(2-Hidroksietil)piperazin)-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2c).....	46
5.1.6. 2-(4-(2-Hidroksipropil)piperazin-1-il)-N-(4- sulfamoilfenil)asetamit (2d)	49
5.1.7. 2-(4-(2-(Dimetilamino)etil)piperazin)-1-il)-N-(4- sulfamoilfenil)asetamit (2e).....	52
5.1.8. 2-(4-(4-Florobenzil)piperazin)-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2f)	55
5.1.9. 2-(4-(4-Klorobenzil)piperazin)-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2g)	57
5.1.10. 2-(4-(4-Metilbenzil)piperazin)-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2h)	60
5.1.11. 2-(4-(4-Metilsülfonil)piperazin)-1-il)-N-(4- sulfamoilfenil)asetamit (2i)	63
5.1.12. 2-(4-(4-Etilsülfonil)piperazin)-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2j)	66
5.2. Sentez Çalışmalarının Değerlendirilmesi.....	69
5.3. Spektral Verilerin Değerlendirilmesi	69
5.3.1. ¹ H-NMR spektrumlarının değerlendirilmesi	69
5.3.2. ¹³ C-NMR spektrumlarının değerlendirilmesi.....	70
5.3.3. Kütle spektrumlarının değerlendirilmesi	71
5.4. Biyolojik Aktivite Çalışmalarının Değerlendirilmesi	71
5.5. Moleküler Modelleme Çalışmalarının Değerlendirilmesi	73
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	82

KAYNAKÇA.....	83
ÖZGEÇMİŞ	

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1.1. İnsan karbonik anhidraz enzimi dağılım, lokalizasyon ve katalitik aktivitesi [4,5].....	2
Tablo 1.2. Karbonik anhidraz inhibitörleri	11
Tablo 1.3. İnhibitör Aktiviteleri Araştırılması Planlanan Sentez Ürünleri.	23
Tablo 5.1. Elde edilen bileşiklerin 10^{-3} ve 10^{-4} M konsantrasyonlarında CA enzimine karşı % inhibisyon oranları.	72
Tablo 5.2. Bileşikler 2a, 2c, 2e, 2f ve referans bileşik asetazolamidin 10^{-3} ve 10^{-9} M konsantrasyonlarında CA enzimine karşı % inhibisyon oranları ve IC_{50} değerleri.	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. α -CA'ların katalizlediği reaksiyonlar [87]	3
Şekil 1.2. Biyosentetik süreçlerde bikarbonat iyonunun substrat olduğu karboksilasyon reaksiyonları [118]	4
Şekil 1.3. CA'nın CO ₂ hidrasyonu katalizinin şematik gösterimi [87].....	6
Şekil 1.4. Karbonik anhidraz enzimi ile ester hidrolizi	6
Şekil 2.1. 4-(3-Fenilüreido)-N-(4-sülfamoilfenetil)butanamid	24
Şekil 2.2. 4-[3-(4-Bromofenil)-5-tiyokso-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]benzensülfonamid.....	24
Şekil 2.3. 4-(3-Fenilsülfonilfuroksan-4-iloksi)benzensülfonamid	25
Şekil 2.4. (S)-4-Etoksi-N-(2-hidroksipropil)-3-(3-metil-1-p-tolil-1H-pirazolo[4,3-e][1,2,4]triazin-5-il)benzensülfonamid	25
Şekil 2.5. N'-((5-(4-Klorofenil)furan-2-il)metilen)-2-((5-(fenilamino)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)tiyo)asetohidrazid	26
Şekil 2.6. (R)- 4-(3-benzil-4-metilpiperazin-1-karbonil)benzen-1-sülfonamid	26
Şekil 2.7. (E)-4-(2-(4-(4-(Furan-2-karbonil)piperazin-1-il)benziliden)hidrazinil)benzensülfonamid	27
Şekil 2.8. (S)-N-(1-okso-1-((4-sülfamoilbenzil)amino)propan-2-il)furan-2-karboksamid	27
Şekil 2.9. N-(5-((4-Klorobenzil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)-4-metilbenzenesülfonamid	27
Şekil 2.10. 2,2'-[(6-({2-(4-Sülfamoilfenil)etil} amino)-1,3,5-triazin-2,4-diil)diimino]bis(3-(4-hidroksifenil)propanoik asit)	28
Şekil 2.11. 4-(2-(2-Okso-2-fenil-1-(fenilsülfonil)etilidene)hidrazineil)benzenesülfonamid.....	28
Şekil 2.12. N ¹ -(2-Metil-4-(1-(4-sülfamoil fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)fenil)-N ₄ -((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimetil)tetrahidro-2H-piran-2-il)süksinamid	29
Şekil 2.13. Etil 7-metil-3-(4-sülfamoilbenzamido)pirazolo[1,5-a]pirimidin-6-karboksilat	30
Şekil 2.14. 4-(2-(2-Methoksifenil)-4,5-difenil-1H-imidazol-1-il)benzen sülfonamid ...	30

Şekil 2.15. 3-Bromo-4-(4,5,6,7-Tetrakloro-1,3-Dioksoizindolin-2-il) benzenesülfonamid	31
Şekil 2.16. 2-Metil-5-(6-fenilimidazo[2,1-b][1,3,4]tiyadiazol-2-il)benzenesülfonamid	31
Şekil 2.17. 2-(Benzo[d][1,3]dioksol-5-il)-N-(4-sülfamoilfenil)kinolin-4-karboksamid bileşiğinin kimyasal yapısı.....	32
Şekil 2.18. 2-Metil-4-okso-3-(4-sülfamoilfenetil)-3,4,5,6-tetrahidro-2H-2,6-metanobenzo[g] [1,3]oksazosin-5-karboksamid.....	32
Şekil 4.1. 2-Kloro-N-(4-sülfamoilfenil)asetamit (1) sentezi	35
Şekil 4.2. 2-(4-Sübstitüepiperazin-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit türevlerinin sentezi	35
Şekil 5.1. 2-Kloro-N-(4-aminosülfonilfenil)asetamit (1) bileşiği	39
Şekil 5.2. 2-Kloro-N-(4-aminosülfonilfenil)asetamit (1) sentezi için önerilen reaksiyon mekanizması	39
Şekil 5.3. 2-(4-Sübstitüepiperazin-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit türevlerinin (2a-2n) genel yapısı	40
Şekil 5.4. 2-(4-Metilpiperazin-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2a) bileşiği.....	40
Şekil 5.5. Bileşik 2a'ya ait ¹ H-NMR spektrumu	41
Şekil 5.6. Bileşik 2a'ya ait ¹³ C-NMR spektrumu	41
Şekil 5.7. Bileşik 2a'ye ait kütle spektrumu	42
Şekil 5.8. 2-(4-Etilpiperazin-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2b) bileşiği	43
Şekil 5.9. Bileşik 2b'ye ait ¹ H-NMR spektrumu	44
Şekil 5.10. Bileşik 2b'ye ait ¹³ C-NMR spektrumu	44
Şekil 5.11. Bileşik 2b'ye ait kütle spektrumu	45
Şekil 5.12. 2-(4-(2-Hidroksietil)piperazin)-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2c) bileşiği.....	46
Şekil 5.13. Bileşik 2c'ye ait ¹ H-NMR spektrumu	47
Şekil 5.14. Bileşik 2c'ye ait ¹³ C-NMR spektrumu	47
Şekil 5.15. Bileşik 2c'ye ait kütle spektrumu	48
Şekil 5.16. 2-(4-(2-Hidroksipropil)piperazin)-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2d) bileşiği.....	49
Şekil 5.17. Bileşik 2d'ye ait ¹ H-NMR spektrumu	50
Şekil 5.18. Bileşik 2d'ye ait ¹³ C-NMR spektrumu	50
Şekil 5.19. Bileşik 2d'ye ait kütle spektrumu.....	51

Şekil 5.20. 2-(4-(2-(Dimetilamino)etil)piperazin)-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2e) bileşiği.....	52
Şekil 5.21. Bileşik 2e'ye ait ¹ H-NMR spektrumu	53
Şekil 5.22. Bileşik 2e'ye ait ¹³ C-NMR spektrumu	53
Şekil 5.23. Bileşik 2e'ye ait kütle spektrumu	54
Şekil 5.24. 2-(4-(4-Florobenzil)piperazin)-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2f) bileşiği.....	55
Şekil 5.25. Bileşik 2f'ye ait ¹ H-NMR spektrumu.....	56
Şekil 5.26. Bileşik 2f'ye ait ¹³ C-NMR spektrumu.....	56
Şekil 5.27. Bileşik 2f'ye ait kütle spektrumu	57
Şekil 5.28. 2-(4-(4-Klorobenzil)piperazin)-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2g) bileşiği.....	57
Şekil 5.29. Bileşik 2g'ye ait ¹ H-NMR spektrumu	58
Şekil 5.30. Bileşik 2g'ye ait ¹³ C-NMR spektrumu	58
Şekil 5.31. Bileşik 2g'ye ait kütle spektrumu.....	59
Şekil 5.32. 2-(4-(4-Metilbenzil)piperazin)-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2h) bileşiği.....	60
Şekil 5.33. Bileşik 2h'ye ait ¹ H-NMR spektrumu	61
Şekil 5.34. Bileşik 2h'ye ait ¹³ C-NMR spektrumu	61
Şekil 5.35. Bileşik 2h'ye ait kütle spektrumu.....	62
Şekil 5.36. 2-(4-(4-Metilsülfonil)piperazin)-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2j) bileşiği.....	63
Şekil 5.37. Bileşik 2j'ye ait ¹ H-NMR spektrumu.....	64
Şekil 5.38. Bileşik 2j'ye ait ¹³ C-NMR spektrumu.....	64
Şekil 5.39. Bileşik 2j'ye ait kütle spektrumu.....	65
Şekil 5.40. 2-(4-(4-Etilsülfonil)piperazin)-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2k) bileşiği.....	66
Şekil 5.41. Bileşik 2k'ye ait ¹ H-NMR spektrumu	67
Şekil 5.42. Bileşik 2k'ye ait ¹³ C-NMR spektrumu	67
Şekil 5.43. Bileşik 2k'ye ait kütle spektrumu.....	68
Şekil 5.44. Hedef bileşiklerin sentezi	69

Şekil 5.45. Bileşik 2e'nin CA-I enzim aktif bölgesiyle etkileşiminin iki boyutlu görünümü (PDB ID: 1AZM)	74
Şekil 5.46. Bileşik 2e'nin CA-I enzim aktif bölgesiyle etkileşiminin üç boyutlu görünümü (Enzim aktif bölgesindeki amino asitler turuncu renkli, bileşik 2e ise yeşil renkli gösterilmiştir).....	75
Şekil 5.47. Bileşik 2e'nin CA-II enzim aktif bölgesiyle etkileşiminin iki boyutlu görünümü (PDB ID: 3HS4)	76
Şekil 5.48. Bileşik 2e'nin CA-II enzim aktif bölgesiyle etkileşiminin üç boyutlu görünümü (Enzim aktif bölgesindeki amino asitler turuncu mor, bileşik 2e ise yeşil renkli gösterilmiştir).....	77
Şekil 5.49. Bileşik 2e'nin CA-IX enzim aktif bölgesiyle etkileşiminin iki boyutlu görünümü (PDB ID: 7JO2).....	78
Şekil 5.50. Bileşik 2e'nin CA-IX enzim aktif bölgesiyle etkileşiminin üç boyutlu görünümü (Enzim aktif bölgesindeki amino asitler turuncu sarı, bileşik 2e ise yeşil renkli gösterilmiştir).....	79
Şekil 5.51. Bileşik 2e'nin CA-XII enzim aktif bölgesiyle etkileşiminin iki boyutlu görünümü (PDB ID: 1JD0).....	80
Şekil 5.52. Bileşik 2e'nin CA-XII enzim aktif bölgesiyle etkileşiminin üç boyutlu görünümü (Enzim aktif bölgesindeki amino asitler turuncu mavi, bileşik 2e ise yeşil renkli gösterilmiştir).....	81

KISALTMALAR DİZİNİ

Å	: Angstrom
CA	: Karbonik Anhidraz
hCA	: İnsan Karbonik Anhidrazı
His	: Histidin
Glu	: Glutamin
Thr	: Treonin
Val	: Valin
Leu	: Lösin
X-ray	: X ışını
ZBG	: Çinko bağlayıcı grup
SG	: Yapışkan grup
¹³ C-NMR	: Karbon nükleer manyetik rezonans
DMF	: Dimetilformamit
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DMSO- <i>d</i> ₆	: Dötorodimetilsülfoksit
DTNB	: 5-5'-Ditiyobis(2-nitrobenzoik asit)
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
E.n.	: Erime noktası
ESI	: Elektron Sprey İyonizasyon
¹ H-NMR	: Proton Nükleer Magnetik Rezonans
HRMS	: Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi
IC ₅₀	: %50 İnhibisyon konsantrasyonu
IR	: Kırmızı ötesi
İTK	: İnce tabaka kromatografisi
J	: Eşleşme sabiti
m/z	: Kütle/yük
AG	: Bağlanan grup
PC	: Pürivat karboksilaz
ACC	: Asetil-CoA karboksilaz
AMPA	: α-Amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propiyonik asit
GABA	: γ-Aminobutirik asit

HIF	: Hipoksi ile indüklenebilir faktör
pVHL	: wild-type von Hippel Lindau tümör baskılayıcı protein
CDK2	: Siklin bağımlı kinaz 2
MDCK	: Madin-Darby köpek böbrek
CPSaz	: Karbamoil-fosfat sentetaz
AMP	: Adenozin monofosfat

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Karbonik anhidrazlar karbondioksitin bikarbonata reversibl hidrasyonunu etkili bir şekilde katalizleyen yaygın enzimlerdir. Omurgalılarda bulunan α -CA enziminin şimdiye kadar 16 izoformu bulunmaktadır ve lokalizasyonuna göre dört gruba ayrılırlar. Bunlar; sitozolik, mitokondriyal, salgısal, membrana bağlı izoformlardır. Diğer organizmalarda bulunan CA'lar sekiz farklı genetik yapı olan α -, β -, γ -, δ -, ζ -, η -, θ - ve ι -CA tarafından kodlanmıştır ve aktif bölgede bulunan metal iyonlarında farklılık göstermektedirler [1,2]. Bütün insan CA'ları aktif bölgesinde üç histidin rezidü ve bir su molekülü / hidroksit iyonu ile koordine Zn^{+2} içeren α -CA'dır [3]. Bu izoformlar moleküler özellikler, hücresel lokalizasyon, organ ve doku dağılımı, ekspresyon bölgeleri ve farklı inhibitör sınıflarına yanıt açısından farklılık göstermektedir. hCA I-III, hCA VII ve hCA XIII sitozolik; hCA IV, hCA IX, hCA XII ve hCA XIV membrana bağlı; hCA VA ve hCA VB mitokondriyal izoformlardır. CA VIII, X ve XI bilinen akatalitik izoformlardır [4,5].

Tablo 1.1. İnsan karbonik anhidraz enzimi dağılım, lokalizasyon ve katalitik aktivitesi [4,5]

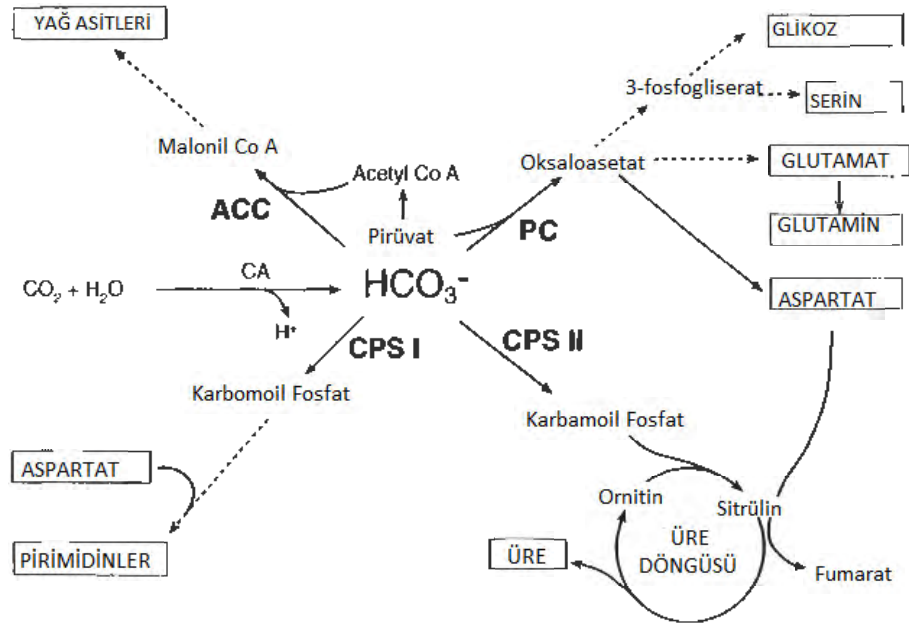
CA izoformları	Katalitik aktivite (CO ₂ hidrasyonu)	Subselüler lokalizasyon	Organ/doku dağılımı
CA I	Zayıf	Sitozol	Eritrosit, gastrointestinal sistem ve göz
CA II	Yüksek	Sitozol	Eritrosit, göz, gastrointestinal sistem, kemik osteoklastları, böbrek, akciğer, testis ve beyin
CA III	Çok zayıf	Sitozol	İskelet kasları ve adipositler
CA IV	Orta	Membrana bağlı	Böbrek, akciğer, pankreas, beyin kapilleri, kolon, kalp kası, göz
CA VA	Zayıf	Mitokondri	Karaciğer
CA VB	Yüksek	Mitokondri	Kalp ve iskelet kası, pankreas, böbrek, omurilik, gastrointestinal sistem
CA VI	Zayıf	Tükürük ve süt salgısı	Tükürük ve meme bezi
CA VII	Yüksek	Sitozol	Santral sinir sistemi
CA VIII	Akatalitik	Sitozol	Santral sinir sistemi
CA IX	Yüksek	Transmembran	Tümörler ve gastrointestinal mukoza
CA X	Akatalitik	Sitozol	Santral sinir sistemi
CA XI	Akatalitik	Sitozol	Santral sinir sistemi
CA XII	Zayıf	Transmembran	Böbrek, intestin, reproduktif epitel, göz, tümörler, santral sinir sistemi
CA XIII	Zayıf	Sitozol	Böbrek, beyin, akciğer, bağırsak, reproduktif sistem
CA XIV	Zayıf	Transmembran	Böbrek, beyin, karaciğer ve göz

Bu enzimler aktif olarak karbondioksitin bikarbonat iyonu ve proton iyonuna iki aşamalı reversibl olarak katalize ederler. CA'lar çok sayıda başka reaksiyonları da katalize eder. Siyanatın karbamik aside, siyanamidin üreye, sülfonil klorürün sülfonik aside, aldehytlerin alkollere dönüşümünü katalizlerler. Ayrıca esterase aktivitesi ile esterleri karboksilik asit, sülfonik asit ve fosforik asit türevleri oluştururlar [6,7].

$\text{O}=\text{C}=\text{O} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$
$\text{O}=\text{C}=\text{NH} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{NCOOH}$
$\text{NH}=\text{C}=\text{NH} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{NCONH}_2$
$\text{RCHO} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RCH(OH)}_2$
$\text{RCOOAr} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RCOOH} + \text{ArOH}$
$\text{RSO}_2\text{Ar} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{RSO}_2\text{H} + \text{ArOH}$
$\text{ArF} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HF} + \text{ArOH}$
Ar: 2,4-Dinitrofenil
$\text{PhCH}_2\text{OCOCI} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{PhCH}_2\text{OH} + \text{CO}_2 + \text{HCl}$
$\text{RSO}_2\text{Cl} + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HSO}_2\text{H} + \text{HCl}$
R: Metil; Fenil

Şekil 1.1. α -CA'ların katalizlediği reaksiyonlar [87]

Birçok organ ve dokuda enzimin ekspresyonu fizyolojik öneminin göstergesidir. CA'ların katalizlediği reaksiyonlar çok sayıda fizyolojik ve patolojik süreçte yer alır. Bunlar; solunum, CO₂ ve bikarbonatın dokular akciğerler arasında transportu, pH ve CO₂ homeostazisi, çeşitli organ ve dokuda elektrolit sekresyonu, glukoneogenesis, lipogenesis, üreogenesis gibi biyosentetik reaksiyonlar, kemik rezorpsiyonu, kalsifikasyon ve tümörjenisite, patojenlerin virülansıdır [8-11].



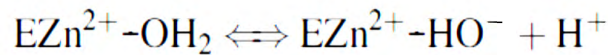
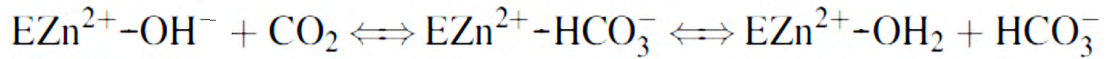
Şekil 1.2. Biosentetik süreçlerde bikarbonat iyonunun substrat olduğu karboksilasyon reaksiyonları [118]

CA araştırmaları glokom, obezite, osteoporoz, kanser, yüksek irtifa hastalığı, epilepsi, nöropatik ağrı, uyku apnesi gibi hastalıkların tedavisine önemli katkı sağlamıştır. Bu nedenle klinik uygulamalarda birçok hCA izoformları önemli hedeflerdir [12-14]. CA I birçok dokuda yaygın olarak bulunur, retina ve beyin ödemi gibi patolojik durumlarda etkilidir [15]. CA II çok sayıda dokuda bol miktarda bulunur ve glokom, epilepsi, ödem, yüksek irtifa hastalığı ve renal bozukluklar gibi patolojik durumlarda önemli rol oynar [16-17]. CA III oksidatif stres ile bağlantılıdır. Bu nedenle çeşitli inflamatuvar hastalıkla ilişkilidir (myastenia gravis, romatoid artrit gibi) [18-20]. CA IV izoformu glokom, inme ve retinitis pigmentosa gibi hastalıklarda önemli ilaç hedefidir [21,22]. Mitokondriyal izoformlar olan CA VA, VB'nin obezitedeki etkinliği kanıtlanmıştır [23]. CA VI izoformu hakkında daha az çalışma yapılmıştır ve bere oluşumu ile ilişkilidir [24]. CA VII epilepsi rol oynar, CA II ve XIV ile birlikte beyindeki kognitif süreçlerde yer alır [25,26]. CA VIII, nörodejeneratif bozuklukların yanı sıra zekâ geriliği ile ilişkisi nedeniyle incelenmiştir. Bununla beraber akatalitik izoformlar olan CA VIII, X ve XI'in fizyolojik işlevleri hakkında yeterli bilgi yoktur [27]. CA IX ve CA XII, hipoksik tümörler/metastazlarda rol oynar ve bu izoformların inhibisyonu, tümör büyümesini, ilerlemesini ve metastazı aktif olarak kontrol eder. CA IX izozimi hipoksik tümörler için önemli bir belirteç olduğu düşünülmektedir. CA XII izoformu CA XI ile karşılaştığında daha az araştırılmıştır. Fakat tümör progresyonunda rolü olduğu birkaç çalışmada ortaya konulmuştur [28-31]. Bazı çalışmalarda ise epilepsi ve santral sinir sistemi

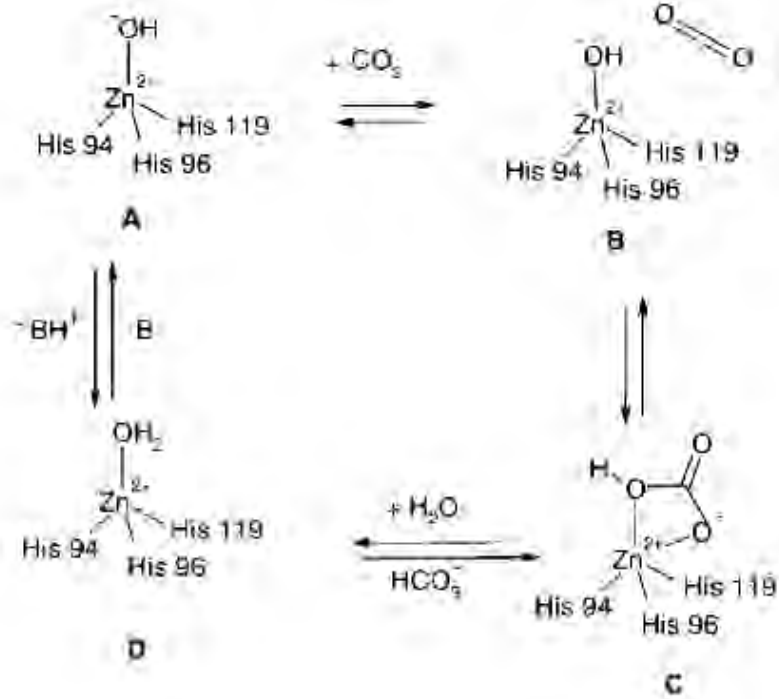
bozukluklarındaki rolünden bahsedilmiştir [32]. CA XIII izoformu ise sperm motilitesindeki rolü incelenmiştir [33]. Ayrıca CA XIV epilepsi ve bazı retinopatilerde hedef olarak görülmüştür [34,35].

1.1. Karbonik Anhidrazların Katalitik Mekanizmaları

CA'ların Zn^{++} iyonu kataliz için gereklidir [36-38]. Metal iyonunun 15 Å derinliğindeki aktif bölge yarığında üç histidin rezidü (His 94, His 96 ve His 119) ve bir su molekülü/ hidroksit iyonu tarafından koordine edildiği X-ray kristallografik verileri ile gösterilmiştir [36-39]. Çinko su bağı Glu 106'nın karboksilat parçasına köprülenen Thr 199'un hidroksil parçası ile hidrojen bağı etkileşimlerine girer. Bu etkileşimler çinkoya bağlı su molekülünün nükleofilliğini artırır ve substratı (CO_2) nükleofilik saldırı için uygun bir konuma yönlendirir. [37-40]. Enzimin Zn^{++} 'ya hidroksid bağlı aktif formu temel formudur [40]. Bu güçlü nükleofil komşuluğunda hidrofobik bir cepte bağlı CO_2 molekülüne saldırır (CA II Val 121, Val 143 ve Leu 198 rezidülerinde bulunan yakalaması zor substrat bağlama bölgesi) Zn^{++} koordineli bikarbonat oluşumuna yol açar. Daha sonra bikarbonat iyonu su molekülü ile yer değiştirir ve çözeltiye salınır, böylece katalitik olarak inaktif olan Zn^{++} su bağı enzimin asit formu oluşur [37-39]. Bazı form A yeniden oluşturmak için aktif bölgeden çevreye ya aktif bölge rezidüleri (örneğin; His 64 - izozim CA I ve II'deki proton mekiği) ya da ortamda bulunan tamponlar tarafından desteklenen bir proton transferi meydana gelir. Süreç şematik olarak şu şekilde özetlenebilir:



Reaksiyonun hız belirleyici basamağı çinko-hidroksitin oluştuğu ikinci basamaktır [40]. CA II, CA IV, CA V, CA VII ve CA IX gibi katalitik olarak çok aktif izozimlerde, proses aktif bölgenin girişine yerleştirilen bir histidin kalıntısı (His 64) ve ayrıca aktif bölgenin kenarından enzimin yüzeyine uzanan bir histidin kümesi tarafından desteklenir, böylece verimli proton transferi sağlanır [39]. Bu aynı zamanda CA II' nin neden bilinen en aktif enzimlerden biri olduğunu ($k_{cat}/K_m = 1.5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{sn}^{-1}$) ve difüzyon sınırına yaklaştığını ve ayrıca klinik uygulamalara sahip inhibitörlerin tasarımı için önemli sonuçlara sahip olduğunu da açıklar.

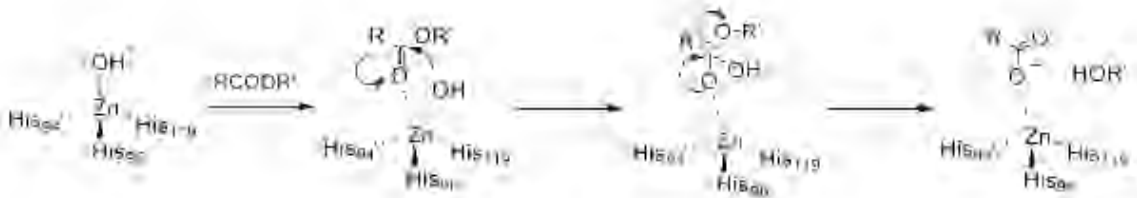


Şekil 1.3. CA'nın CO₂ hidrasyonu katalizinin şematik gösterimi [87]

CA'lar sadece karbondioksit ve bikarbonat arasındaki reversibl dönüşümü katalize etmekle kalmaz çeşitli katalitik süreçlerde de yer alır.

1.1.1. Karbonik anhidraz tarafından katalizlenen hidroliz reaksiyonları

Esterlerin hidrolizi gibi karbonil sistemlerinin katalizinde rol aldığı bildirilmiştir [41]. 15-Å genişliğinde ve 15-Å derinliğinde hidrofobik cepte çinko iyonuna yakın CO₂ den çok daha büyük ligantlar katalizlenir. Bu esteraz aktivitesi muhtemelen CO₂ hidrasyonu ile ester hidrolizinin mekanik benzerliğinden kaynaklanmaktadır. Birçok çalışmada CA'ların aktif bölgesindeki farklı mutasyonların artan esteraz aktivitesine neden olduğu gösterilmiştir [42,43]. Bu mutasyonlar CA aktif bölgenin sterik adaptasyonu ile daha büyük ligantların yerleşmesini sağlayarak aktiviteyi artırır. Aldehitlerinde esterler gibi CA tarafından hidrolize edildiği yapılan çalışmalarda bildirilmiştir [46].



Şekil 1.4. Karbonik anhidraz enzimi ile ester hidrolizi

CA katalitik bölgesinde güçlü nükleofil olan çinko bağlı hidroksit iyonu siyanamid gibi diğer moleküllerin hidrolizine olanak sağlar. Siyanamid lineer, CO₂ ile izoelektronik bir moleküldür. CA üre formuna hidrasyonunu katalizler, enzimin aktif bölgesinde Zn⁺⁺ ile üreat anyonu olarak bağlanır [47, 48].

Son zamanlarda CA hidroliz reaksiyonu H₂S üretimi için kullanılmıştır. Küçük gaz halinde bir biyomolekül olan H₂S önemli fizyolojik rolü ile dikkat çekmiştir. Hem endojen sentezlenen H₂S hem eksojen H₂S uygulaması çeşitli hastalıkların farklı evrelerinde koruyucu etkileri gözlenmiştir [49]. CA'ın doğal substratı olmayan COS irreversibl katalizi ile H₂S oluşur ve karbonil sülfür toksik etkiden sorumludur [50].

1.1.2. Redüktaz enzimi olarak karbonik anhidrazlar

CA üzerinde çeşitli mutasyonlar ile enzime redüktif etki kazandırılmıştır. Kazlauskas vd., tarafından 2009 yılında çinko yerine rodyum iyonu bağlayarak yeni bir katalitik aktivite kazandırılmıştır. Çinko ile rodyumun iyonik yarıçaplarının benzemesi, histidin rezidülerinin rodyum ile iyi ligant oluşturması nedeniyle rodyum seçilmiştir [51]. Bir diğer redüktaz etkinliğine sahip karbonik anhidraz Cu-CA'dır. Bu enzim nitritin vazodilatasyonda önemli rol oynayan nitroksite redüksiyonu katalizler. Enzim aktif bölgesinde ve yarığın girişinde bulunmak üzere iki bakır bulunduğu redüktaz aktivitesine sahiptir [52-55]. Ward ve ark., tarafından farklı para süstitüe aril sülfonamidler bağlanarak iridyum kompleksi enzimin aktif bölgesine bağlanmış ve redüktaz aktivitesi gözlenmiştir [56].

1.1.3. Oksidaz enzimi olarak karbonik anhidrazlar

Yakın zamandaki araştırmalarda iridyum kompleksi içeren CA enziminin oksidaz etkinliğine odaklanılmıştır. Ir-CA pH, sıcaklık gibi fizyolojik koşullara duyarlıdır. pH arttırıldığında enzimin oksidaz aktivitesinin artması bu durumu desteklemektedir [63]. Soumillion ve ark., tarafından epoksid-sentaz etkinliğine sahip Mn-CA enzimi keşfedilmiştir. Enantioselektif oksidasyon aktivitesi enzimden çinko iyonu yerine manganez iyonu eklenerek elde edilmiştir [57].

1.2. Karbonik Anhidraz İnhibisyon Mekanizmaları

1.2.1. Çinko Bağlayıcı Karbonik Anhidraz İnhibisyonu

Çinko bağlayıcı inhibisyon mekanizması sülfonamidler, sülfamatlar ve sülfamidlerin etkileşimini kapsar. Bu CA inhibitörleri anyon formunda enzimin aktif bölgesinde Zn⁺⁺ iyonu ile tetrahedral yapı oluşturur ve çinko bağlayıcı grup (ZBG) metal ile direkt etkileşir. Sülfonamidler, sülfamatlar ve sülfamidlerin bu şekilde bağlandığını

gösteren X-ray kristallografi kanıtları bulunmaktadır. ZBG aynı zamanda α -CA'da bulunan, "kapı bekçileri" gibi hareket eden Thr199 ve Glu106 (Thr 199 Glu106'nın karboksil parçası ile hidrojen bağı yapar) ile etkileşime girer [58-61].

CA inhibitör tasarımı son zamanlarda ana konu farklı patolojilerde izozime selektif inhibitör tasarımıdır. Primatlarda bulunan izozimlerin aynı yapıya sahip olması işi zorlaştırmaktadır. Bu nedenle alternatif yaklaşımlar ileri sürülmüştür. Bu alternatif yaklaşımlardan "kuyruk yaklaşımı" en başarılı olanıdır. Amino, imino, hidroksi gruplarının türevlerine sahip aromatik, heterosiklik sülfonamidlerin iskeletlerine kuyruk eklenmesine dayanır. Kuyruk aktif bölge kavitesinin ortası ve kenarından aminoasitlerle etkileşime girebilecek kadar uzun tasarlanır. Çinko bağlayıcı CA inhibitörleri de kuyruk ve iskeletten oluşur [58,61,62].

1.2.2. Çinko Koordineli Su / Hidroksit İyonuna Bağlanan Karbonik Anhidraz İnhibisyonu

Bu inhibisyon mekanizması için ilk bildirilen bileşik fenol'dür [63]. Bir ikincisi ise poliamin spermin'dir [64]. Bu mekanizma ile inhibisyon sağlayan bileşikler iskelete bağlı kuyruklar ile aktif bölgenin iki yarısı ile etkileşen bağlanan grup (AG) içerir (çinko bağlayıcılar gibi). Çinko bağlayıcılar ile aralarındaki temel fark inhibitörün metal iyonu ile direkt temas halinde olmamasıdır. Bağlanan grup fenolik OH [63], primer amin [64], COOH [65], COOMe [66] ve SO₃H [67] gibi çeşitli fonksiyonel gruplar olabilir. Bu bileşiklerin iskeletleri aromatik, alifatik, heterosiklik ya da şeker tipinde olabilen α ve β -CA'lara karşı inhibitör aktivite gösterir [67-76]. Fenolün H atomu ile çinko ligandının OH⁻ iyonu arasında hidrojen bağı oluşarak bağlanır. Ek olarak ikinci bir hidrojen bağı kapı bekçisi Thr199'un -NH grubu ve fenol arasında oluşur [63]. Spermin fenol ile oldukça benzer şekilde bağlanır. İnhibitörün bir primer amin parçası (muhtemelen amonyum tuzu) ile su/hidroksit iyonu koordineli çinko arasında ve bir ikincisi Thr 199'un OH⁻ iyonu ile hidrojen bağı oluşturur [64].

1.2.3. Aktif Bölgenin Girişini Tıkayan Karbonik Anhidraz İnhibisyonu

Çinko bağlayıcılar ve çinko koordineli su/hidroksit iyonuna bağlananlara göre metal iyonundan biraz daha uzağında aktif bölgenin girişine bağlanır. Bu inhibisyon mekanizmasına sahip bileşikler aromatik, heterosiklik, alifatik yapıda iskelete bağlı yapışkan gruba (SG) sahiptir. Bu bileşikler kavitenin çok uzağına bağlandığı için aktif bölgeden uzağa uzanabilen bir kuyrukta bulundurulabilirler. Bu inhibisyon mekanizması ilk olarak kumarinler ile kanıtlanmıştır fakat daha sonra antiepileptik olan lakozamid,

sübstitüe kumarinler, 5 ve 6 üyeli laktonlar ve tiyolaktonlar ya da kinolinlerde önemli CA inhibitör özellik gözlenmiştir [76-83].

1.2.4. Aktif Bölgenin Dışına Bağlanan Karbonik Anhidraz İnhibisyonu

Bu inhibisyon mekanizması, oldukça yakın zamanda keşfedilen son mekanizmadır. 2-(benzilsülfolil)-benzoik asit hCA II ile birlikte kristalleştirildiğinde, inhibitörün elektronik yoğunluğu aktif bölgede değil, aktif bölgeye bitişik bir bağlanma cebinde gözlenmiştir. Böylece, bu bileşik enzimin aktif bölgesinin dışında oldukça uzağa bağlanır. Enzimin His64 kalıntısı dış konformasyonunda aktif bölgesinin dışında proton mekiğini bloke ederek etki ederler. Bu amino asit kalıntısı (His64), aktif bölge boşluğunun dışına doğru, biri içeri (metal iyonuna daha yakın) ve diğeri dışarı olmak üzere iki ana konformasyonla yüksek bir esnekliğe sahiptir. Çinko ile koordine sudan bir proton kabul ederek, bu aminoasit kalıntısının imidazol kısmı protonlanır, oysa dışarıdayken aynı proton çevreye aktarılabilir [84].

1.3. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri

Bilinen iki ana CA inhibitör (CA I) sınıfı vardır. Bunlar metal ile kompleks oluşturan anyonlar, sübstitüe olmayan sülfonamidler ve sülfamat, sülfamid gibi biozosterlerdir [Şeki 11]. Bu inhibitörler Zn^{++} iyonu ile bağlanarak ya non-protein ligand ile tetrahedral yapı oluşturur ya da metal koordinasyonu ile trigonal bipiramidal yapı oluşturur [85-91]. Klinik olarak kullanılan en az 25 ilacın önemli CA inhibe edici özelliklere sahip olduğu ve birçoğunun sülfonamid, sülfamat, sülfamid türevleri olduğu bildirilmiştir [85-87,89,91,92,103-109].

CA inhibitörleri arasında asetazolamid (Bileşik 1), metazolamid (Bileşik 2), etokszolamid (Bileşik 3), sultiam (Bileşik 4), diklorofenamid (Bileşik 5) klasik inhibitörlerdir. Ayrıca CA inhibitörleri arasında dorzolamid (Bileşik 6), brinzolamid (Bileşik 7), indisulam (Bileşik 8), topiramid (Bileşik 9), zonisamid (Bileşik 10), sulpirid (Bileşik 11), coumate (Bileşik 12), emate (Bileşik 13), selekoksib (Bileşik 14), valdekoksib (Bileşik 15) ve sakkarin (Bileşik 16) gibi daha yeni ilaçlar ya da araştırma ajanları da bulunur [Şekil 1]. Bileşik 17 ve 18 tümör ilişkili CA IX izoformunu hedefleyen araştırma ajanlarıdır. Bu bileşiklerin çoğu, ilk olarak yıllar önce diüretik araştırmaları sırasında geliştirilmiştir; bunların arasında tiyazidlerin de olduğu (bileşik 19a-e) türevler 20-25 tanesi klinikte yaygın olarak kullanılmaktadır [86,87]. Ancak bu enzim inhibitörlerinin bazıları glokomun sistemik tedavisinde kullanılabilir ve son

zamanlarda yeni türevler potansiyel topikal antiglokom ajan olarak, antitümör, antiobezite, antiinfektif ilaç olarak da kullanılmaktadır [85-87,89,91,93-110].

Spesifik izozimler farklı biyolojik yanıtlardan sorumlu olduğu için farklı izozimlerin inhibisyonu ile CA inhibitörlerinin diüretik ve antiglokom ajanlardan antikanser, antiobezite, antiepileptik ajanlara kadar değişen farklı etkinlikleri gözlenmektedir. Ancak CA inhibitör tasarımında izoform sayısının fazlalığı, birçok organ ve doku dağılımı, mevcut olan inhibitörlerin düşük izozim selektivitesi önemli bir problemdir. CA II, VI, VII, IX, XII ve XIII izozimleri sülfonamid ve sulfamat türevi inhibitörlere genellikle düşük nanomolar affinite gösterir. Bununla beraber CA I, IV, VA, VB ve XIV gibi diğer izozimler, nanomolar ile mikromolar aralıkta inhibisyon sabitleri ile bu bileşikler tarafından inhibe edilmek için daha az eğilim gösterir. CA III sülfonamidler ya da sülfamatlar tarafından inhibisyona duyarlı olmayan tek izoformdur.



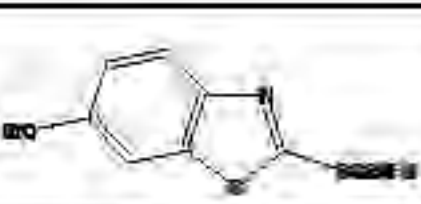
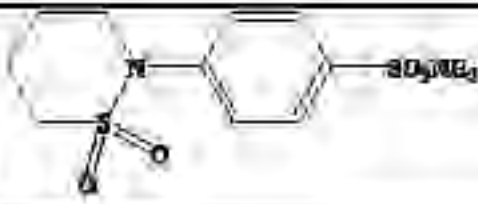
16 türevden birkaçı (Şekil 1), belirli bir izoform için seçicilik gösterir: Klasik inhibitörlerden asetazolamid (Bileşik 1), metazolamid (Bileşik 2), etokszolamid (Bileşik 3), sultiam (Bileşik 4), diklorofenamid (Bileşik 5), topikal etkili antiglokom sülfonamidler dorzolamid (Bileşik 6) ve Brinzolamid (Bileşik 7), indisulam (Bileşik 8) II, VA, VB, VI, VII, IX, XII, XIII ve XIV izoformlarına güçlü afiniteleri vardır. Topiramamat (bileşik 9) subnanomolar CA VII inhibitörüdür ve ayrıca II, VB ve XII izoformlarının da etkili inhibitörüdür. Zonisamid (bileşik 10), CA IX'ye iyi affinite gösterir, ancak diğer izoformlara daha düşük afinitelere sahipken CA II ve VA'yı da önemli ölçüde inhibe eder [7-18]. Sulpirid (bileşik 11) CA VI ve CA XII'in güçlü bir inhibitörüdür ve diğer izoformlara düşük affinite gösterir. Valdekoksib (bileşik 15) CA XII güçlü inhibitörü ve sakkarin CAVII spesifik inhibitörüdür [91-102,103].

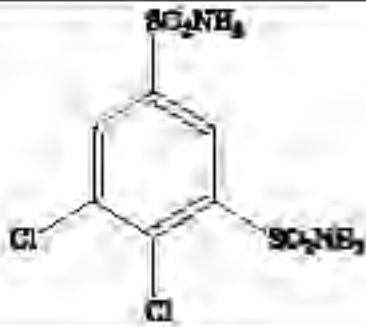
Son araştırmalarda CA selektif ve izozime spesifik CA inhibitörleri bulunmuştur. CA IV, IX, XII and XIV izozimlerinin ekstraselüler lokasyonu sayesinde sitozolik ve mitokondriyal izozimler ile etkileşime girmeden membran geçirimsiz izozimleri selektif olarak inhibe etmek mümkündür. Bu durum Bileşik 18'in temsilcisi olduğu piridinyum içeren pozitif yüklü sülfonamidlerin tasarımı ile araştırılmıştır [104-106]. Bu yolla elde edilen inhibitörler CA II ve ayrıca CA IV ve CA IX'a nanomolar affinite göstermiştir ve daha da önemlisi *in vivo* olarak plazma membranını geçememiştir [104-106]. Bu yeni sınıf potent ve pozitif yüklü inhibitörler membranal ve sitozolik izozimler arasında ayırım yapabilmiş ve iki modelli sistemde CA IV izozimine selektif inhibisyon sağladığı bildirilmiştir [104-106]. Bir başka izozim spesifik inhibitörü memeli izoformu olan CA

II de bulunan Ala65 amino asidi varlığından yararlanılmıştır [107]. Topiramata CA II'yi 210 kat daha az potent inhibe ederken CA VA, VB, VII, XIII ve XIV izozimlerini etkili bir şekilde inhibe eder (21–35 nM aralığındaki $K_{1/2}$). Topiramatin CA II'ye zayıf bağlanmasının, inhibitörün bir metil grubu ile Ala65 amino asit kalıntısı arasındaki bir uyumsuzluktan kaynaklandığı bildirilmiştir, bu durum izozim için daha düşük afiniteye sahip bileşiklerin tasarımında kullanılabilir [107].

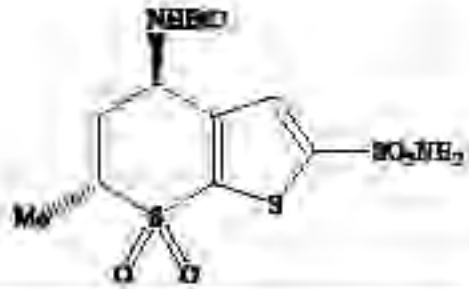
Hipoksik tümörlerle ilişkili olan CA IX izozimini inhibe etmek için hipoksik tümörün bulunduğu dokuda hipoksi ile aktive olan biyoredüktif ön ilaçlar öngörülmüştür. Seçilen strateji ile indirgenebilen disülfür bağı kullanılmıştır. Hipoksik tümörlerdeki redüksiyon koşulları redoks proteini tioredoksin 1'in varlığı ile kombinasyon halinde tiyollerin oluşumu ile disülfür bağının redüksiyonuna aracılık eder. İndirgenmiş bileşikler (tiyoller) daha az hacimlidir ve enzim aktif bölgesinin sınırlı alanına girmekte güçlük çeken sterik engel oluşturan disülfidlerle karşılaştırıldığında (düşük nanomolar aralıkta) çok iyi CA inhibe edici aktivite gösterirler [108,109].

Tablo 1.2. Karbonik anhidraz inhibitörleri

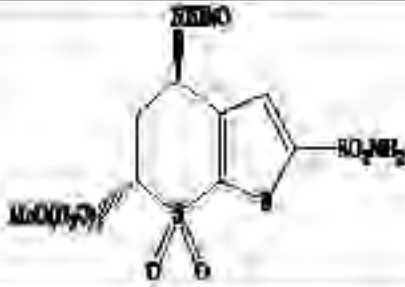
	
Bileşik 1: Asetazolamid	Bileşik 2: Metazolamid
	
Bileşik 3: Etoksazolamid	Bileşik 4: Sultiam



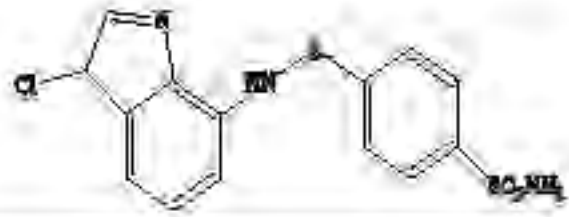
Bileşik 5: Diklorofenamid



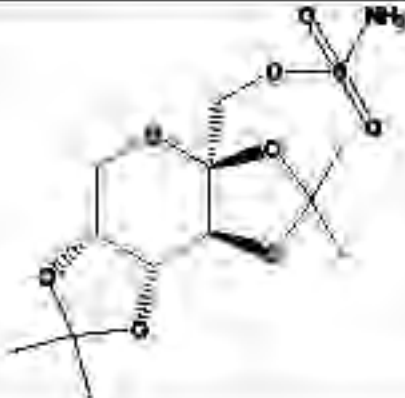
Bileşik 6: Dorzolamid



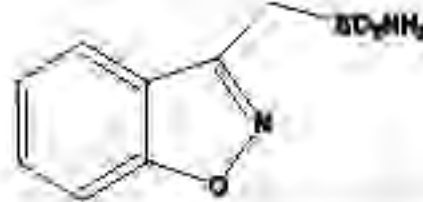
Bileşik 7: Brinzolamid



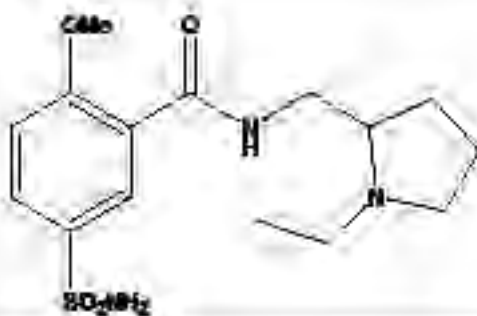
Bileşik 8: İndisulam



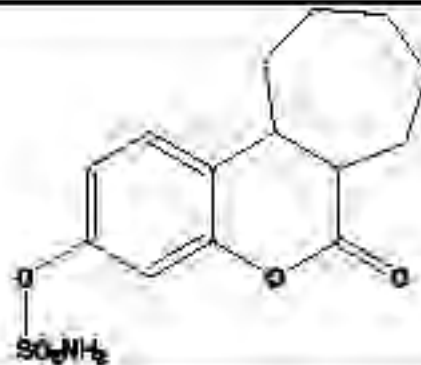
Bileşik 9: Topiramamat



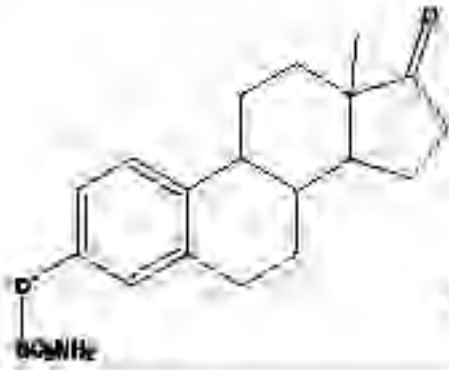
Bileşik 10: Zonisamid



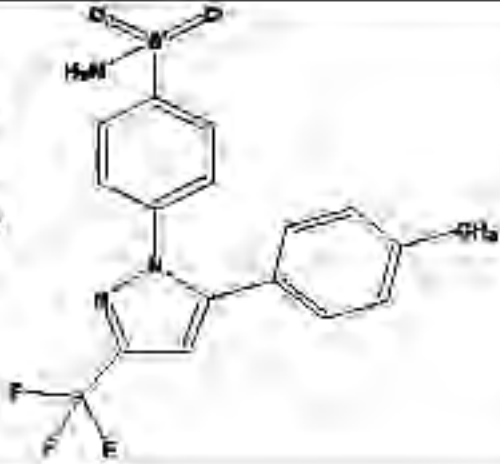
Bileşik 11: Sulpirid



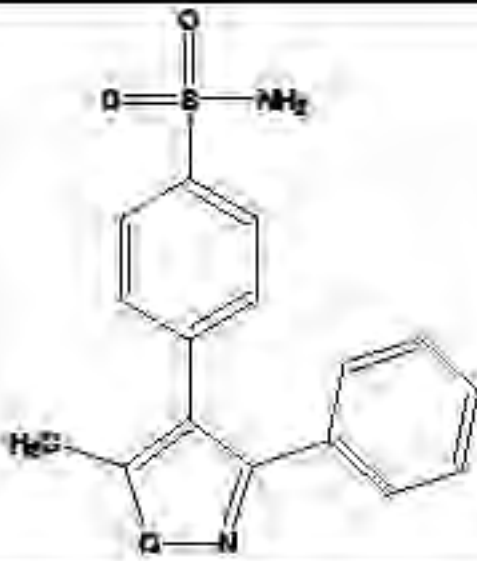
Bileşik 12: Coumate



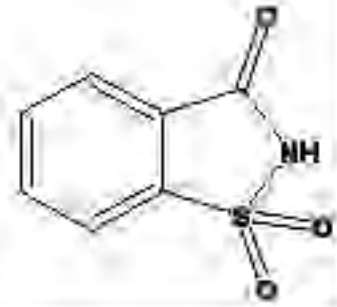
Bileşik 13: Emate



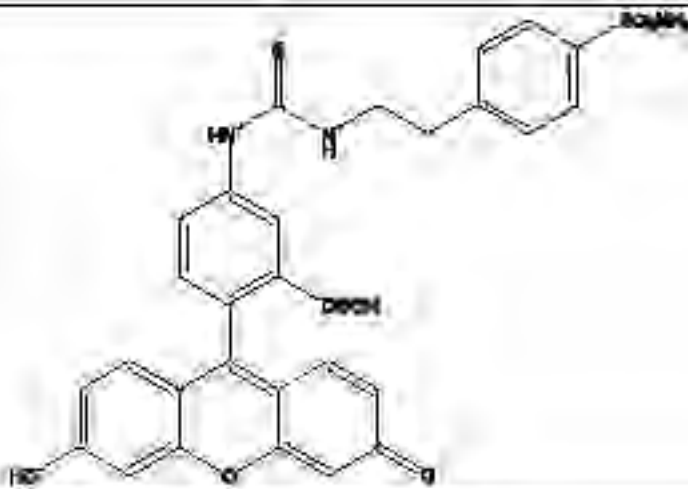
Bileşik 14: Selekoksib



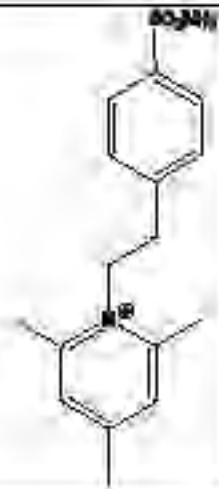
Bileşik 15: Valdekoksib



Bileşik 16: Sakkarin



Bileşik 17



Bileşik 18



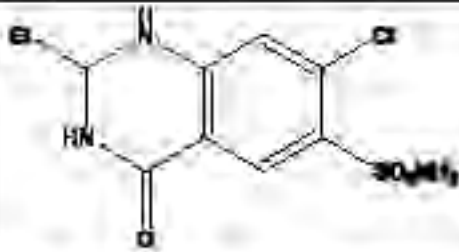
Bileşik 19 a $R^2 = R^3 = H$, $R^6 = Cl$, Hidroklorotiyazid

b $R^2 = R^3 = H$, $R^6 = CF_3$, Hidroflumetazid

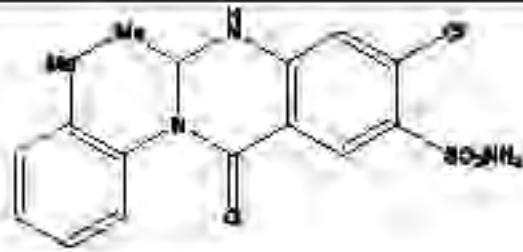
c $R^2 = H$, $R^3 = PhCH_2$, $R^6 = CF_3$, Bendroflumetazid

d $R^2 = H$, $R^3 = CHCl_2$, $R^6 = Cl_2$, Triklorometazid

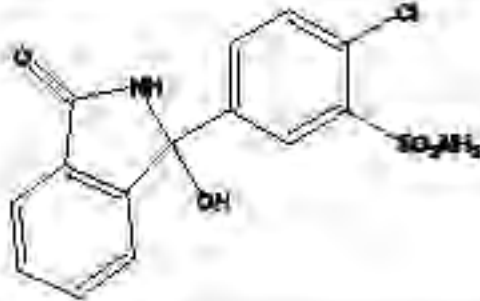
e $R^2 = Me$, $R^3 = CH_2SCH_2CF_3$, $R^6 = Cl$, Politiyazid



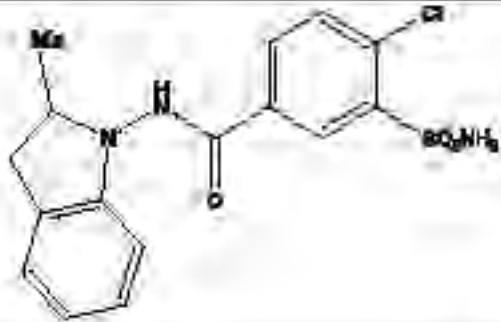
Bileşik 20



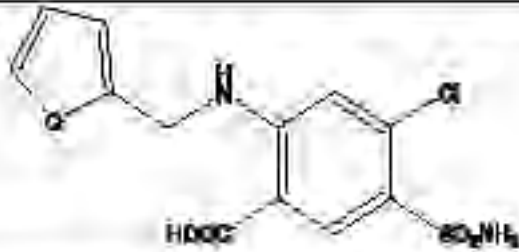
Bileşik 21



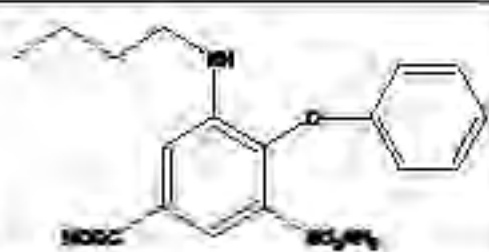
Bileşik 22



Bileşik 23



Bileşik 24



Bileşik 25

1.3.1. Diüretik CA inhibitörleri

CA'lar böbrekte bol miktarda bulunur ve asid/baz homeostaz dengesinin sağlanması, bikarbonatın rezorpsiyonu ve amonyum çıkışı gibi önemli fizyolojik olaylarda yer alır [126,127]. Asetazolamid 1956 yılında klinikte kullanılan ilk civasız diüretiktir. Sınırlı terapötik kullanımına rağmen tiazid ve kıvrım diüretikleri gibi birçok diüretik ajanın tasarımında önemli bir rol oynamıştır. Asetazolamid, metazolamid, etokszolamid ve diklorfenamid konjestif kalp yetmezliğine bağlı ödem tedavisi için kullanılır. Nispeten sınırlı terapötik kullanımı ile bir farmakolojik sınıfı temsil eder fakat böbreğin temel fizyoloji ve farmakolojisinin geliştirilmesinde ve günümüzde yaygın olarak kullanılan tiyazid ve kıvrım (loop) diüretik ajanların tasarımında büyük rol oynamıştır. Asetazolamid gibi bir CA inhibitörünün verilmesini takiben idrar hacmi artar ve alkali hale gelir [86,126]. Artan bikarbonat idrara elimine edilirken, bununla birlikte Na^+ ve K^+ gibi katyonlar eşlik ederken salgılanan klorür miktarı azalır. Bu olayların nedeni proksimal tübülde CA inhibisyonu ile H^+ sekresyonunun inhibisyonudur. Sitosolik (CA II) ve zara bağlı (CA IV, XII ve CA XIV) enzimlerin inhibisyonu, sülfonamidlerin diüretik etkilerinde rol oynadığı düşünülmektedir [86,127]. Sürecin net etkisi olarak tübüler lümeninden intestinal boşluğa sodyum bikarbonat transportu ardından izotonik denge gereği suyun hareketi ve artmış diürez meydana gelir. Asetazolamid, metazolamid, etokszolamid ve diklorfenamid konjestif kalp yetmezliğine bağlı ödem tedavisi için kullanılır [126,127]. Diğer çoğu diüretik; benzotiyadiazinler (klorotiyazid, hidroklorotiyazid), kinetazon, metolozan, klortalidon, indapamid, furosemid değişen etkinliğe sahip CA inhibitörleridir [86, 87, 126]. Hepsi çinko bağlayıcı özelliğe sahip süstitüe olmayan primer sülfonamid taşıdığı için bu beklenen bir durumdur [103].

1.3.2. Glokomda CA inhibitörleri

Oküler hastalıklarda CA inhibitörleri optik sinirlerde irreversibl hasara neden olan göz içi basınç artışı ile karakterize körlüğe kadar gidebilen görme fonksiyon kaybına neden olan kronik, dejeneratif bir hastalık olan glokomun tedavisinde kullanılırlar [128-130]. Aköz hümörün kimyası ve dinamiği üzerine yapılan araştırmalar, bu sekresyonun ana bileşeninin sodyum bikarbonat olduğunu belirlemiştir [85, 86, 128-130]. Anterior uveada tanımlanan karbonik anhidrazların bikarbonat salgılanmasından sorumlu olduğu gösterilmiştir. Karbonik anhidraz enzim inhibitörleri siliyer proseslerde yer alan CA II enzimini inhibe ederek sodyum bikarbonat ve aköz hümör sekresyonunu azaltarak intraoküler basıncı %25-30 azaltır. Aslında sistemik olarak asetazolamid (Bileşik 1), metazolamid (Bileşik 2), etokszolamid (Bileşik 3), diklorfenamid (Bileşik 4) bu hastalığın

tedavisinde kullanılır [2,45]. İntraoküler basıncı etkili bir şekilde düşürmesi, minimal toksisitesi, ideal farmakokinetik özellikleri nedeniyle uzun süreli kullanılan en iyi bilinen ilaç asetazolamiddir. Bununla beraber CA'lar omurgalılarda her yerde bulunduğu için sistemik uygulanması spesifik olmayan CA inhibisyonuna ve böylelikle ekstremitelerde uyuşma ve karıncalanma, metalik tat, depresyon, tükenmişlik, halsizlik, kilo kaybı, azalmış libido, gastrointestinal tahriş, metabolik asidoz, böbrek taşı ve geçici miyopluk dahil olmak üzere istenmeyen yan etkilere sebep olmaktadır. Göz damlası olarak kullanılacak suda çözünür sülfonamid CA inhibitörlerinin geliştirilmesi 1990'larda başlamıştır ve 1995'te bu tür ilk farmakolojik ajan olan dorzolamid (bileşik 6) Merck firması tarafından Trusopt ticari adı altında piyasaya sürülmüştür. İkinci olarak yapısal olarak benzer bir bileşik olan brinzolamid glokomun topikal tedavisi için onaylanmıştır (Alcon firması tarafından Azopt ticari adı ile) [129].

Dorzolamid ve brinzolamid, korneaya nüfuz etmek için yeterince yağda çözünür olan güçlü suda çözünür CA inhibitörleridir ve sırasıyla hidroklorür tuzu (pH 5.5'te) veya serbest baz olarak topikal olarak uygulanabilir [129]. Bu iki ilaç intraoküler basıncı düşürmede etkilidir ve sistemik olarak uygulanan ilaçlara kıyasla daha az yan etki gösterirler. Gözlenen yan etkiler; batma, yanma veya kızarma, bulanık görme ve kaşınma; muhtemelen bu yan etkilere asidik dorzolamid göz damlası neden olur. Ayrıca, hem sistemik hem de topikal CA inhibitörlerinde acı bir tat gözlenir, bu muhtemelen ilaç yüklü gözyaşı sıvısının orofarenks içine akması ve tükürükte (CA VI) ve tat tomurcuklarında (CA II ve CA VI) bulunan CA'ları inhibe etmesi nedeniyle biriken bikarbonattan kaynaklanır. Bundan dolayı yeni topikal antiglokom ajanı olan CA inhibitörleri araştırılmaktadır [130]. Son zamanlarda suda çözünen halka sistemleri bağlanmış aromatik, heterosiklik, tavşanlarda intraoküler basıncı düşürmede iki ya da üç kat daha etkili olduğu gösterilmiş sülfonamidler üretilmiştir. Bu bileşikler suda çözünür (hidroklorürler, triflatlar veya trifloroasetatlar gibi) güçlü CA II inhibitörleridir hem normotansif hem de glokomatöz tavşanlarda korneaya nüfuz edip intraoküler basıncı önemli ölçüde düşürdükleri gözlemlenmiştir [130-135].

CA inhibitörü asetazolamidin sistemik uygulaması maküler ödem tedavisinde kullanılmaktadır [136]. Yakın zamanda dorzolamid ve brinzolamidin topikal uygulaması için de benzer etkinlik bildirilmiştir [129]. Genellikle ödemin kaybolması, görme fonksiyonunun düzelmesi sülfonamidlerin hipotansif etkisinden bağımsız olarak retinadaki dolaşım üzerindeki etkilerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Asetazolamid, dorzolamid veya brinzolamid lokal vazodilatör olarak hareket eder, bu organdaki kan akışını iyileştirir ve sonuç olarak metabolik atık ürünleri ve druseni temizler. Hastalığın erken evrelerinde bu tedaviyi takiben görme belirgin bir şekilde iyileşir [129,136].

1.3.3. Obezitede CA inhibitörleri

Hayvanlarda bulunan α -CA izozimlerinin ikisi CA VA ve VB izozimleri mitokondride bulunur. Omurgalı ve omurgasızlarda üregenezis, glukoneogenezis ve lipogenezis gibi birçok biyosentetik reaksiyonda yer alır [142]. Piruvat karboksilaz (PC), asetil-CoA karboksilaz (ACC) ve karbamoil fosfat sentetaz I ve II'yi içeren biyosentetik prosesler için substrat olan bikarbonat yeterli miktarda mitokondriyal izozimler olan CA VA ve VB tarafından sağlanır ve muhtemelen yüksek aktiviteli sitozolik izozim CA II tarafından desteklenir [142].

Birçok çalışmada CA inhibitörlerinin potansiyel anti-obezite ilacı olduğunu kanıtlamıştır. Topiramamat sodyum kanalları ve AMPA (α -amaino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazol propiyonik asit) blokajı, kırmızı kan hücreleri ve beyin CA izozimi inhibisyonu ile CO₂ ikincil tutulumu, GABAerjik (γ -aminobutirik asit) transmisyon artışı gibi multifaktoriyal etki mekanizması ile güçlü antikonvülzan etkinliğe sahip antiepileptik bir ilaçtır [143]. Topiramamatın herhangi bir farmakolojik açıklaması sağlanmamasına rağmen yan etki olarak obez hastalarda kilo kaybına neden olmuştur [144]. Ayrıca zayıf ve obez Zucker ratlarında enerji ve yağ kazanımını azalttığı gösterilmiştir [144]. Topiramamatın ayrıca CA II, VA, VB, VI, VII, XII ve XIII gibi birçok izoziminin güçlü bir inhibitörü olduğu gösterilmiştir ve CA II ile enzim kompleksinin X-ray kristalografisi ile yüksek affiniteli moleküler yapısı belirlenmiştir [143]. Topiramamat ayrıca insan mitokondriyal izozimleri CA VA ve VB'nin etkili bir inhibitörü olarak da hareket ettiğinden, lipogenezde yer alan hem mitokondriyal hem de sitozolik CA izozimlerinin bu inhibisyonu, kilo kaybını kontrol etmek için yeni bir yaklaşım olduğu düşünülmektedir [142-144].

Zonisamid (Bileşik 10), dirençli parsiyel nöbetler için yardımcı tedavi olarak kullanılan başka bir antiepileptik ilaçtır [85, 145, 146]. Birden fazla etki mekanizmasına sahiptir ve geniş bir antikonvülzan aktivite spektrumu gösterir. Topiramamat'a benzer şekilde, son klinik çalışmalar nöropatik ağrı, bipolar bozukluk, migren, obezite, yeme bozuklukları ve Parkinson hastalığının tedavisi için potansiyeli vardır [85]. Zonisamid lipogenezde yer alan mitokondriyal ve sitozolik CA izozimlerin potent inhibitörü olan

alifatik bir sülfonamiddir [145]. Ayrıca, zonisamid, düşük kalorili bir diyetle birlikte (günde 500 kcal eksiltilerek), obez kadın hastalarda tek başına diyetle kıyasla ek ortalama 5 kg kilo kaybıyla sonuçlanmıştır [146]. Bu nedenle, mitokondriyal izoformlar CA VA ve VB'nin ve muhtemelen CA II inhibisyonu lipogenezi azaltan yeni anti-obezite ilaçları için hedef olabilirler [142].

1.3.4. Antikanser CA inhibitörleri

Birçok tümör için anahtar özellik hipoksidir [147-152]. Öncelikle yapısal ve işlevsel olarak bozulmuş mikrosirkülasyon ve bozulan oksijen difüzyon prosesi yetersiz oksijen kaynağının patofizyolojik bir sonucudur [89,147-152]. Tümör hipoksisi; tümör yayılımı, malign progresyon, kemoterapi ve radyoterapiye direnç ile güçlü şekilde ilişkili görünmektedir [89,147-152]. Hipoksi, hipoksi ile indüklenebilir faktör 1 (HIF1) kaskadı yoluyla bir CA izozimi CA IX dahil olmak üzere birçok genin ekspresyonunu düzenler [89,147-155]. CA IX ekspresyonu hipoksi tarafından kuvvetli bir şekilde upregüle ve wild-type von Hippel Lindau tümör baskılayıcı protein (pVHL) tarafından downregüle edilir.

CA IX ekspresyonu, gliomalar/ependimomlar [148], mezotelyomalar [148], papiller/foliküler karsinomlar [148], mesane karsinomları [156], uterin serviks [157,158], nazofaringeal karsinom [159], baş ve boyun [160], meme [154, 161, 162], akciğerler [163], beyin [148], vulva [148], skuamöz/bazal hücreli karsinomlar [148] ve böbrek [164] tümörleri gibi birçok tümör türünde güçlü bir şekilde artmıştır. Bazı kanser hücrelerinde VHL geni mutasyona uğrayarak HIF aktivasyonu ile CA IX downregülasyona neden olur [89, 148, 161].

Yüksek düzeyde aktif insan α -CA'lardan biri olan CA IX, CO₂ hidrasyon reaksiyonu için katalitik özellikleri, yüksek düzeyde gelişmiş CA II'ninkilerle karşılaştırılabilir [89,148]. Tüm α -CA'larda olduğu gibi CA IX, aktif bölge boşluğu içindeki çinko iyonu ile doğrudan koordine olan ve aktif bölgenin hidrofobik ve hidrofilik yarılarında yer alan amino asit kalıntıları ile sülfonamidler ve sülfamatlar tarafından inhibisyona duyarlıdır [85,86,89,98,165-173]. Son birkaç yılda birçok düşük nanomolar CA IX inhibitörü tanımlanmıştır [85,86,89,98]. Bunların arasında, bazı sülfamatlar [165, 172, 173] ve sülfonamidler [166-170], X-ışını kristalografisi ve homoloji modellemesi ile karakterize edilmiştir. Bu tür çalışmalar ayrıca membran geçirgen olmayan (ve dolayısıyla CA IX'u *in vivo* olarak spesifik olarak inhibe eden) [174-177] ya da ikili CA IX–COX2 (siklooksijenaz 2) inhibitörleri olarak hareket eden bileşikler ile kanıtlanmıştır

[166, 177]. CA IX'ı inhibe eden düşük nanomolar inhibitör aktiviteye sahip heterosiklik [177,179] aromatik sülfonamidler [180,181] ve ayrıca alifatik[98] sülfonamid/sülfamat/sülfamitler [186,187] tespit edilmiştir. Çeşitli şeker parçalarını içeren bazı sülfonamidler de rapor edilmiştir, ancak şimdiye kadar bu proteinin *in vivo* işlevini anlamak için en yararlı CA inhibitörü, floresin tip bileşik 17'dir [168,178,188].

Daha önce açıklandığı gibi HIF kaskadı ile hipoksi birçok tümörde güçlü bir CA IX aşırı ekspresyonuna yol açar. Bunun genel sonucu pH dengesizliğidir, normal dokuda 7,4 olan pH hipoksik tümörde 6 civarındadır. İnsan CA IX'un temel ekspresyonunun yakın zamanda Madin-Darby köpek böbrek (MDCK) epitel hücrelerinde hücre dışı pH'ı (pH_e) azalttığı gösterilmiştir [84,85,104]. Spesifik olarak CA IX eksprese eden hipoksik hücrelere bağlanan CA IX-seçici sülfonamid inhibitörleri (bileşik 17 ve 18) enzimin katalitik aktivitesini azaltarak ortamın asiditesini ve böylelikle H⁺ iyonu oluşumunu düşürürler [168]. CA enziminin aktif bölgesi delesyona uğratarak ortamın asitliğinin düştüğü gösterilmiştir, ancak sülfonamid inhibitörü bu tür mutant enzime bağlanmadığı gözlenmiştir [168]. Bu nedenle, tümör hücreleri hem laktik asit üretimi (yüksek glikoliz oranları nedeniyle) hem de hücre dışı bir katalitik alana sahip tümörle ilişkili CA IX tarafından katalize edilen CO₂ hidrasyonu ile pH'larını düşürür. Düşük pH_e, tümörijenik transformasyon, kromozomal yeniden düzenlemeler, hücre dışı matris parçalanması, migrasyon ve invazyon, hücre büyüme faktörlerinin ekspresyonunun indüklenmesi ve proteaz aktivasyonu ile ilişkilendirilmiştir. CA IX, pirimidin nükleotitlerinin sentezinde bikarbonatın gerekli olduğu için hücre büyümesi için bir substrat olarak kullanılacak bikarbonatın sağlanmasında rol oynar [89,168,188].

İndisulam güçlü antikanser aktivitesine sahip CA IX izoziminin nanomolar inhibitörü olan sülfonamid türevi bir ilaçtır. Ayrıntılı etki mekanizması net değildir ama CA IX inhibitör özelliklerine ek olarak G1 ve / veya G2 fazlarında hücre döngüsünün bozulmasında, siklinlerin downregülasyonunda, siklin bağımlı kinaz 2 (CDK2) aktivitesinin azalmasında, retinoblastom fosforilasyonunun inhibisyonunda, hücre yapışmasına katıldığı bilinen farklı moleküllerin ifadesinde, immün cevapta rol oynadığı bilinmektedir. İndisulam solid tümörlerin faz I ve II çalışmalarında insandan fareye aktarılan tümörlere karşı *in vivo* etkinlik göstermiştir [189-192].

Svastova ve arkadaşları [168] tarafından araştırılan bileşikler şimdiye kadar bildirilen birçok türev arasında en ilginç potent CA IX inhibitörlerinden bazılarıdır. Bileşik 17 hipoksik koşullarda yalnızca CA IX'a bağlanan floresan sülfonamiddir.

Dolayısıyla bu bileşikler hipoksik tümörü görüntülemeye bir prob olarak kullanılabilir [168, 169, 188]. Bileşik 18; pozitif yüklü, zar geçirgen olmayan bileşikler sınıfındadır. Bu tür bileşikler hücre içi CA'ları inhibe etmedikleri için, tüm CA'ları ayırım gözetmeksizin inhibe eden mevcut bileşiklerle (asetazolamid gibi) karşılaştırıldığında daha az yan etki sergileyebilirler [132-134]. CA II'ye (aktif bölgesi CA IX ile benzer) [90] bağlı bileşik 18'in yapısı X-ray kristalografisinde belirlenmiştir. Pozitif yüklü piridinyum türevi bileşik 18, katalitik olarak gerekli olan deprotonize sülfonamid parçası ile enzim aktif bölgesi Zn^{2+} iyonunu koordine ederek bağlanır. Aynı zamanda, inhibitör bileşik 18'in trimetilpiridinyum halkası ile inhibitörlerin CA'lara bağlanması için önemli bir amino asit olan Phe131'in fenil halkası arasında yığılma dahil olmak üzere, aktif bölge boşluğunda bulunan amino asit kalıntıları ile diğer birçok uygun etkileşime katılır. Daha sonra bileşik 17'nin de benzer bağlanma mekanizmasına sahip olduğu gösterilmiştir [102]. Bu tür yapılar daha selektif ve potent CA IX inhibitörü rasyonel ilaç tasarımında kullanılabilir. CA IX'un X-ışını yapısı henüz mevcut olmadığından, çoğu çalışmada CA IX inhibitörlerini modellemek ve tasarlamak için CA II yapısı kullanılmıştır [89, 148, 168, 188].

Özetle, biyokimyasal, fizyolojik ve farmakolojik veriler, tümörle ilişkili CA izozim IX'un inhibisyonunun, klasik kemoterapi veya radyoterapiye yanıt vermeyen hipoksik tümörlerin tedavisinde faydalı olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, yukarıda açıklanan CA inhibitörlerinin kullanımı, hem bu tümörlerin invazif olmayan görüntülenmesi için tanı araçlarının hem de muhtemelen CA IX'un bozduğu ekstrasitoplazmik asitleşme için terapötik ajanların geliştirilmesine olanak sağlar [89, 148, 168, 188]. Birçok efektif CA IX inhibitörü *in vitro* olarak geliştirilmiş ve tanımlanmıştır [164-188]. Bununla birlikte, her yerde eksprese edilen CA I ve II izozimlerine kıyasla tümörle ilişkili izozim IX için artırılmış afiniteye sahip çok sayıda türev keşfedilmiş olmasına rağmen, bu tür bileşiklerin hücre kültürlerinde *in vivo* veya hastalığın hayvan modelleri davranışını anlamak için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir [178].

1.3.5. Osteoporozda potansiyel CA inhibitörleri

Oldukça aktif CA II kemikte bol miktarda bulunur, osteoklastlarda böbreklerdeki kadar önemli miktarda bulunur. Buradaki rolü CO_2 hidrasyonu ile oluşan hidrojen iyonunun ATP bağımlı proton pompası ile kalsiyumun mobilizasyonunun sağlamasıdır [193]. Osteoklastlarda membrana bağlı CA'ların fizyolojik rolünü değerlendirmek için, yapısal olarak bileşik 18'e benzer yeni bir membran geçirimsiz CA inhibitörü

kullanılmıştır. Düşük inhibitör konsantrasyonuna maruz kalan rat osteoklast kültüründe osteoklast sayısı ve kemik rezorpsiyon aktivitesi artmıştır, yüksek konsantrasyona maruz kalan hücrenin yaşamını etkilemiştir. Ayrıca inhibitör tedavisi intraselüler asiditeye de zarar vermektedir. Membrana bağlı izozimler olan CA IV ve CA XIV osteoklastlarda *in vivo* ve *in vitro* eksprese edilmiştir. Ek olarak, inhibitör deneyleri, osteoklastlarda hücre içi transport metabolonların aracılığıyla intraselüler pH regülasyonunun ve bu tür inhibitörlerin olası kullanımının yeni anti-osteoporoz tedavilerinin tasarımında bilgi sağlamaktadır [193].

1.3.6. Omurgasızlarda CA ve inhibisyonu

Ökaryotlar ve prokaryotlarda gen sekanslama ile özellikle yaygın hastalıklara neden olan patojenler (örneğin, sıtma, tüberküloz ve ayrıca diğer bakteriyel ve mantar enfeksiyonları), CA'ların bu organizmalarda da bulunduğu ortaya çıkarılmıştır [85-88]. Omurgalılar yalnızca α -sınıfına ait CA'lara [89-100] sahip olsa da bu tür 'basit' organizmalar, örneğin α - ve β -CA'lar, β - ve γ -CA'lar, γ - ve δ -CA'lar veya hatta bu üç gen ailesinden (α - γ -CA'lar) gibi çeşitli CA familyalarına ait enzimlere sahiptir [111-118,194-196].

Son zamanlarda α -CA veya β -CA sınıfının temsilcileri, protozoan *P. falciparum* [110], *H. pylori* ve *M. tuberculosis* [113] bakterileri ve *C. Albicans* [114] ve *C. neoformans* [115,116] mantarları gibi çeşitli patojenlerde klonlanmış ve karakterize edilmiştir. Bu CA'ların bu patojenlerin büyümesi veya virülansı için kritik olduğu kanıtlandığından, inhibe edilme kapasiteleri de araştırılmıştır. Bu tür pek çok organizma oldukça patojenik olduğundan ve onları hedefleyen mevcut ilaçlara farklı derecelerde direnç gösterdiğinden, bunların CA'larının inhibisyonu bu hastalıklarla savaşmak için yeni yaklaşımlar oluşturabilir [110-118,194-196].

P. falciparum, yaşamı tehdit eden insan sıtma vakalarının çoğundan sorumludur. İlaça dirençli sıtma parazitlerinin küresel olarak ortaya çıkması, yeni ilaç hedeflerinin tanımlanmasını ve karakterize edilmesini gerektirir. *P. falciparum*'da bulunan CA'lar α -CA sınıfına (pfCA) aittir ve insan konakçı enzimleri CA I ve II'den farklı katalitik özelliklere sahiptir. K_1 nanomolar aralıkta (80 nM), düşük sıcaklık EC_{50} (ex vivo) ve düşük mikromolar aralıkta (20 μ M) *P. falciparum*'un *in vitro* büyümesine karşı en etkili antimalaryal sülfonamid CA inhibitörü 4-(3,4-Diklorofenilüreido-etil)-benzen-sülfonamiddir. Bu nedenle, protozoon enzimini hedefleyen sülfonamid CA inhibitörleri yeni antimalaryal ilaçların geliştirilmesi için potansiyele sahip olabilir [110].

H. pylori α -sınıfı CA (hp α CA), gastrit, ülser ve kanser dahil olmak üzere farklı mide mukozal lezyonları olan hastalardan klonlanmış ve sekanslanmıştır [111, 112]. Aralarında asetazolamid, 4-amino-6-kloro-1,3-benzendisülfonamid ve lipofilik kuyruklara sahip bazı yeni bileşiklerin bulunduğu güçlü hp α CA inhibitörleri (K_I 12-84 nM) tespit edilmiştir. hp α CA asitte hayatta kalması için gerekli olduğundan inhibisyonu ilaca dirençli *H. pylori* enfeksiyonunun yönetiminde yeni bir farmakolojik araç olarak kullanılabilir [111]. *H. pylori*'nin β -sınıf CA (hp β CA) için DNA klonları, gastrit, mide ülseri ve mide kanseri hastaları dahil çeşitli mide mukozal lezyonları olan hastalardan elde edilen bağımsız suşlardan izole edilmiştir [112]. hp β CA ayrıca klinik olarak kullanılan asetazolamid, etokszolamid, topiramet ve sülpirid de dahil olmak üzere birçok sülfonamid/sülfamat tarafından yüksek oranda inhibe edilmiştir (K_I 24-45 nM). *H. pylori*'nin α - ve/veya β -sınıfı CA'larının ikili inhibisyonu ile gastrit/mide ülserlerinin yanı sıra mide kanserinin tedavisi için yararlı bir alternatif olabilir. Bu çalışma aynı zamanda ilk bakteriyel β -CA ilaçlanabilir hedef olduğunu göstermiştir [112]. *H. pylori*'de bulunan bu iki CA'nın mide içindeki patojenin asit ortamına alışmasında oynadığı önemli rol, Şekil 2'de şematik olarak gösterilmiştir ve bu aynı zamanda iki enzimin inhibisyonunun bakterilerin ölümüne ve *H. pylori*'nin mideden eradikasyonuna yol açtığını anlamaya yardımcı olmaktadır [111, 112].

M. tuberculosis'in *in vivo* büyümesi için gerekli olan, aktivitesi büyük ölçüde pH'ya bağlı; pH 8.4'te aktif olan ancak pH 7.5'te olmayan Rv3588c geni β -CA'yı kodladığı keşfedilmiştir[29]. Bu β -CA'nın aktif bölgenin açık ve kapalı durumunu arasında geçiş yapabilen bloke edilmiş aktif bölgeye sahip dimerik bir protein olduğu gözlemlenmiştir. Bu β -CA ile hiçbir inhibisyon çalışması yapılmamış olsa da, güçlü inhibitörlerin saptanması ve tasarlanması muhtemeldir. Bu şu anda mevcut ilaçlara dirençli tüberküloz için yeni bir ilaç sınıfı olabilir [113].

Ayrıca *Saccharomyces cerevisiae* mayasının NCE103 geni bir CA kodlar [118]. Glikoz-amonyum tuzları ortamında *S. cerevisiae*'nin büyümesi sırasında CA'nın ana fizyolojik rolü, PC, ACC ve CPSaz (karbamoil-fosfat sentetaz) tarafından katalize edilen bikarbonata bağlı karboksilasyon reaksiyonları için inorganik karbon sağlanmasıdır [114-116]. Bununla birlikte, bu alandaki en ilginç bulgular Muhlschlegel ve Heitman'nın grupları tarafından tanımlandığı *C. albicans* ve *C. neoformans* gibi fungal patojenlerin virülansı için önemli olan CA'ların sinyal rolü ile ilgilidir [114-116]. CO₂/HCO₃'ün fizyolojik konsantrasyonlarının, Şekil 3'de şematik olarak gösterildiği gibi, adenilil siklaz

aktivitesinin doğrudan uyarılmasıyla *C. albicans*'ta filamentasyonu indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca, organizmada bulunan β -CA'larla $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ dengelemesinin, oyuklarda sınırlı olduğu bulunan CO_2 'nin *C. albicans*'ın patogenezi için gerekli olduğu gösterilmiştir. Muhlschlegel'in grubu *C. neoformans* kaynaklı adenilil siklazın fizyolojik $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ konsantrasyonlarına duyarlı olduğunu göstermiştir. Böylece, siklik AMP sinyali ile $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ algılama arasındaki bağlantı funguslarda korunur ve CO_2 algılaması mantar patogenezinin önemli bir araçtır. Bu yeni β -CA'ların inhibitörleri henüz test edilmemiş olsa da bu yolu çeşitli seviyelerde hedefleyen yeni terapötik ajanlar, yeni antifungaller olarak işlev görebilirler [114-116].

Yapılan literatür araştırmaları ve ilgili enzim inhibisyonunda etkili farmakofor grupların tesbiti sonucu sunulan yüksek lisans tezinde sülfonamid gurubu yeni karbonik anhidraz enzim inhibitörü bileşiklerin sentezlenmesi ve sentezlenen bileşiklerin *in-vitro* aktivitelerinin araştırılması amaçlanmıştır. 2-(4-Süstitüepiperazin-1-il)-N-(sülfamoilfenil)asetamid ana yapısı üzerinden 4. konumda farklı süstitüentler ile bileşikler sentezlenmiştir. *In-vitro* olarak karbonik anhidraz enzimi üzerindeki etkinliği araştırılmıştır.

Tablo 1.3. *Inhibitör Aktiviteleri Araştırılması Planlanan Sentez Ürünleri*

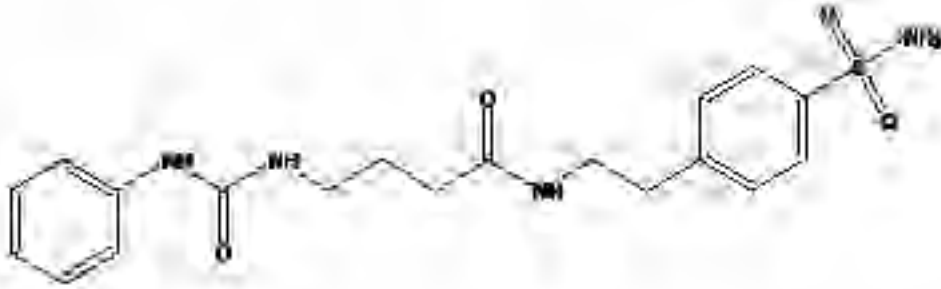


Bileşik	R
2a	-CH ₃
2b	-CH ₂ -CH ₃
2c	-CH ₂ -CH ₂ -OH
2d	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -OH
2e	-CH ₂ -CH ₂ -N(CH ₃) ₂
2f	
2g	
2i	-SO ₂ -CH ₃

2. KAYNAK BİLGİSİ

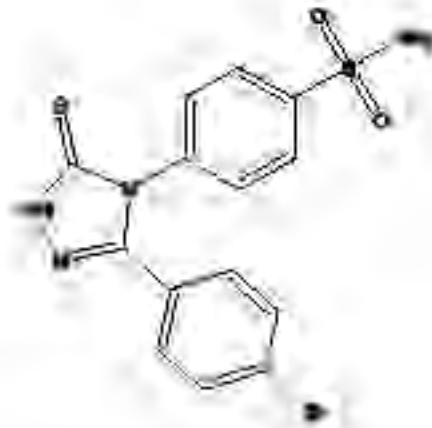
2.1. Karbonik Anhidraz Enzim İnhibitörü Çalışmalarına Konu Olmuş Sülfonamid Türevleri

Ceruso vd., bir seri üreido sübstitüe benzen sülfonamid sentezlenmiştir. hCA I–XIV İzozimlerine karşı inhibitör aktiviteleri incelenmiştir. hCA II İzozimine karşı 4.9 nM IC₅₀ değeri ile 4-(3-Fenilüreido)-N-(4-sülfamoilfenetil)butanamid en yüksek inhibitör aktiviteye sahip bileşik olarak tesbit edilmiştir [206].



Şekil 2.1. 4-(3-Fenilüreido)-N-(4-sülfamoilfenetil)butanamid

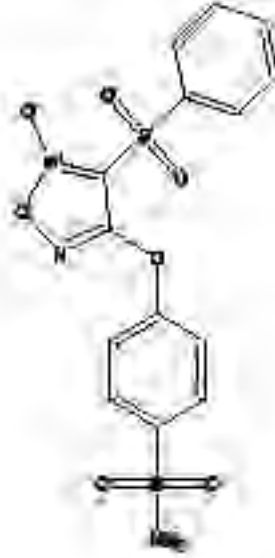
SitaRam vd., tarafından 1,2,4-triazol içeren benzen sülfonamid türevi bileşikler sentezlenmiş ve hCA I, II, IX, XII izozimlerine karşı inhibitör aktiviteleri araştırılmıştır. Standart olarak kullanılan asetazolamid ile karşılaştırıldığında 4-[3-(4-Bromofenil)-5-tiyokso-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]benzen sülfonamid 1.3 nM IC₅₀ değeri ile hCA XII izozimine karşı en yüksek inhibitör aktiviteye sahip bileşik olduğu bulunmuştur [207].



Şekil 2.2 4-[3-(4-Bromofenil)-5-tiyokso-1,5-dihidro-4H-1,2,4-triazol-4-il]benzen sülfonamid

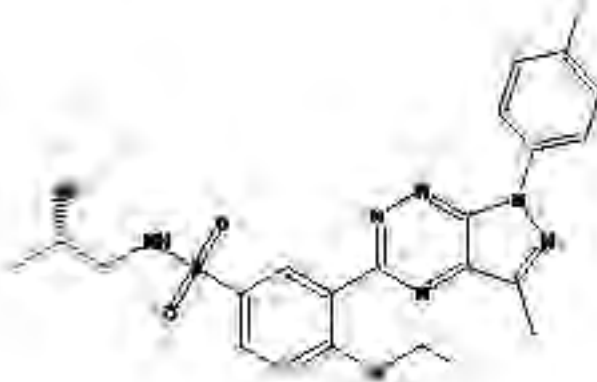
Chegaev vd., tarafından metil ya da fenil sübstitüe furazan ve furoksan içeren benzen sülfonamid türevi bileşikler sentezlenmiştir. hCA I, hCA II, hCA IX ve hCA XII izozimlerine karşı inhibitör aktiviteleri incelenmiştir. 4-(3-Fenilsülfonilfuroksan-4-

iloksi)benzensulfonamid bileşiği 2.9 nM IC₅₀ değeri ile hCA XII izozimine karşı en yüksek inhibitör aktiviteyi göstermiştir [208].



Şekil 2.3. 4-(3-Fenilsulfonilfuroksan-4-iloksi)benzensulfonamid

Mojzych vd., tarafından pirazolo[4,3-e][1,2,4]triazin içeren sulfonamid türevi bileşikler sentezlenmiştir. hCA enzim inhibisyonu ile antitümör özellikleri araştırılmıştır. Sentezlenen bileşikler Carmichael metodu kullanılarak MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanseri hücreleri üzerinde orta derecede etkili bulunmuştur. (S)-4-Etoksi-N-(2-hidroksipropil)-3-(3-metil-1-p-tolil-1H-pirazolo[4,3-e][1,2,4]triazin-5-il)benzensulfonamid 13.8 nM IC₅₀ değeri ile hCA IX izozimine karşı en yüksek inhibitör aktiviteyi göstermiştir [209].



Şekil 2.4. (S)-4-Etoksi-N-(2-hidroksipropil)-3-(3-metil-1-p-tolil-1H-pirazolo[4,3-e][1,2,4]triazin-5-il)benzensulfonamid

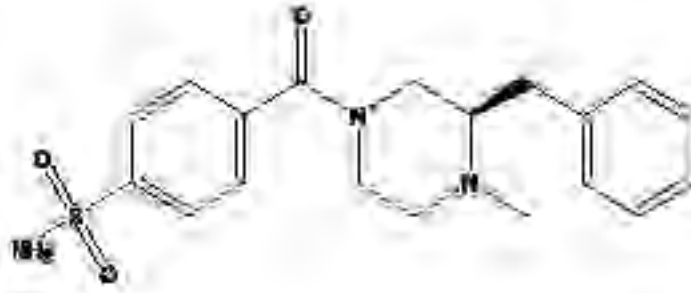
Altıntop vd., tarafından yeni bir seri 1,3,4-tiadiazol içeren benzensulfonamid türevi bileşikler sentezlenmiştir. hCA I ve hCA II izozimlerine karşı inhibitör aktiviteleri incelenmiştir. N'-((5-(4-Klorofenil)furan-2-il)metilen)-2-((5-(fenilamino)-1,3,4-

tiyadiazol-2-il)tiyo)asetohidrazid 0.14 nM IC₅₀ değeri ile en yüksek aktiviteye sahip bileşiktir [210].



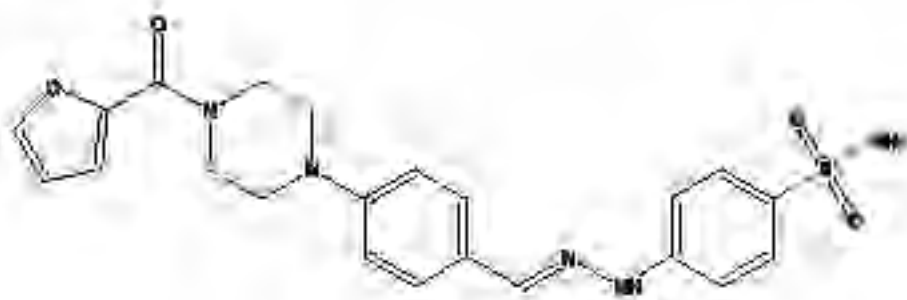
Şekil 2.5. *N'*-((5-(4-Klorofenil)furan-2-il)metilen)-2-((5-(fenilamino)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)tiyo)asetohidrazid

Chiaromonte vd., tarafından iki seri 2-benzilpiperazin türevi bileşik sentezlenmiştir. hCA I, II, IV, IX izozimleri üzerinde inhibisyon aktiviteleri test edilmiştir. (R)- 4-(3-benzil-4-metilpiperazin-1-karbonil)benzen-1-sülfonamid hCA IV izozimine karşı 1.7 nM IC₅₀ değeri ile en aktif türev olduğu gösterilmiştir [211].



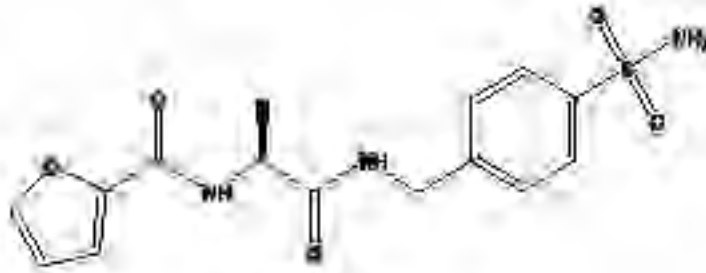
Şekil 2.6. (R)- 4-(3-benzil-4-metilpiperazin-1-karbonil)benzen-1-sülfonamid

Mishra vd., tarafından yeni benzen-sülfonamid türevi bileşikler sentezlenmiş ve hCA I, II, VII, IX izozimlerine karşı inhibitör aktiviteleri *in vitro* olarak araştırılmıştır. İki seri bileşik sentezlenmiş olup birinci seri 4-(2-(4-(4-süstitüepiperazin-1-il)benziliden)hidrazinil)benzen-sülfonamid türevi bileşiklerdir. Düşük ve orta nanomolar düzeyde hCA II ve VII izozimlerine karşı inhibitör aktivite gözlenmiştir. İkinci seri ise 4-(2-(4-(4-süstitüepiperazin-il)benziliden)hidrazinkarbonil)benzen-sülfonamid türevi bileşiklerdir ve hCA VII izozimine karşı yüksek inhibitör aktivite göstermiştir. (E)-4-(2-(4-(4-(Furan-2-karbonil)piperazin-1-il)benziliden)hidrazinil)benzen-sülfonamid 6.2 nM IC₅₀ değeri ile hCA VII izozimine karşı en yüksek inhibitör aktiviteyi göstermiştir [212].



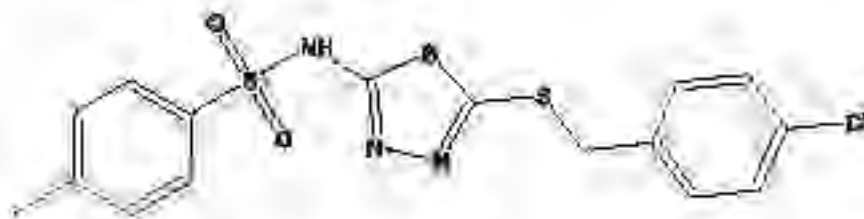
Şekil 2.7. (E)-4-(2-(4-(4-(Furan-2-karbonil)piperazin-1-il)benziliden)hidrazinil)benzensulfonamid

Mancuso vd., tarafından antikolera tedavisinde kullanılmak üzere bir dizi VchCA α , VchCA β ve VchCA γ enzimlerinin inhibitörleri sentezlenmiştir. Sentezlenen 4-sülfamoilfenilalkilamid türevi bileşikler arasında (S)-N-(1-okso-1-((4-sülfamoilbenzil)amino)propan-2-il)furan-2-karboksamid bileşiği en aktif türevi olduğu bildirilmiştir [213].



Şekil 2.8. (S)-N-(1-okso-1-((4-sülfamoilbenzil)amino)propan-2-il)furan-2-karboksamid

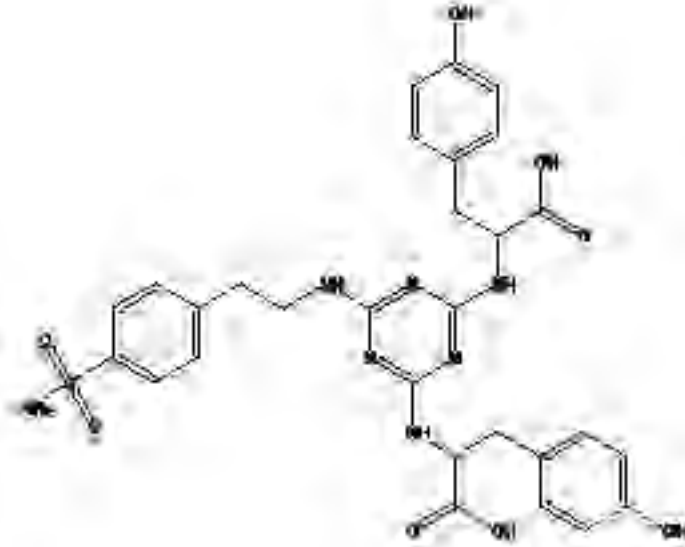
Abas ve diğerleri tarafından 2,5-disüstitüe-1,3,4-tiadiazol (5a-j) içeren bir dizi sülfonamid türevi sentezlenmiştir. hCA II enzime karşı aktivite çalışmaları yapılmıştır. Yapılan aktivite çalışmalarında standart olarak kullanılan asetazolamidin IC₅₀ 0.984 \pm 0.12 μ M değerine karşılık N-(5-((4-Klorobenzil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)-4-metilbenzenesülfonamid bileşiğinin IC₅₀ 0.60 \pm 0.02 μ M en aktif bileşik olduğunu göstermiştir [214].



Şekil 2.9. N-(5-((4-Klorobenzil)tiyo)-1,3,4-tiyadiazol-2-il)-4-metilbenzenesülfonamid

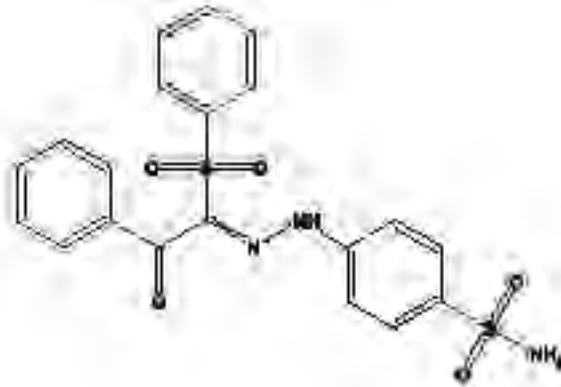
Polar (Ser, Thr, Asn, Gln) ve nonpolar (Ala, Tyr, Trp) aminoasitler ile disüstitüe 1,3,5-triazin bağlı 4-aminometil ve aminoetil benzensülfonamid türevi bileşikler Mikulova ve diğerleri tarafından sentezlenmiştir. hCA I, II, IV, tümör ilişkili izozim olan

IX ve XII izozimleri üzerinde *in vitro* inhibisyon testleri yapılmıştır. Deney sonuçlarına göre nonpolar aminoasit yan zincirine sahip inhibitörlerin düşük nanomolar konsantrasyonda hCA XII izozimine karşı yüksek aktivite gösterilmiştir. Yan zincirde Trp aminoasidi taşıyan türevler ise hCA II izozimine karşı yüksek inhibitör aktivite göstermiştir. Sentezlenen bileşikler arasında 2,2'-[(6-({2-(4-sülfamoilfenil)etil}amino)-1,3,5-triazin-2,4-diil)diimino]bis(3-(4-hidroksifenil)propanoik asit) bileşiği hCA XII izozimine karşı IC₅₀ 7.5 nM değerine sahip en aktif bileşik olduğu tespit edilmiştir [215].



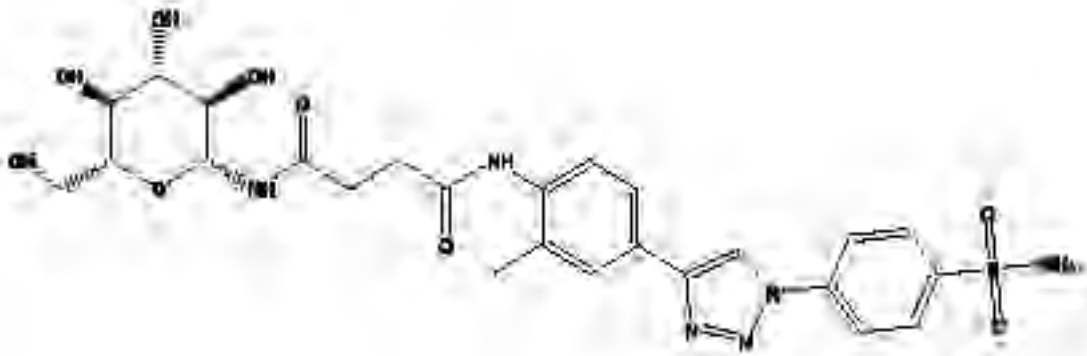
Şekil 2.10. 2,2'-[(6-({2-(4-Sülfamoilfenil)etil}amino)-1,3,5-triazin-2,4-diil)diimino]bis(3-(4-hidroksifenil)propanoik asit)

Eldeeb ve diğerleri tarafından asetazolamid standart olarak kullanılıp CA I, II, IV ve IX izozimlerinin inhibisyonu için bir dizi CA inhibitörü sentezlenmiştir. Sentezlenen bu benzenesülfonamid türevi bileşikler arasında hCA II izozimine karşı 7.6 nM IC₅₀ değeri ile güçlü selektif inhibitör aktivite 4-(2-(2-okso-2-fenil-1-(fenilsülfonil)etiliden)hidrazinil)benzenesülfonamid bileşiğinde gözlenmiştir [216].



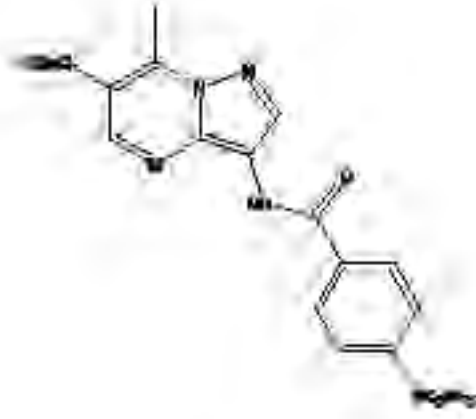
Şekil 2.11. 4-(2-(2-Okso-2-fenil-1-(fenilsülfonil)etilidene)hidrazineil)benzenesülfonamid

Zhang ve diğeri tarafından kuyruk yaklaşımına dayalı olarak sakkarit modifiye 15 yeni sülfonamid sentezlenmiştir. Bu sentezlenen yeni bileşikler sitoplazmik hCA II, transmembranal hCA IX ve XII izozimleri üzerinde inhibitör etkinlikleri değerlendirilmiştir. *In vitro* aktivite çalışmaları sonucunda hipoksi ile CA IX ekspresyonu indüklenen HT-29 ve MDA-MB-231 hücrelerinde canlılığı azalttığı gözlenmiştir. Yüksek CA IX ve XII ekspresyonuna sahip insan osteosarkom MG-63 hücre hattında N¹-(2-Metil-4-(1-(4-sülfamoilfenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)fenil)-N₄-((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimethyl)tetrahidro-2H-piran-2-il)süksinamid bileşiği referans madde olan asetazolamidden daha yüksek inhibitör aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur [217].



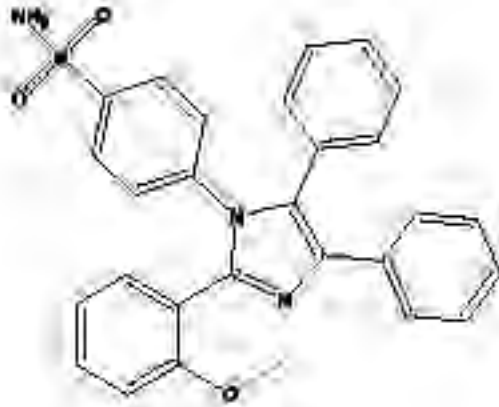
Şekil 2.12. N¹-(2-Metil-4-(1-(4-sülfamoil fenil)-1H-1,2,3-triazol-4-il)fenil)-N₄-((2R,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihidroksi-6-(hidroksimethyl)tetrahidro-2H-piran-2-il)süksinamid

Pirazolo[1,5- α]pirimidin içeren sülfonamid türevi hCA inhibitörü bileşikler Gümüş ve diğeri tarafından sentezlenmiştir. Fizyolojik olarak önemli hCA I, II, VA, IX and XII izozimleri üzerinde aktivite çalışmaları yapılmış olup II, IX ve XII izozimleri üzerinde güçlü etki ve selektivite gösteren bileşikler belirlenmiştir. Etil 7-metil-3-(4-sülfamoilbenzamido)pirazolo[1,5- α]pirimidin-6-karboksilat bileşiği 0.7 nM IC₅₀ değeri ile hCA II izozimine karşı en yüksek inhibitör aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir [218].



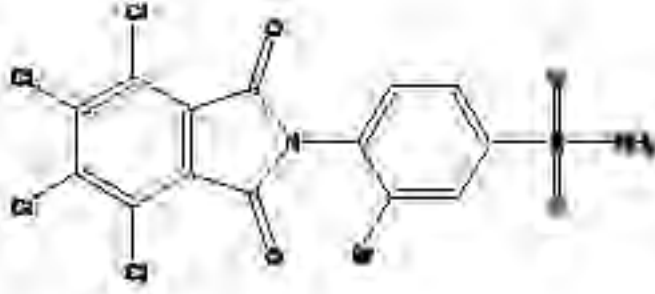
Şekil 2.13. *Etil 7-metil-3-(4-sülfamoilbenzamido)pirazolo[1,5-a]pirimidin-6-karboksilat*

Wahaibi vd., tarafından CA IX ve XII izozimleri üzerinde selektif inhibitör aktivitelerinin tespiti için tri-aril imidazol türevi içeren benzen sülfonamidler tasarlanıp sentezlenmiştir. Standart olan asetazolamide bağlı olarak altı bileşik CA IX izozimine karşı yüksek aktivite ve selektivite bulunmuştur. Sentezlenen bileşikler arasında 4-(2-(2-Metoksifenil)-4,5-difenil-1H-imidazol-1-il)benzen sülfonamid bileşiği 0.3 μ M IC₅₀ değeri ile CA IX izozimine karşı yüksek inhibitör aktivite göstermiştir. MTT çalışmaları sonucunda pankreas kanseri hücre hattı (Panc-1), meme kanseri hücre hattı (MCF-7), kolon kanseri hücre hattı (HT-29) ve epitelyal kanser hücre hattı (A-549) üzerinde yüksek aktivite göstermiştir [219].



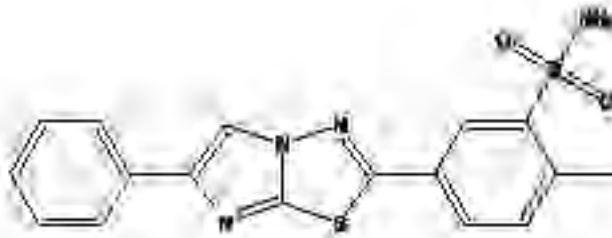
Şekil 2.14. *4-(2-(2-Metoksifenil)-4,5-difenil-1H-imidazol-1-il)benzen sülfonamid*

Sethi vd., tarafından aromatik sülfonamidler mono-, bi- ve trisiklik anhidritler ile reaksiyona girerek yeni CA inhibitörleri sentezlenmiştir. Sentezlenen bu yeni bileşikler hCA I, II, IX, XII izozimlerine karşı etkinlikleri araştırılmıştır. 3-Bromo-4-(4,5,6,7-Tetrakloro-1,3-Dioksoizindolin-2-il) benzenesülfonamid 2.4 nM IC₅₀ değeri ile hCA II izozimine karşı en yüksek inhibitör aktivite gösteren bileşiktir. Brinzolamid ile karşılaştırıldığında bu bileşik hCA II inhibisyonu açısından daha güçlüdür [220].



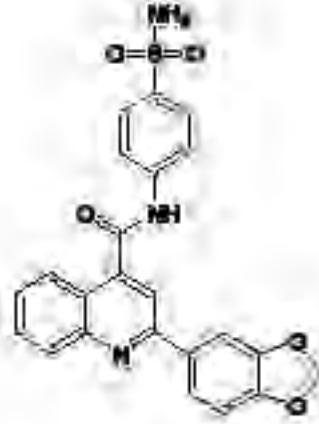
Şekil 2.15. 3-Bromo-4-(4,5,6,7-Tetrakloro-1,3-Dioksoizindolin-2-il) benzenesulfonamid

Swain vd., tarafından imidazotiyadiazol bağlı benzenesulfonamid türevi bileşikler sentezlenip hCA I, II, VA, IX izozimlerine karşı aktiviteleri *in vitro* olarak test edilmiştir. Sentezlenen bileşikler hCA I ve II izozimlerine hCA VA ve IX izozimlerinden daha çok selektivite göstermiştir. 0.246 μ M IC_{50} değeri ile 2-Metil-5-(6-fenilimidazo[2,1-b][1,3,4]tiyadiazol-2-il)benzenesulfonamid hCA II izozimine karşı en yüksek inhibitör aktiviteyi göstermiştir. Yapılan doking çalışmaları ile Thr200 aminoasidi ile H bağı yaptığı tespit edilmiştir [221].



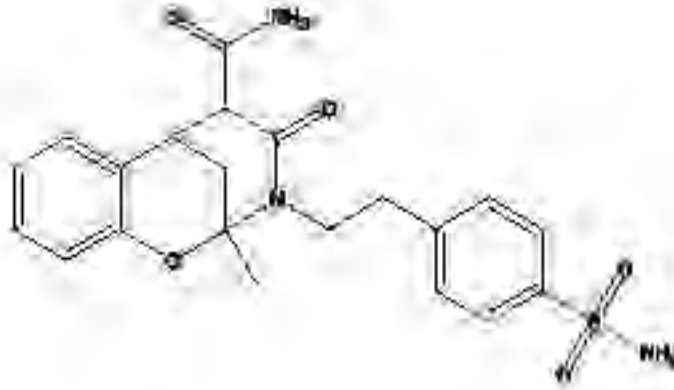
Şekil 2.16. 2-Metil-5-(6-fenilimidazo[2,1-b][1,3,4]tiyadiazol-2-il)benzenesulfonamid

Swain ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada yeni sulfonamid türevleri sentezlenmiş ve hCA I, hCAII, hCAIX ve hCAXII enzimlerine karşı inhibitör etkinlikleri *in vitro* olarak incelenmiştir. Yapılan biyolojik aktivite testleri sonucunda 2-(benzo[d][1,3]dioksol-5-il)-N-(4-sülfamoilfenil)kinolin-4-karboksamid bileşiği seri içerisinde 6.5 nM IC_{50} değeri ile hCAIX enzimine karşı en aktif türev olarak belirlenmiştir [222].



Şekil 2.17. 2-(Benzo[d][1,3]dioksol-5-il)-N-(4-sülfamoilfenil)kinolin-4-karboksamid bileşiğinin kimyasal yapısı

Angeli ve diğerleri tarafından Pirazolo[4,3-c]piridin sülfonamid türevi CA inhibitörü bileşikler sentezlenmiştir. hCA I, hCA II, hCA IX, hCA XII ve farklı mikroorganizmalardan elde edilen üç β -CA ve üç γ -CA enzimlerine karşı inhibisyon aktiviteleri araştırılmıştır. 2-Metil-4-okso-3-(4-sülfamoilfenetil)-3,4,5,6-tetrahidro-2H-2,6-metanobenzo[g] [1,3]oksazosin-5-karboksamid bileşiği hCA II enzimine karşı IC_{50} : 5.6 nM değeri ile en yüksek aktiviteyi gösteren türevdir. Yapılan docking çalışmaları ile sülfonamidin negatif yüklü azot atomu ile Zn^{++} iyonu şelatladığı ve hidrojen bağı oluşturduğu gösterilmiştir [223].



Şekil 2.18. 2-Metil-4-okso-3-(4-sülfamoilfenetil)-3,4,5,6-tetrahidro-2H-2,6-metanobenzo[g] [1,3]oksazosin-5-karboksamid

3. GEREÇLER

3.1. Kullanılan Maddeler

1-Metilpiperazin	: Merck, Almanya
1-Etilpiperazin	: TCI, Japonya
1-[2-(Dimetilamino)etil]piperazin	: Acros Organics, Almanya
1-(4-Florobenzil)piperazin	: TCI, Japonya
1-(3-Hidroksipropil)piperazin	: Acros Organics, Almanya
1-(4-Klorobenzil)piperazin	: Sigma-Aldrich, Almanya
1-(4-Metilbenzil)piperazin	: Sigma-Aldrich, Almanya
1-(Metilsülfonil)piperazin	: Sigma-Aldrich, Almanya
1-(Etansülfonil)piperazin	: Sigma-Aldrich, Almanya
Asetik asit	: Sigma-Aldrich, Almanya
Aseton	: VWR Chemicals, Fransa
DMSO- <i>d</i> ₆	: Merck, Almanya
Dimetilformamid	: Sigma, Almanya
Dimetilsülfoksit	: Sigma, Almanya
Etanol	: Merck, Almanya
Etil asetat	: Carlo Erba Reagents, Fransa
Petrol eteri	: VWR Chemicals, Fransa
Potasyum karbonat	: Sigma-Aldrich, Almanya
Silikajel 60 F254 kaplı alüminyum İTK plağı	: Merck, Almanya

3.2. Kullanılan Cihazlar

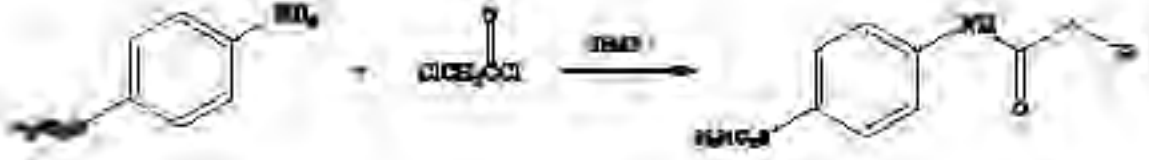
Elektronik terazi	: Shimadzu, Libror EB-330 HU, Japonya
Erime derecesi tayin cihazı	: Mettler Toledo-MP90 Melting Point System
İnkübatör	: Heraeus, Almanya
Infrared spektrofotometresi	: Shimadzu-IR Affinity-1S, Japonya
Kütle spektrometresi	: Shimadzu, LCMS-IT-TOF, Japonya
Manyetik tabanlı ısıtıcı karıştırıcı	: Heidolph, MR 3003, Almanya
Nükleer manyetik rezonans spektrometresi	: Bruker, UltraShield 300 MHz, ABD
Steril kabin	: Class II TypeA2 (CHC-222A2-60), Kore
Ultraviyole lambası	: Camag, Cabinet, İsviçre
Vorteks	: Wisemix, Kore
Mikroplate okuyucu	: BioTek-Synergy H1 ABD
Robotik pipetleme tablası	: BioTek-Preccision XS, ABD

4. YÖNTEMLER

4.1. Sentez Çalışmaları

4.1.1. 2-Kloro-N-(4-aminosülfonilfenil)asetamit (1) sentezi (Yöntem A)

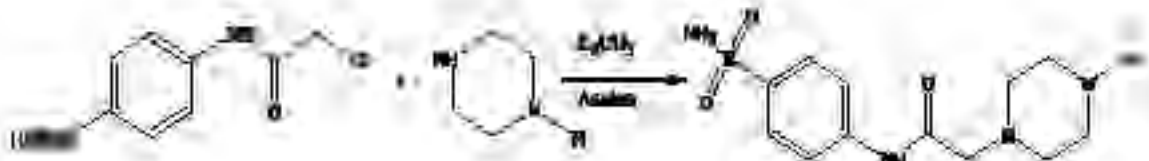
DMF'de (20 mL) çözündürülerek 4-Aminobenzensülfonamit (10 g, 0,06 mol) buz banyosunda soğutulmuştur. Kloroasetil klorür (ClCH_2COCl) (4,77 mL, 0,072 mol) DMF'de (5 mL) çözündürülerek damlatma hunisine aktarılmıştır. ClCH_2COCl çözeltisi, 4-aminobenzensülfonamitin buz banyosundaki çözeltisi ile sürekli karıştırılarak damlalar halinde ilave edilmiştir. Damlatma işlemi bittikten sonra yaklaşık 4 saat daha karıştırmaya devam edilmiştir. Reaksiyonu tamamlanan karışımın içinde 10 mL buzlu su olan bir behere aktararak çöktürülmüştür. Çöken katı kütle süzülerek alınmış ve etanolden kristallendirilmiştir.



Şekil 4.1. 2-Kloro-N-(4-sülfamoilfenil)asetamit (1) sentezi

4.1.2. 2-(4-Süstitüepiperazin-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit türevlerinin sentezi (Yöntem B)

2-Kloro-N-(4-aminosülfonilfenil)asetamit (1) (0,3 g, 0,0012 mol), potasyum karbonat (0,166 g, 0,0012 mol) ve 1-süstitüepiperazin (0,0018 mol) türevi, aseton (60 mL) içerisinde geri çeviren soğutucuda 7 saat kaynatılarak karıştırılmıştır. İTK ile reaksiyonun bitip bitmediği kontrol edilmiştir. Aseton ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra ürün etanolden kristallendirilmiştir.



Şekil 4.2. 2-(4-Süstitüepiperazin-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit türevlerinin sentezi

4.2. İTK Çalışmaları ve R_f Değerlerinin Saptanması

Bütün sentez çalışmalarında reaksiyonun tamamlanıp tamamlanmadığı İTK ile kontrol edilmiştir. Deney ortamından belirli zaman aralıklarında alınan numunelerin başlangıç maddelerinin etanoldeki çözeltisi ile adsorban olarak kullanılan silika jel 60

F254 kaplı, önceden uygun çözücü karışımları ile doyurulmuş alüminyum plaklara kılcal borular yardımı ile uygulanıp hareketli fazlar içerisinde sürüklenmiştir. Ultraviyole (254 nm ve 366 nm) ışığı altında lekeler saptanmıştır. İTK sonucuna göre reaksiyon sonlandırılmış veya devam edilmiştir. Çözücü sistemi olarak petrol eteri-etil asetat (3:1, 1:1) çözücü sistemi kullanılmıştır.

4.3. Erime Noktası Tayini

Mettler Toledo-MP90 Melting Point System kullanılarak sentezlenen bileşiklerin erime noktaları tayin edilmiştir. Kılcal borulara 0.5 cm yüksekliğinde sentezlenen bileşikler eklenerek cihazın haznesine yerleştirilmiştir. İşlem sonucunda cihazdan alınan görüntüler izlenerek erime noktası tayini yapılmıştır.

4.4. ¹H-NMR Spektrumlarının Alınması

Tez kapsamında sentezlenen bileşiklerin ¹H-NMR spektrumları, sentez ürünlerinin dimetilsülfoksit-d₆ (DMSO-*d*₆) içindeki çözeltileri, tetrametilsilana (TMS) karşı Bruker 500 MHz NMR spektrometresine uygulanması ile sonuçlar alınmıştır.

4.5. ¹³C-NMR Spektrumlarının Alınması

Elde edilen sonuç bileşiklerin ¹³C-NMR spektrumları, sentez ürünlerinin dimetilsülfoksit-d₆ (DMSO-*d*₆) içindeki çözeltilerinin, tetrametilsilana (TMS) karşı Bruker 100 MHz NMR spektrometresine uygulanması sonucu alınmıştır.

4.6. Kütle Spektrumlarının Alınması

Sentezlenen bileşiklerin kütle spektrumları, numunelerin asetonitril içindeki çözeltilerinden LCMS-IT-TOF (Shimadzu, Kyoto, Japonya) cihazında elektron sprej iyonizasyon (ESI) iyonlaştırma tekniği kullanılarak negatif ve pozitif modda sonuçlar elde edilmiştir.

4.7. Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Bu tez içerisinde sentezlenen bileşiklerin karbonik anhidraz inhibitör etkileri araştırılmıştır. Biyolojik aktivite çalışmalarının her kademesinde Milipor, Milli-Q Synthesis A10 saflaştırma cihazından alınan distile su kullanılmıştır. Kullanılan bütün çözeltilerin yeni hazırlanmasına ve hazırlandıktan sonra 1 hafta içerisinde kullanılmasına

dikkat edilmiştir. Enzim inhibisyon çalışmasında hazırlanan çözeltilerin kısımlar halinde ayrılması, test bileşiklerinin 96 kuyucuklu plakalara uygulanması, enzim substrat çözeltilerinin ilave edilmesi işlemlerinde BioTek-Precision Power (Amerika Birleşik Devletleri) robotik pipetleme sistemi kullanılmıştır. Enzim protokolünün oluşturulması, izlenmesi ve spektrofotometrik ölçümlerin alınması, BioTek-Synergy H1 Microplate Reader (Amerika Birleşik Devletleri) cihazı kullanılmıştır. Bileşiklerin inhibisyon aktiviteleri spesifik CA enzim inhibitörü olan asetazolamid referans madde olarak kullanılmıştır. Bileşiklerin inhibisyon aktiviteleri BioVision CA Inhibitor Screening Kitleri (Milpitas, CA, USA) kullanılarak incelenmiştir.

İnhibitör aktivite, substrat ve enzimin kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. CA'ya özgü bir inhibitör varlığında, enzim aktivitesini kaybeder ve absorbansı azalır. Kit içeriğinde CA Test Tamponu 20 ml, CA Seyreltme tamponu 1.5 ml, CA enzim 1 şişe, CA Substrat 500 µl, CA İnhibitörü (2 mM Asetazolamid) 200 µl bulunmaktadır.

Bileşiklerin biyolojik aktiviteleri, öncelikle 10^{-3} ve 10^{-4} M'lık iki konsantrasyonda %2'lik dimetilsülfoksit (DMSO) içerisinde hazırlanarak test edilmiştir. Aktivite değerleri %0-100 aralığında inhibisyonları değerlendirilmiştir.

4.7.1. Reaktif çözeltilerinin hazırlanması

CA test tamponu, CA seyreltme tamponu, CA substratı, CA inhibitörü -20°C 'de saklanıp aktivite çalışmalarına başlamadan önce $20-25^{\circ}\text{C}$ 'ye getirilmiştir. CA enzimi ise bir şişe için 500 µl seyreltme tamponu eklenerek sulandırılmıştır.

4.7.2. İnhibitör bileşiklerin çözeltilerinin hazırlanması

Sentezlenen bileşikler %2'lik dimetilsülfoksitte 10^{-3} ve 10^{-4} M'lık çözeltileri hazırlanmıştır. Aktivite değerleri %0-100 aralığında inhibisyonlar değerlendirilmiştir. Bileşiklerin 10^{-4} M konsantrasyonda %50 ve daha fazla değerde inhibisyon görülen bileşiklerin 10^{-9} M konsantrasyona kadar alt konsantrasyonlarda inhibisyon oranları incelenmiştir.

96 kuyucuklu plaka kullanılarak inhibisyon aktiviteleri araştırılmıştır. Enzim kontrol, numune, inhibitör kontrol, solvent kontrol, arkaplan kontrolü olmak üzere kuyucuklar sınıflandırılmıştır. CA test tamponundan her bir kuyucuğa arkaplan kontrolü için 85 µL, enzim kontrolü için 90 µL, numune, inhibitör kontrol, solvent kontrolü için 90 µL eklenmiştir. CA enzim çözeltisinden her bir kuyucuğa enzim kontrolü, numune, inhibitör kontrol, solvent kontrolü için 5 µL eklenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin çözeltileri 10 µL numune, arkaplan kontrolü, solvent kontrolü kuyucuklarına eklenmiştir.

CA inhibitörü (asetazolamid) 10 µL inhibitör kontrol, arkaplan kontrol kuyucuklarına eklenmiştir. 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Son olarak 5 µL CA substratı her bir kuyucuğa eklenmiştir. Oda sıcaklığında 1 saat boyunca kinetik modda 405 nm'de absorbansı ölçüm yapılmıştır. Belirli iki zaman aralığında ölçülen absorbanslar alınarak lineer regresyon ile tüm numuneler için % inhibisyonları hesaplanmıştır.

$$\%R\text{ölatif aktivite} = \frac{\Delta Ab N}{\Delta Ab EK} \times 100$$
$$\%R\text{ölatif inhibisyon} = \frac{\Delta Ab EK - \Delta Ab N}{\Delta Ab EK} \times 100$$

EK: Enzim kontrol

N: Numune

Δ Ab: Absorbans değişimi

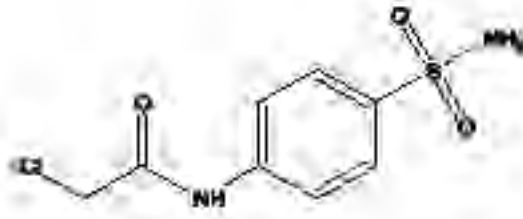
4.8. Moleküler Modelleme Çalışmaları

Tez kapsamında sentezi tamamlanan, CA enzimi üzerine inhibisyon aktivitesi en yüksek bulunan bileşik **2e**'nin ilgili enzim aktif bölgeleriyle (CA-I, CA-II, CA-IX, CA-XII) olası etkileşimlerini belirlemek için CA-I enzime ait (PDB Kodu: 1AZM) [225], CA-II enzime ait (PDB Kodu: 3HS4) [226], CA-IX enzime ait (PDB Kodu: 7JO2) [227] ve CA-XII enzime ait (PDB Kodu: 1JD0) [228] kristal yapıları üzerinde docking çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda *Glide 7.1* [229-231] programı ile gerçekleştirilen docking tekniği uygulanmış ve GlideScore SP ile en olası pozlar üretilmiştir.

5. BULGULAR ve TARTIŞMALAR

5.1. Sentez Çalışmaları

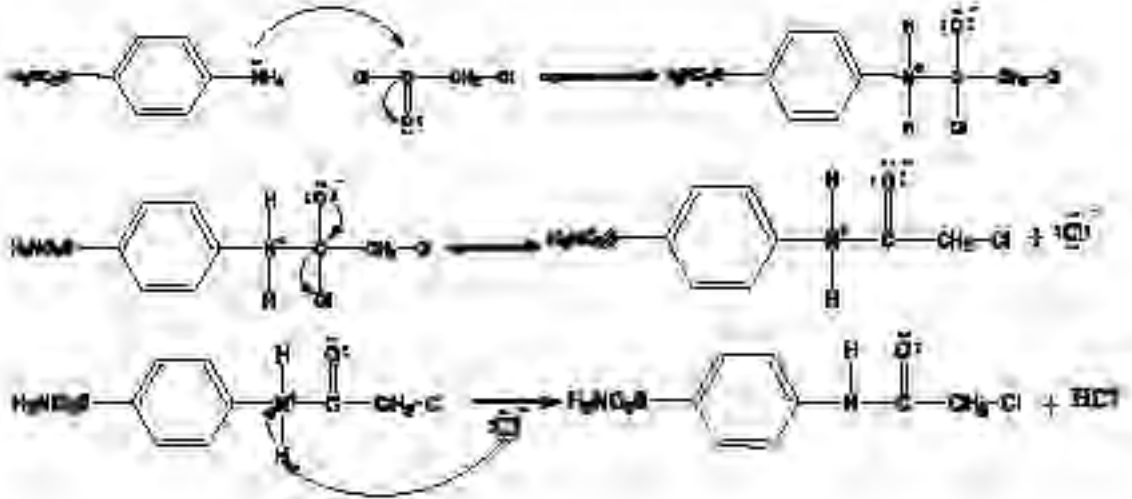
5.1.1. 2-Kloro-N-(4-aminosülfonilfenil)asetamit (1)



Şekil 5.1. 2-Kloro-N-(4-aminosülfonilfenil)asetamit (1) bileşiği

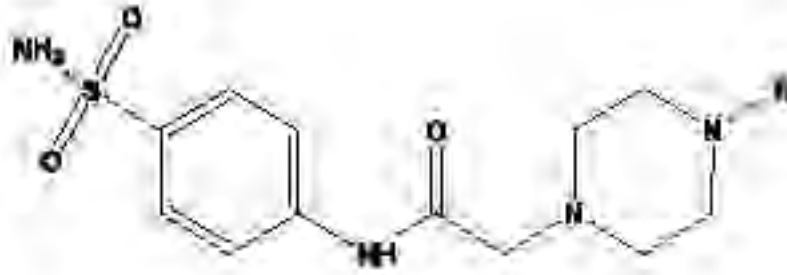
Yöntem A'ya göre sentezlenmiştir. Verim: %85.

Deneysel E.N.: 215-217 °C, Literatür E.N.: 217 °C [166]



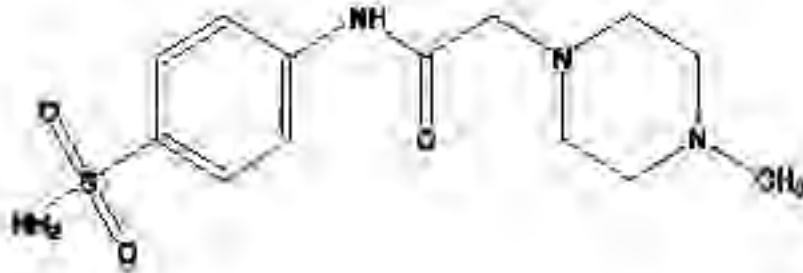
Şekil 5.2. 2-Kloro-N-(4-aminosülfonilfenil)asetamit (1) sentezi için önerilen reaksiyon mekanizması

5.1.2. 2-(4-Süstitüepiperazin-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit türevleri (2a-2j)



Şekil 5.3. 2-(4-Süstitüepiperazin-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit türevlerinin (2a-2n) genel yapısı
Yöntem B'ye göre sentezlenmiştir. Verim %75-87.

5.1.3. 2-(4-Metilpiperazin-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2a)



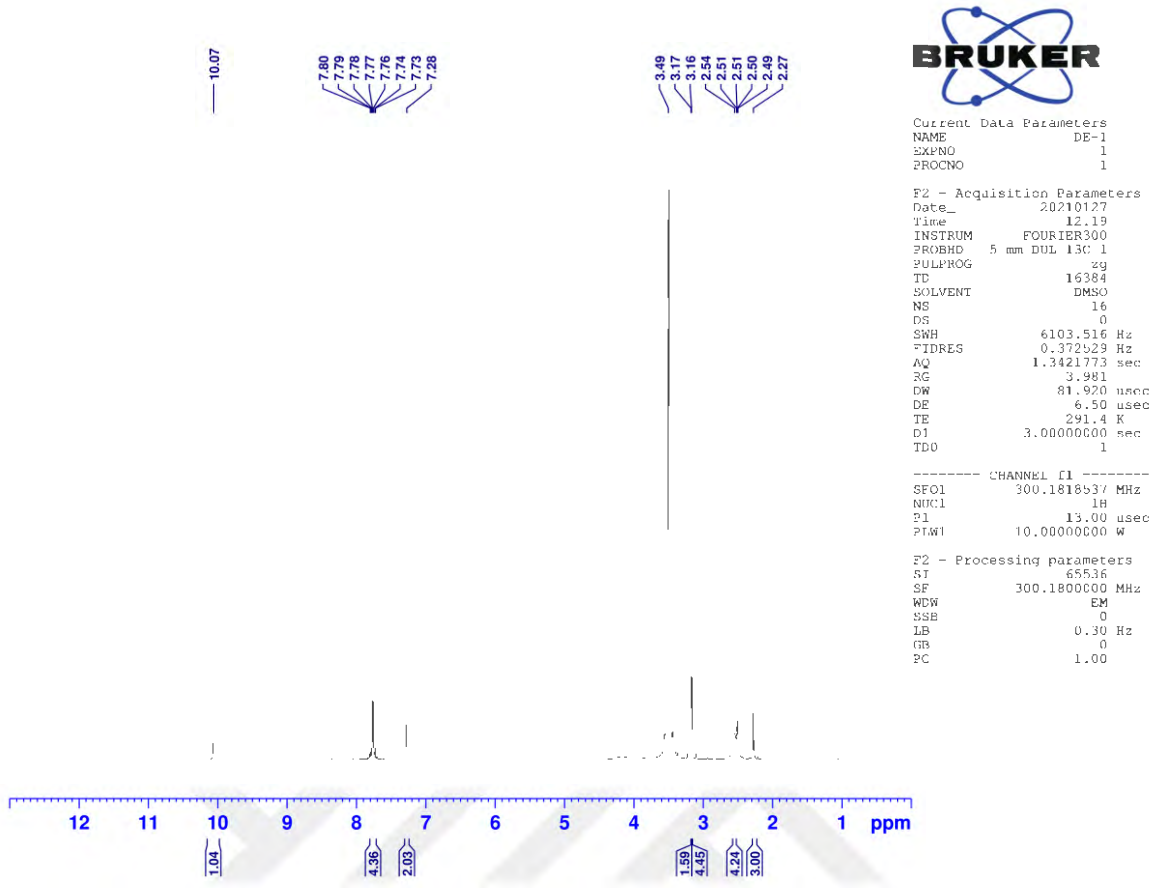
Şekil 5.4. 2-(4-Metilpiperazin-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2a) bileşiği

Verim: %81.

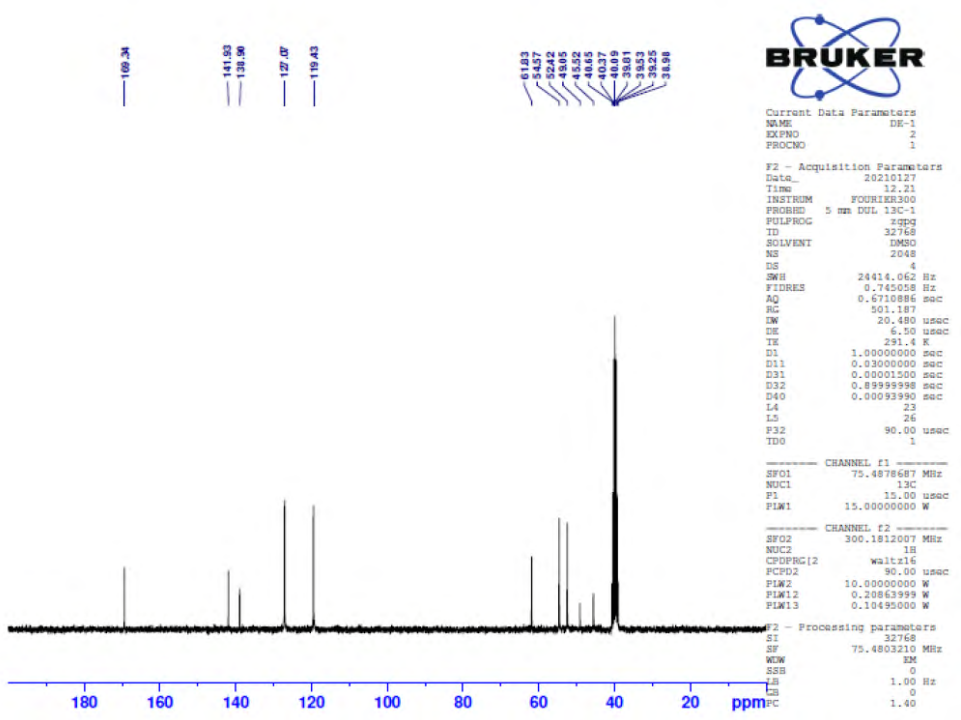
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.27 (3H, s, -CH₃), 2.49-2.54 (4H, m, piperazin-CH₂), 2.54 (4H, m, piperazin-CH₂), 3.17(2H, s, CH₂), 7.28 (2H, s, NH₂), 7.73-7.80 (4H, m, fenil-H), 10.07(1H, s, amit-NH-).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 45.52, 49.05, 52.42, 54.57, 61.83, 119.43, 127.07, 138.90, 141.93, 169.34.

HRMS (m/z): [M+H]⁺ calcd for C₁₃H₂₂N₄O₃S: 313.1329; found: 313.1319.



Şekil 5.5. Bileşik 2a'ya ait ¹H-NMR spektrumu



Şekil 5.6. Bileşik 2a'ya ait ¹³C-NMR spektrumu

Data File: C:\LabSolutions\Data\Analiziderya\DE-1_1.lcd

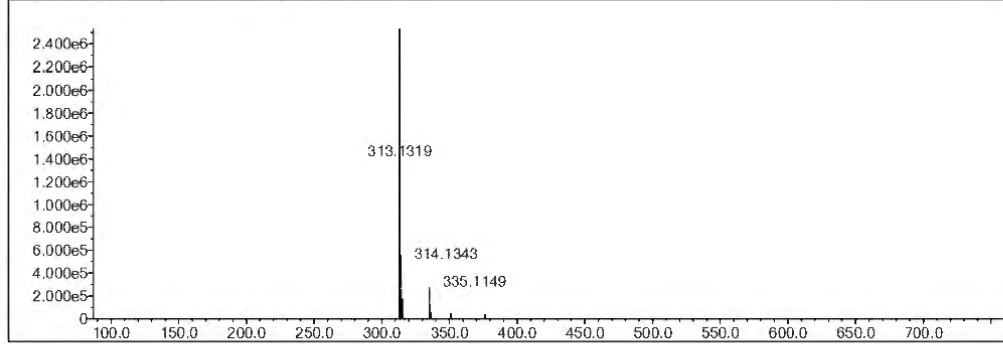
Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Use Adduct
H	1	9	35	O	2	0	3	S	2	0	2	Ru	2	0	0	H
C	4	7	35	F	1	0	0	Cl	1	0	0	Pd	2	0	0	
N	3	0	5	P	3	0	0	Br	1	0	0	i	3	0	0	

Error Margin (ppm): 5
 HC Ratio: unlimited
 Max Isotopes: 3
 MSn Iso RI (%): 10.00

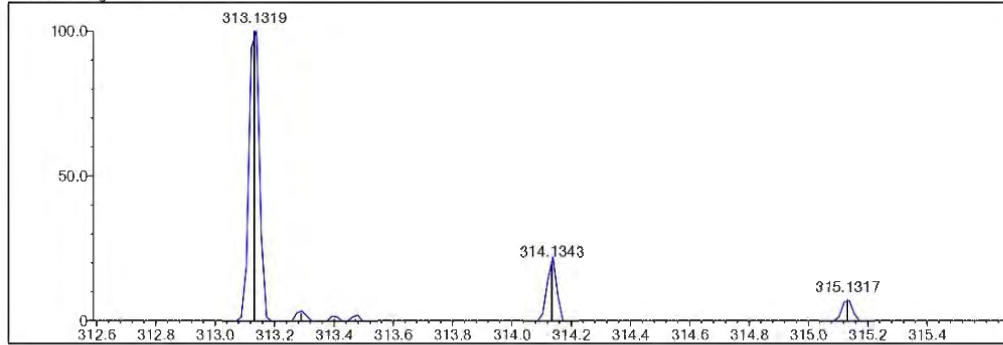
DBE Range: 5.0 - 25.0
 Apply N Rule: yes
 Isotope RI (%): 1.00
 MSn Logic Mode: AND

Electron Ions: both
 Use MSn Info: yes
 Isotope Res: 9000
 Max Results: 50

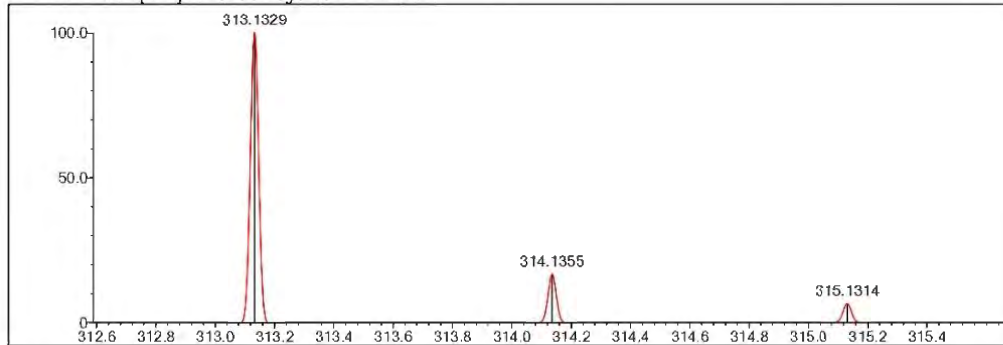
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time: 1.800 Scan#: 271



Measured region for 313.1319 m/z



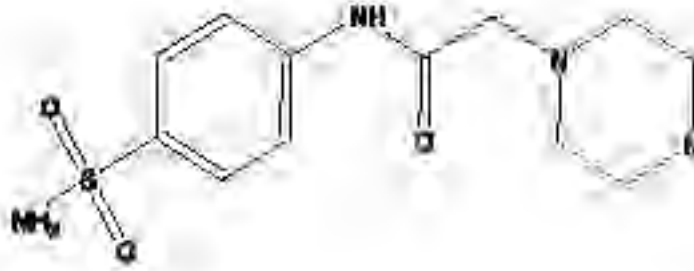
C13 H20 N4 O3 S [M+H]⁺ : Predicted region for 313.1329 m/z



Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	90.96	C13 H20 N4 O3 S	[M+H] ⁺	313.1319	313.1329	-1.0	-3.19	96.22	6.0

Şekil 5.7. Bileşik 2a'ye ait kütle spektrumu

5.1.4. 2-(4-Etilpiperazin-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2b)



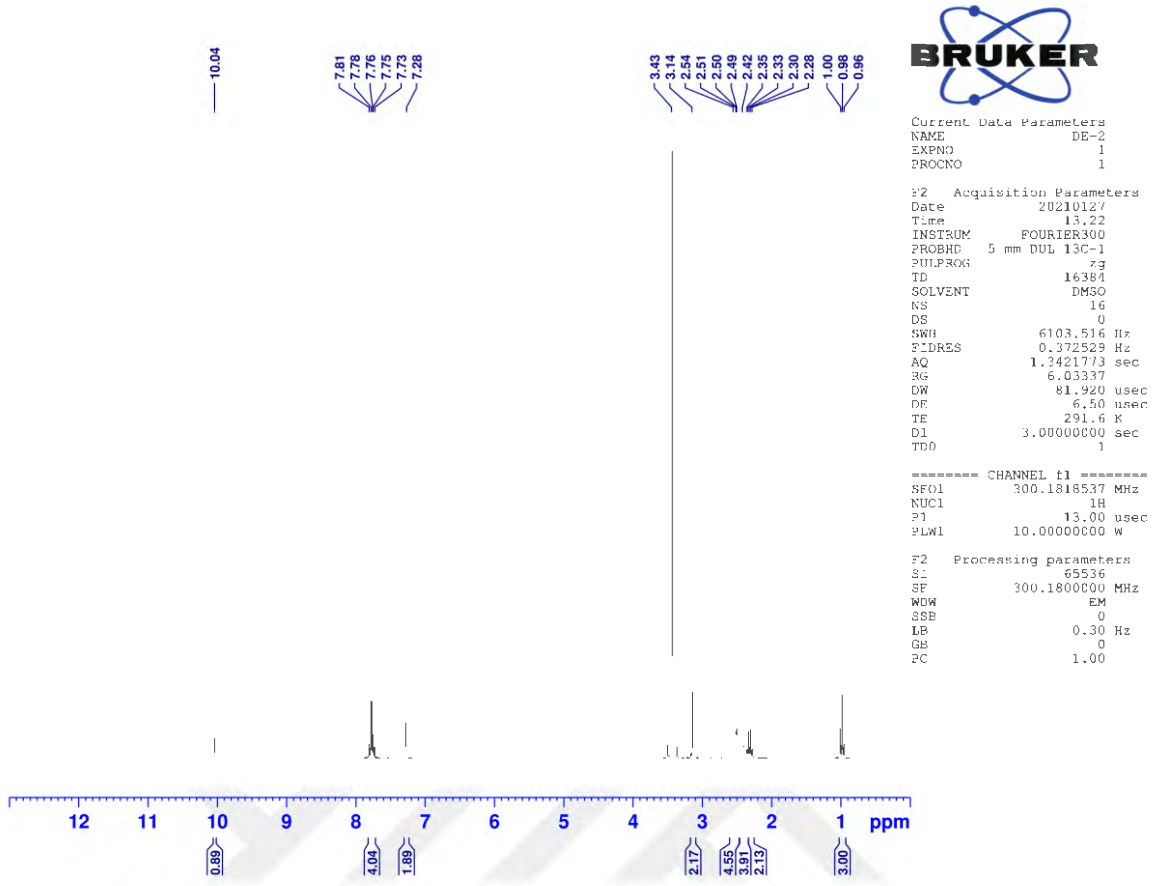
Şekil 5.8. 2-(4-Etilpiperazin-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2b) bileşiği

Verim: %79.

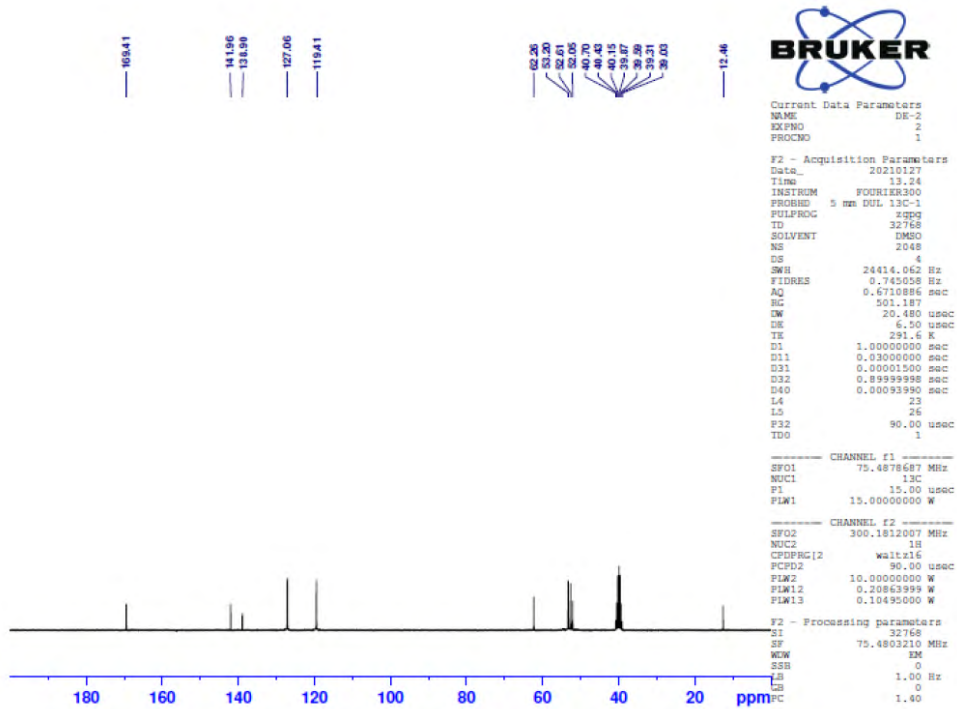
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 0.96-1.0(3H, s, -CH₃), 2.28-2.35(2H, q, *J*= 7.18,-CH₂), 2.42 (4H, m, piperazin-CH₂), 2.49-2.54 (4H, m, piperazin), 3.14 (2H, s,-CH₂), 7.28 (2H, s,NH₂), 7.73-7.81 (4H, dd, fenil-H), 10.04(1H, s, amit-NH-).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 12.46, 52.05, 52.61, 53.20, 62.26, 119.41, 127.06, 138.90, 141.96, 169.41.

HRMS (m/z): [M+H]⁺ calcd for C₁₄H₂₂N₄O₃S: 327.1485; found: 327.1481.



Şekil 5.9. Bileşik 2b'ye ait ^1H -NMR spektrumu



Şekil 5.10. Bileşik 2b'ye ait ^{13}C -NMR spektrumu

Data File: C:\LabSolutions\Data\Analiz\deya\DE-2_2.lcd

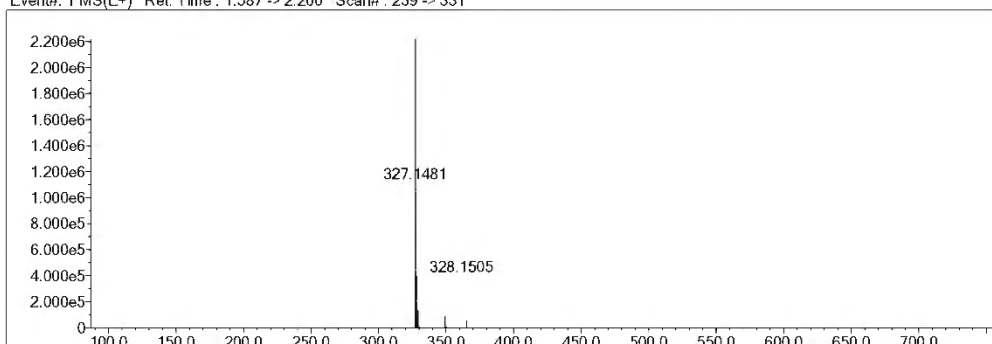
Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Use Adduct
H	1	9	35	O	2	0	3	S	2	1	2	Ru	2	0	0	H
C	4	7	35	F	1	0	0	Cl	1	0	0	Pd	2	0	0	
N	3	0	5	P	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 5
 HC Ratio: unlimited
 Max Isotopes: 3
 MSn Iso RI (%): 10.00

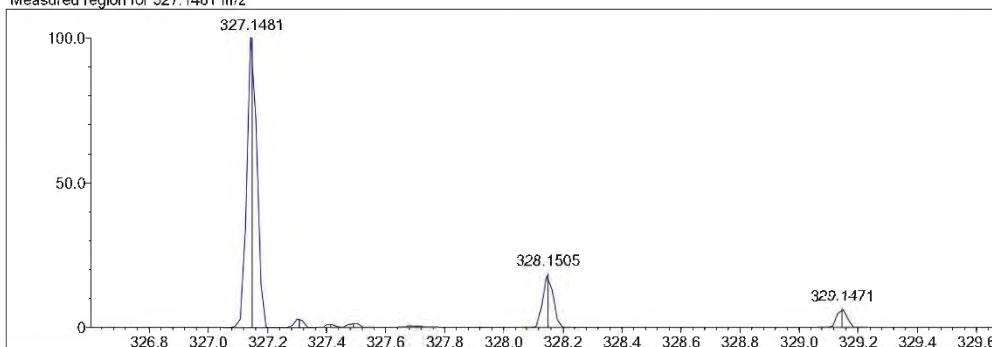
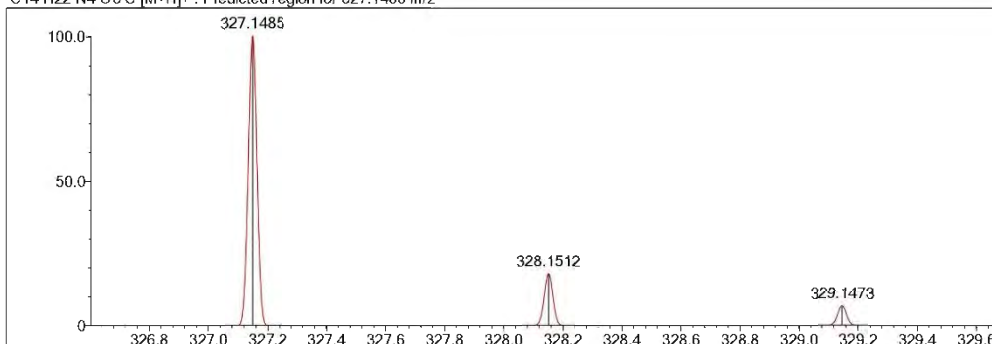
DBE Range: 5.0 - 25.0
 Apply N Rule: yes
 Isotope RI (%): 1.00
 MSn Logic Mode: AND

Electron Ions: both
 Use MSn Info: yes
 Isotope Res: 9000
 Max Results: 50

Event#: 1 MS(E+) Ret. Time: 1.587 -> 2.200 Scan#: 239 -> 331



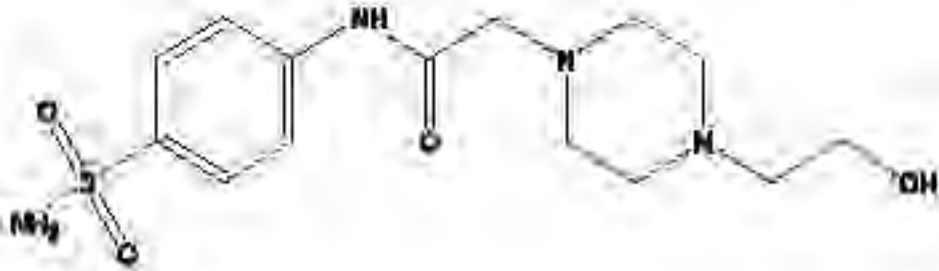
Measured region for 327.1481 m/z

C14 H22 N4 O3 S [M+H]⁺: Predicted region for 327.1485 m/z

Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	79.68	C14 H22 N4 O3 S	[M+H] ⁺	327.1481	327.1485	-0.4	-1.22	80.12	6.0

Şekil 5.11. Bileşik 2b'ye ait kütle spektrumu

5.1.5. 2-(4-(2-Hidroksietil)piperazin)-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2c)



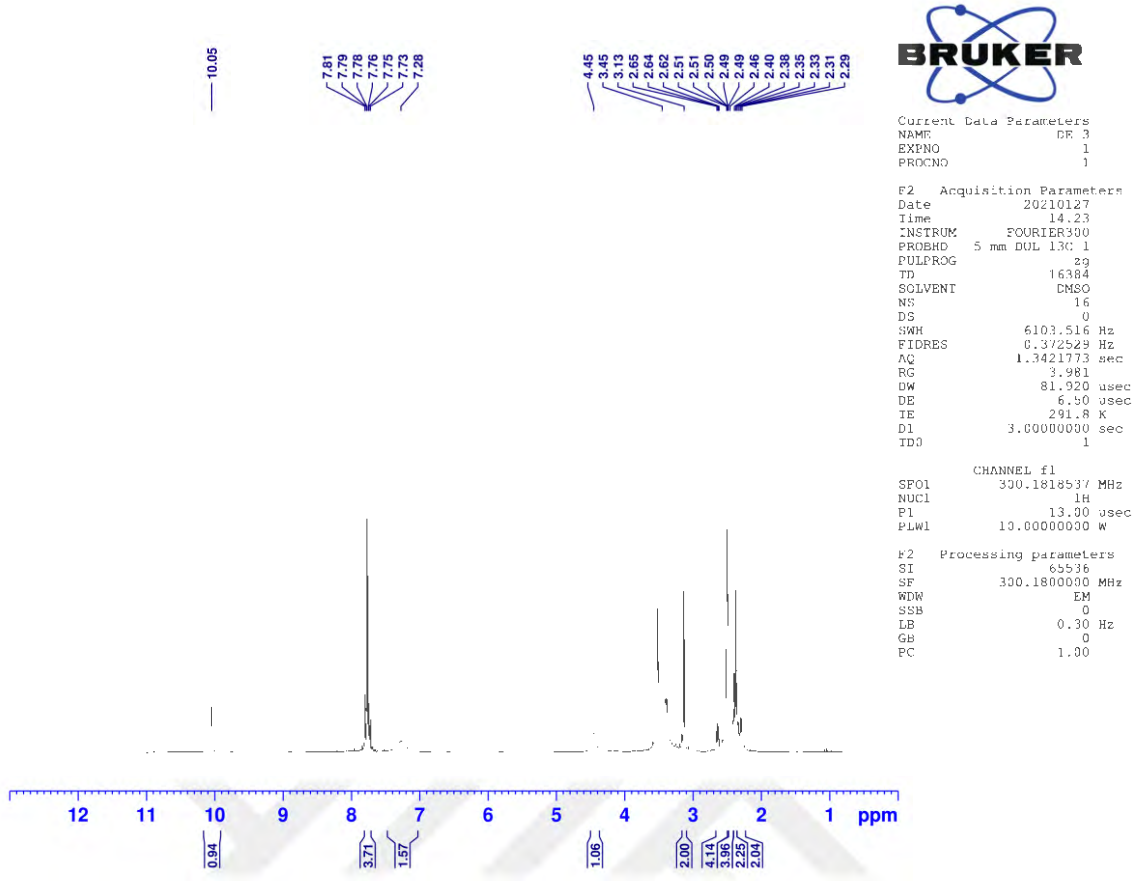
Şekil 5.12. 2-(4-(2-Hidroksietil)piperazin)-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2c) bileşiği

Verim: %82.

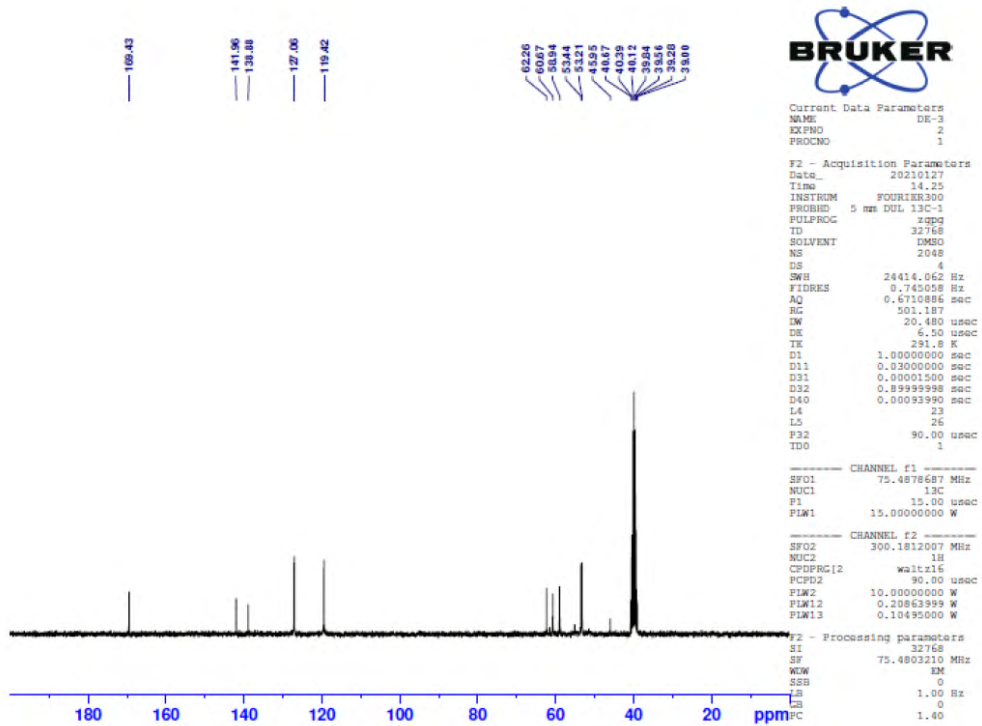
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.29-2.40 (2H, m, -CH₂), 2.46 (2H, t, *J*=6.3, -CH₂), 2.49-2.51 (4H, m, piperazin-CH₂), 2.62-2.65 (4H, m, piperazin-CH₂), 3.13 (2H, s, -CH₂), 4.45 (1H, s, OH), 7.28 (2H, s, NH₂), 7.73-7.81 (4H, dd, fenil-H), 10.05 (1H, s, amit-NH-).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 45.95, 53.21, 53.44, 58.95, 60.67, 62.26, 119.42, 127.06, 138.88, 141.96, 169.43.

HRMS (m/z): [M+H]⁺ calcd for C₁₄H₂₂N₄O₄S:343.1435; found: 343.1426.



Şekil 5.13. Bileşik 2c'ye ait ¹H-NMR spektrumu



Şekil 5.14. Bileşik 2c'ye ait ¹³C-NMR spektrumu

Data File: C:\LabSolutions\Data\Analiz\derya\DE-3_3.lcd

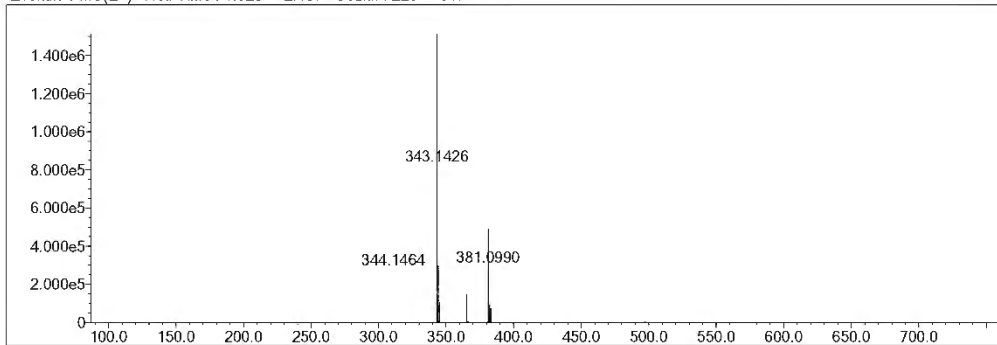
Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Use Adduct
H	1	9	35	O	2	0	4	S	2	1	2	Ru	2	0	0	H
C	4	7	35	F	1	0	0	Cl	1	0	0	Pd	2	0	0	
N	3	0	5	P	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 5
 HC Ratio: unlimited
 Max Isotopes: 3
 MSn Iso RI (%): 10.00

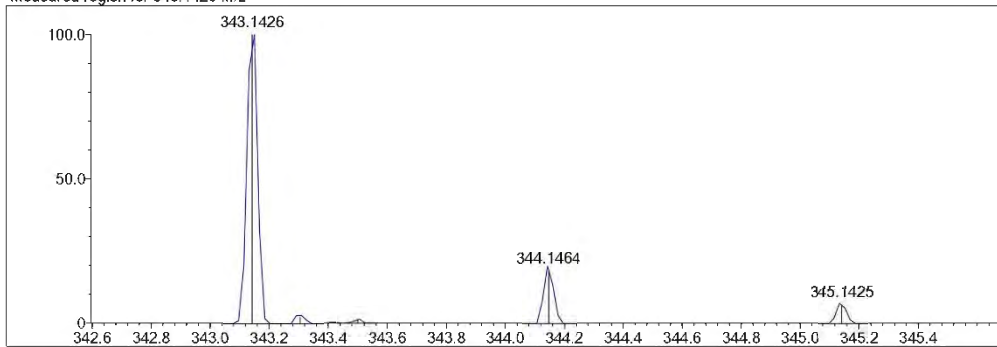
DBE Range: 5.0 - 25.0
 Apply N Rule: yes
 Isotope RI (%): 1.00
 MSn Logic Mode: AND

Electron Ions: both
 Use MSn Info: yes
 Isotope Res: 9000
 Max Results: 50

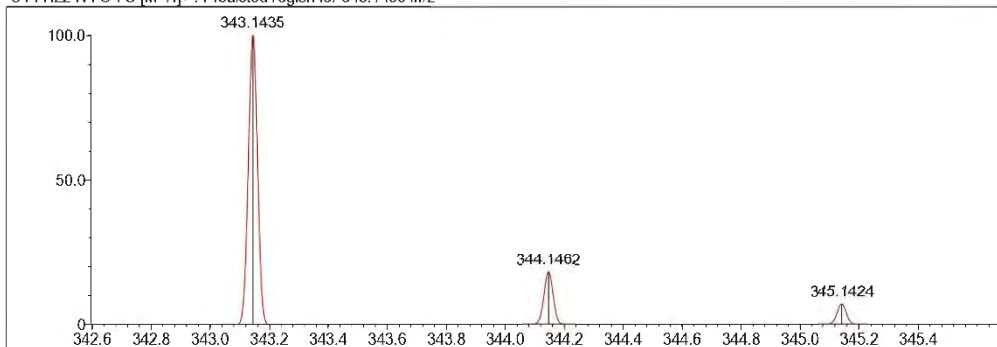
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 1.520 -> 2.107 Scan#: 229 -> 317



Measured region for 343.1426 m/z



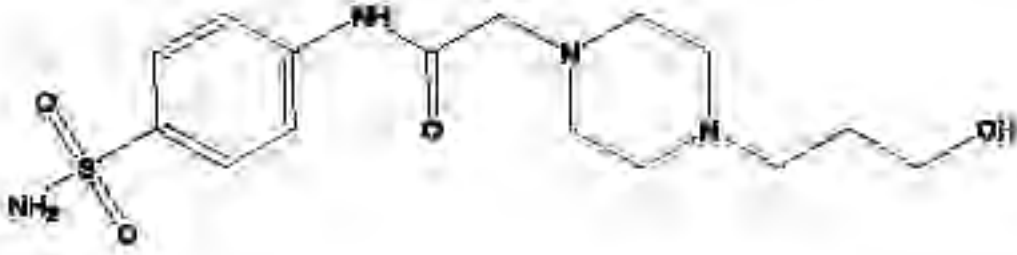
C14 H22 N4 O4 S [M+H]⁺ : Predicted region for 343.1435 m/z



Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	92.56	C14 H22 N4 O4 S	[M+H] ⁺	343.1426	343.1435	-0.9	-2.62	96.47	6.0

Şekil 5.15. Bileşik 2c'ye ait kütle spektrumu

5.1.6. 2-(4-(2-Hidroksipropil)piperazin-1-il)-N-(4-sülfamoilfenil)asetamit (2d)



Şekil 5.16. 2-(4-(2-Hidroksipropil)piperazin-1-il)-N-(4-sülfamoilfenil)asetamit (2d) bileşiği

Verim: %78.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.51-1.60 (2H, m, -CH₂), 2.31-2.35 (2H, t, *J*=14.41,-CH₂), 2.42 (4H, m, piperazin-CH₂), 2.49-2.51 (4H, m, piperazin-CH₂), 3.14 (2H, s,-CH₂), 3.36 (2H, t, *J*=6.29,-CH₂), 4.47(1H, s, OH), 7.27 (2H, s,NH₂), 7.73-7.82 (4H, dd, fenil-H), 10.04(1H, s, amit-NH-).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 30.03, 53.13, 53.29, 55.59, 59.87, 62.26, 119.40, 127.06, 138.91, 141.98, 169.39.

HRMS (m/z): [M+H]⁺ calcd for C₁₅H₂₄N₄O₄S: 357.1591; found: 357.1592.

Data File: C:\LabSolutions\Data\Analiz\derya\DE-4. 4.lcd

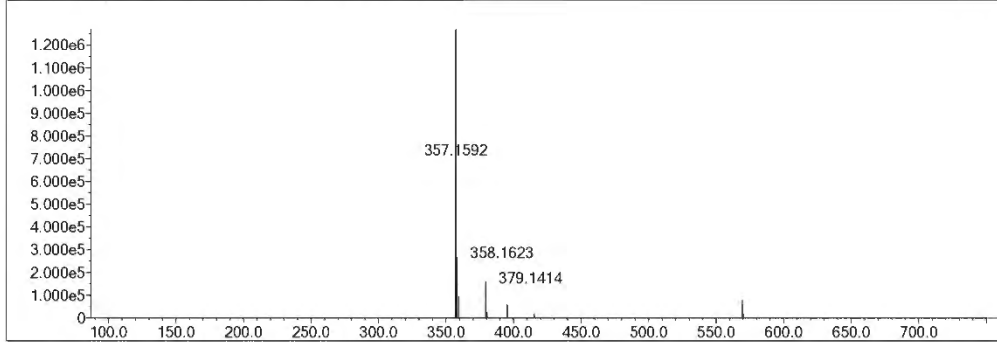
Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Use Adduct
H	1	9	35	O	2	0	4	S	2	1	2	Ru	2	0	0	H
C	4	7	35	F	1	0	0	Cl	1	0	0	Pd	2	0	0	
N	3	0	5	P	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 5
 HC Ratio: unlimited
 Max Isotopes: 3
 MSn Iso RI (%): 10.00

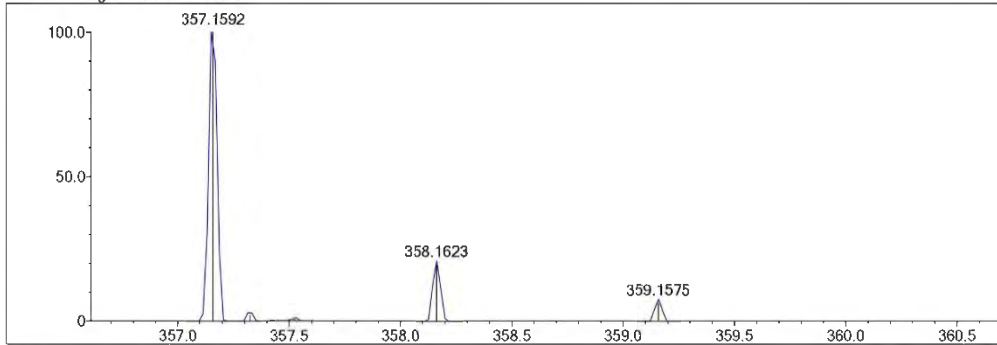
DBE Range: 5.0 - 25.0
 Apply N Rule: yes
 Isotope RI (%): 1.00
 MSn Logic Mode: AND

Electron Ions: both
 Use MSn Info: yes
 Isotope Res: 9000
 Max Results: 50

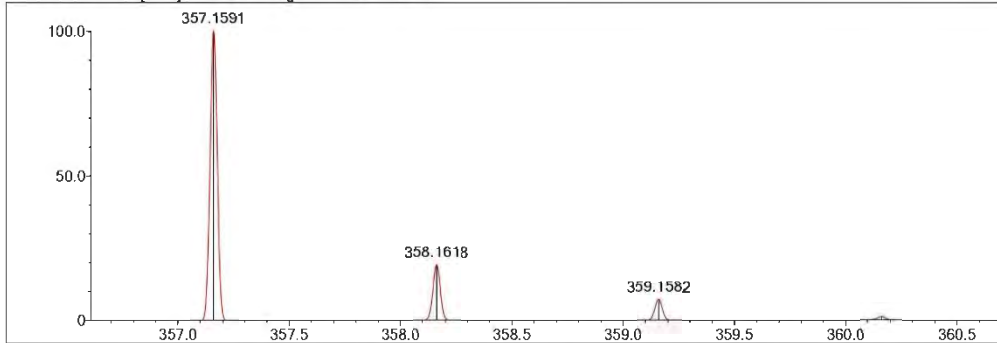
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time: 1.560 -> 2.187 Scan#: 235 -> 329



Measured region for 357.1592 m/z



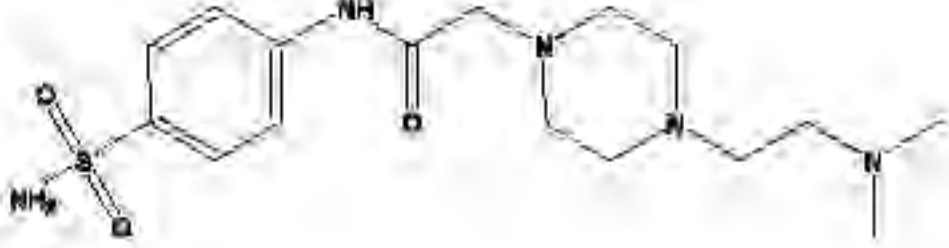
C15 H24 N4 O4 S [M+H]⁺ : Predicted region for 357.1591 m/z



Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	89.41	C15 H24 N4 O4 S	[M+H] ⁺	357.1592	357.1591	0.1	0.28	89.41	6.0

Şekil 5.19. Bileşik 2d'ye ait kütle spektrumu

5.1.7. 2-(4-(2-(Dimetilamino)etil)piperazin)-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2e)



Şekil 5.20. 2-(4-(2-(Dimetilamino)etil)piperazin)-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2e) bileşiği

Verim: %85.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.10 (6H, s, -CH₃), 2.11-2.36 (4H, m, piperazine-CH₂), 2.44 (4H, m, -CH₂), 2.49-2.51 (4H, m, piperazin -CH₂), 3.13 (2H, s, asetamit-CH₂), 7.27 (2H, s, NH₂), 7.73-7.80 (4H, dd, fenil-H), 10.03(1H, s, amid-NH-).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 24.10, 46.10, 53.58, 57.18, 62.41, 68.85, 119.42, 127.07, 139.05, 141.44, 169.41

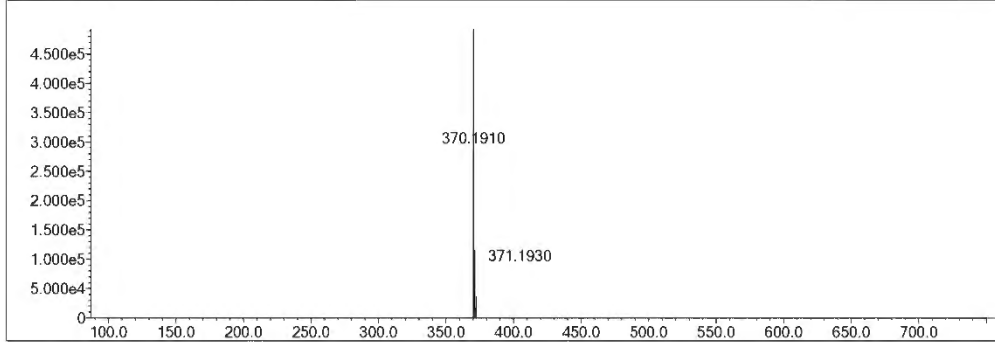
HRMS (m/z): [M+H]⁺ calcd for C₁₆H₂₇N₅O₃S: 370.1907; found: 370.1910.

Data File: C:\LabSolutions\Data\Analiz\deya\DE-5_5.lcd

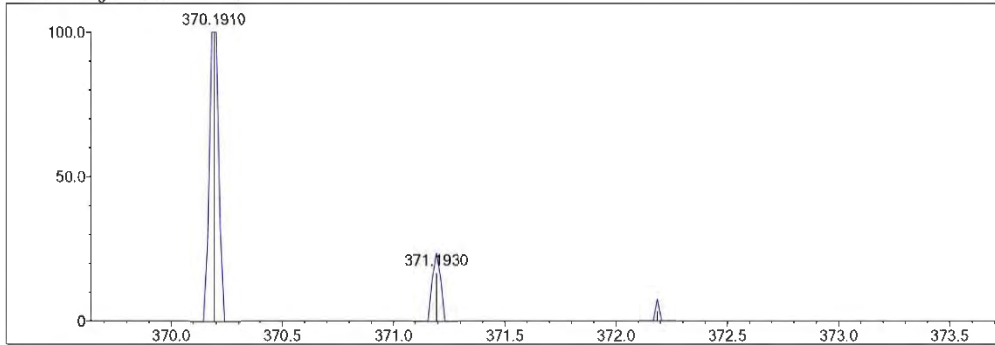
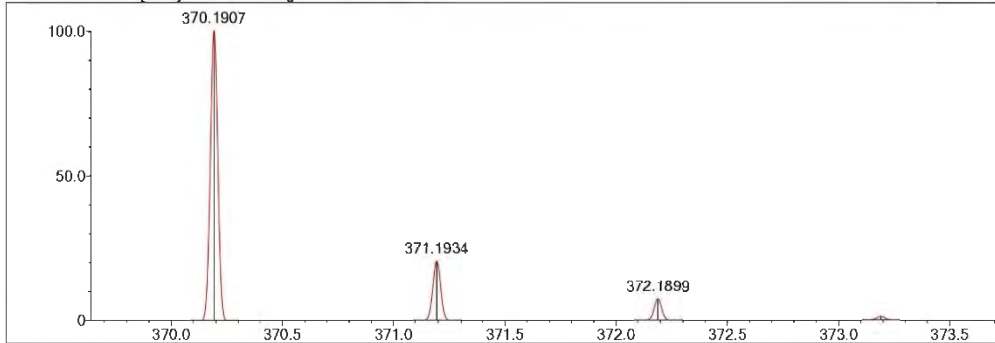
Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Use Adduct
H	1	9	35	O	2	0	4	S	2	1	2	Ru	2	0	0	H
C	4	7	35	F	1	0	0	Cl	1	0	0	Pd	2	0	0	
N	3	0	5	P	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 5
 DBE Range: 5.0 - 25.0
 Electron Ions: both
 HC Ratio: unlimited
 Apply N Rule: yes
 Use MSn Info: yes
 Max Isotopes: 3
 Isotope RI (%): 1.00
 MSn Iso RI (%): 10.00
 MSn Logic Mode: AND
 Max Results: 50

Event#: 1 MS(E+) Ret. Time: 2.280 Scan#: 343



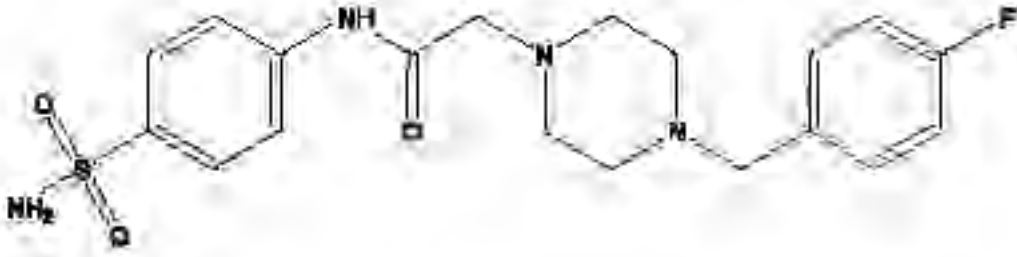
Measured region for 370.1910 m/z

C16 H27 N5 O3 S [M+H]⁺ : Predicted region for 370.1907 m/z

Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	98.65	C16 H27 N5 O3 S	[M+H] ⁺	370.1910	370.1907	0.3	0.81	98.65	6.0

Şekil 5.23. Bileşik 2e'ye ait kütle spektrumu

5.1.8. 2-(4-(4-Florobenzil)piperazin)-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2f)



Şekil 5.24. 2-(4-(4-Florobenzil)piperazin)-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2f) bileşiği

Verim: %85.

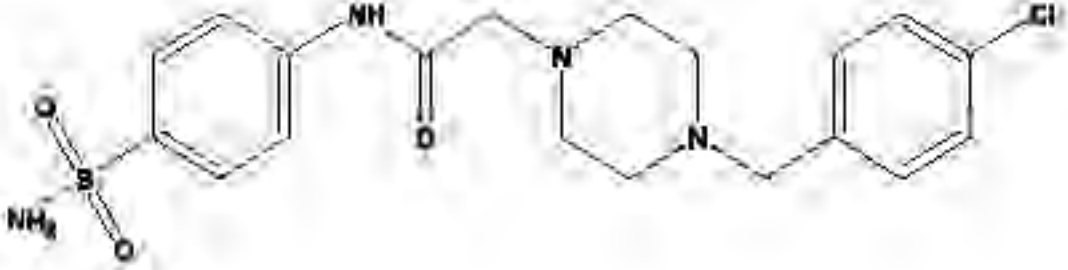
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 2.26-2.29 (4H, m, piperazin -CH₂), 2.49-2.51 (4H, m, piperazin -CH₂), 2.76 (2H, s, benzil-CH₂), 3.22 (2H, s, asetamit -CH₂), 5.07 (2H, s, NH₂), 7.10-7.16 (4H, dd, J =, fenil-H), 7.29-7.34 (4H, dd, J =, fenil-H), 10.04 (1H, s, amit-NH-).

$^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 44.10, 45.02, 53.29, 61.94, 115.18, 115.46, 131.07, 131.17, 134.46, 134.71, 134.80, 134.84, 160.09, 163.30.

HRMS (m/z): [M+H]⁺ calcd for C₂₁H₂₄N₄O₂S: 397.1693; found: 397.1707.

Şekil 5.27. Bileşik 2f'ye ait kütle spektrumu

5.1.9. 2-(4-(4-Klorobenzil)piperazin)-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2g)



Şekil 5.28. 2-(4-(4-Klorobenzil)piperazin)-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2g) bileşiği

Verim: %87.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.26 (2H, s, benzil-CH₂), 2.49-2.51 (4H, m, piperazin-CH₂), 2.66-2.69 (4H, m, piperazin-CH₂), 3.14 (2H, s, asetamit-CH₂), 7.28-735 (2H, s, NH₂), 7.37-7.38 (4H, m, fenil-H), 7.72-7.79 (4H, dd, *J*=, fenil-H), 10.05(1H, s, amit-NH-).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 45.65, 52.75, 53.11, 53.90, 61.55, 62.22, 119.48, 127.05, 128.53, 131.14, 131.88, 137.65, 138.89, 141.94, 169.49.

HRMS (m/z): [M+H]⁺ calcd for C₁₉H₂₃N₄O₃SCI: 423.1252; found: 423.1259.

Data File: C:\LabSolutions\Data\Analiz\derya\DE-7_7.lcd

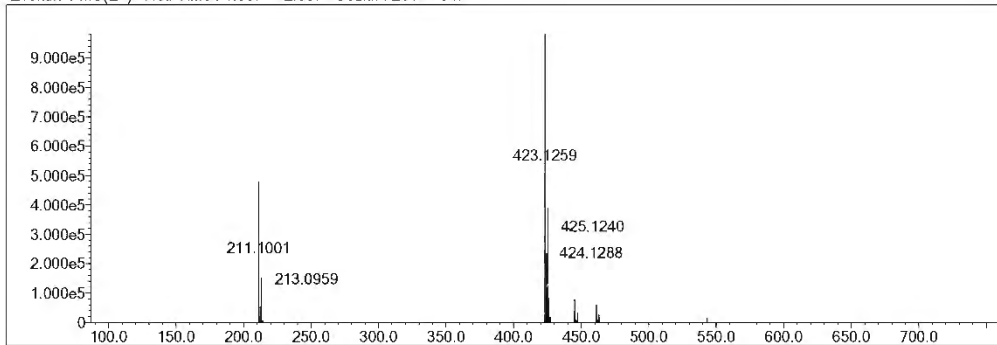
Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Use Adduct
H	1	9	35	O	2	0	4	S	2	1	2	Ru	2	0	0	H
C	4	7	35	F	1	0	0	Cl	1	1	1	Pd	2	0	0	
N	3	0	5	P	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 5
 HC Ratio: unlimited
 Max Isotopes: 3
 MSn Iso RI (%): 10.00

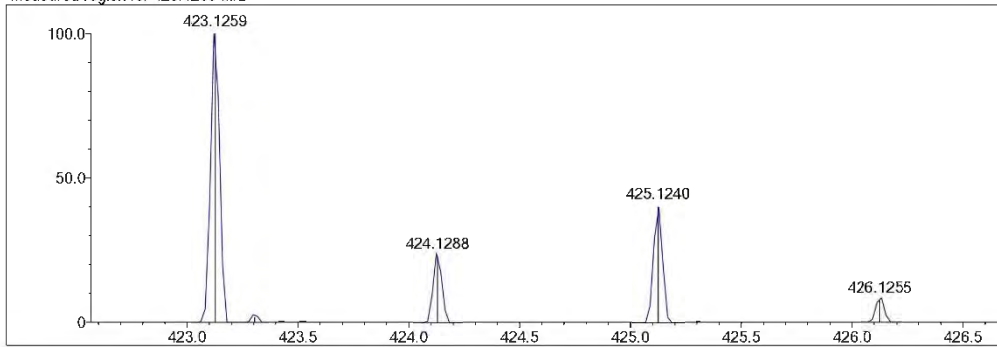
DBE Range: 5.0 - 25.0
 Apply N Rule: yes
 Isotope RI (%): 1.00
 MSn Logic Mode: AND

Electron Ions: both
 Use MSn Info: yes
 Isotope Res: 9000
 Max Results: 50

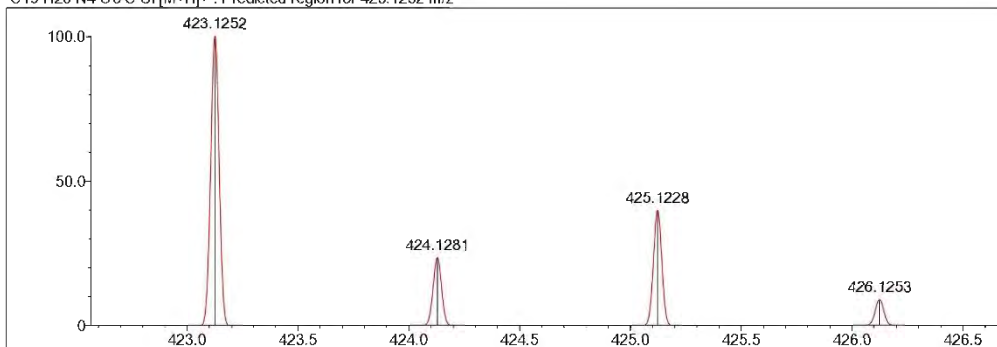
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 1.667 -> 2.307 Scan#: 251 -> 347



Measured region for 423.1259 m/z



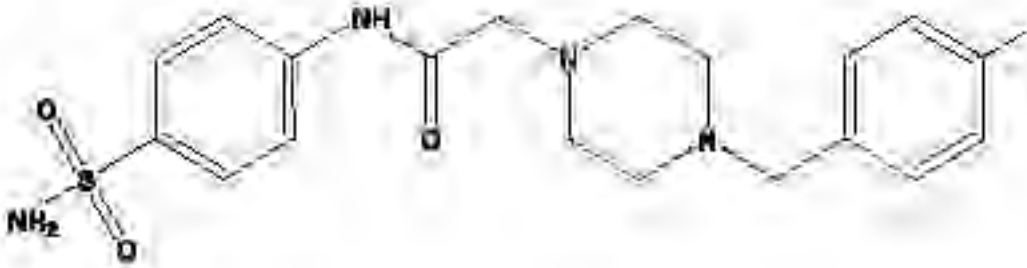
C19 H23 N4 O3 S Cl [M+H]⁺ : Predicted region for 423.1252 m/z



Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	89.03	C19 H23 N4 O3 S Cl	[M+H] ⁺	423.1259	423.1252	0.7	1.65	90.50	10.0

Şekil 5.31. Bileşik 2g'ye ait kütle spektrumu

5.1.10. 2-(4-(4-Metilbenzil)piperazin)-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2h)



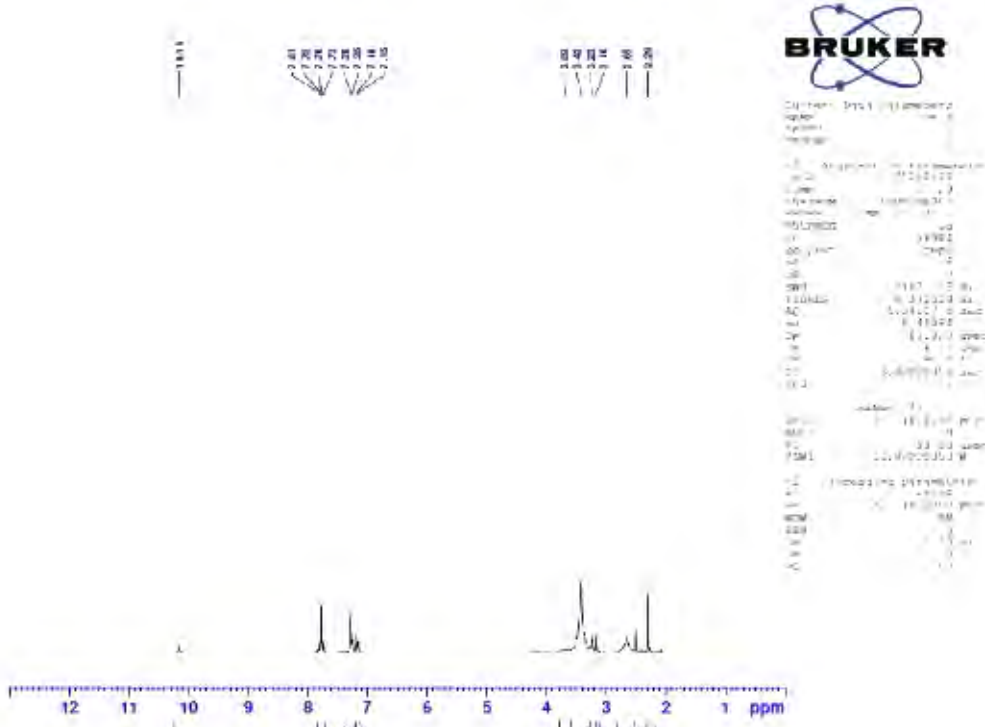
Şekil 5.32. 2-(4-(4-Metilbenzil)piperazin)-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2h) bileşiği

Verim: % 80.

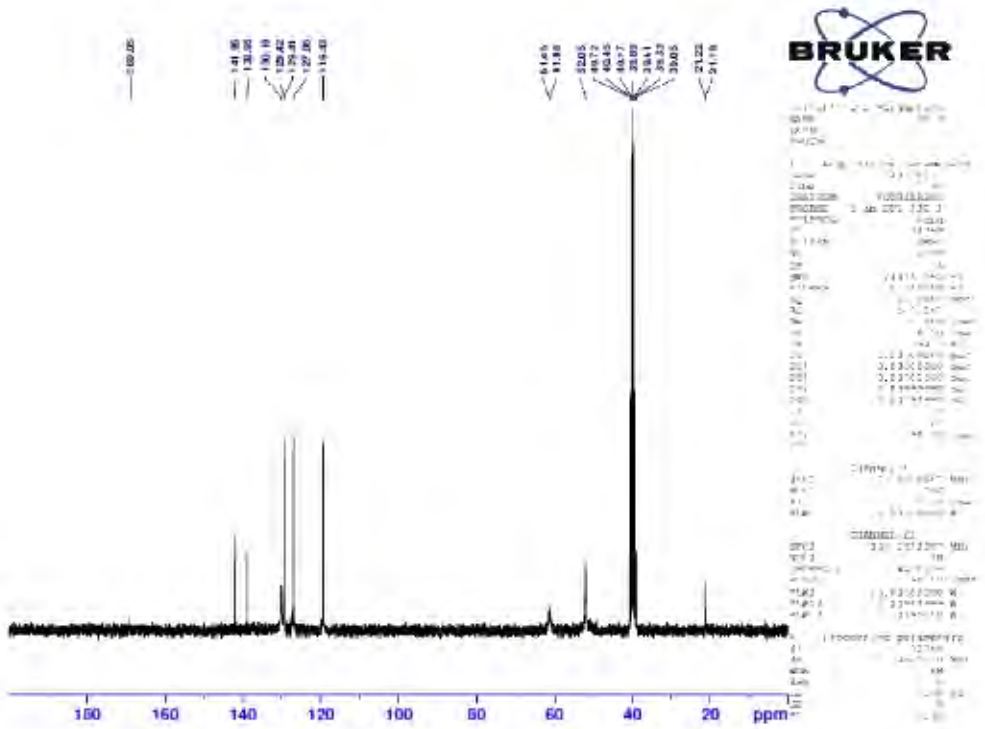
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.29 (3H, s, -CH₃), 2.65 (8H, m, piperazin-CH₂), 3.16 (2H, s, asetamit -CH₂), 3.23 (2H, s, benzil-CH₂), 7.15-7.18 (2H, s, NH₂), 7.25-7.28 (4H, m, benzil-H), 7.73-7.81 (4H, dd, fenil-H), 10.16(1H, s, amit-NH-).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 21.18, 21.22, 52.05, 61.45, 119.43, 127.06, 129.41, 130.19, 138.95, 141.95, 169.05.

HRMS (m/z): [M+H]⁺ calcd for C₂₀H₂₆N₄O₃S: 403.1798; found: 403.1804.



Şekil 5.33. Bileşik 2h'ye ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu



Şekil 5.34. Bileşik 2h'ye ait $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu

Data File: C:\LabSolutions\Data\Analiz\derya\DE-8_8.lcd

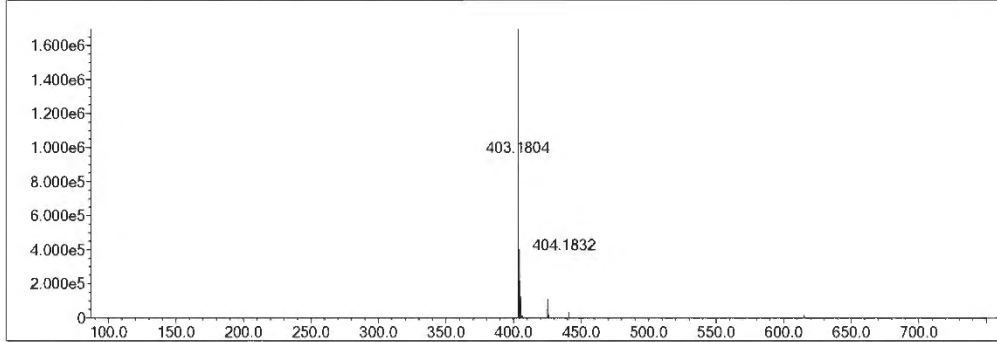
Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Use Adduct
H	1	9	35	O	2	0	4	S	2	1	2	Ru	2	0	0	H
C	4	7	35	F	1	0	0	Cl	1	0	0	Pd	2	0	0	
N	3	0	5	P	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 5
 HC Ratio: unlimited
 Max Isotopes: 3
 MSn Iso RI (%): 10.00

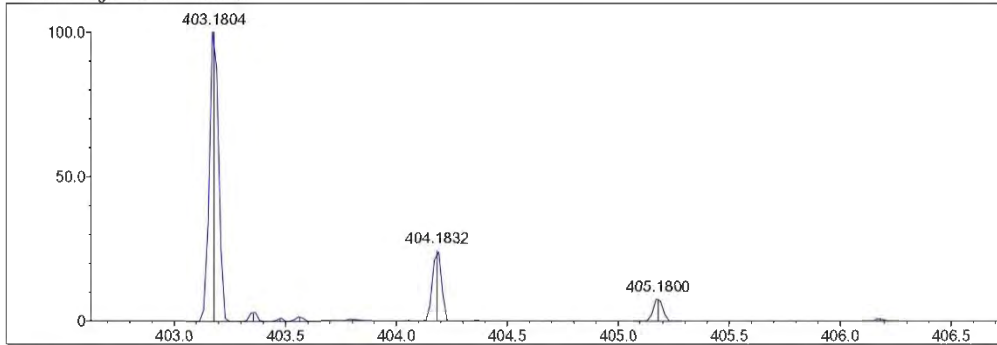
DBE Range: 5.0 - 25.0
 Apply N Rule: yes
 Isotope RI (%): 1.00
 MSn Logic Mode: AND

Electron Ions: both
 Use MSn Info: yes
 Isotope Res: 9000
 Max Results: 50

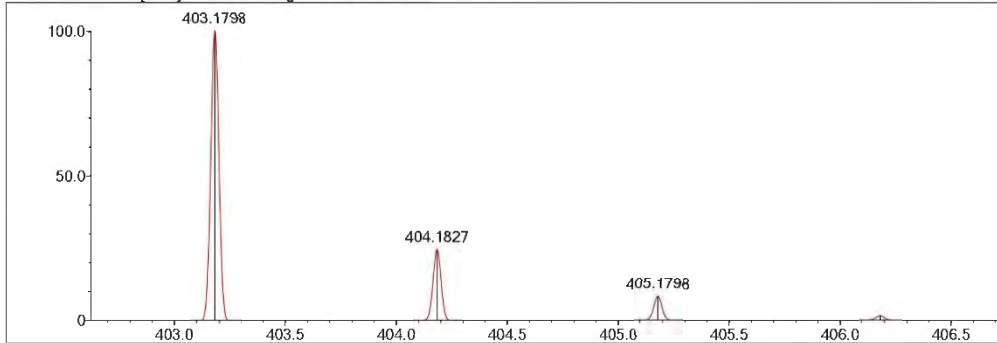
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time: 1.720 -> 2.333 Scan#: 259 -> 351



Measured region for 403.1804 m/z



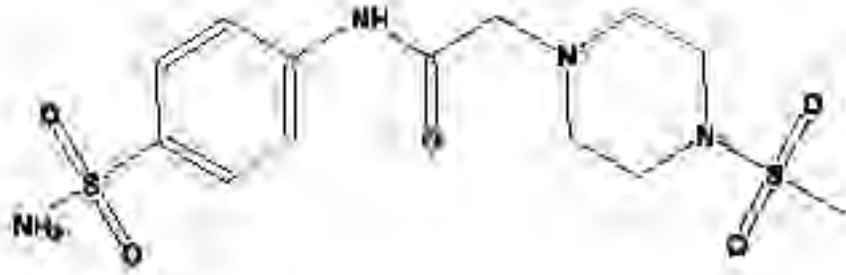
C20 H26 N4 O3 S [M+H]⁺ : Predicted region for 403.1798 m/z



Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	86.89	C20 H26 N4 O3 S	[M+H] ⁺	403.1804	403.1798	0.6	1.49	87.97	10.0

Şekil 5.35. Bileşik 2h'ye ait kütle spektrumu

5.1.11. 2-(4-(4-Metilsülfolil)piperazin)-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2i)



Şekil 5.36. 2-(4-(4-Metilsülfolil)piperazin)-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2j) bileşiği

Verim: %86.

¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 2.49-2.51 (4H, t, *J*= piperazin-CH₂), 2.61-2.64 (3H, s, -CH₃), 2.90 (4H, t, *J*= piperazin-CH₂), 3.15-3.25 (2H, s, asetamit-CH₂), 7.27 (2H, s, NH₂), 7.74-7.82 (4H, dd, phenyl-H), 10.12 (1H, s, amit-NH-).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 34.23, 52.28, 61.44, 119.47, 127.07, 138.96, 141.98, 169.17.

HRMS (m/z): [M+H]⁺ calcd for C₁₃H₂₀N₄O₅S₂: 377.0948; found: 377.0953.

Data File: C:\LabSolutions\Data\Analiz\deya\DE-10_10.lcd

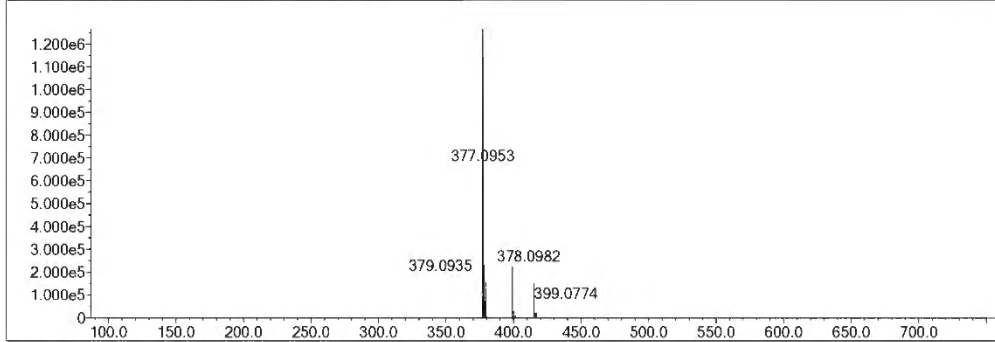
Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Use Adduct
H	1	9	35	O	2	0	5	S	2	2	2	Ru	2	0	0	H
C	4	7	35	F	1	0	0	Cl	1	0	0	Pd	2	0	0	
N	3	0	5	P	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 5
 HC Ratio: unlimited
 Max Isotopes: 3
 MSn Iso RI (%): 10.00

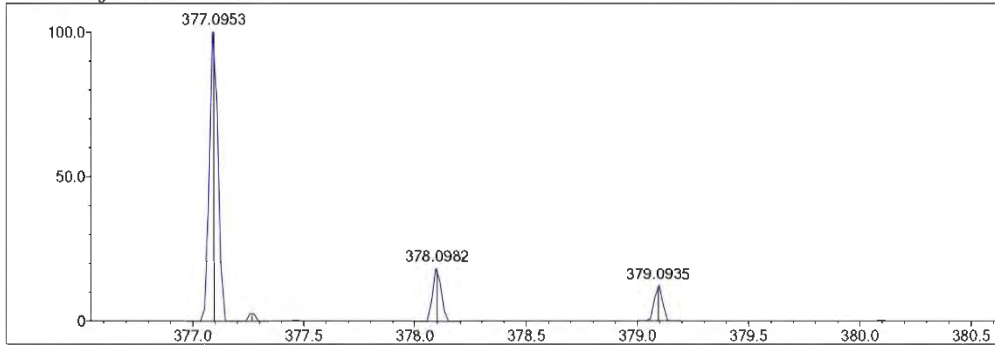
DBE Range: 5.0 - 25.0
 Apply N Rule: yes
 Isotope RI (%): 1.00
 MSn Logic Mode: AND

Electron Ions: both
 Use MSn Info: yes
 Isotope Res: 9000
 Max Results: 50

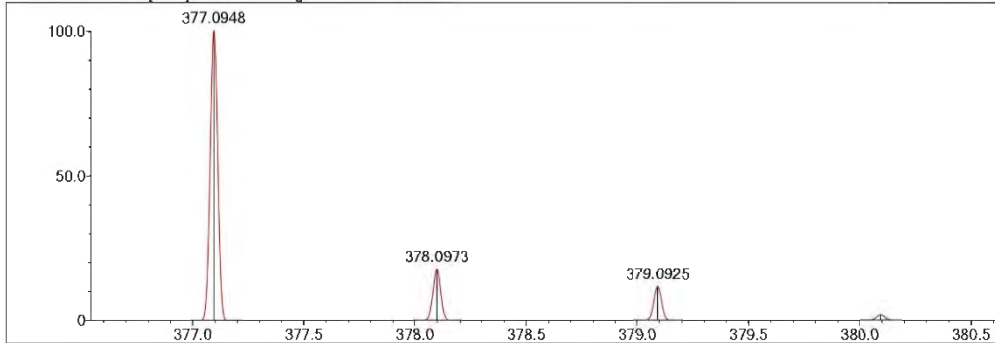
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time: 1.653 -> 2.013 Scan#: 249 -> 303



Measured region for 377.0953 m/z



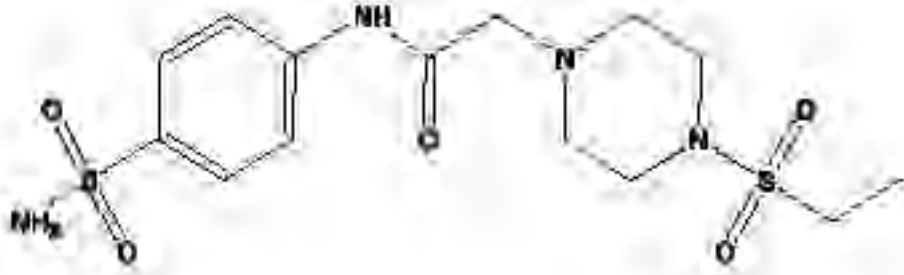
C13 H20 N4 O5 S2 [M+H]+ : Predicted region for 377.0948 m/z



Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	84.70	C13 H20 N4 O5 S2	[M+H]+	377.0953	377.0948	0.5	1.33	85.41	6.0

Şekil 5.39. Bileşik 2j'ye ait kütle spektrumu

5.1.12. 2-(4-(4-Etilsülfonil)piperazin)-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2j)



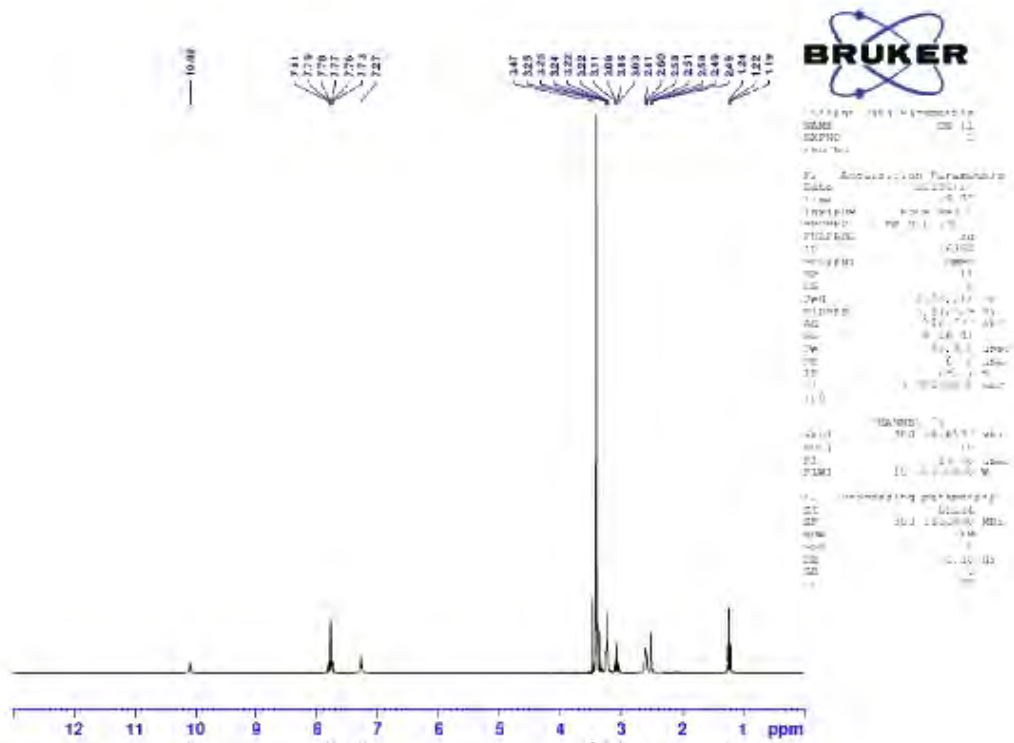
Şekil 5.40. 2-(4-(4-Etilsülfonil)piperazin)-1-il)-N-(4-sulfamoilfenil)asetamit (2k) bileşiği

Verim: %89.

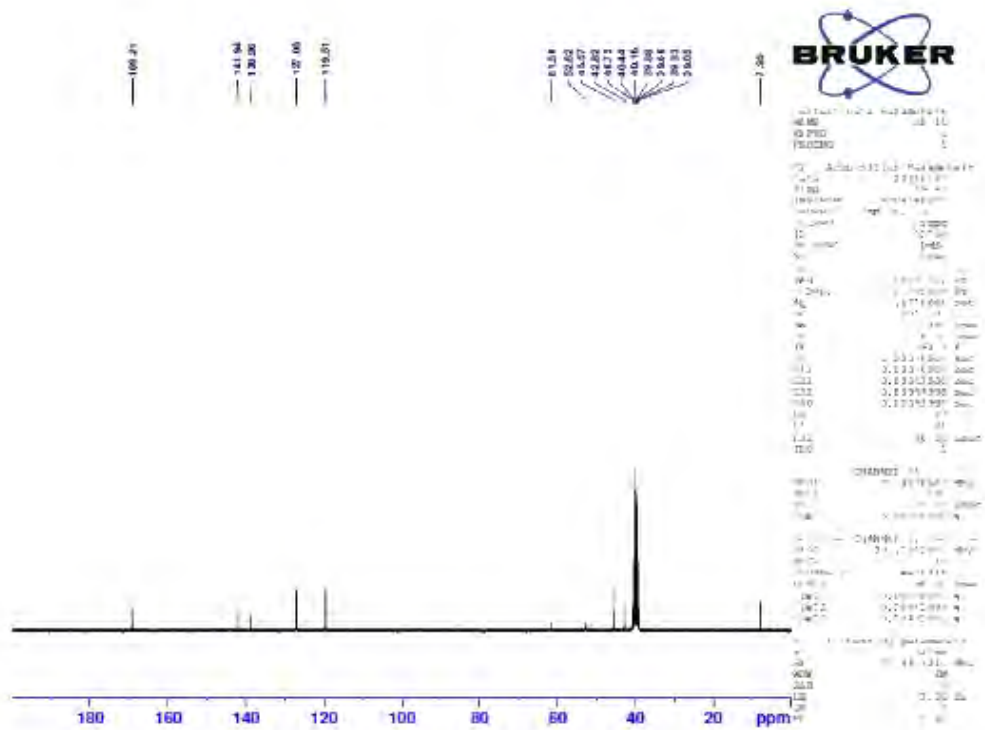
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 1.19-1.24 (3H, t, $J=7.36$, -CH₃), 3.03-3.11 (2H, q, $J=7.37$ -CH₂), 2.57-2.61 (4H, t, piperazin-CH₂), 3.22-3.25 (4H, m, piperazin-CH₂), 3.47 (2H, s, asetamit-CH₂), 7.27 (2H, s, NH₂), 7.73-7.81 (4H, dd, fenil-H), 10.09 (1H, s, amid-NH-).

¹³C-NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 7.95, 42.82, 45.57, 52.62, 61.50, 119.51, 127.05, 138.96, 141.94, 169.21.

HRMS (m/z): [M+H]⁺ calcd for C₁₄H₂₂N₄O₅S₂: 391.1104; found: 391.1110.



Şekil 5.41. Bileşik 2k'ye ait ¹H-NMR spektrumu



Şekil 5.42. Bileşik 2k'ye ait ¹³C-NMR spektrumu

Data File: C:\LabSolutions\Data\Analiz\deya\DE-11_11.lcd

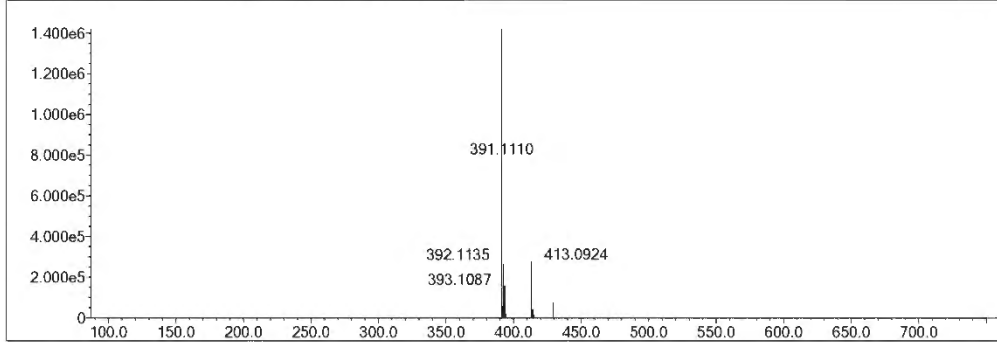
Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Use Adduct
H	1	9	35	O	2	0	5	S	2	2	2	Ru	2	0	0	H
C	4	7	35	F	1	0	0	Cl	1	0	0	Pd	2	0	0	
N	3	0	5	P	3	0	0	Br	1	0	0	I	3	0	0	

Error Margin (ppm): 5
 HC Ratio: unlimited
 Max Isotopes: 3
 MSn Iso RI (%): 10.00

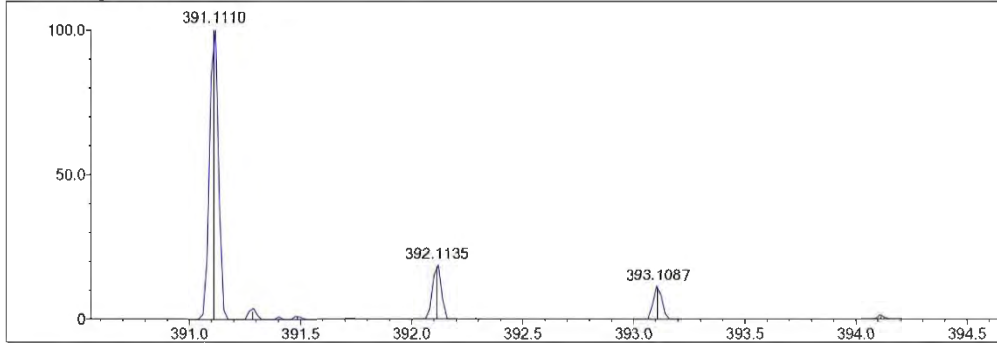
DBE Range: 5.0 - 25.0
 Apply N Rule: yes
 Isotope RI (%): 1.00
 MSn Logic Mode: AND

Electron Ions: both
 Use MSn Info: yes
 Isotope Res: 9000
 Max Results: 50

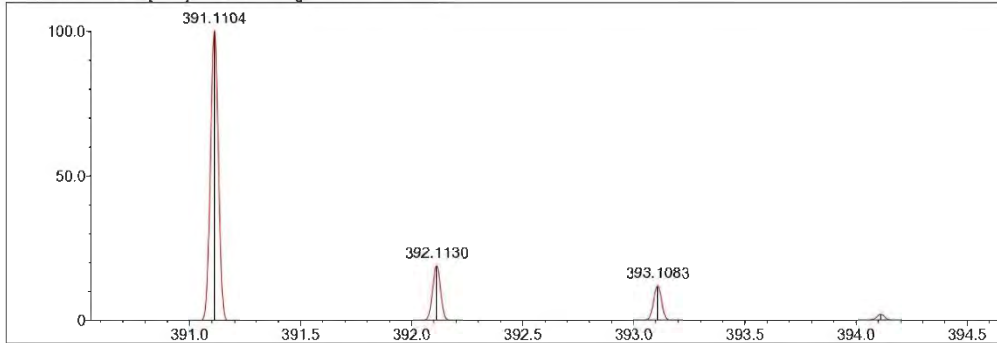
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time: 1.653 -> 2.173 Scan#: 249 -> 327



Measured region for 391.1110 m/z



C14 H22 N4 O5 S2 [M+H]⁺: Predicted region for 391.1104 m/z

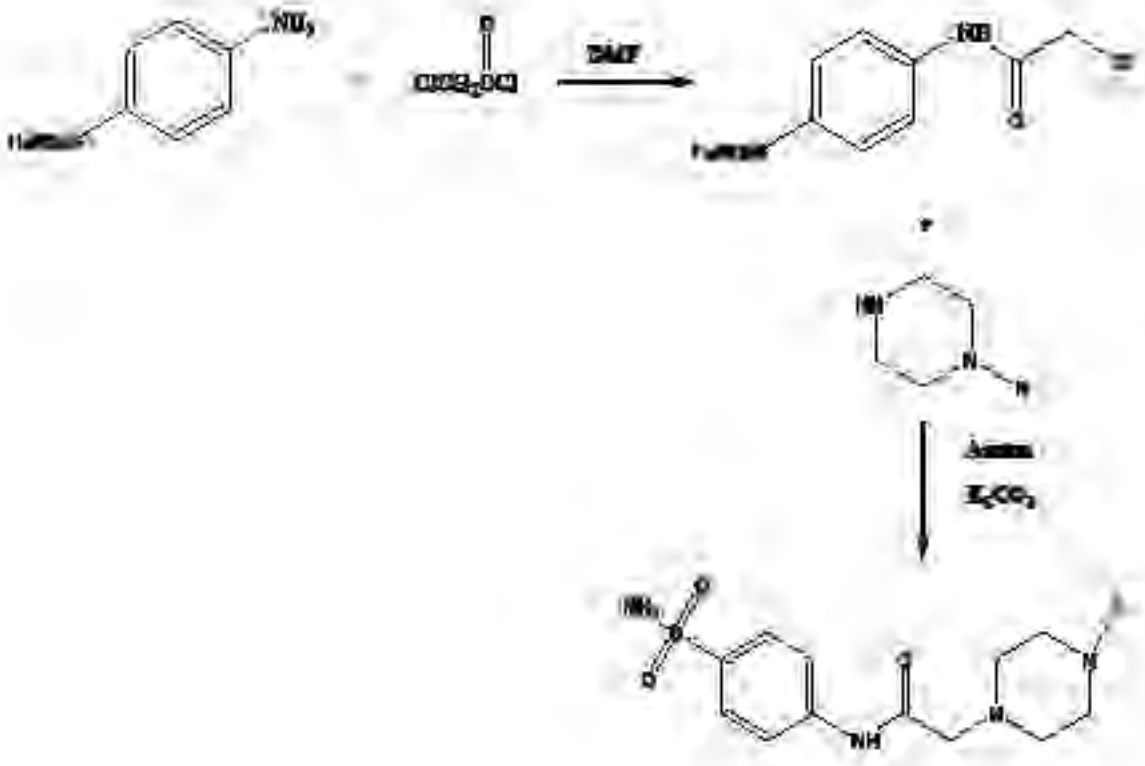


Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	88.60	C14 H22 N4 O5 S2	[M+H] ⁺	391.1110	391.1104	0.6	1.53	89.79	6.0

Şekil 5.43. Bileşik 2k'ye ait kütle spektrumu

5.2. Sentez Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Yapılan araştırmalar sonucu bu yüksek lisans tezinde sülfonamid yapıları yeni karbonik anhidraz enzim inhibitörü bileşiklerin sentezlenmesi amaçlanmıştır. Karbonik anhidraz enzim inhibitörlerinden yola çıkılarak 2-(4-süstitüepiperazin-1-il)-N-(sülfamoilfenil)asetamid ana yapı kabul edilerek 4. konumda farklı süstitüentler ile bileşikler sentezlenmiştir. 4-Aminobenzensülfonamid ile kloroasetil klorür reaksiyona sokularak 2-Kloro-N-(4-aminosülfonilfenil)asetamid ana yapısı elde edilmiştir. Elde edilen ana yapı 1-süstitü piperazin türevleri ile amaçlanan bileşikler sentezlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin yapıları, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ ve HRMS spektroskopik yöntemler ile ortaya konmuştur.



Şekil 5.44. Hedef bileşiklerin sentez şeması

5.3. Spektral Verilerin Değerlendirilmesi

Sentezlenen **2a-2j** kodlu, 10 adet orijinal bileşiğin yapıları $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ ve HRMS spektroskopik yöntemlerin sonuçları ile aydınlatılmıştır. Spektrum yapı değerlendirmeleri, ilgili spektroskopik yöntem başlığında aktarılmıştır.

5.3.1. $^1\text{H-NMR}$ spektrumlarının değerlendirilmesi

Bu yüksek lisans tezi içerisinde sentezlenen bileşiklerde bulunan alifatik ve aromatik protonlar $^1\text{H-NMR}$ spektrumlarında genel olarak beklenen doğrultuda gibi

pikler elde edilmiştir. Sentezlenen bileşiklerin spektrum sonuçlarında, toplam hidrojen sayısı tespit edilip beklenen sayıda pik gözlenmiştir.

Sentezi yapılan bileşiklerde 1-sübstitüe piperazin yapısı içeren türevler sentezlenmiştir. 1-sübstitüe piperazin yapısının yer aldığı türevlerin (**2a-2k**) ¹H-NMR sonuçları incelendiğinde bileşiklerin kimyasal yapılarında ortak olarak piperazin halkası, asetamit, benzen ve sülfonamid yapıları bulunmaktadır. Piperazin halkasına ait protonlar, **2h** kodlu bileşiklerde 2.65 ppm değerinde 8 hidrojenlik multipler; **2b, 2c, 2d, 2e, 2f, 2g, 2i** kodlu bileşiklerde 2.49-2.51 ppm değerlerinde 4 hidrojenlik multipler, 2.42-2.90 ppm değerleri arasında 4 hidrojenlik multipler, **2a** kodlu bileşikte 2.49-2.54 ppm değerleri arasında 4 hidrojenlik yaygın multipler, 3.16-3.17 ppm değerleri arasında 4 hidrojenlik yaygın multipler; **2j** kodlu bileşikte 2.57-2.61 ppm değerleri arasında 4 hidrojenlik multipler, 3.22-3.25 ppm değerinde 4 hidrojenlik yaygın multipler şeklinde gözlenmiştir. Asetamite ait NH yapısına ait protonlar tüm bileşiklerde (**2a-2k**) 10.3-10.16 ppm değerleri arasında 1 hidrojenlik singlet olarak gözlenmiştir. Karbonil grubuna komşu β protonu **2b, 2d, 2g** kodlu bileşiklerde 3.14 ppm değerinde 2 hidrojenlik singlet; **2c, 2e** kodlu bileşiklerde 3.13 ppm değerinde 2 hidrojenlik singlet, **2a** kodlu bileşikte 3.16-3.17 ppm değerleri arasında 2 hidrojenlik singlet, **2h** kodlu bileşikte 3.16 ppm değerinde 2 hidrojenlik singlet, **2i** kodlu bileşikte 3.15-3.25 ppm değerleri arasında 2 hidrojenlik singlet, **2j** kodlu bileşikte ise 3.47 ppm değerinde 2 hidrojenlik singlet olarak gözlenmiştir. Bütün bileşiklerde bulunan 1,4-disübstitüe benzen halkasına ait protonlar ise 7.73-7.81 ppm değerlerinde 4 hidrojenlik dubletin dubleti pik şeklinde gözlenmiştir. Sülfonamid yapısına ait NH₂ protonları **2f** kodlu bileşikte 5.07 ppm; **2a, 2b, 2c** kodlu bileşiklerde 7.28 ppm; **2d, 2e, 2i, 2j** kodlu bileşiklerde 7.27 ppm; **2g** kodlu bileşikte 7.28-7.35 ppm değerleri arasında; **2h** kodlu bileşikte 7.15-7.18 ppm değerleri arasında 2 hidrojenlik singlet şeklinde gözlenmiştir.

5.3.2. ¹³C-NMR spektrumlarının değerlendirilmesi

Bu yüksek lisans tezi kapsamında bileşiklerde ortak yapısal parçacıklar ¹³C-NMR spektrumlarında genel olarak beklendiği gibi pikler vermiştir [224]. Bileşiklere ait spektrumlarda spesifik fonksiyonel gruplardan amid karboniline (C=O) ait karbonlar 165.05-166.41 ppm aralığında, aromatik karbonlar ise 115.18-14.96 ppm aralığında pik vermiştir. Karbonil karbonuna bağlı karbon piki ise 52.05-68.85 ppm aralığında pik vermiştir.

5.3.3. Kütle spektrumlarının değerlendirilmesi

Sentez edilen bileşiklerin kütle spektrumları, elektron spray yöntemi kullanılarak pozitif iyonlaştırma tekniği ile çekilmiştir. Tüm bileşiklerin kütle spektrumlarında $[M+H]^+$ pikleri gözlemlenmiştir. Spektrumlar incelendiğinde hesaplanan veriler ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir.

5.4. Biyolojik Aktivite Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Bu tez çalışması içerisinde sentezlenen bileşiklerin enzim inhibitör aktiviteleri BioVision CA Inhibitor Screening Kitleri (Milpitas, CA, USA) kullanılarak incelenmiştir. Referans bileşik olarak asetazolamid kullanılmıştır. Sentezlenen bileşikler 10^{-3} ve 10^{-4} M konsantrasyonlarında CA enzimine karşı % inhibisyon oranları hesaplanmıştır. Elde edilen inhibisyon sonuçlarına göre IC_{50} değerleri hesaplanmıştır.

5.4.1. CA enzim aktivite çalışmalarının değerlendirilmesi

Elde edilen bileşiklerin inhibisyon aktiviteleri enzim ve bileşiklerin reaksiyonu ile renk değişiminin absorbansının ölçülmesi esasına dayanır.

10^{-3} ve 10^{-4} M konsantrasyonda % inhibisyonları hesaplanan **2a-2j** kodlu bileşiklerden **2a**, **2c**, **2e**, **2f** kodlu bileşikler %50'den fazla bir oranda inhibitör aktivite göstermiştir. Bu bileşiklerin IC_{50} değerleri sırasıyla şu şekildedir; 0.052 ± 0.002 μ M, 0.174 ± 0.007 μ M, 0.038 ± 0.001 μ M, 0.230 ± 0.010 μ M. Bu bileşikler arasında 0.038 ± 0.001 μ M değeri ile **2e** kodlu bileşiğin en yüksek aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir.

Tablo 5.1. Elde edilen bileşiklerin 10^{-3} ve 10^{-4} M konsantrasyonlarında CA I, II, IV, IX, XII enzimine karşı % inhibisyon oranları.

Bileşikler	CA % İnhibisyon		CA IC ₅₀ (µM)
	10^{-3} M	10^{-4} M	
2a	93.624±2.321	90.491±1.564	0.052±0.002
2b	90.342±2.218	45.192±0.914	>100
2c	92.846±2.055	89.175±2.422	0.174±0.007
2d	87.228±1.769	40.345±0.721	>100
2e	96.538±1.802	94.702±2.150	0.038±0.001
2f	91.418±2.735	87.729±1.328	0.230±0.010
2g	48.561±0.957	29.347±0.728	>1000
2h	86.720±1.378	39.418±0.833	>100
2i	46.448±0.819	32.036±0.748	>1000
2j	78.691±1.039	44.114±0.965	>100
Asetazolamit	98.367±2.503	96.489±2.041	0.025±0.001

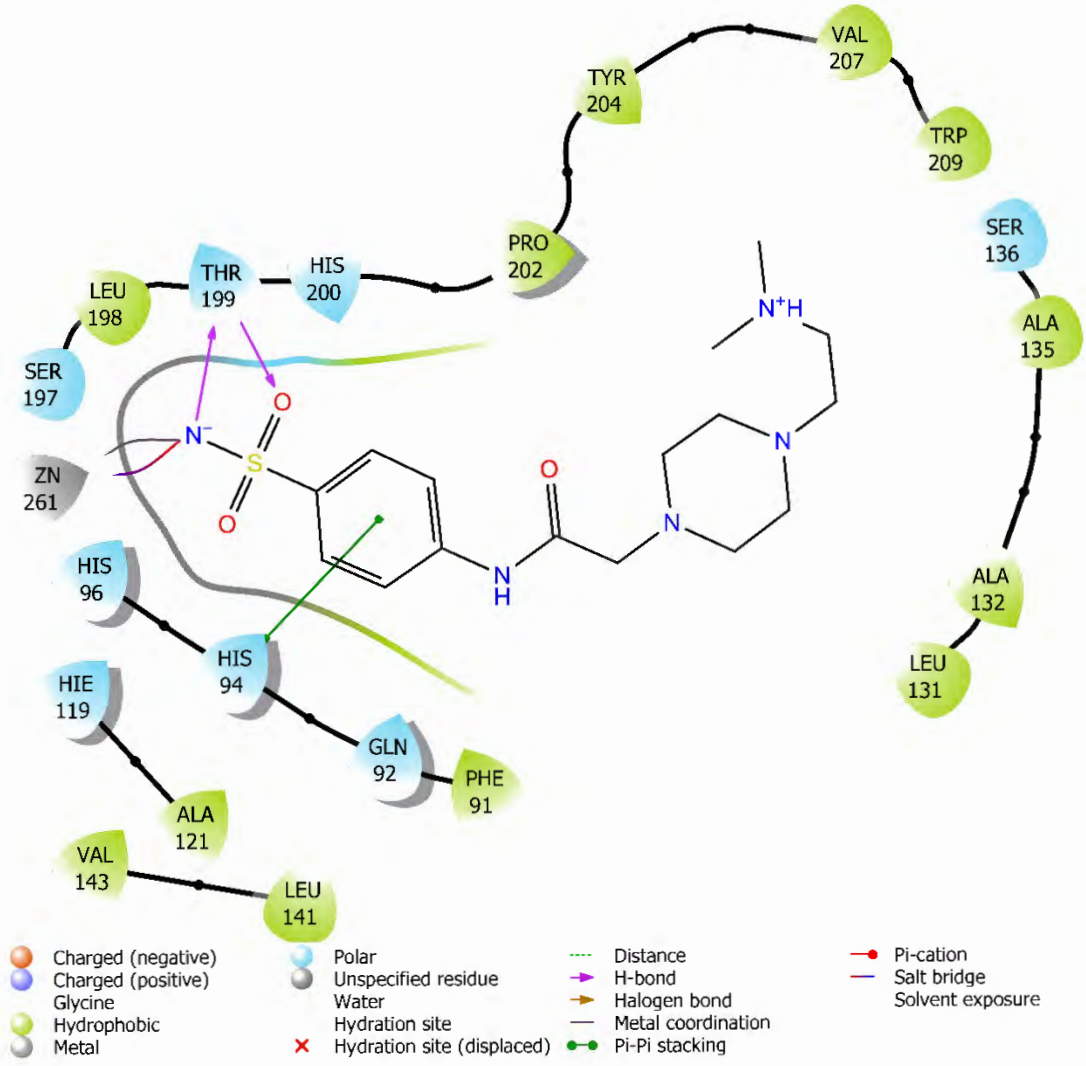
Tablo 5.2. Bileşikler 2a, 2c, 2e, 2f ve referans bileşik asetazolamidin 10^{-3} ve 10^{-9} M konsantrasyonlarında CA I, II, IV, IX, XII enzimine karşı % inhibisyon oranları ve IC₅₀ değerleri.

Bileşikler	CA % İnhibisyon							IC ₅₀ (µM)
	10^{-3} M	10^{-4} M	10^{-5} M	10^{-6} M	10^{-7} M	10^{-8} M	10^{-9} M	
2a	93.624 ±2.321	90.491 ±1.564	84.779 ±2.199	78.274 ±1.212	67.169 ±1.061	41.335 ±0.941	27.628 ±0.726	0.052 ±0.002
2c	92.846 ±2.055	89.175 ±2.422	82.365 ±2.051	79.109 ±1.057	47.921 ±1.115	36.625 ±0.890	20.647 ±0.855	0.174 ±0.007
2e	96.538 ±1.802	94.702 ±2.150	90.667 ±1.736	86.903 ±1.859	72.741 ±1.628	41.897 ±1.075	25.375 ±0.913	0.038 ±0.001
2f	91.418 ±2.735	87.729 ±1.328	80.416 ±1.207	75.621 ±1.123	45.587 ±0.986	36.951 ±0.939	22.463 ±0.788	0.230 ±0.010
Asetazolamit	98.367 ±2.503	96.489 ±2.041	93.176 ±1.762	90.485 ±1.145	82.929 ±1.811	40.785 ±0.947	24.811 ±0.820	0.025 ±0.001

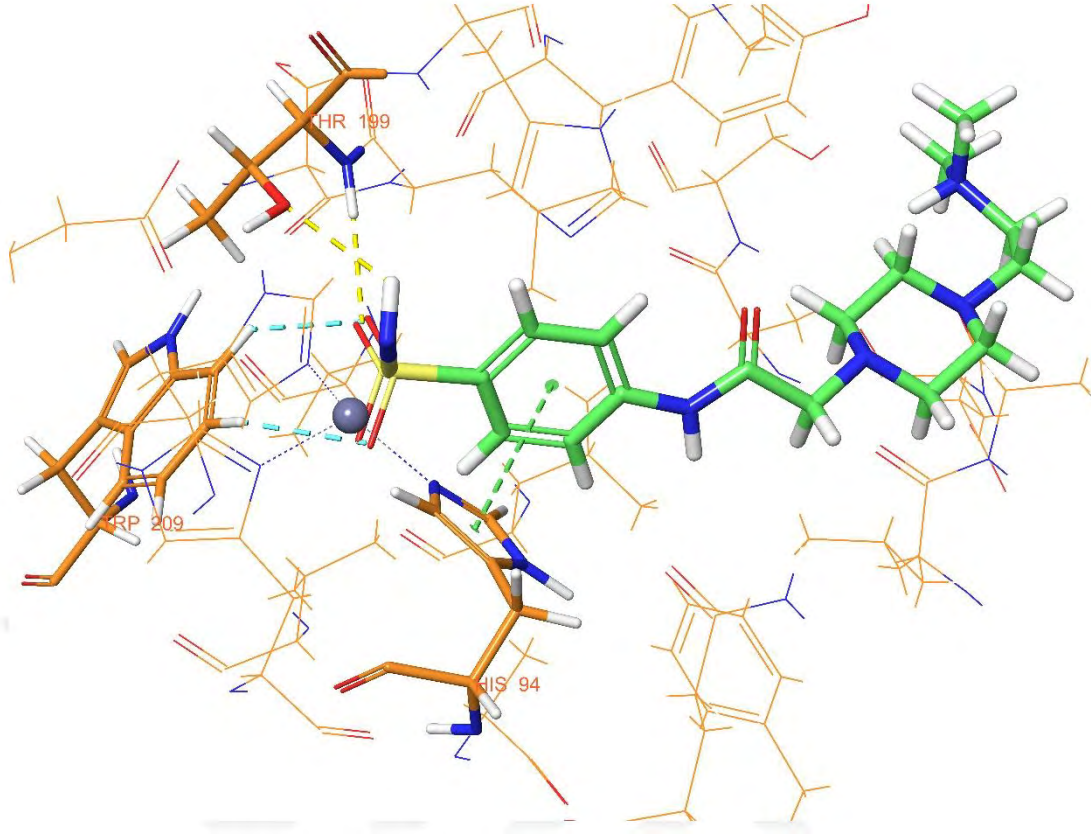
5.5. Moleküler Modelleme Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Tez kapsamında sentezi tamamlanan, CA enzimi üzerine inhibisyon aktivitesi en yüksek bulunan bileşik **2e**'nin ilgili enzim aktif bölgeleriyle (CA-I, CA-II, CA-IX, CA-XII) olası etkileşimlerini belirlemek için CA-I enzimine ait (PDB Kodu: 1AZM) [225], CA-II enzimine ait (PDB Kodu: 3HS4) [226], CA-IX enzimine ait (PDB Kodu: 7JO2) [227] ve CA-XII enzimine ait (PDB Kodu: 1JD0) [228] kristal yapıları üzerinde docking çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda *Glide 7.1* [229-231] programı ile gerçekleştirilen docking tekniği uygulanmış ve GlideScore SP ile en olası pozlar üretilmiştir. Şekil 5.45.-5.52'de CA izoenzimleri ile yapılan çalışma neticesinde elde edilen docking pozları verilmiştir.

Şekil 5.46.-5.46'da görülebildiği gibi, bileşik **2e**'de bulunan sülfonamid grubunun azotu çinko metali ile ikili tuz köprüsü oluşturmuştur. Aynı azot grubu ile Thr199 aminoasidinin hidroksil grubu arasında bir hidrojen bağı gözlenmektedir. Sülfonamid grubunun sülfon grubu ise Thr199 aminoasidinin amin grubu ile bir hidrojen bağı oluşturmaktadır. Sülfon grubu aynı zamanda Trp209 aminoasidinin indol halkası ile iki tane aromatik hidrojen bağı oluşturmaktadır. Bileşik **2e**'nin 1,4-disübstitüebenzen halkası ile His94 aminoasidinin imidazol halkası arasında pi-pi etkileşimi gözlenmektedir.

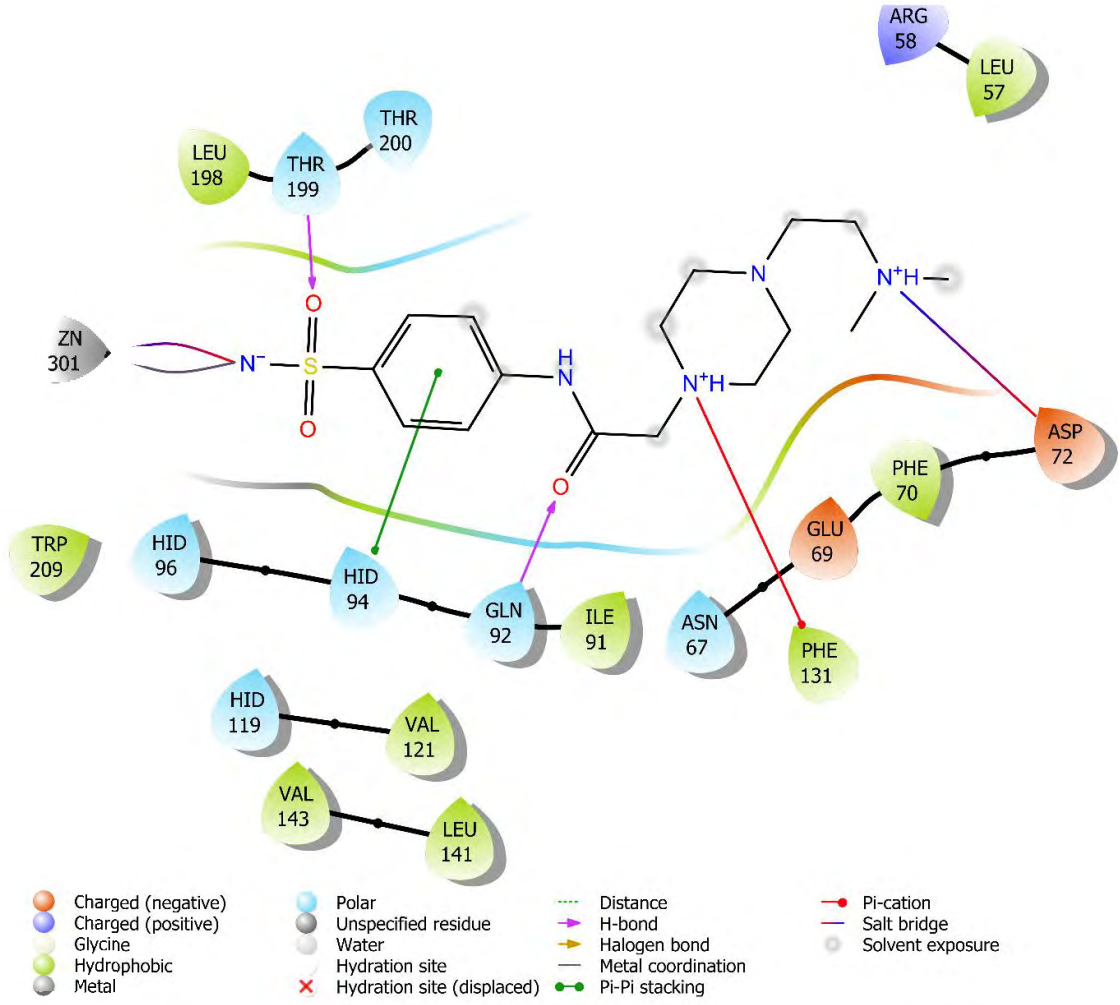


Şekil 5.47. Bileşik 2e'nin CA-I enzim aktif bölgesiyle etkileşiminin iki boyutlu görünümü (PDB ID: 1AZM)

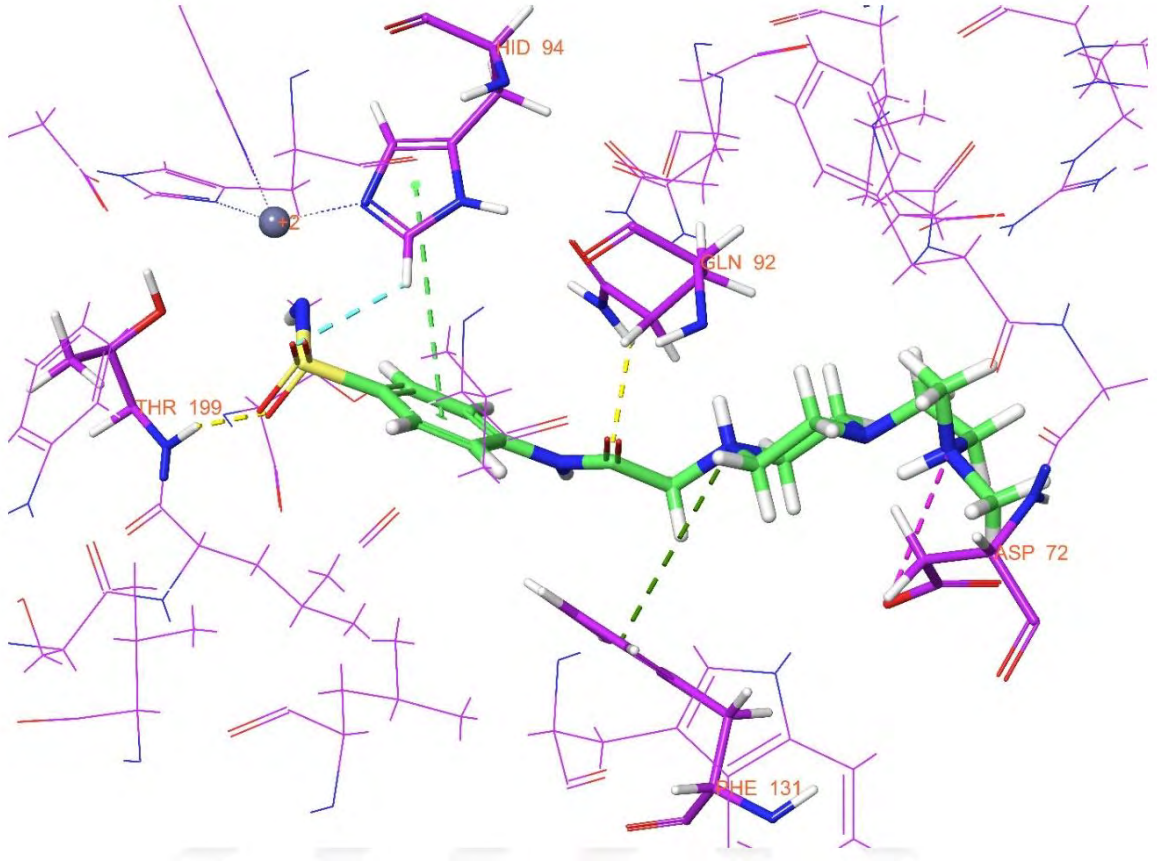


Şekil 5.48. *Bileşik 2e'nin CA-I enzim aktif bölgesiyle etkileşiminin üç boyutlu görünümü (Enzim aktif bölgesindeki amino asitler turuncu renkli, bileşik 2e ise yeşil renkli gösterilmiştir).*

Şekil 5.47.-5.48.'de bileşik 2e'nin CA-II izoenzimi ile etkileşimleri sunulmaktadır. Şekillerden görülebildiği gibi, bileşik 2e'de bulunan sülfonamid grubunun azotu çinko metali ile ikili tuz köprüsü oluşturmuştur. Sülfonamid grubunun sülfon grubu ise Thr199 aminoasidinin amin grubu ile bir hidrojen bağı oluşturmaktadır. Sülfon grubu aynı zamanda Hid94 aminoasidinin imidazol halkası ile aromatik hidrojen bağı oluşturmaktadır. Bileşik 2e'nin 1,4-disüstitübenzen halkası ile His94 aminoasidinin imidazol halkası arasında pi-pi etkileşimi gözlenmektedir. Karbonil grubu ile Gln92 aminoasidinin amino grubu arasında hidrojen bağı görülmektedir. Son olarak piperazin halkasının kendi azotu Phe131 aminoasidinin fenil halkası ile katyon-pi etkileşimi oluştururken, dimetilaminoetil kalıntısının azot atomu ise Asp72 aminoasidinin hidroksil grubu ile tuz köprüsü oluşturmuştur.

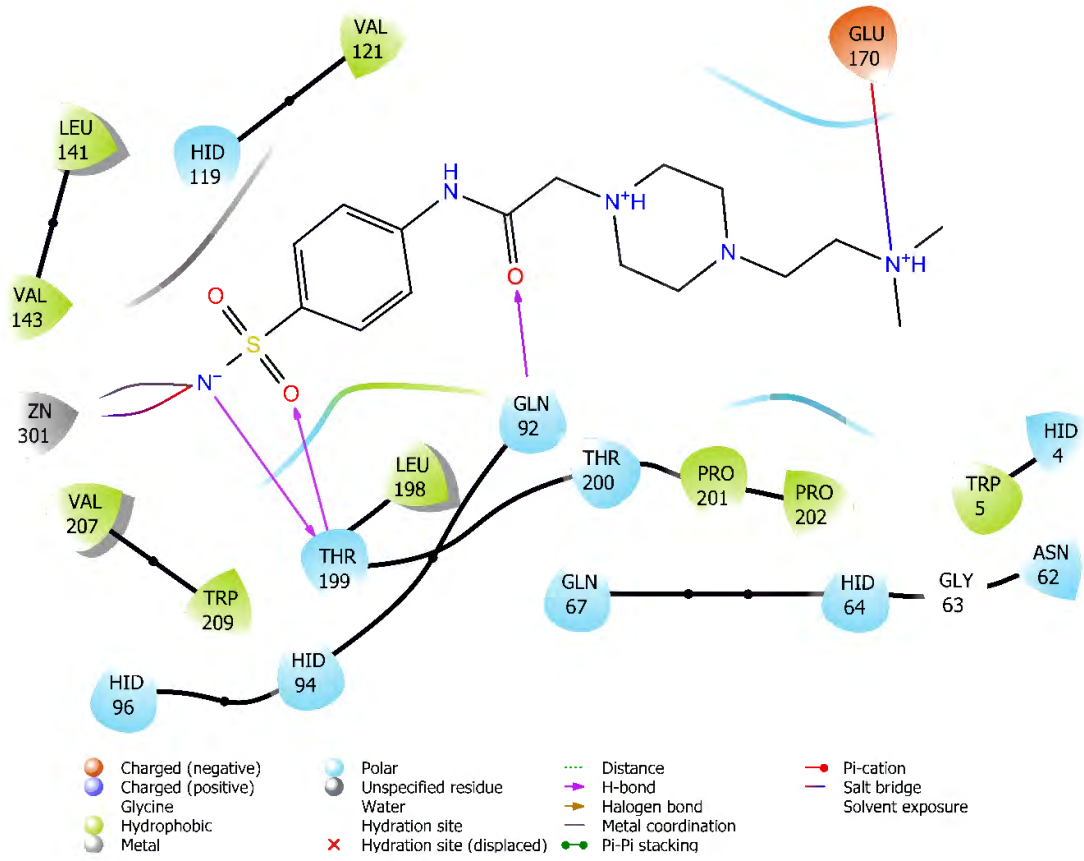


Şekil 5.49. Bileşik 2e'nin CA-II enzim aktif bölgesiyle etkileşiminin iki boyutlu görünümü (PDB ID: 3HS4)

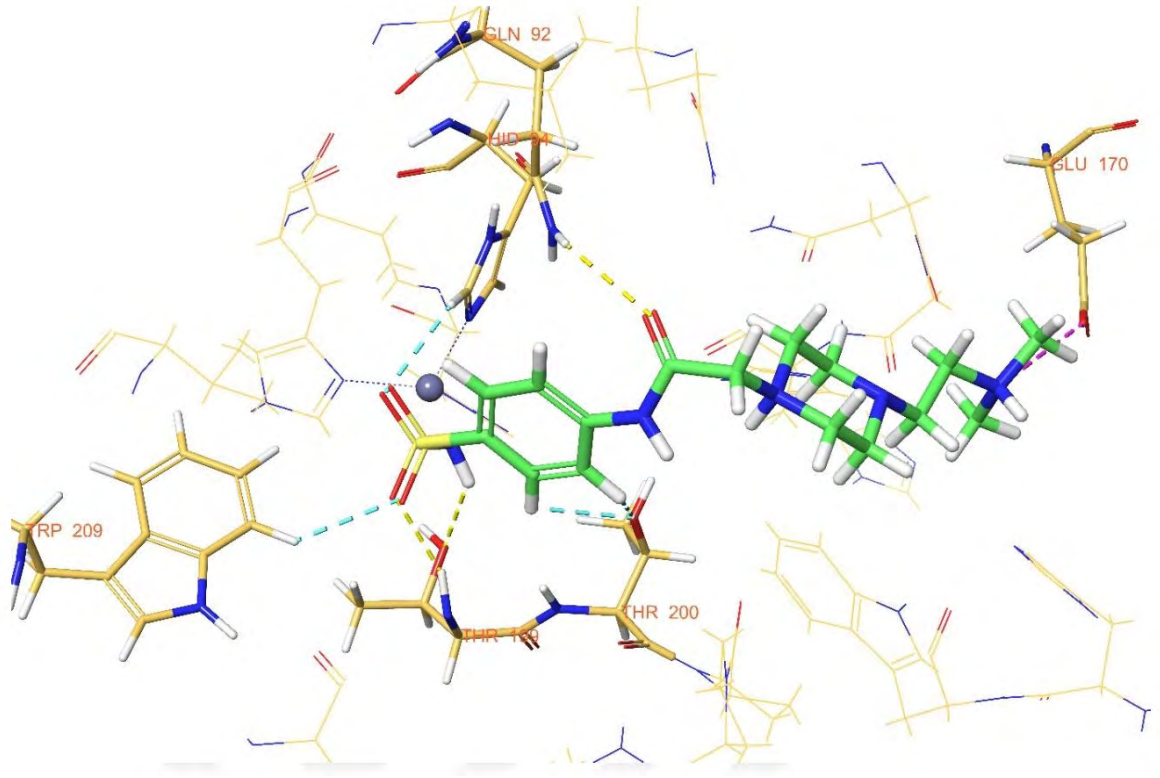


Şekil 5.50. Bileşik **2e**'nin CA-II enzim aktif bölgesiyle etkileşiminin üç boyutlu görünümü (Enzim aktif bölgesindeki amino asitler turuncu mor, bileşik **2e** ise yeşil renkli gösterilmiştir).

Şekil 5.4951.-50 bileşik **2e**'nin CA-IX izoenzimi ile etkileşimleri sunulmaktadır. Şekillerden görülebildiği gibi, bileşik **2e**'de bulunan sülfonamid grubunun azotu çinko metali ile ikili tuz köprüsü oluşturmuştur. Sülfonamid grubunun azotu Thr199 aminoasidinin hidroksil grubu ile bir hidrojen bağı oluşturmaktadır. Sülfonamid grubunun sülfon grubu ise Thr199 aminoasidinin amin grubu ile bir hidrojen bağı oluşturmaktadır. Sülfon grubu aynı zamanda Trp209 aminoasidinin indol halkası ve Hid94 aminoasidinin imidazol halkası ile aromatik hidrojen bağı oluşturmaktadır. Bileşik **2e**'nin 1,4-disübtübenzen halkası ile Thr200 aminoasidinin hidroksil grubu arasında iki tane aromatik hidrojen bağı gözlenmektedir. Karbonil grubu ile Gln92 aminoasidinin amino grubu arasında hidrojen bağı oluşturmaktadır. Son olarak piperazin dimetilaminoetil kalıntısının azot atomu ise Glu170 aminoasidinin hidroksil grubu ile tuz köprüsü oluşturmuştur.

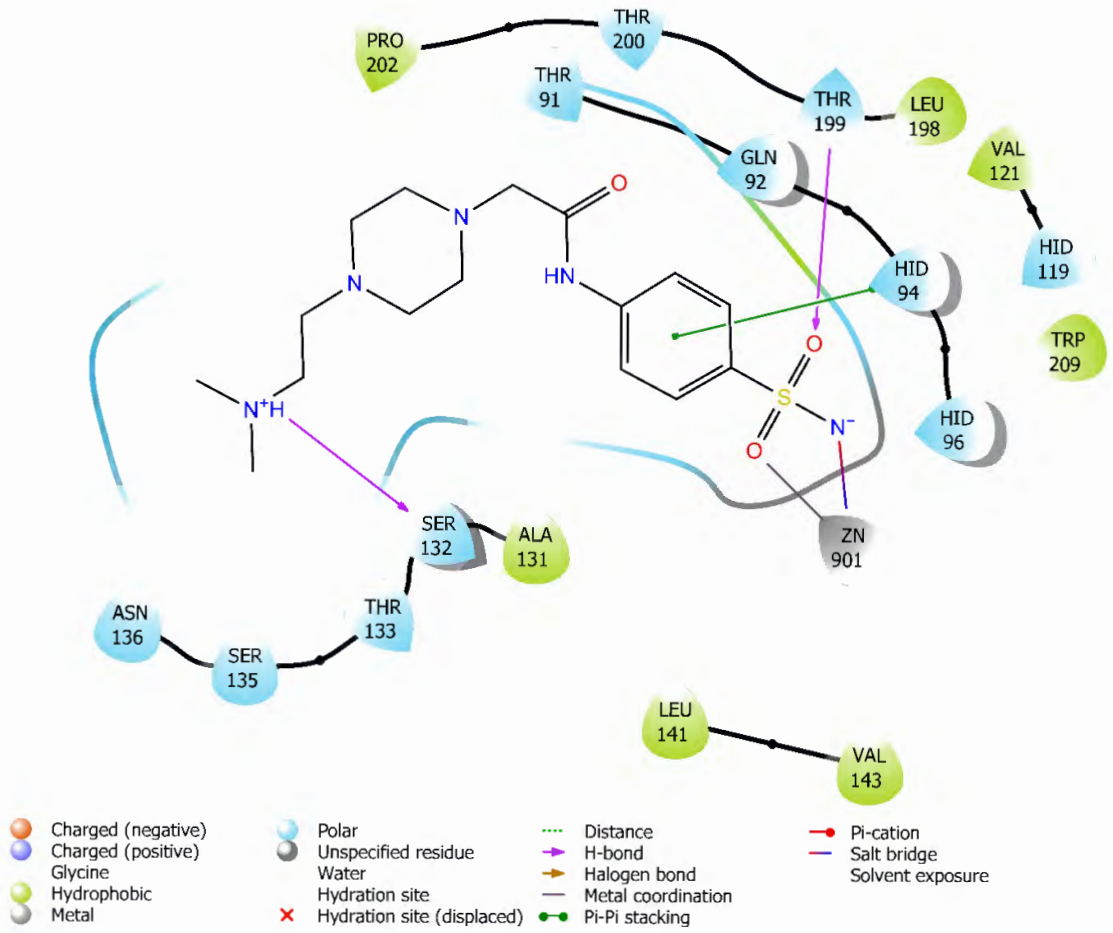


Şekil 5.52. Bileşik 2e'nin CA-IX enzim aktif bölgesiyle etkileşiminin iki boyutlu görünümü (PDB ID: 7J02)

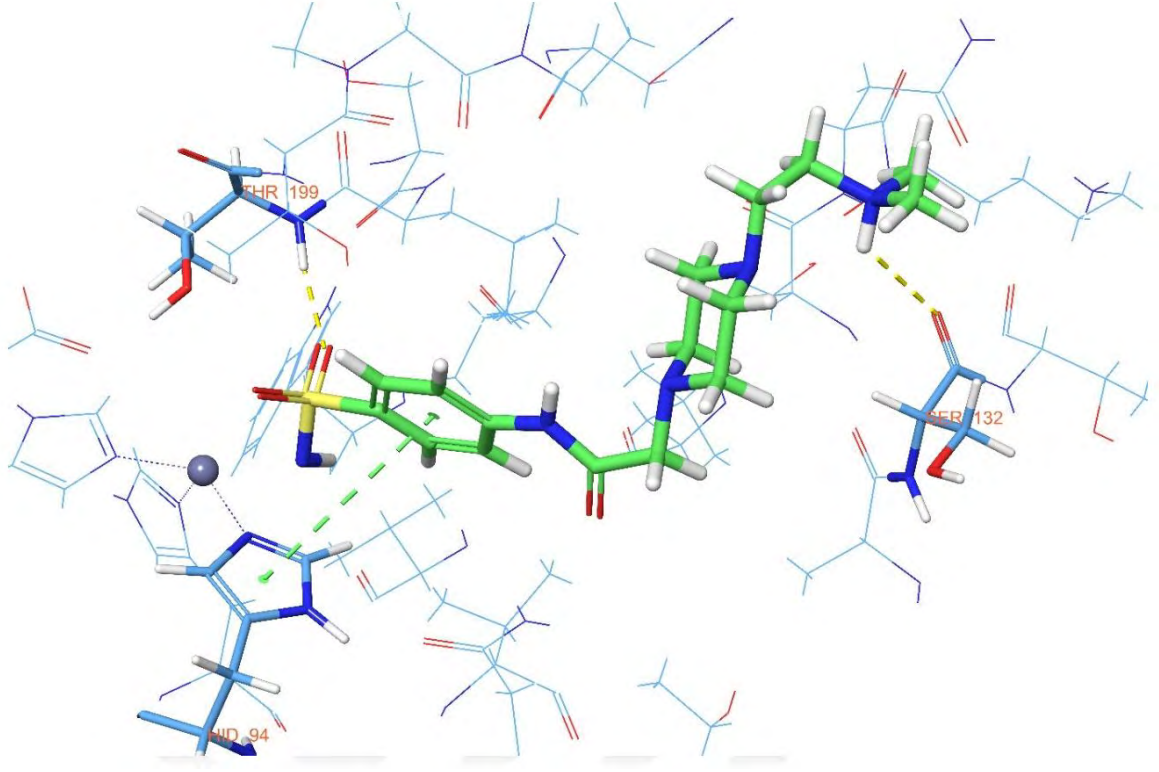


Şekil 5.53. Bileşik **2e**'nin CA-IX enzim aktif bölgesiyle etkileşiminin üç boyutlu görünümü (Enzim aktif bölgesindeki amino asitler turuncu sarı, bileşik **2e** ise yeşil renkli gösterilmiştir).

Şekil 5.51.-5.52.'de bileşik **2e**'nin CA-XII izoenzimi ile etkileşimleri sunulmaktadır. Şekillerden görülebildiği gibi, bileşik **2e**'de bulunan sülfonamid grubunun azotu ve sülfon grubu çinko metali ile ikili tuz köprüsü oluşturmuştur. Sülfonamid grubunun sülfon grubu ise Thr199 aminoasidinin amin grubu ile bir hidrojen bağı oluşturmaktadır. Bileşik **2e**'nin 1,4-disübtübenzen halkası ile His94 aminoasidinin imidazol halkası arasında pi-pi etkileşimi gözlenmektedir. Son olarak piperazin dimetilaminoetil kalıntısının azot atomu ise Ser132 aminoasidinin karbonil ile hidrojen bağı oluşturmuştur.



Şekil 5.54. Bileşik 2e'nin CA-XII enzim aktif bölgesiyle etkileşiminin iki boyutlu görünümü (PDB ID: 1JD0)



Şekil 5.55. Bileşik 2e'nin CA-XII enzim aktif bölgesiyle etkileşiminin üç boyutlu görünümü (Enzim aktif bölgesindeki amino asitler turuncu mavi, bileşik 2e ise yeşil renkli gösterilmiştir).

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

CA enzimi alanında yapılan araştırmalar son yıllarda oldukça dinamik ve üretkendir. Omurgalılarda bulunan α -CA izoformunun yanı sıra β -, γ -, δ -, ζ -, η -, θ - ve ι -CA izoformları izole edilmiş ve karakterize edilmiş ve saflaştırılmıştır. Bugüne kadar α -CA izoformunun 16 farklı izozimi bulunmuştur. Hem omurgalılarda hem de omurgasızlarda geniş organ ve doku dağılımı göstermektedir ve çeşitli patolojik ve fizyolojik süreçlerde yer almaktadırlar. Glokom, obezite, osteoporoz, kanser, yüksek irtifa hastalığı, epilepsi, nöropatik ağrı, uyku apnesi gibi hastalıklarda önemli rol üstlenmektedirler. Bu nedenle CA enzimlerinin inhibisyonu ve aktivasyonu ile birçok patolojik durumun tedavisinde kullanılabilen umut verici yeni ilaçlar keşfedilebilir. Örneğin; mevcut ilaçlara dirençli *P. falciparum*, *H. pylori*, *M. tuberculosis* ve *C. albicans*'ın neden olduğu enfeksiyonlar için ciddi bir tıbbi sorun teşkil etmektedir ve CA inhibitörleri yeni etki mekanizması ile bu durumun üstesinden gelebilir. CA inhibitörlerinin çeşitli oftalmolojik ve anti-obezite uygulamalarının yanı sıra antikonvülsanlar olarak işlev gören yeni türevler de bildirilmiştir. Uzamsal öğrenme ve hafıza üzerindeki olumlu etkileri nedeniyle, CA aktivatörlerinin Alzheimer hastalığı gibi hastalıkların tedavisi için yeni bir mekanizma sağlayabileceği bildirilmiştir. İzozim selektif ilaçların araştırılması da mevcut ilaçların yan etkisinin azaltılmasında önemlidir. Yakın zamanda katalitik olarak önemli olan CA izozimlerine karşı sülfonamid, sülfamatlar ve sülfamitler ayrıntılı olarak araştırılmıştır. CA inhibitörlerinin önemli bir kısmı sülfonamid yapılıdır.

Enzimin aktif bölgesinde bulunan Zn^{+2} iyonu sülfonamidler ile kompleks oluşturarak güçlü etkileşimde bulunurlar. Bu bilgilerden hareketle bu yüksek lisans tezinde sentezlenen bileşikler (**2a-2j**) CA enzim inhibisyon aktiviteleri incelenmiştir. **2a**, **2c**, **2e**, **2f** kodlu bileşikler CA enzimine karşı yüksek inhibitör aktivite göstermiştir. En yüksek aktivite gösteren **2e** kodlu bileşiğin CA-I, CA-II, CA-IX, CA-XII izozimleri ile etkileşimi *in silico* docking çalışmaları ile aydınlatılmıştır.

Bu tez çalışması ile elde edilen veriler ile CA enzim inhibisyonu için benzer kimyasal yapılu bileşiklerin tasarlanması, sentezlenmesi ve aktivitelerinin araştırılması amaçlanmaktadır.

KAYNAKÇA

- [1] 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?* Chem Rev., 112:4421-4468.
- [2] Supuran, C.T. (2008). *Carbonic anhydrases: Novel therapeutic applications for inhibitors and activators.* Nat Rev Drug Discov., 7:168-181.
- [3] Clare, B.W., Supuran, C.T. (2006). *A perspective on quantitative structure-activity relationships and carbonic anhydrase inhibitors.* Expert Opin Drug Metab Toxicol., 2:113-137
- [4] Supuran, C.T. (2013). *Carbonic anhydrases: from biomedical applications of the inhibitors and activators to biotechnologic use for CO₂ capture.* J Enzyme Inhib Med Chem., 28:229-230.
- [5] Supuran, C.T. (2012). *Structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors.* J Enzyme Inhib Med Chem., 27:759-772.
- [6] Supuran, C.T., Scozzafava, A. (2000). *Carbonic anhydrase inhibitors and their therapeutic potential.* Exp Opin Ther Patents., 10:575-600.
- [7] Briganti, F., Mangani, S., Scozzafava, A., Vernaglione, G., Supuran, C.T. (1999). *Carbonic anhydrase catalyzes cyanamide hydration to urea: is it mimicking the physiological reaction?* J Biol Inorg Chem., 4:528-536.
- [8] Supuran, C.T., Winum, J.Y. (2009). *Drug Design of Zinc-Enzyme Inhibitors: Functional, Structural, and Disease Applications.* Part II. Hoboken, NJ: Wiley.
- [9] Supuran, C.T., Scozzafava, A., Conway, J. (2004). *Carbonic Anhydrase: Its Inhibitors and Activators.* Boca Raton, FL: CRC Press.
- [10] Maren, T.H. (1967). *Carbonic anhydrase: chemistry, physiology and inhibition.* Physiol Rev., 47:595-781.
- [11] Supuran, C.T., De Simone, G. (2015). *Carbonic Anhydrases as Biocatalysts: From Theory to Medical and Industrial Applications.* Amsterdam: Elsevier B.V.
- [12] Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A., Supuran, C.T. (2004). *Modulation of carbonic anhydrase activity and its applications in therapy.* Exp Opin Ther Pat., 14:667-702.
- [13] Winum, J.Y., Scozzafava, A., Montero, J.L., Supuran, C.T. (2006). *New zinc binding motifs in the design of selective carbonic anhydrase inhibitors.* Mini Rev Med Chem., 6:921-936.
- [14] Temperini, C., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2009). *Drug design studies of carbonic anhydrase activators.* In: Supuran CT, Winum JY, eds. *Drug Design of Zinc-Enzyme Inhibitors: Functional, Structural, and Disease Applications.* Hoboken, NJ: Wiley, 473.
- [15] Gao, B.B., Clermont, A., Rook, S., vd. (2007). *Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation.* Nat Med., 13:181-188.
- [16] Supuran, C.T. (2008). *Diuretics: from classical carbonic anhydrase inhibitors to novel applications of the sulfonamides.* Curr Pharm Des., 14:641-648.
- [17] Basnyat, B., Gertsch, J.H., Johnson, E.W., Castro-Marin, F., Inoue, Y., Yeh, C. (2003). *Efficacy of low-dose acetazolamide (125 mg BID) for the prophylaxis of acute mountain sickness: a prospective, double-blind, randomized, placebo-controlled trial.* High Alt Med Biol., 4:45-52.
- [18] Barreiro, E., Hussain, S.N. (2010). *Protein carbonylation in skeletal muscles: impact on function.* Antioxid Redox Signal., 12:417-429.

- [19] Du, AL., Ren, HM., Lu, CZ., Tu, JL., Xu, CF., Sun, YA. (2009). *Carbonic anhydrase III is insufficient in muscles of myasthenia gravis patients*. *Autoimmunity*, 42:209-215.
- [20] Liu, C., Wei, Y., Wang, J., Pi, L., Huang, J., Wang, P. (2012). *Carbonic anhydrases III and IV autoantibodies in rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, diabetes, hypertensive renal disease, and heart failure*. *Clin Dev Immunol*.
- [21] Datta, R., Waheed, A., Bonapace, G., Shah, GN., Sly, WS. (2009). *Pathogenesis of retinitis pigmentosa associated with apoptosis-inducing mutations in carbonic anhydrase IV*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 106:3437-3442.
- [22] De Simone, G., Supuran, C.T. (2009). *Drug design of antiobesity carbonic anhydrase inhibitors*. In: Supuran CT, Winum JY, eds. *Drug Design of Zinc-Enzyme Inhibitors: Functional, Structural, and Disease Applications*. Hoboken, NJ: Wiley, 241.
- [23] De Simone, G., Supuran, C.T. (2007). *Antiobesity carbonic anhydrase inhibitors*. *Curr Top Med Chem.*, 7:879-884.
- [24] Kivelä, J., Parkkila, S., Parkkila, AK., Rajaniemi, H. (1999). *A low concentration of carbonic anhydrase isoenzyme VI in whole saliva is associated with caries prevalence*. *Caries Res.*, 33:178-184.
- [25] Ruusuvuori, E., Li, H., Huttu, K., vd. (2004). *Carbonic anhydrase isoform VII acts as a molecular switch in the development of synchronous gamma-frequency firing of hippocampal CA1 pyramidal cells*. *J Neurosci.*, 24:2699-2707.
- [26] De Simone, G., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2009). *Which carbonic anhydrases are targeted by the antiepileptic sulfonamides and sulfamates?* *Chem Biol Drug Des.*, 74:317-321.
- [27] Aspatwar, A., Tolvanen, ME., Ortutay, C., Parkkila, S. (2010). *Carbonic anhydrase related protein VIII and its role in neurodegeneration and cancer*. *Curr Pharm Des.*, 16:3264-3276.
- [28] De Simone, G., Supuran, C.T., (2010). *Carbonic anhydrase IX: biochemical and crystallographic characterization of a novel antitumor target*. *Biochim Biophys Acta.*, 1804:404-409.
- [29] Guler, OO., De Simone, G., Supuran, C.T. (2010). *Drug design studies of the novel antitumor targets carbonic anhydrase IX and XII*. *Curr Med Chem.*, 17:1516-1526.
- [30] Pastorekova, S., Parkkila, S., Zavada, J. (2006). *Tumor-associated carbonic anhydrases and their clinical significance*. *Adv Clin Chem.*, 42:167-216.
- [31] Battke, C., Kremmer, E., Mysliwicz, J., vd. (2011). *Generation and characterization of the first inhibitory antibody targeting tumour-associated carbonic anhydrase XII*. *Cancer Immunol Immunother.*, 60:649-658.
- [32] Halmi, P., Parkkila, S., Honkaniemi, J. (2006). *Expression of carbonic anhydrases II, IV, VII, VIII and XII in rat brain after kainic acid induced status epilepticus*. *Neurochem Int.*, 48:24-30.
- [33] Lehtonen, J., Shen, B., Vihinen, M., vd. (2004). *Characterization of CA XIII, a novel member of the carbonic anhydrase isozyme family*. *J Biol Chem.*, 279:2719-2727.
- [34] Shah, GN., Ulmasov, B., Waheed, A., vd. (2005). *Carbonic anhydrase IV and XIV knockout mice: roles of the respective carbonic anhydrases in buffering the extracellular space in brain*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 102:16771-16776.
- [35] Nagelhus, E.A., Mathiisen, T.M., Bateman, A.C., vd. (2005). *Carbonic anhydrase XIV is enriched in specific membrane domains of retinal pigment epithelium, Muller cells, and astrocytes*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 102:8030-8035.

- [36] Supuran, C.T., Scozzafava, A. (2002). *Applications of carbonic anhydrase inhibitors and activators in therapy*. *Exp Opin Ther Patents*, 12:217–242
- [37] Supuran, C.T., Scozzafava, A. (2000). *Carbonic anhydrase inhibitors and their therapeutic potential*. *Exp Opin Ther Patents*, 10:575–600.
- [38] Kim, G., Selengut, J., Levine, R.L. (2000). *Carbonic anhydrase III: The phosphatase activity is extrinsic*. *Arch Biochem Biophys*, 377:334–340.
- [39] Briganti, F., Mangani, S., Orioli, P., Scozzafava, A., Vernaglione, G., Supuran, C.T. (1997). *Carbonic anhydrase activators: X-ray crystallographic and spectroscopic investigations for the interaction of isozymes I and II with histamine*. *Biochemistry*, 36:10384–10392.
- [40] Lindskog, S., Silverman, D.W. (2000). *The catalytic mechanism of mammalian carbonic anhydrases*. In: Chegwidde WR, Edwards Y, Carter N, editors. *The carbonic anhydrases—New horizons*; Basel: Birkhäuser Verlag, 175–196.
- [41] Innocenti, A., Scozzafava, A., Parkkila, S., Puccetti, L., De Simone, G., Supuran, C.T. (2008). *Investigations of the esterase, phosphatase, and sulfatase activities of the cytosolic mammalian carbonic anhydrase isoforms I, II, and XIII with 4-nitrophenyl esters as substrates*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18, 2267–2271.
- [42] Gould, S.M., Tawfik, D.S. (2005). *Directed evolution of the promiscuous esterase activity of carbonic anhydrase II*. *Biochemistry*, 44, 5444–5452.
- [43] Höst, G., Mårtensson, L.G., Jonsson, B.H. (2006). *Redesign of human carbonic anhydrase II for increased esterase activity and specificity towards esters with long acyl chains*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1764, 1601–1606.
- [44] Pocker, Y., Meany, J.E. (1967). *The catalytic versatility of erythrocyte carbonic anhydrase. II. Kinetic studies of the enzyme-catalyzed hydration of pyridine aldehydes*. *Biochemistry*, 6, 239–246.
- [45] Cheshnovsky, D., Navon, G. (1980). *Nuclear magnetic resonance studies of carbonic anhydrase catalyzed reversible hydration of acetaldehyde by the saturation transfer method*. *Biochemistry*, 19, 1866–1873.
- [46] Pocker, Y., Meany, J.E. (1965) *Photoregeneration of faded alkali metal solutions. The catalytic versatility of carbonic anhydrase from erythrocytes. The enzyme-catalyzed hydration of acetaldehyde*. *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 1809–1811.
- [47] Briganti, F., Mangani, S., Scozzafava, A., Vernaglione, G., Supuran, C.T. (1999) *Carbonic anhydrase catalyzes cyanamide hydration to urea: Is it mimicking the physiological reaction?* *J. Biol. Inorg. Chem.*, 4, 528–536.
- [48] Guerri, A., Briganti, F., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Mangani, S. (2000) *Mechanism of cyanamide hydration catalyzed by carbonic anhydrase II suggested by cryogenic X-ray diffraction*. *Biochemistry*, 39, 12391–12397.
- [49] Wallace, J.L., Wang, R. (2015). *Hydrogen sulfide-based therapeutics: Exploiting a unique but ubiquitous gasotransmitter*. *Nat. Rev. Drug Dis.*, 14, 329–345.
- [50] Notni, J., Schenk, S., Protoschill-Krebs, G., Kesselmeier, J., Anders, E. (2007). *The missing link in COS metabolism: A model study on the reactivation of carbonic anhydrase from its hydrosulfide analogue*. *Chembiochem*, 8, 530–536.
- [51] Jing, Q., Okrasa, K., Kazlauskas, R.J. (2009). *Stereoselective hydrogenation of olefins using rhodium-substituted carbonic anhydrase—A new reductase*. *Chemistry*, 15, 1370–1376.
- [52] Andring, J.T., Kim, C.U., McKenna, R. (2020). *Structure and mechanism of copper-carbonic anhydrase II: A nitrite reductase*. *IUCrJ*, 7, 287–293.

- [53] Andring, J.T., Lomelino, C.L., Tu, C., Silverman, D.N., McKenna, R., Swenson, E.R. (2018). *Carbonic anhydrase II does not exhibit Nitrite reductase or Nitrous Anhydrase Activity*. *Free Radic. Biol. Med.*, 117, 1–5.
- [54] Aamand, R., Dalsgaard, T., Jensen, F.B., Simonsen, U., Roepstor, A., Fago, A. (2009). *Generation of nitric oxide from nitrite by carbonic anhydrase: A possible link between metabolic activity and vasodilation*. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 297, H2068–H2074.
- [55] Han, E., Zinke, M., Böhmer, A., Niebuhr, J., Maassen, M., Endeward, V., Maassen, N., Tsikas, D. (2018). *GC-MS determination of nitrous anhydrase activity of bovine and human carbonic anhydrase II and IV*. *Anal. Biochem.*, 550, 132–136.
- [56] Monnard, F.W., Nogueira, E.S., Heinisch, T., Schirmerb, T., Ward, T.R. (2013). *Human carbonic anhydrase II as host protein for the creation of artificial metalloenzymes: The asymmetric transfer hydrogenation of imines*. *Chem. Sci.*, 4, 3269–3274.
- [57] Fernández-Gacio, A., Codina, A., Fastrez, J., Riant, O., Soumillion, P. (2006). *Transforming carbonic anhydrase into epoxide synthase by metal exchange*. *Chembiochem*, 7, 1013–1016.
- [58] Alterio, V., Di Fiore, A., D’Ambrosio, K., vd. (2012). *Multiple binding modes of inhibitors to carbonic anhydrases: how to design specific drugs targeting 15 different isoforms?* *Chem Rev*, 112:4421–68.
- [59] Alterio, V., Vitale, R.M., Monti, S.M., vd. (2006). *Carbonic anhydrase inhibitors: X-ray and molecular modeling study for the interaction of a fluorescent antitumor sulfonamide with isozyme II and IX*. *J Am Chem Soc*, 128:8329–35.
- [60] Pacchiano, F., Aggarwal, M., Avvaru, B.S., vd. (2010). *Selective hydrophobic pocket binding observed within the carbonic anhydrase II active site accommodate different 4-substituted-ureido-benzenesulfonamides and correlate to inhibitor potency*. *Chem Commun (Camb)*, 46:8371–3.
- [61] Hen, N., Bialer, M., Yagen, B., vd. (2011). *Anticonvulsant 4-aminobenzenesulfonamide derivatives with branched-alkylamide moieties: X-ray crystallography and inhibition studies of human carbonic anhydrase isoforms I, II, VII and XIV*. *J Med Chem*, 54:3977–81.
- [62] Scozzafava, A., Menabuoni, L., Mincione, F., vd. (1999). *Carbonic anhydrase inhibitors. Synthesis of water-soluble, topically effective, intraocular pressure-lowering aromatic/heterocyclic sulfonamides containing cationic or anionic moieties: is the tail more important than the ring?* *J Med Chem*, 42:2641–50.
- [63] Nair, S.K., Ludwig, P.A., Christianson, D.W. (1994). *Two-site binding of phenol in the active site of human carbonic anhydrase II: structural implications for substrate association*. *J Am Chem Soc*, 116: 3659–60.
- [64] Carta, F., Temperini, C., Innocenti, A., vd. (2010). *Polyamines inhibit carbonic anhydrases by anchoring to the zinc-coordinated water molecule*. *J Med Chem*, 53:5511–22.
- [65] Martin, D.P., Cohen, S.M. (2012). *Nucleophile recognition as an alternative inhibition mode for benzoic acid based carbonic anhydrase inhibitors*. *Chem Commun (Camb)*, 48:5259–61.
- [66] Davis, R.A., Hofmann, A., Osman, A., vd. (2011). *Natural product-based phenols as novel probes for mycobacterial and fungal carbonic anhydrases*. *J Med Chem*, 54:1682–92.

- [67] Tars, K., Vullo, D., Kazaks, A., vd. (2013). *Sulfocoumarins (1,2-benzoxathiine-2,2-dioxides): a class of potent and isoform-selective inhibitors of tumor-associated carbonic anhydrases*. J Med Chem, 56:293–300.
- [68] Buchieri, M.V., Riafrecha, L.E., Rodri'guez, O.M., vd. (2013). *Inhibition of the b-carbonic anhydrases from Mycobacterium tuberculosis with C-cinnamoyl glycosides: identification of the first inhibitor with anti-mycobacterial activity*. Bioorg Med Chem Lett, 23:740–3.
- [69] Riafrecha, L.E., Rodri'guez, O.M., Vullo, D., vd. (2013). *Synthesis of C-cinnamoyl glycosides and their inhibitory activity against mammalian carbonic anhydrases*. Bioorg Med Chem, 21:489–94.
- [70] Ekinci, D., Karagoz, L., Ekinci, D., Şentürk, M., Supuran, C.T. (2013). *Carbonic anhydrase inhibitors: in vitro inhibition of a isoforms (hCA I, hCA II, bCA III, hCA IV) by flavonoids*. J Enzyme Inhib Med Chem, 28:283–8.
- [71] Sahin H, Can Z, Yildiz O, et al. *Inhibition of carbonic anhydrase isozymes I and II with natural products extracted from plants, mushrooms and honey*. J Enzyme Inhib Med Chem 2012;27:395–402.
- [72] Supuran, C.T. (2011). *Carbonic anhydrase inhibition with natural products: novel chemotypes and inhibition mechanisms*. Mol Divers, 15: 305–16.
- [73] Karioti, A., Ceruso, M., Carta, F., Bilia, A-R., Supuran, C.T. (2015). *New natural product carbonic anhydrase inhibitors incorporating phenol moieties*. Bioorg Med Chem, 23:7219–25.
- [74] Maresca, A., Akyuz, G., Osman, S.M., AlOthman, Z., Supuran, C.T. (2015). *Inhibition of mammalian carbonic anhydrase isoforms I-XIV with a series of phenolic acid esters*. Bioorg Med Chem, 23:7181–8.
- [75] Maresca, A., Temperini, C., Vu, H., Pham, N.B., Poulsen, S-A., Scozzafava, A., Quinn, R. J., Supuran C.T. (2009). *Non-zinc mediated inhibition of carbonic anhydrases: coumarins are a new class of suicide inhibitors*. J Am Chem Soc, 131:3057–62.
- [76] Maresca, A., Temperini, C., Pochet, L., Masereel, B., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2010). *Deciphering the mechanism of carbonic anhydrase inhibition with coumarins and thiocoumarins*. J Med Chem, 53:335–44.
- [77] Temperini C, Innocenti A, Scozzafava A, Parkkila, S., Supuran, C.T. (2010). *The coumarinbinding site in carbonic anhydrase accommodates structurally diverse inhibitors: the antiepileptic lacosamide as an example and lead molecule for novel classes of carbonic anhydrase inhibitors*. J Med Chem, 53:850–4.
- [78] Touisni, N., Maresca, A., McDonald, P.C., Lou, Y., Scozzafava, A., Dedhar, S., Winum, J-Y., Supuran, C.T. (2011). *Glycosyl coumarin carbonic anhydrase IX and XII inhibitors strongly attenuate the growth of primary breast tumors*. J Med Chem, 54:8271–7.
- [79] Bonneau, A., Maresca, A., Winum, J-Y., Supuran, C.T. (2013). *Metronidazolecoumarin conjugates and 3-cyano-7-hydroxy-coumarin act as isoform-selective carbonic anhydrase inhibitors*. J Enzyme Inhib Med Chem, 28:397–401.
- [80] Sharma, A., Tiwari, M., Supuran, C.T. (2014). *Novel coumarins and benzocoumarins acting as isoform-selective inhibitors against the tumor-associated carbonic anhydrase IX*. J Enzyme Inhib Med Chem, 29:292–6.
- [81] Maresca, A., Supuran, C.T. (2010). *Coumarins incorporating hydroxy- and chloro-moieties selectively inhibit the transmembrane, tumorassociated carbonic*

- anhydrase isoforms IX and XII over the cytosolic ones I and II. Bioorg Med Chem Lett*, 20:4511–4.
- [82] Maresca, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2010). *78-Disubstituted- but not 6,7-disubstituted coumarins selectively inhibit the transmembrane, tumor-associated carbonic anhydrase isoforms IX and XII over the cytosolic ones I and II in the low nanomolar/subnanomolar range. Bioorg Med Chem Lett*, 20:7255–8.
- [83] Carta, F., Maresca, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2012). *5- and 6-membered (thio)lactones are prodrug type carbonic anhydrase inhibitors. Bioorg Med Chem Lett*, 22:267–70.
- [84] 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. Chem Commun*, 51:302–5.
- [85] Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A., Supuran, C.T. (2006). *Carbonic anhydrase inhibitors and activators and their use in therapy. Expert Opin. Ther. Pat.*, 16, 1627–1664.
- [86] Supuran, C.T., Scozzafava, A., Conway, J. (2004). *Carbonic Anhydrase — Its inhibitors and Activators* CRC, Boca Raton, 1–363.
- [87] Supuran, C.T., Scozzafava, A., Casini, A. (2003). *Carbonic anhydrase inhibitors. Med. Res. Rev.* 23, 146–189. A comprehensive review on the development of CAIs.
- [88] Smith, K.S., Ferry, J.G. (2000). *Prokaryotic carbonic anhydrases. FEMS Microbiol. Rev.*, 24, 335–366.
- [89] Thiry, A., Dogne, J-M., Masereel, B., Supuran, C.T. (2006). *Targeting tumor-associated carbonic anhydrase IX in cancer therapy. Trends Pharmacol. Sci.*, 27, 566–573.
- [90] Stams, T., Christianson, D.W. (2000). in *The Carbonic Anhydrases — New Horizons*, 159–174, Basel: Birkhauser.
- [91] Pastorekova, S., Parkkila, S., Pastorek, J., Supuran, C.T. (2004). *Carbonic anhydrases: current state of the art, therapeutic applications and future prospects. J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 19, 199–229.
- [92] Nishimori, I., Minakuchi, T., Onishi, S., Vullo, D., Cecchi, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2007). *Carbonic anhydrase inhibitors. Cloning, characterization and inhibition studies of the cytosolic isozyme III with sulfonamides. Bioorg. Med. Chem.*, 15, 7229–7236.
- [93] Vullo, D., Franchi, M., Gallori, E., Antel, J., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2004). *Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of mitochondrial isozyme V with aromatic and heterocyclic sulfonamides. J. Med. Chem.*, 47, 1272–1279.
- [94] Nishimori, I., Vullo, D., Innocenti, A., Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A., Supuran, C.T. (2005). *Carbonic anhydrase inhibitors. The mitochondrial isozyme VB as a new target for sulfonamide and sulfamate inhibitors. J. Med. Chem.*, 48, 7860–7866.
- [95] Nishimori, I., Minakuchi, T., Onishi, S., Vullo, D., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2007). *Carbonic anhydrase inhibitors. DNA cloning, characterization and inhibition studies of the human secretory isoform VI, a new target for sulfonamide and sulfamate inhibitors. J. Med. Chem.*, 50, 381–388.
- [96] Vullo, D., Voipio, J., Innocenti, A., Baeza, C.R., Ranki, H., Scozzafava, A., Kaila, K., Supuran, C.T. (2005). *Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the human cytosolic isozyme VII with aromatic and heterocyclic sulfonamides. Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 971–976.

- [97] Nishimori, I. (2004). *Carbonic Anhydrase — Its Inhibitors and Activators* (eds Supuran, C. T., Scozzafava, A. & Conway J.) 25–43 (CRC, Boca Raton).
- [98] Vullo, D., Franchi, M., Gallori, E., Pastorek, J., Scozzafava, A., Pastoreka, S., Supuran, C.T. (2003). *Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the tumor-associated isozyme IX with aromatic and heterocyclic sulfonamides*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13, 1005–1009.
- [99] Vullo, D., Innocenti, A., Nishimori, I., Pastorek, J., Scozzafava, A., Pastorekova, S., Supuran, C.T. (2005). *Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the transmembrane isozyme XII with sulfonamides — a new target for the design of antitumor and antiglaucoma drugs?* *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 963–969.
- [100] Lehtonen, J., Shen, B., Vihinen, M., Casini, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Parkkila, A-K., Saarnio, J., Kivela, A.J., Waheed, A., Sly, W.S., Parkkila, S. (2004). *Characterization of CA XIII, a novel member of the carbonic anhydrase isozyme family*. *J. Biol. Chem.*, 279, 2719–2727.
- [101] Nishimori, I., Vullo, D., Innocenti, A., Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A., Supuran, C.T. (2005). *Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the transmembrane isozyme XIV with sulfonamides*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 3828–3833.
- [102] Alterio, V., Vitale, R.M., Monti, S.M., Pedone, C., Scozzafava, A., Cecchi, A., De Simone, G., Supuran, C.T. (2006). *Carbonic anhydrase inhibitors: X-ray and molecular modeling study for the interaction of a fluorescent antitumor sulfonamide with isozyme II and IX*. *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 8329–8335. X-ray crystal structure of a fluorescent, antitumour sulphonamide in adduct with CA II and homology modelling for the binding to CA IX. Opens new perspectives for the design of isoform-specific CAIs.
- [103] Köhler, K., Hillebrecht, A., Wischeler, J.S., Innocenti, A., Heine, A., Supuran, C.T., Klebe, G. (2007). *Saccharin inhibits carbonic anhydrases: possible explanation for its unpleasant metallic aftertaste*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 46, 7697–7699.
- [104] Supuran, C.T., Ilies, M.A., Scozzafava, A. (1998). *Carbonic anhydrase inhibitors. Part 29. Interaction of isozymes I, II and IV with benzolamide-like derivatives*. *Eur. J. Med. Chem.*, 33, 739–752.
- [105] Supuran, C.T., Scozzafava, A., Ilies, M.A., Briganti, F. (2000). *Carbonic anhydrase inhibitors. Synthesis of sulfonamides incorporating 2,4,6-trisubstituted-pyridinium-ethylcarboxamido moieties possessing membrane-impermeability and in vivo selectivity for the membrane-bound (CA IV) versus the cytosolic (CA I and CA II) isozymes*. *J. Enz. Inhib.*, 15, 381–401.
- [106] Scozzafava, A., Briganti, F., Ilies, M.A., Supuran, C.T. (2000). *Carbonic anhydrase inhibitors. Synthesis of membrane-impermeant low molecular weight sulfonamides possessing in vivo selectivity for the membrane-bound versus the cytosolic isozymes*. *J. Med. Chem.*, 43, 292–300. A report of membrane-impermeable CAIs, which selectively inhibit extracellular and not cytosolic isozymes.
- [107] Winum, J.Y., Temperini, C., Cheikh, K.E., Innocenti, A., Vullo, D., Ciattini, S., Montero, J-L., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2006). *Carbonic anhydrase inhibitors: clash with Ala65 as a means for designing inhibitors with low affinity for the ubiquitous isozyme II, exemplified by the crystal structure of the topiramate sulfamide analogue*. *J. Med. Chem.*, 49, 7024–7031.
- [108] Saczewski, F., Slawinski, J., Kornicka, A., Brzozowski, Z., Pomarnacka, E., Innocenti, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2006). *Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the cytosolic human isozymes I and II, and the transmembrane, tumor-associated isozymes IX and XII with substituted aromatic*

- sulfonamides activatable in hypoxic tumors*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16, 4846–4851.
- [109] De Simone, G., Vitale, R.M., Fiore, A.D., Pedone, C., Scozzafava, A., Montero, J-L., Winum, J-Y, Supuran, C.T. (2006). *Carbonic anhydrase inhibitors: hypoxia-activatable sulfonamides incorporating disulfide bonds that target the tumor-associated isoform IX*. *J. Med. Chem.*, 49, 5544–5551.
- [110] Krungkrai, J., Scozzafava, A., Reungprapavut, S., Krungraki, S.R., Rattanajak, R., Kamchonwongpaisan, S., Supuran, C.T. (2005). *Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of Plasmodium falciparum carbonic anhydrase with aromatic sulfonamides: towards antimalarials with a novel mechanism of action?* *Bioorg. Med. Chem.*, 13, 483–489.
- [111] Nishimori, I., Minakuchi, T., Morimoto, K., Sano, S., Onishi, S., Takeuchi, H., Vullo, D., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2006). *Carbonic anhydrase inhibitors. DNA cloning and inhibition studies of the α -carbonic anhydrase from Helicobacter pylori: a new target for developing sulfonamide and sulfamate gastric drugs*. *J. Med. Chem.*, 49, 2117–2126.
- [112] Nishimori, I., Minakuchi, T., Kohsaki, T., Onishi, S., Takeuchi, H., Vullo, D., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2007). *Carbonic anhydrase inhibitors. The β -carbonic anhydrase from Helicobacter pylori is a new target for sulfonamide and sulfamate inhibitors*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17, 3585–3594.
- [113] Suarez Covarrubias, A., Larsson, A.M., Högbom, M., Lindberg, J., Bergfors, T., Björkelid, C., Mowbray, S.L., Unge, T., Jones, T.A. (2005). *Structure and function of carbonic anhydrases from Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.*, 280, 18782–18789.
- [114] Klengel, T., Liang, W-J., Chaloupka, J., Ruoff, C., Schröppel, K., Naglik, J.R., Eckert, S.E., Mogensen, E.G., Haynes, K., Tuite, M.F., Levin, L.R., Buck, J., Mühlischlegel, F.A. (2005). *Fungal adenylyl cyclase integrates CO₂ sensing with cAMP signaling and virulence*. *Curr. Biol.*, 15, 2021–2026.
- [115] Morgensen, E.G., Janbon, G., Chaloupka, J., Steegborn, C., Fu, M.S., Moyrand, F., Klengel, T., Pearson, D.S., Geeves, M.A., Buck, J., Levin, L.R., Mühlischlegel, F.A. (2006). *Cryptococcus neoformans senses CO₂ through the carbonic anhydrase Can2 and the adenylyl cyclase Cac1*. *Eukaryot. Cell*, 103–111.
- [116] Bahn, Y. S., Cox, G.M., Perfect, J.R., Heitman, J. (2005). *Carbonic anhydrase and CO₂ sensing during Cryptococcus neoformans growth, differentiation, and virulence*. *Curr. Biol.*, 15, 2013–2020.
- [117] Soto, A.R., Zheng, H., Shoemaker, D., Rodriguez, J., Read, B.A., Wahlund, T.M. (2006). *Identification and preliminary characterization of two cDNAs encoding unique carbonic anhydrases from the marine alga Emiliana huxleyi*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 5500–5511.
- [118] Aguilera, J., Dijken, J.P.V., De Winde, J.H., Pronk, J.T. (2005). *Carbonic anhydrase (Nce103p): an essential biosynthetic enzyme for growth of Saccharomyces cerevisiae at atmospheric carbon dioxide pressure*. *Biochem. J.*, 391, 311–316.
- [119] Supuran, C.T., Scozzafava, A. (2000). *The Carbonic Anhydrases — New Horizons* (eds Chegwidde, W. R., Carter, N. D. & Edwards, Y. H.) 197–219 (Birkhauser, Basel).
- [120] Ilies, M. ve ark. (2004). *Carbonic anhydrase activators. in Carbonic Anhydrase — Its Inhibitors and Activators* (eds Supuran, C. T., Scozzafava, A. & Conway, J.) 317–352 (CRC, Boca Raton).

- [121] Briganti, F., Mangani, S., Orioli, P., Scozzafava, A., Vernaglione, Supuran, C.T. (1997). *Carbonic anhydrase activators: X-ray crystallographic and spectroscopic investigations for the interaction of isozymes I and II with histamine*. *Biochemistry*, 36, 10384–10392. First study characterizing CA activators by means of X-ray crystallography.
- [122] Temperini, C., Scozzafava, A., Vullo, D., Supuran, C.T. (2006). *Carbonic anhydrase activators. Activation of isozymes I, II, IV, VA, VII and XIV with L- and D-histidine and crystallographic analysis of their adducts with isoform II: engineering proton transfer processes within the active site of an enzyme*. *Chemistry*, 12, 7057–7066.
- [123] Temperini, C., Scozzafava, A., Vullo, D., Supuran, C.T. (2006). *Carbonic anhydrase activators. Activation of isoforms I, II, IV, VA, VII and XIV with L- and D-phenylalanine and crystallographic analysis of their adducts with isozyme II: stereospecific recognition within the active site of an enzyme and its consequences for the drug design*. *J. Med. Chem.*, 49, 3019–3027.
- [124] Sun, M.K., Alkon, D.L. (2002). *Carbonic anhydrase gating of attention: memory therapy and enhancement*. *Trends Pharmacol. Sci.*, 23, 83–89.
- [125] Temperini, C., Innocenti, A., Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A., Supuran, C.T. (2007). *Carbonic anhydrase activators: L-adrenaline plugs the active site entrance of isozyme II, activating better isoforms I, IV, VA, VII, and XIV*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17, 628–635.
- [126] Splendiani, G., Condo, S. (2006). *Diuretic therapy in heart failure*. *G. Ital. Nefrol.*, 23, S74–S76.
- [127] Kyllonen, M.S., Parkkila, S., Rajaniemi, H., Waheed, A., Grubb, J.H., Shah, G.N., Sly, W.S., Kaunisto, K. (2003). *Localization of carbonic anhydrase XII to the basolateral membrane of H⁺-secreting cells of mouse and rat kidney*. *J. Histochem. Cytochem.*, 51, 1217–1224.
- [128] Mincione, F., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2007). *The development of topically acting carbonic anhydrase inhibitors as antiglaucoma agents*. *Curr. Top. Med. Chem.*, 7, 849–854.
- [129] Sugrue, M.F. (2000). *Pharmacological and ocular hypotensive properties of topical carbonic anhydrase inhibitors*. *Prog. Retin. Eye Res.*, 19, 87–112.
- [130] Scozzafava, A., Menabuoni, L., Mincione, F., Briganti, F., Mincione, G., Supuran, C.T. (1999). *Carbonic anhydrase inhibitors. Part 74. Synthesis of water-soluble, topically effective, intraocular pressure-lowering aromatic/heterocyclic sulfonamides containing cationic or anionic moieties: is the tail more important than the ring?* *J. Med. Chem.*, 42, 2641–2650.
- [131] Scozzafava, A., Briganti, F., Mincione, G., Menabuoni, L., Mincione, F., Supuran, C.T. (1999). *Carbonic anhydrase inhibitors: synthesis of water-soluble, aminoacyl/dipeptidyl sulfonamides possessing long-lasting intraocular pressure-lowering properties via the topical route*. *J. Med. Chem.*, 42, 3690–3700.
- [132] Ilies, M., Supuran, C.T., Scozzafava, A., Casini, A., Mincione, F., Menabuoni, L., Caproiu, M.T., Maganu, M., Banciu, M.D. (2000). *Carbonic anhydrase inhibitors: sulfonamides incorporating furan-, thiophene- and pyrrole-carboxamido groups possess strong topical intraocular pressure lowering properties as aqueous suspensions*. *Bioorg. Med. Chem.*, 8, 2145–2155.
- [133] Scozzafava, A., Menabuoni, L., Mincione, F., Briganti, F., Mincione, G., Supuran, C.T. (2000). *Carbonic anhydrase inhibitors: perfluoroalkyl/aryl-substituted*

- derivatives of aromatic/ heterocyclic sulfonamides as topical intraocular pressure-lowering agents with prolonged duration of action.* J. Med. Chem., 43, 4542–4551.
- [134] Scozzafava, A., Menabuoni, L., Mincione, F., Supuran, C.T. (2002). *Carbonic anhydrase inhibitors. A general approach for the preparation of watersoluble sulfonamides incorporating polyaminopolycarboxylate tails and of their metal complexes possessing long-lasting, topical intraocular pressure-lowering properties.* J. Med. Chem., 45, 1466–1476.
- [135] Winum, J.Y., Casini, A., Mincione, F., Starnotti, M., Montero, J-L., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2004). *Carbonic anhydrase inhibitors: N-(p-sulfamoylphenyl)-α-D-glycopyranosylamines as topically acting antiglaucoma agents in hypertensive rabbits.* Bioorg. Med. Chem. Lett., 14, 225–229.
- [136] Cox, S.N., Hay, E., Bird, A.C. (1988). *Treatment of chronic macular edema with acetazolamide.* Arch. Ophthalmol., 106, 1190–1195.
- [137] Gao, B.B., Clermont, A., Rook, S., Fonda, S.J., Srinivasan, V.J., Wojtkovski, M., Fujimoto, J.G., Avery, R.L., Arrigg, P.G., Bursell, S-E., Aiello, L.P., Feener, E.P. (2007). *Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation.* Nature Med., 13, 181–188.
- [138] Supuran, C.T., Mastrolorenzo, A. (2006). *Carbonic Anhydrase – Its Inhibitors and Activators* (eds Supuran, C. T., Scozzafava, A. & Conway, J.) 67–147 (CRC, Boca Raton).
- [139] Maren, T.H. (1995). *The development of topical carbonic anhydrase inhibitors.* J. Glaucoma, 4, 49–62.
- [140] Innocenti, A., Fringes, M.A., Antel, J., Wurl, M., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2005). *Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the membrane-bound human and bovine isozymes IV with sulfonamides.* Bioorg. Med. Chem. Lett., 15, 1149–1154.
- [141] Liao, S., Ivanov, S., Ivanova, A., Ghosh, S., Cote, M., Keefe, K., Coca-Prados, M., Stanbridge, E., Lerman, M. (2003). *Expression of cell surface transmembrane carbonic anhydrase genes CA9 and CA12 in the human eye: overexpression of CA12 (CA XII) in glaucoma.* J. Med. Genet., 40, 257–261.
- [142] Supuran, C.T. (2003). *Carbonic anhydrase inhibitors in the treatment and prophylaxis of obesity.* Expert Opin. Ther. Pat., 13, 1545–1550.
- [143] Casini, A., Antel, J., Abbate, F., Scozzafava, A., David, S., Waldeck, H., Schafer, S., Supuran, C.T. (2003). *Carbonic anhydrase inhibitors: SAR and X-ray crystallographic study for the interaction of sugar sulfamates/sulfamides with isozymes I, II and IV.* Bioorg. Med. Chem. Lett., 13, 841–845.
- [144] Picard, F., Deshaies, Y., Lalonde, J., Samson, P., Richard, D. (2000). *Topiramate reduces energy and fat gains in lean (Fa/?) and obese (fa/fa) Zucker rats.* Obesity Res., 8, 656–663.
- [145] De Simone, G., Di Fiore, Menchise, V., Pedone, C., Antel, J., Casini, A., Scozzafava, A., Wurl, M., Supuran, C.T. (2005). *Carbonic anhydrase inhibitors. Zonisamide is an effective inhibitor of the cytosolic isozyme II and mitochondrial isozyme V: solution and X-ray crystallographic studies.* Bioorg. Med. Chem. Lett., 15, 2315–2320.
- [146] Gadde, K.M., Kopping, M.F., Wagner, H.R., Yonish, G.M., Allison, D.B., Bray, G.A. (2003). *Zonisamide for weight loss in obese adults: a randomized controlled trial.* JAMA, 289, 1820–1825.

- [147] 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, 271–275.
- [148] Pastorekova, S., Pastorek, J. (2004). *Carbonic Anhydrase — Its Inhibitors and Activators* (eds Supuran, C. T., Scozzafava, A. & Conway, J.) 255–281 (CRC, Boca Raton).
- [149] Semenza, G.L. (2007). *Hypoxia and cancer*. *Cancer Metastasis Rev.*, 26, 223–224.
- [150] Brahimi-Horn, M.C., Pouyssegur, J. (2007). *Oxygen, a source of life and stress*. *FEBS Lett.*, 581, 3582–3591.
- [151] Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Von Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., Maxwell, P.H., Ratcliffe, P.J. (2001). *Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation*. *Science*, 292, 468–472.
- [152] Hon, W.C., Wilson, M.I., Harlos, K., Claridge, T.D.W., Schofield, C.J., Pugh, C.W., Maxwell, P.H., Ratcliffe, P.J., Stuart, D.I., Jones, E.Y. (2002). *Structural basis for the recognition of hydroxyproline in HIF-1 α by pVHL*. *Nature*, 417, 975–978.
- [153] Ratcliffe, P.J., Pugh, C.W., Maxwell, P.H. (2000). *Targeting tumors through the HIF system*. *Nature Med.*, 6, 1315–1316.
- [154] Trastour, C., Benizri, E., Ettore, F., Ramaioli, A., Chamorey, E., Pouyssegur, J., Berra, E. (2007). *HIF-1 α and CA IX staining in invasive breast carcinomas: prognosis and treatment outcome*. *Int. J. Cancer*, 120, 1451–1458.
- [155] Pouyssegur, J., Dayan, F., Mazure, N.M. (2006). *Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression*. *Nature*, 441, 437–443.
- [156] Ord, J.J., Agrawal, S., Thamboo, T.P., Roberts, I., Campo, L., Turley, H., Han, C., Fawcett, D.W., Kulkarni, R.P., Cranston, D., Harris, A.L. (2007). *An investigation into the prognostic significance of necrosis and hypoxia in high grade and invasive bladder cancer*. *J. Urol.*, 178, 677–682.
- [157] Swietach, P., Vaughan-Jones, R.D., Harris, A.L. (2007). *Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9*. *Cancer Metastasis Rev.*, 26, 299–310.
- [158] Hutchison, G.J., Valentine, H.R., Lancaster, J.A., Davidson, S.E., Hunter, R.D., Roberts, S.A., Harris, A.L., Stratford, I.J., Price, P.M., West, C.M.L. (2004). *Hypoxia-inducible factor 1- α expression as an intrinsic marker of hypoxia: correlation with tumor oxygen, pimonidazole measurements, and outcome in locally advanced carcinoma of the cervix*. *Clin. Cancer Res.*, 10, 8405–8412.
- [159] Sung, F.L., Hui, E.P., Tao, Q., Li, H., Tsui, N.B.Y., Lo, Y.M.D., Ma, B.B.Y., To, K.F., Harris, A.L., Chan, A.T.C. (2007). *Genome-wide expression analysis using microarray identified complex signaling pathways modulated by hypoxia in nasopharyngeal carcinoma*. *Cancer Lett.* 253, 74–88.
- [160] Koukourakis, M.I., Giatromanolaki, A., Sivridis, E., Pastorek, J., Krapantzos, I., Gatter, K.C., Harris, A.L. (2004). *Hypoxia-activated tumor pathways of angiogenesis and pH regulation independent of anemia in head-and-neck cancer*. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 59, 67–71.
- [161] Potter, C.P., Harris, A.L. (2003). *Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of carbonic anhydrases in cancer*. *Br. J. Cancer*, 89, 2–7.
- [162] Hussain, S.A., Ganesan, R., Reynolds, G., Gross, L., Stevens, A., Pastorek, J., Murray, Perunovic, B., Anwar, M.S., Billingham, L., James, N.D., Spooner, D., Poole, C.J., Palmer, D.H. (2007). *Hypoxia-regulated carbonic anhydrase IX*

- expression is associated with poor survival in patients with invasive breast cancer.* Br. J. Cancer, 96, 104–109.
- [163] Swinson, D.E., Jones, J.L., Richardson, D., Wykoff, C., Turley, H., Pastorek, J., Taub, N., Harris, A.L., O'Bryne, K.J. (2003). *Carbonic anhydrase IX expression, a novel surrogate marker of tumor hypoxia, is associated with a poor prognosis in non-small-cell lung cancer.* J. Clin. Oncol., 21, 473–482.
- [164] Dorai, T., Sawczuk, I., Pastorek, J., Wiernik, P.H., Dutcher, J.P. (2006). *Role of carbonic anhydrases in the progression of renal cell carcinoma subtypes: proposal of a unified hypothesis.* Cancer Invest., 24, 754–779.
- [165] Abbate, F., Winum, J-Y., Potter, B.V.L., Casini, A., Montero, J-L., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2004). *Carbonic anhydrase inhibitors: X ray crystallographic structure of the adduct of human isozyme II with a EMATE, a dual inhibitor of carbonic anhydrases and steroid sulfatase.* Bioorg. Med. Chem. Lett., 14, 231–234.
- [166] Di Fiore, A., Pedone, C., D'Ambrosio, K., Scozzafava, A., De Simone, G., Supuran, C.T. (2006). *Carbonic anhydrase inhibitors: valdecoxib binds to a different active site region of the human isoform II as compared to the structurally related, cyclooxygenase II “selective” inhibitor celecoxib.* Bioorg. Med. Chem. Lett., 16, 437–442.
- [167] Abbate, F., Coetzee, A., Casini, A., Ciattini, S., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2004). *Carbonic anhydrase inhibitors: X ray crystallographic structure of the adduct of human isozyme II with the antipsychotic drug sulpiride.* Bioorg. Med. Chem. Lett., 14, 337–341.
- [168] Svastova, E., Hulikova, A., Rafajova, M., Zat'ovicova, M., Gibadulinova, A., Casini, A., Cecchi, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T., Pastorek, J., Pastorekova, S. (2004). *Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH.* FEBS Lett., 577, 439–445.
- [169] Cecchi, A., Hulikova, A., Pastorek, J., Pastorekova, S., Scozzafava, A., Winum, J-Y., Montero, J-L., Supuran, C.T. (2005). *Carbonic anhydrase inhibitors. Sulfonamides inhibit isozyme IX mediated acidification of hypoxic tumors. Fluorescent sulfonamides design as probes of membrane-bound carbonic anhydrase isozymes involvement in tumorigenesis.* J. Med. Chem., 48, 4834–4841.
- [170] Menchise, De Simone, G., Alterio, V., Di Fiore, A., Pedone, C., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2005). *Carbonic anhydrase inhibitors: Stacking with Phe131 determines active site binding region of inhibitors as exemplified by the X-ray crystal structure of a membrane-impermeant antitumor sulfonamide complexed with isozyme II.* J. Med. Chem., 48, 5721–5727.
- [171] Ilies, M. A., Vullo, D., Pastorek, J., Scozzafava, A., Ilies, M., Caproiu, M.T., Pastorekova, S., Supuran, C.T. (2003). *Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of tumor-associated isozyme IX by halogenosulfanilamide and halogenophenylaminobenzolamide derivatives.* J. Med. Chem., 46, 2187–2196.
- [172] Winum, J.Y., Vullo, D., Casini, A., Montero, J-L., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2003). *Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of cytosolic isozymes I and II and transmembrane, tumor-associated isozyme IX with sulfamates including EMATE also acting as steroid sulfatase inhibitors.* J. Med. Chem., 46, 2197–2204.
- [173] Winum, J.Y., Vullo, D., Casini, A., Montero, J-L., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2003). *Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of transmembrane, tumor-associated isozyme IX, and cytosolic isozymes I and II with aliphatic sulfamates.* J. Med. Chem., 46, 5471–5477.

- [174] Pastorekova, S., Casini, A., Scozzafava, A., Vullo, D., Pastorek, J., Supuran, C.T. (2004). *Carbonic anhydrase inhibitors: the first selective, membrane-impermeant inhibitors targeting the tumor-associated isozyme IX*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, 869–873.
- [175] Vullo, D., Scozzafava, A., Pastorekova, S., Pastorek, J., Supuran, C.T. (2004). *Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of the tumor-associated isozyme IX with fluorine-containing sulfonamides. The first subnanomolar CA IX inhibitor discovered*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, 2351–2356.
- [176] Casey, J.R., Morgan, P.E., Vullo, D., Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A., Supuran, C.T. (2004). *Carbonic anhydrase inhibitors. Design of selective, membrane-impermeant inhibitors targeting the human tumor-associated isozyme IX*. *J. Med. Chem.*, 47, 2337–2347.
- [177] Supuran, C.T., Casini, A., Mastrolorenzo, A., Scozzafava, A. (2004). *COX-2 selective inhibitors, carbonic anhydrase inhibition and anticancer properties of sulfonamides belonging to this class of pharmacological agents*. *Mini Rev. Med. Chem.*, 4, 625–632.
- [178] Garaj, V., Puccetti, L., Fasolis, G., Winum, J-Y., Montero, J-L., Scozzafava, A., Vullo, D., Innocenti, A., Supuran, C.T. (2004). *Carbonic anhydrase inhibitors: synthesis and inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with sulfonamides incorporating 1,2,4-triazine moieties*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, 5427–5433.
- [179] Innocenti, A., Casini, A., Alcaro, M.C., Papini, A.M., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2004). *Carbonic anhydrase inhibitors: the first on-resin screening of a 4-sulfamoylphenylthiourea library*. *J. Med. Chem.*, 47, 5224–5229.
- [180] Cecchi, A., Winum, J-Y., Innocenti, A., Vullo, D., Montero, J-L., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2004). *Carbonic anhydrase inhibitors: synthesis and inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with sulfonamides derived from 4-isothiocyanato-benzolamide*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14, 5775–5780.
- [181] Winum, J.Y., Dogne, J-M., Casini, A., De Leval, X., Montero, J-L., Scozzafava, A., Vullo, D., Innocenti, A., Supuran, C.T. (2005). *Carbonic anhydrase inhibitors: synthesis and inhibition of cytosolic/membrane-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with sulfonamides incorporating hydrazino moieties*. *J. Med. Chem.*, 48, 2121–2125.
- [182] Winum, J.Y., Pastorekova, S., Jakubickova, L., Montero, J-L., Scozzafava, A., Pastorek, J., Vullo, D., Innocenti, A., Supuran, C.T. (2005). *Carbonic anhydrase inhibitors: synthesis and inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with bis-sulfamates*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 579–584.
- [183] Winum, J.Y., Innocenti, A., Nasr, J., Montero, J-L., Scozzafava, A., Vullo, D., Supuran, C.T. (2005). *Carbonic anhydrase inhibitors: synthesis and inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, IX, and XII with N-hydroxysulfamides — a new zinc-binding function in the design of inhibitors*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 15, 2353–2358.
- [184] Winum, J.Y., Cecchi, A., Montero, J-L., Innocenti, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2005). *Carbonic anhydrase inhibitors. Synthesis and inhibition of cytosolic/tumor-associated carbonic anhydrase isozymes I, II, and IX with boron-containing sulfonamides, sulfamides, and sulfamates: toward agents for boron*

- neutron capture therapy of hypoxic tumors.* Bioorg. Med. Chem. Lett., 15, 3302–3306.
- [185] Thiry, A., Ledecq, M., Cecchi, Donge, J-M., Wouters, J., Supuran, C.T., Masereel, B. (2006). *Indanesulfonamides as carbonic anhydrase inhibitors. Toward structure-based design of selective inhibitors of the tumor-associated isozyme CA IX.* J. Med. Chem., 49, 2743–2749.
- [186] Wilkinson, B.L., Bornaghi, L.F., Houston, T.A., Innocenti, A., Supuran, C.T., Poulsen, S-A. (2006). *A novel class of carbonic anhydrase inhibitors: glycoconjugate benzene sulfonamides prepared by “click-tailing”.* J. Med. Chem., 49, 6539–6548.
- [187] Wilkinson, B.L., Bornaghi, L.F., Houston, T.A., Innocenti, A., Vullo, D., Supuran, C.T., Poulsen, S-A. (2007). *Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of isozymes I, II, and IX with triazole-linked O-glycosides of benzene sulfonamides.* J. Med. Chem., 50, 1651–1657.
- [188] Dubois, L., Douma, K., Supuran, C.T., Chiu, R.K., Van Zandvoort, M.A.M.J., Pastorekova, S., Scozzafava, A., Wouters, B.G., Lambin, P. (2007). *Imaging the hypoxia surrogate marker CA IX requires expression and catalytic activity for binding fluorescent sulfonamide inhibitors.* Radiother. Oncol., 83, 367–373.
- [189] Abbate, F., Casini, A., Owa, T., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2004). *Carbonic anhydrase inhibitors: E7070, a sulfonamide anticancer agent, potently inhibits cytosolic isozymes I and II, and transmembrane, tumor-associated isozyme IX.* Bioorg. Med. Chem. Lett., 14, 217–223.
- [190] Owa, T., Yokoi, A., Yamazaki, K., Yoshimatsu, K., Yamori, T., Nagasu, T. (2002). *Array-based structure and gene expression relationship study of antitumor sulfonamides including N-[2-[(4-hydroxyphenyl)-amino]-3-pyridinyl]-4-methoxybenzenesulfonamide and N-(3-chloro-7-indolyl)-1,4-benzenedisulfonamide.* J. Med. Chem., 45, 4913–4922.
- [191] Owa, T., Yoshino, H., Okauchi, T., Yoshimatsu, K., Ozawa, Y., Sugi, N.H., Nagasu, T., Koyanagi, N., Kitoh, K. (1999). *Discovery of novel antitumor sulfonamides targeting G1 phase of the cell cycle.* J. Med. Chem., 42, 3789–3799.
- [192] Talbot, D.C., Von Pawel, J., Cattell, E., Yule, S.M., Johnston, C., Zandvliet, A.S., Huitema, A.D.R., Norbury, C.J., Ellis, P., Bosquee, L., Reck, M. (2007). *A randomized phase II pharmacokinetic and pharmacodynamic study of indisulam as second-line therapy in patients with advanced non-small cell lung cancer.* Clin. Cancer Res., 13, 1816–1822.
- [193] Riihonen, R., Supuran, C.T., Parkkila, S., Pastorekova, S., Vaanannen, H.K., Laitala-Leinonen, T. (2007). *Membrane-bound carbonic anhydrases in osteoclasts.* Bone, 40, 1021–1031.
- [194] Innocenti, A., Zimmerman, S., Ferry, J.G., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2004). *Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the β -class enzyme from the methanoarchaeon Methanobacterium thermoautotrophicum (Cab) with anions.* Bioorg. Med. Chem. Lett., 14, 4563–4567.
- [195] Zimmerman, S.A., Innocenti, A., Casini, A., Ferry, J.G., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2004). *Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the prokaryotic b and g-class enzymes from Archaea with sulfonamides.* Bioorg. Med. Chem. Lett., 14, 6001–6006.
- [196] Zimmerman, S.A., Ferry, J.G., Supuran C.T. (2007). *Inhibition of the archaeal β -Class (Cab) and γ -Class (Cam) carbonic anhydrases.* Curr. Top. Med. Chem., 7, 901–908.

- [197] Sun, M.K., Alkon, D.L. (2001). *Pharmacological enhancement of synaptic efficacy, spatial learning, and memory through carbonic anhydrase activation in rats*. J. Pharmacol. Exp. Ther., 297, 961–967.
- [198] Supuran, C.T., Clare, B.W. (1994). *Carbonic anhydrase activators. Part 3. Structure–activity correlations for a series of isozyme II activators*. J. Pharm. Sci., 83, 768–773.
- [199] Supuran, C.T., Scozzafava, A. (1999). *Carbonic anhydrase activators: amino acyl/dipeptidyl histamine derivatives bind with high affinity to isozymes I, II and IV and act as efficient activators*. Bioorg. Med. Chem., 7, 2915–2923.
- [200] Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2002). *Carbonic anhydrase activators: high affinity isozymes I, II, and IV activators, incorporating a beta-alanyl-histidine scaffold*. J. Med. Chem., 45, 284–291.
- [201] Ilies, M., Banciu, M.D., Ilies, M. A., Scozzafava, A., Caproiu, M.T., Supuran, C.T. (2002). *Carbonic anhydrase activators: design of high affinity isozymes I, II, and IV activators, incorporating tri-/tetrasubstituted-pyridinium-azole moieties*. J. Med. Chem., 45, 504–510.
- [202] Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2002). *Carbonic anhydrase activators: human isozyme II is strongly activated by oligopeptides incorporating the carboxyterminal sequence of the bicarbonate anion exchanger AE1*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 12, 1177–1180.
- [203] Parkkila, S., Vullo, D., Puccetti, L., Parkkila, A-K., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2006). *Carbonic anhydrase activators: activation of isozyme XIII with amino acids and amines*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 16, 3955–3959.
- [204] Temperini, C., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2006). *Carbonic anhydrase activators: the first X-ray crystallographic study of an adduct of isoform I*. Bioorg. Med. Chem. Lett. 16, 5152–5156.
- [205] Nishimori, I., Onishi, S., Vullo, D., Innocenti, A., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2007). *Carbonic anhydrase activators: the first activation study of the human secretory isoform VI with amino acids and amines*. Bioorg. Med. Chem. Lett., 17, 5351–5357.
- [206] Ceruso, M., Antel, S., Vullo, D., Scozzafava, A., Supuran, C.T. (2014). *Inhibition studies of new ureido-substituted sulfonamides incorporating a GABA moiety against human carbonic anhydrase isoforms I–XIV*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 22: 6768–6775.
- [207] Ram, S., Çelik, G., Khloya, P., Vullo, D., Supuran, C.T., Sharma, P.K. (2014). *Benzenesulfonamide bearing 1,2,4-triazole scaffolds as potent inhibitors of tumor associated carbonic anhydrase isoforms hCA IX and hCA XII*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 22: 1873–1882.
- [208] Chegaev, K., Lazzarato, L., Tamboli, Y., Boschia, D., Blangettia, M., Scozzafava, A., Carta, F., Masinic, E., Fruttero, R., Supuran, C.T., Gascoa, A. (2014). *Furazan and furoxan sulfonamides are strong α -carbonic anhydrase inhibitors and potential antiglaucoma agents*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 22: 3913–3921.
- [209] Mojzych, M., Ceruso, M., Bielawska, A., Bielawski, K., Fornale, E., Supuran, C.T. (2015). *New pyrazolo[4,3-*e*][1,2,4]triazine sulfonamides as carbonic anhydrase inhibitors*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 23: 3674–3680.
- [210] Altıntop, M.D., Sever, B., Özdemir, A., Küçüköğlü, K., Onem, H., Nadaroglu, H., Kaplancıklı, Z.A. (2017). *Potential inhibitors of human carbonic anhydrase isozymes I and II: Design, synthesis and docking studies of new 1,3,4-thiadiazole derivatives*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 23: 3547–3554.

- [211] Chiamonte, N., Bua, S., Ferraroni, M., Nocentini A., Bonardi A., Bartolucci G., Durante M., Lucarini L., Chiapponi D., Dei S., Manetti D., Teodori E., Gratteri P., Masini E., Supuran C.T., Romanelli M.N. (2018). *2-Benzylpiperazine: A new scaffold for potent human carbonic anhydrase inhibitors. Synthesis, enzyme inhibition, enantioselectivity, computational and crystallographic studies and in vivo activity for a new class of intraocular pressure lowering agents.* European Journal of Medicinal Chemistry, 151: 363-375.
- [212] Mishra, C.B., Kumari, S., Angeli, A., Bua, S., Buonanno, M., Montic, S.M., Tiwari, M., Supuran, C.T. (2018). *Discovery of potent anti-convulsant carbonic anhydrase inhibitors: Design, synthesis, in vitro and in vivo appraisal.* European Journal of Medicinal Chemistry, 156: 430-443.
- [213] Mancuso, F., Luca, L.D., Bucolo, F., Vrabel, M., Angeli, A., Capasso, C., Supuran, C.T., Gitto, R. (2021). *4-Sulfamoylphenylalkylamides as Inhibitors of Carbonic Anhydrases Expressed in Vibrio cholerae.* ChemMedChem, 16: 3787-3794.
- [214] Abasa, M., Bahadur, A., Ashraf, Z., Iqbal, S., Shahid, M., Rajoka, R., Rashid, S.G., Jabeen, E., Iqbal, Z., Abbas, Q., Bais, A., Hassan, M., Liu, G., Feng, K., Lee, S.H., Nawaz, M., Qayyum, M.A. (2021). *Designing novel anticancer sulfonamide based 2,5-disubstituted-1,3,4-thiadiazole derivatives as potential carbonic anhydrase inhibitor.* Journal of Molecular Structure, 1246: 131-145.
- [215] Mikulová, M.B., Kružlicová, D., Pecher, D., Petreni, A., Supuran, C.T., Mikuš, P. (2021). *Synthesis and Inhibition Activity Study of Triazinyl-Substituted Amino(alkyl)-benzenesulfonamide Conjugates with Polar and Hydrophobic Amino Acids as Inhibitors of Human Carbonic Anhydrases I, II, IV, IX, and XII.* Internatinal Journal of Molecular Sciences, 22: 11283.
- [216] Eldeeb, A.H., Abo-Ashour, M.F., Angeli, A., Bonardi, A., Lasheen, D.S., Elrazaz, E.Z., Nocentini, A., Gratteri, P., Abdel-Aziz, H.A., Supuran, C.T. (2021). *Novel benzenesulfonamides aryl and arylsulfone conjugates adopting tail/dual tail approaches: Synthesis, carbonic anhydrase inhibitory activity and molecular modeling studies.* European Journal of Medicinal Chemistry, 221: 113-486.
- [217] Zhang, Z., Yang, H., Zhong, Y., Wang, Y., Wang, J., Cheng, M., Liu, Y. (2021). *Synthesis, Molecular Docking Analysis, and Biological Evaluations of Saccharide-Modified Sulfonamides as Carbonic Anhydrase IX Inhibitors.* Internatinal Journal of Molecular Sciences, 22: 13610.
- [218] Gümüş, A., Bozdađ, M., Angeli, A., Peat, T.S., Carta, F., Supuran, C.T., Selleri, S. (2021). *Privileged scaffolds in medicinal chemistry: Studies on pyrazolo[1,5-a]pyrimidines on sulfonamide containing Carbonic Anhydrase inhibitors.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 49: 128-309.
- [219] Al-Wahaibi, L.H., Youssif, B.G.M., Taher, E.S., Abdelazeem, A.H., Abdelhamid, A.A., Marzouk, A.A. (2021). *Design, Synthesis, Biological Evaluation, and Computational Studies of Novel Tri-Aryl Imidazole-Benzene Sulfonamide Hybrids as Promising Selective Carbonic Anhydrase IX and XII Inhibitors.* Internatinal Journal of Molecular Sciences, 26: 4718.
- [220] Sethi, K.K., Mishra, K.M. A., Verma, S.M., Vullo, D., Carta, F., Supuran, C.T. (2021). *Synthesis and Human Carbonic Anhydrase I, II, IX, and XII Inhibition Studies of Sulphonamides Incorporating Mono-, Bi- and Tricyclic Imide Moieties.* Internatinal Journal of Molecular Sciences, 14: 693.
- [221] Swain, B., Aashritha, K., Singh, P., Angeli, A., Kothari, A., Sigalapalli, D.K., Yaddanapudi, V.M., Supuran, C.T., Arifuddin, M. (2021). *Design and synthesis of*

- benzenesulfonamide-linked imidazo[2,1-b][1,3,4]thiadiazole derivatives as carbonic anhydrase I and II inhibitors*. ArchPharm, 354.
- [222] Swain, B., Sahoo, S.K., Singh, P., Angeli, A., Yaddanapudi, V.M., Supuran, C.T., Arifuddin, M.(2022). *Exploration of 2-phenylquinoline-4-carboxamide linked benzene sulfonamide derivatives as isoform selective inhibitors of transmembrane human carbonic anhydrases*. European Journal of Medicinal Chemistry, 234: 114247.
- [223] Angeli, A., Kartsev, V., Petrou A., Lichitsky, B., Komogortsev, A., Pinteala, M., Geronikaki, A., Supuran, C.T. (2022). *Pyrazolo[4,3-c]pyridine Sulfonamides as Carbonic Anhydrase Inhibitors: Synthesis, Biological and In Silico Studies*. Internatinal Journal of Molecular Sciences,15: 316.
- [224] Erdik, E., Organik kimyada spektroskopik yöntemler. 1993: Gazi Büro Kitabevi.
- [225] Chakravarty, S.,Kannan, K. K. (1994). *Drug-protein interactions: refined structures of three sulfonamide drug complexes of human carbonic anhydrase I enzyme*. Journal of molecular biology, 243(2), 298-309.
- [226] Sippel, K. H., Robbins, A. H., Domsic, J., Genis, C., Agbandje-McKenna, M., & McKenna, R. (2009). High-resolution structure of human carbonic anhydrase II complexed with acetazolamide reveals insights into inhibitor drug design. Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications, 65(10), 992-995.
- [227] Andring, J. T., Fouch, M., Akocak, S., Angeli, A., Supuran, C. T., Ilies, M. A., & McKenna, R. (2020). *Structural basis of nanomolar inhibition of tumor-associated carbonic anhydrase IX: X-ray crystallographic and inhibition study of lipophilic inhibitors with acetazolamide backbone*. Journal of Medicinal Chemistry, 63(21), 13064-13075.
- [228] Whittington, D. A., Waheed, A., Ulmasov, B., Shah, G. N., Grubb, J. H., Sly, W. S., & Christianson, D. W. (2001). *Crystal structure of the dimeric extracellular domain of human carbonic anhydrase XII, a bitopic membrane protein overexpressed in certain cancer tumor cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 98(17), 9545-9550.
- [229] Schrödinger, L., (2020). New York, NY, USA, 2012. LigPrep. version, 3.
- [230] Release, S., (2020). 2: LigPrep, version 3.8 (2016) Schrödinger. LLC, New York, NY.
- [231] Schrödinger, L., (2020). Glide, version 7.1. Schrödinger, LLC: New York, NY, USA.