

UNIVERZITA KARLOVA

1. LÉKAŘSKÁ FAKULTA



Nové farmakofory a jejich formulace v medicíně

Habilitační práce

Ing. Milan Jakubek, Ph.D.

Vestec, 2022

Obsah

1. ÚVOD.....	3
2. KURKUMINOIDY.....	5
2.1 CHEMICKÝ POPIS.....	5
2.2 BIOAKTIVITA	6
2.3 ADMET.....	9
2.4 MODIFIKACE MOLEKULÁRNÍ STRUKTURY	9
2.5 KOMPLEXY S IONTY PŘECHODNÝCH KOVŮ	11
2.6 FORMULACE.....	12
3. INHIBITORY SIGNALIZACE IL-6/IL-6R/GP130.....	15
3.1 PROTILÁTKY	16
3.2 MADINDOLINOVÁ ANALOGA	17
3.3 ESTROGENOVÁ ANALOGA.....	18
3.4 DERIVÁTY BUFADIENOLIDŮ.....	20
3.5 DERIVÁTY PEPTIDŮ	21
4. CHELÁTORY PŘECHODNÝCH KOVŮ	23
4.1. MEDICINÁLNÍ POTENCIÁL.....	23
4.2. CHELÁTORY A IONOFORY	25
4.3. KOMPLEXACE A VLASTNOSTI BIOAKTIVNÍCH LÁTEK	27
5. INHIBITORY TET1 PROTEINU	29
6. STATINY.....	30
7. VÝSLEDKY A DISKUSE.....	32
7.1 FORMULACE KURKUMINU	32
7.2 FORMULACE BAZEDOXIFENU	32
7.3 SYNTETICKÉ CHELÁTORY.....	37
7.4 KOMPLEXACE ŽELEZA V INHIBICI TET1 PROTEINU.....	40
7.5 BIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKY Z HUB.....	43
8. ZÁVĚR	46
9. SEZNAM PUBLIKACÍ SOUVISEJÍCÍCH S PRACÍ	47
10. PŘEHLED ZKRATEK	49
11. LITERATURA	51
12. PŘÍLOHY.....	62

1. ÚVOD

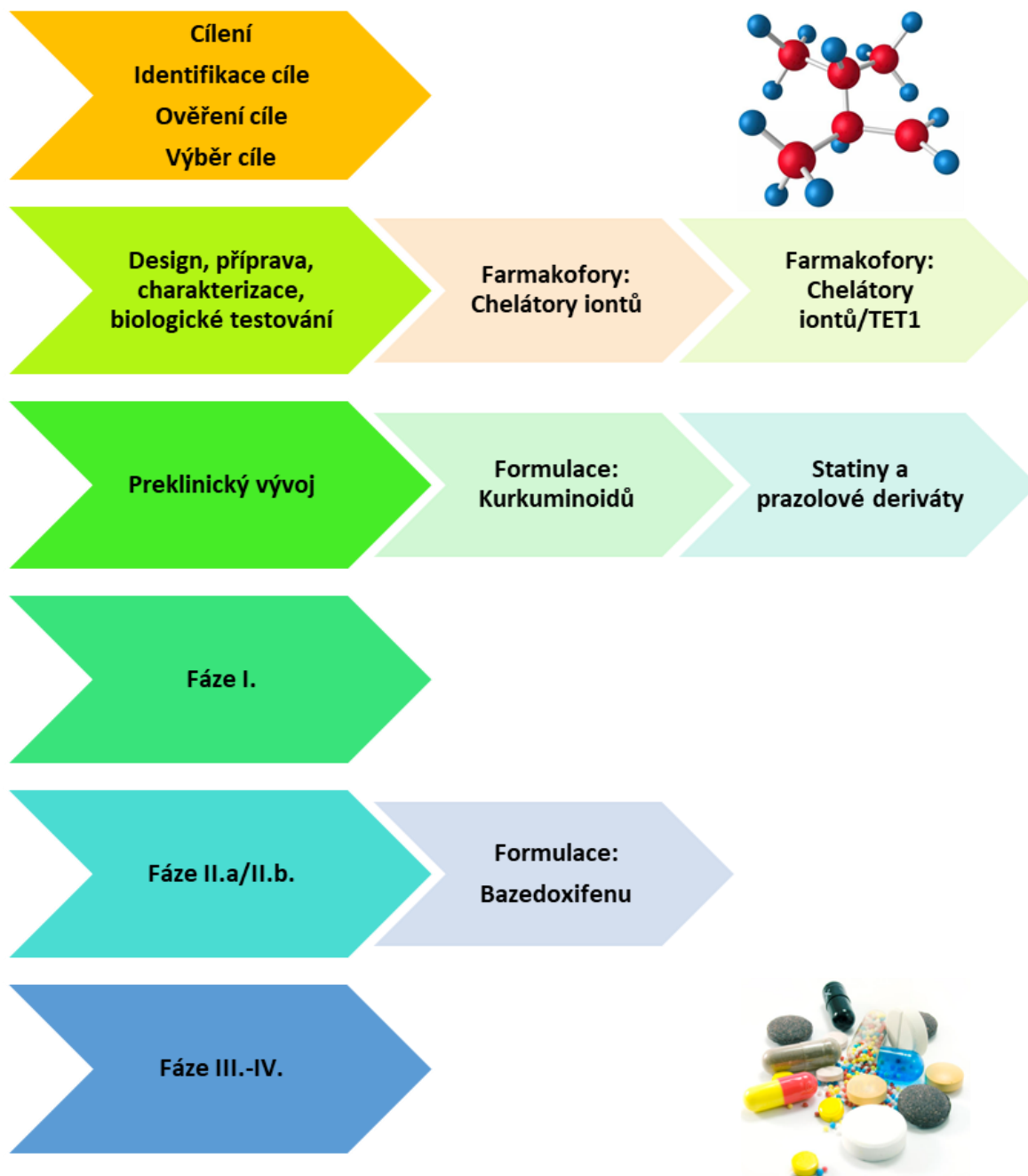
Medicinální chemie se zabývá návrhem, přípravou, charakterizací a formulací molekul/sloučenin, které mohou vykazovat specifickou biologickou aktivitu. [1] Moderní medicínální chemie je komplexní, vícerozměrná disciplína, která působí na rozhraní chemických (organická chemie, analytická chemie, farmacie, biochemie) a biologických disciplín (molekulární, buněčná a strukturní biologie a medicína) [2] a je zcela nepostradatelnou součástí preklinických i klinických fází výzkumu a vývoje léčiv.

Z pohledu klinického vývoje léčiv je v rané fázi výzkumu a vývoje cílem identifikovat chemické sloučeniny schopné ovlivnit stav onemocnění, a to buď utlumením, zesílením nebo alternativní modifikací zvolené biologické dráhy či biologického cíle. [2] Nicméně, tyto sloučeniny musí nejprve podstoupit náročnou optimalizaci, než budou moci být postoupeny do preklinického vývoje a klinických studií pro vyhodnocení jejich terapeutické účinnosti. Tento proces objevování (obrázek 1), je složitý, časově náročný, multi-parametrový proces, který zahrnuje četné sekvenční optimalizační kroky. [3, 4] V případě malých molekul syntetického původu (cca do 1000 g/mol) dochází často k výrazné a náročné strukturní optimalizaci před samotným zahájením preklinické a klinické fáze vývoje léčiv.

Z pohledu současného výzkumu a vývoje jsou nové terapeutické strategie a léčiva zaměřena zejména na léčbu onkologických a infekčních onemocnění. Medicínální chemie v této oblasti nabízí dvě základní strategie: a) reformulaci již používaných látek (angl. repurposing) a b) návrh nových farmakoforů. Vedle toho medicínální chemie může na základě chemické struktury použitých látek predikovat jejich možné vedlejší účinky.

V rámci této předložené práce byly připraveny zejména nové formulace klinicky aplikovatelných látek na bázi strukturního motivu kurkuminoidů a basedoxifenu s řádově vyšší rozpustností, bioaktivitou a velmi slibným klinickým potenciálem. Dále byly syntetizovány nové farmakofory na bázi strukturního motivu chelátorů iontů přechodných kovů pro cílení do nádorových buněk, nebo s vysokou inhibiční aktivitou pro TET1 protein, který je zásadní v oxidaci methylové skupiny cytosinových bází v DNA a tím v regulaci genové exprese. V závěru práce je popsán syntetický protokol pro přípravu statinů a jejich modifikace jakožto látek s vysokým biologickým účinkem. V rámci této práce byla rovněž popsána chelatice

(komplexace) iontů přechodných kovů s deriváty prazolových léčiv a diskutován možný vztah získaných výsledků k jejich vedlejším účinkům.

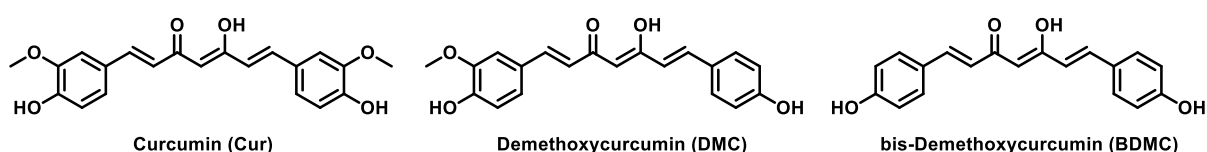


Obrázek 1 Situační přehled jednotlivých témat práce a jejich aktuální stav z pohledu výzkumu a vývoje léčiv

2. KURKUMINOIDY

2.1 CHEMICKÝ POPIS

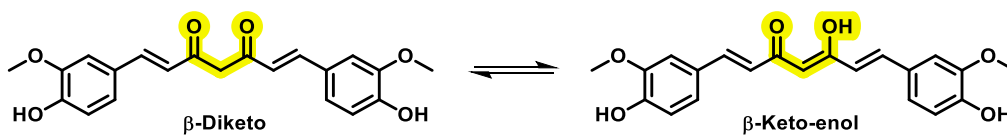
Kurkuminoid je název pro lineární, diarylheptanoidní molekuly, které zahrnují kurkumin a příbuzné sloučeniny. [5] Přirozeně se kurkuminoidy vyskytují v rostlině *Curcuma longa*, např. dva hlavní deriváty kurkuminu, a to demethoxykurkumin (DMC) a bisdemethoxykurkumin (BDMC) (Obrázek 2).



Obrázek 2. Struktura kurkuminu a jeho dimethoxy derivátů

V současné době se kurkuminoidy běžně používají jako potravinové doplňky i jako přísady do potravin. Světová zdravotnická organizace (WHO) uvedla přijatelný denní příjem kurkuminoidů jako potravinářské přídatné látky v rozmezí 0–3 mg/kg. Jednoznačně nevyšší konzumaci kurkumy vykazuje Indie, kde průměrný příjem kurkumy ve stravě je přibližně 2–2,5 g pro 60 kg jedince, což odpovídá přibližně 60–100 mg kurkuminu za den. [6]

Kurkumin je zlatožlutá pevná látka hydrofobní povahy, plným chemickým názvem (1*E*,4*Z*,6*E*)-5-hydroxy-1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-hepta-1,4,6-trien-3-on (keto-enol tautomer) nebo (1*E*,6*E*)-1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyfenyl)-1,6-heptadien-3,5-dion (beta-diketo tautomer); jeho obecný název je diferuloylmethan s molekulovým vzorcem $C_{21}H_{20}O_6$ a molekulovou hmotností má 368,38 g/mol. [7, 8] Molekula kurkuminu je prakticky nerozpustná ve vodě (7,8 $\mu\text{g/ml}$) [9], ale je rozpustná v organických rozpouštědlech, jako je metanol, etanol, aceton, DMSO, DMF a CH_3CN . Má vysoký bod tání 183°C a maximum jeho absorpce UV-Vis záření leží ve fialové oblasti např. v etanolu při 423 nm. [10] První krystalová struktura z kurkuminu byla publikována v roce 1982 a následně potvrzena dalšími pracemi. [11-13] Strukturální analýza ukazuje že kurkumin existuje převážně jako keto-enol tautomer. Kurkumin může v pevné stavu existovat také ve formě beta-diketo tautomeru (Obrázek 3). V roztoku výskyt beta-diketo nebo beta-keto-enol tautomeru závisí na pH.

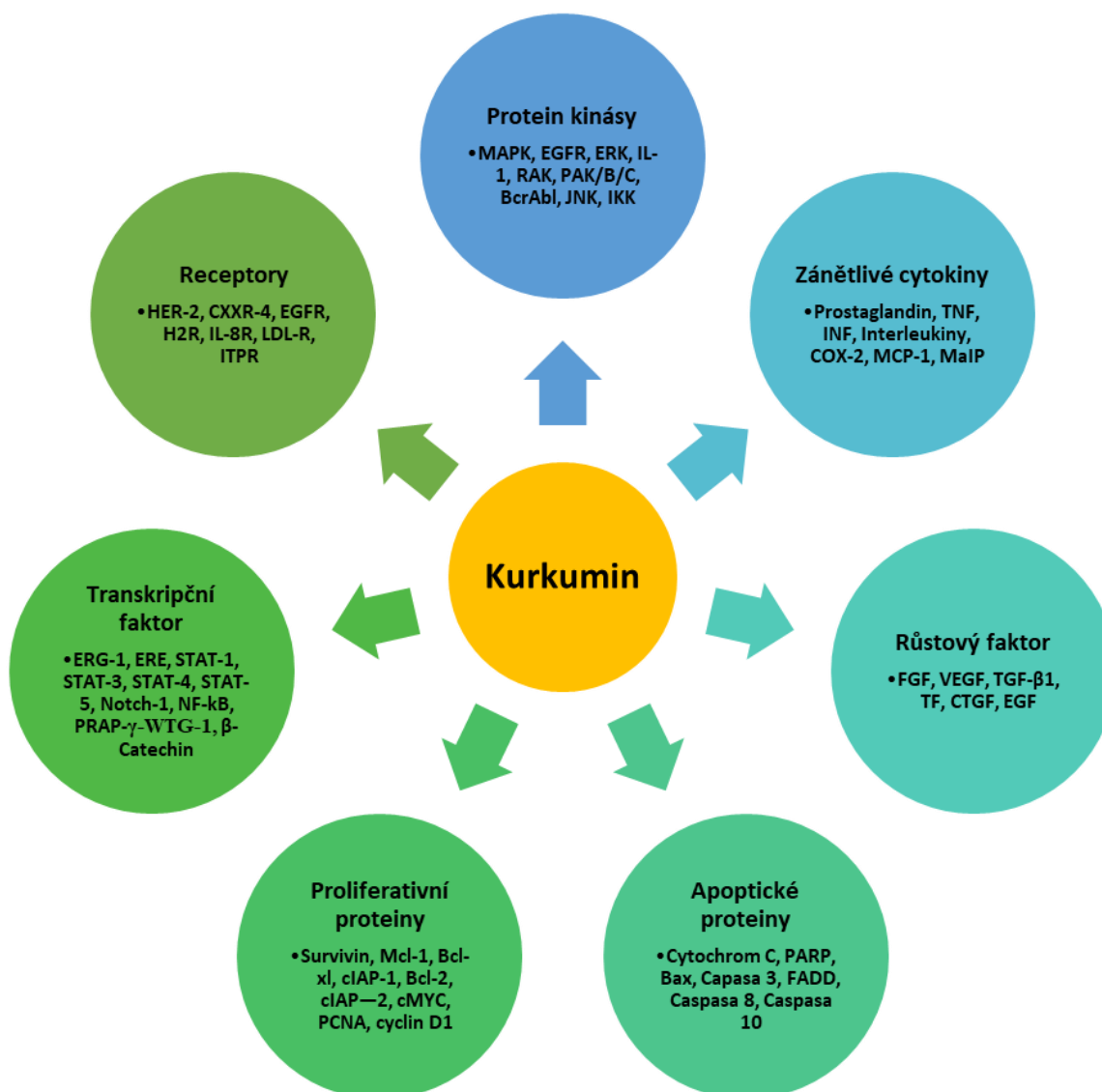


Obrázek 3 Diketo a keto-enol formy kurkuminu

2.2 BIOAKTIVITA

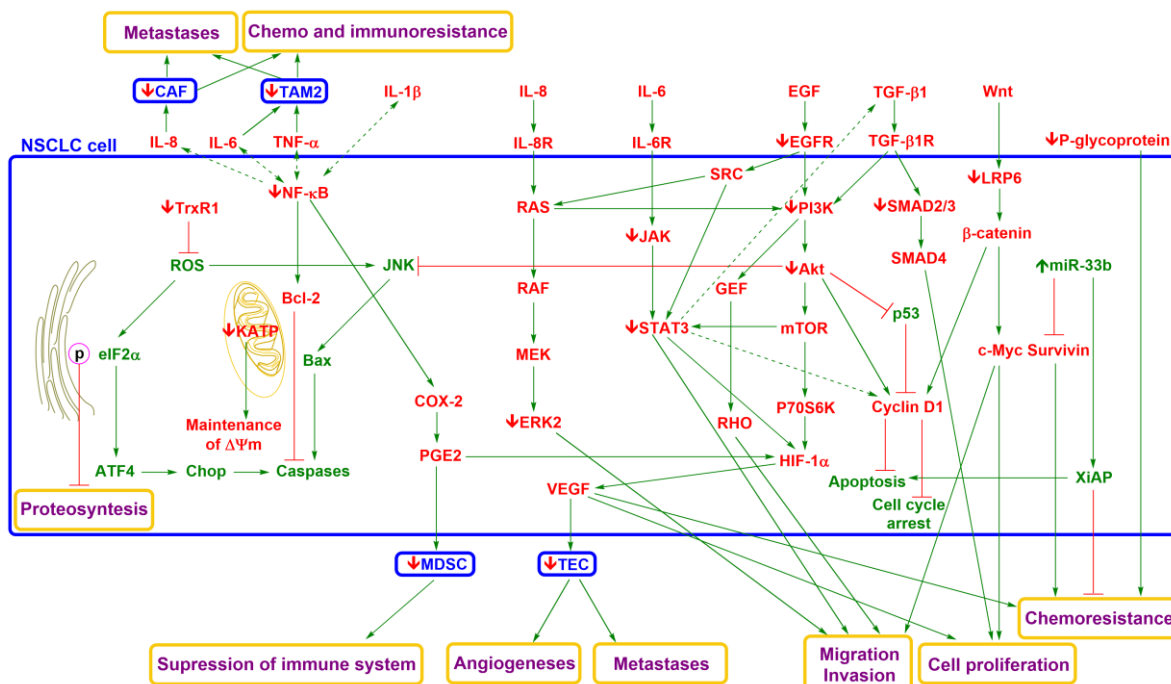
Mnoho publikovaných studií uvádí terapeutický potenciál kurkuminoidů v těchto základních oblastech: protizánětlivé [14, 15], snížení hladiny volných radikálů [16, 17], protinádorové [18, 19], antihyperglykemické [20], antimalarické [21, 22], antibakteriální [23, 24], antivirové [25, 26], antifungální [19, 27], parazitárních [28] a v problematice neurodegenerativních onemocnění [29, 30].

Kurkuminoidy rozpoznávají celou řadu molekulárních cílů podílejících se na nádorové transformaci [31], včetně DNA polymeráz, kinázy fokální adheze, thioredoxin reduktázy, mikroRNA, DNA methyltransferázy, histon deacetylázy, cyklooxygenázy, lipoxygenázy, iontů kovů a tubulinu. Kurkuminoidy navíc mohou inhibovat růst a proliferaci nádorových buněk prostřednictvím modulace řady faktorů, které kontrolují buněčný cyklus (cyklin D1, c-Myc), apoptotických a anti-apoptických faktorů (Bcl-2, Bcl-xL, cFLIP, XIAP, c-IAP1), kaspáz (kaspáza-8, 3, 9), tumor supresorových genů (p53, p21) či kináz (např. JNK, Akt a AMPK) (Obrázek 4).



Obrázek 4 Příklady hlavních mechanismů působení/molekulární cíle kurkuminu jako protinádorového léčiva. Obrázek sestaven na základě literatury [31]

Výsledky některých odborných studií také naznačují, že aplikace kurkuminu může mít protektivní účinek v oblasti onkologických onemocnění. Příkladem může být nemalobuněčný karcinom plic (Non Small Cell Lung Carcinoma, NSCLC). Bylo pozorováno, že denní aplikace kurkuminu zmírňuje poškození, způsobené chronickou expozicí arsenem (snížení poškození DNA, hladiny ROS, peroxidace lipidů a stimulaci antioxidační aktivity) [32]. Blíže je tato problematika popsána v přílohách habilitační práce (Kejik 2021-CTC). Výhodou jeho účinku je, že nepůsobí pouze na nádorové buňky ale i na tumor-asociované fibroblasty, stimulující rozvoj onemocnění (např. angiogeneze, imunosupresi, metastaze). Schéma účinku kurkuminu je znázorněno na obrázku 5.



Obrázek 5 Zjednodušený model účinků kurkuminu na nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC). [81-95], **Zelená šipka** = indukce/aktivace faktoru/fenoménu/buňky, přerušovaná; **červená šipka** = represe/inhibice faktoru/fenoménu/buňky; zelený faktor = protinádorový faktor; červený faktor = onkogenní faktor; ↑ = kurkuminová aktivace/indukce; ↓ = kurkuminová represe/inhibice. Obrázek převzat z literatury [33].

NSCLC je spojen s dysregulací mnoha signálních a regulačních drah. Některé signální molekuly (např. interleukin 6 (IL-6), interleukin 8 (IL-8), epidermální růstový faktor (EGF), transformující růstový faktor beta (TGF-β a Wnt) produkované nádorovými buňkami nebo tumor asociovanými buňkami mohou indukovat fenotypy migrace a invaze buněk NSCLC a tím podporovat šíření cirkulujících nádorových buněk (CTC). Tyto dráhy jsou vzájemně propojeny a dysregulace jedné může vyvolat dysregulaci jiné a modulovat tak terapeutické cílení. Kurkumin může ovlivňovat více signálních cest a regulačních faktorů. Kromě toho kurkumin indukuje stres endoplasmatického retikula inhibicí thio-redoxin reductázy 1 (TrxR1) a mitochondriálně závislých a mitochondriálně nezávislých apoptotických drah a potlačením rezistence vůči léčivům. Snížené hladiny signálních faktorů produkovaných buňkami NSCLC, jako je IL-6, 8, vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF) a prostaglandin E2 (PGE2), vedou ke snížené aktivitě buněk asociovaných s nádorem/nádor infiltrujících, a tím ke sníženému výskytu metastáz, proliferace a přežití buněk NSCLC v nádorovém mikroprostředí. Účinky kurkuminu na nádorové mikroprostředí také zahrnují aktivaci imunitního systému a potlačení angiogeneze, chemorezistence a imunitní rezistence.

2.3 ADMET

Vlastnosti kurkuminu z pohledu ADMET (absorpce, distribuce, metabolismus, vylučování a toxikologie) jsou shrnuty v tabulce 1. V závislosti ADMET studiích a pozorované vysoké tolerance u lidí a potkanů lze použít několik strategií přípravy finální lékové formy pro optimalizaci biologické dostupnosti (amorfní pevná disperze, nanoformace a nanoemulze /suspenze) [34]. Obecně lze říci, že krystalické formy jsou stabilnější a bio-dostupnější ve srovnání s nanoformulacemi, a proto je velmi důležité pokračovat ve výzkumu v této oblasti.

Tabulka 1 Přehled základních ADMET parametrů kurkuminu

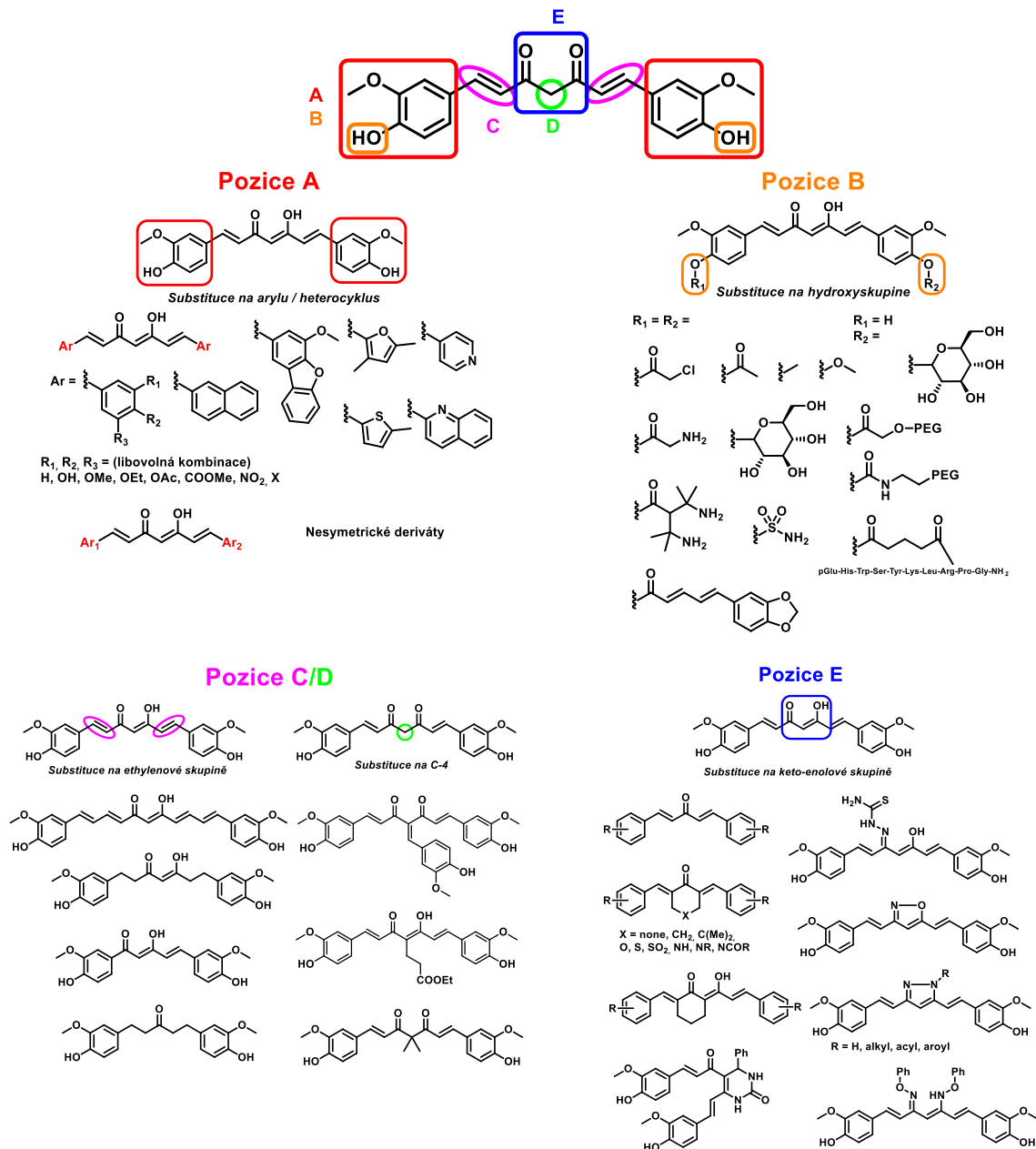
ADMET	ADMET parametry		Ref.
Adsorpce		Krysa (50mg/kg) orálně	Člověk (30mg/kg) orálně
	AUC (ng.h/ml)	51,1 ± 25 (0-24h)	4,1 ± 7 (0-6h)
	C_{max} (mg/ml)	13,0 ± 5,8	1,8 ± 2,8
	T_{max} (h)	2	6
	Permeabilita (Caco-2) je $3,18 \times 10^{-6} \pm 1,08 \times 10^{-6}$		
Distribuce	Krysa		Člověk
	Krev, moč, žluč, střeva, játra, ledvina, srdce a tuky		Krev, moč a střeva
Metabolismus	Alkohol dehydrogenáza (fáze 1) a glucuronidáza a sulfotranferáza (fáze 2) - redukce dvojných vazeb a zpracování konjugovaných/redukovaných metabolitů		[38-40]
	Krysa: Krev, moč, žluč, střeva, játra a ledviny		
	Člověk: Krev, moč, žluč střeva, játra		
Vylučování	Majorita kurkuminu a jeho metabolitů je vyloučena ve stolici, v případě krysy malé množství bylo stanoveno v moči		[35, 38]
Toxicita	Inhibice řady enzymů, hlavně cytochrom P450, glutathion S-tránsferáza, hERG K(+) přenašeč, možné vedlejší efekty či chelatace železa.		[35]

Z pohledu fyzikálně chemických vlastností a zejména nízké rozpustnosti kurkuminu ve vodných roztocích je jeho biologická dostupnost z vodných systémů značně omezena. Jedním z možných molekulárních řešení ovlivnění biologické dostupnosti je využití molekulárního motivu kurkuminoidů [41, 42] či tvorba komplexů nebo vývoj lékové formulace. [43, 44].

2.4 MODIFIKACE MOLEKULÁRNÍ STRUKTURY

Ze syntetického pohledu je kurkumin jednoduchý symetrický β-diketon, který obsahuje několik funkčních skupin. [44] Dva aromatické kruhy obsahující fenolické skupiny jsou spojeny dvěma α,β-nenasycenými karbonylovými skupinami. Tyto karbonylové skupiny tvoří diketonovou skupinu, která existuje v keto-enolových tautomerních formách, kde energeticky stabilnější enol-forma existuje v pevné fázi a v kyselých roztocích. Může být snadno deprotonován za mírně alkalických podmínek za vzniku enolátové skupiny. [45] Předpokládá se, že takové snadné tautomerní přeměny přispívají k rychlému metabolismu kurkuminu. Ve

své nemodifikované formě reaktivní skupiny v kurkuminu hrají roli Michaelova akceptoru a mohou podléhat nukleofilní adici za biologických podmínek, které mohou zvýšit jeho biologickou dostupnost. [44] Vzhledem k tomu se několik výzkumných skupin pokusilo modifikovat strukturální motiv kurkuminu za účelem zpomalení jeho metabolismu a zlepšení jeho potence a účinnosti protinádorové aktivity. Na Obrázku 6 jsou na struktuře kurkuminu znázorněny místa, která jsou vhodná pro syntetickou modifikaci.

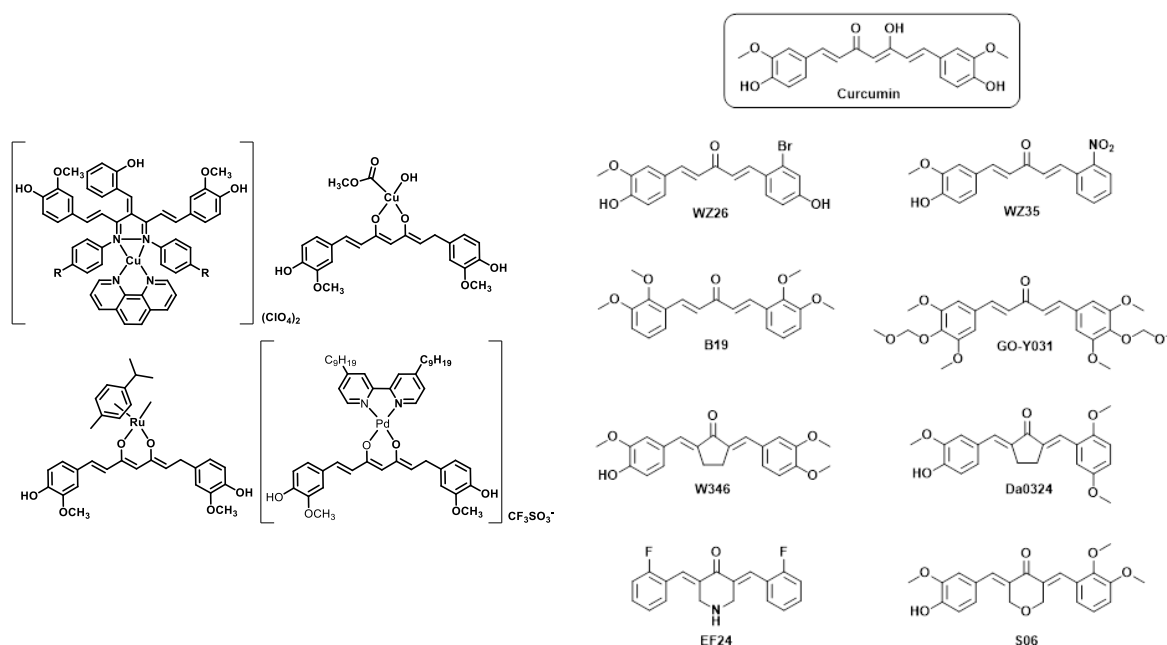


Obrázek 6 Znázornění míst pro syntetickou modifikaci kurkuminu, A, B – 2-methoxy-2-hydroxyfenylový zbytek: substituence na hydroxyskupině, jiné substituenty na fenylovém jádře/heterocyklu; C – ethylenová skupina: redukovaná forma (CH₂CH₂), vynechání nebo prodloužení o ethylenovou jednotku; D – substituence na C-4: substituence alkylem, arylem nebo arylidenem; E – diketo, resp. keto-enolová skupina: keto-enol tautomerismus, heterocyklus (zejména pyrazolové a isoxazolové deriváty), Schiffovy báze a oximy, záměna za ketoskupinu (deriváty acetonu nebo cyklických ketonů)

2.5 KOMPLEXY S IONTY PŘECHODNÝCH KOVŮ

Příkladem zlepšení rozpustnosti kurkuminu je jeho komplexace s ionty kovů. Zebib a kol. publikovali, že komplexace s dvojmocnými kationty kovů (např. Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mg^{2+}) kurkuminem významně zlepšuje jeho rozpustnost ve vodných systémech [46] za fyziologických podmínek (0,1 mol/l fosfátový pufr; pH 7,0 při 37°C). Protože stabilita kurkuminu je do značné míry způsobena nestabilitou β -diketonu [47], interakce s ionty kovů může snížit jeho molekulární nestabilitu.

Alternativní, a ještě častěji používanou technikou je vývoj derivátů kurkuminů bez typické β -diketonové skupiny, tedy příprava tzv. kurkuminoidů. Příklady studovaných derivátů jsou ukázány na obrázku 7. Jejich efekt je shrnut v tabulce 2.



Obrázek 7 Příklady syntetických kurkuminoidů studovaných pro léčbu onkologických chorob

Tabulka 2. Příklady terapeutických efektů syntetických kurkuminoidů v *in vitro* modelech karcinomu žaludku dle Jakubek a kol. [48]

Derivát	Použitý model	Terapeutický Efekt	Ref.
GO-Y031	K19-Wnt1/C2mE Gan myš s HFD32-indukovanou rakovinou	↓β-catenin, ↓STAT3, ↓CD44 exprese, ↓infiltrace makrofágů, ↓ četnost a hmotnost tumorů	[49]
EF24	SGC-7901, BGC-823 a KATO III	↓thioredoxin reductase 1, ↑p53, ↓MDM-2, ↓Cdc2, ↑p-eIF2α, ↑ATF4, ↑CHOP, ↑H ₂ O ₂ , ↑NO, ↑citlivost vůči 5-floururacilu, ↑změna morfologie endoplasmatického reticula a ↑G2/M cell cycle arrest	[50]
	Myš s SGC-7901 tumorem	↑malondialdehyd (product peroxidace lipidů), ↓Trx1 and ↑citlivost vůči 5-flourouracilu	
B19	SGC-7901, BGC-823 a KATO III	↑ROS, ↑G2/M cell cycle arrest, ↓MDM-2, ↓cyklin B1, ↓Cdc2, ↑kaspase-9 and kaspase-3, ↑p-eIF2α and ATF4, ↑CHOP ↑ změna morfologie endoplasmatického reticula, ↓mitochondriální membránový potenciál a ↓buněčná proliferace	[51]
	Imunodeficientní myš s SGC-790 tumory	↑CHOP and ↑kaspase-3	
Da0324	SGC-7901, BGC-823, a MGC-803	↓IκB-α, ↑p53, ↓TNF-α-indukovanou p65 nukleární translokací, ↓cyklin B1, ↓mdm-2, ↓cdc-2, ↑kaspase-3, ↓buněčná proliferace a invazivita a ↑G2/M cell cycle arrest	[52]
W346	SGC-7901, BGC-823, MGC-803 a KATO III	↓NF-κB aktivace, ↓IKK, ↓IκB-α fosforylace, ↑IκB-α, ↓mdm-2, ↓cdc-2, ↓cyclin B1, ↓Bcl-2, ↑p53, ↑Bax, ↑kaspase-3, ↓buněčná migrace a tvorba kolonií	[53]
S06	BGC-823, SGC-7901, a MFC	↑kaspase-3, ↑Bax, ↓Bcl-2 ↑IκB-α a ↑senzitivita vůči irinotecan sensitivity	[54]
WZ35	SGC-7901, BGC-823 a MGC-803	↓cyklin B1, ↓MDM-2, ↓Cdc2, ↑kaspase-3, ↑p-JNK, ↑pERK, ↑pERK2, ↑p38, ↑CHOP, ↑ATF4 a ATF6, ↑CHOP, ↑Bax and ↓Bcl-2	[55]
	nu/nu myš s SGC-7901 tumory	↑CHOP, ↑kaspase-3, ↓proliferace buněk a ↓hmota tumoru	
WZ26	SGC-7901, BGC-823, a MGC-803	↓cyklin B1, ↓MDM-2, ↓Cdc2, ↑p53, ↑kaspase-3, ↑Bax, ↑pERK2, ↑p38, ↑p-JNK, ↑CHOP, ↑ATF4 a ATF6	[56]
	Imunodeficientní myš s SCG-7901 tumorem	↑caspase-3 and ↓Ki-67 (marker proliferace buněk)	

Poznámka: ↑ = Zvýšení aktivity/koncentrace faktoru/jevu, ↓ = Snížení aktivity/koncentrace faktoru/jevu.

2.6 FORMULACE

Další možností zvýšení rozpustnosti či jiných chemicko-fyzikálních nebo biologických parametrů kurkuminu je jeho nanoformulace pomocí vhodných excipientů. [57-61] Bylo pozorováno a prokázáno, že tento přístup může zlepšit rozpustnost léčiva a významně zlepšit terapeutické vlastnosti, účinnost a protinádorovou selektivitu. [48] Terapeuticky použitelné systémy pro dodávání léčiv (*angl.* Drug Delivery System) by měly být netoxické, biologicky dostupné, biologicky rozložitelné a specifické pro nádorovou tkáň a nádorové buňky.

Odborná literatura popisuje několik přístupů ve formulaci kurkuminu, jak pomocí excipientů, tak pomocí technologických přístupů, jako například nanoformulace. Níže jsou popsány konkrétní příklady komerčně dostupných formulací, s pozitivním efektem na bioaktivitu kurkuminu.

a) Komplex s lecitinem

Komplex s lecitinem pod obchodní značkou Meriva® je kurkumin-fosfatidylcholinový fytozomový komplex sójového lecitinu, mikrokrystalické celulózy a 18 –20 % kurkuminoidů. [62] Kurkumin má dva fenolické hydroxyly a jednu enolickou hydroxylovou skupinu, které mohou tvořit vodíkové vazby s komplementárními polárními skupinami fosfolipidů. Jakmile je kurkumin v komplexu s fosfatidylcholinem, hydrofobní jádro fytozomu jej chrání před degradací a zároveň zvyšuje buněčnou absorpci prostřednictvím usnadněné difúze přes lipofilní buněčné membrány. [62, 63] Randomizovaná, dvojitě zaslepená, zkřížená studie u zdravých dobrovolníků zjistila, že absorpce kurkuminu byla po požití Merivy® asi 29-krát vyšší ve srovnání s neformulovanou směsí kurkuminoidů. [62] Je zajímavé, že nejvyšší koncentrace v plazmě byly nalezeny pro demethoxykurkumin, přestože obsah kurkuminu je ve formulaci čtyřikrát vyšší. To naznačuje, že lecitin podporuje vyšší biologickou dostupnost demethoxykurkuminu z Meriva® a zároveň jeho metabolizaci.

b) Lipidové částice

Lipidové částice pod obchodním názvem LongVida® jsou na bázi pevných lipidových částic kurkuminu (SLCP) se zlepšenou biologickou dostupností ve srovnání s neformulovaným kurkuminem. [64] Obsah kurkuminu v LongVida® je mezi 20 % a 30 %. Komplex SLCP chrání kurkumin před rychlou degradací a vylučováním, čímž se podstatně zvyšuje maximální a souhrnná koncentrace kurkuminu. [64]

c) Mikronizované částice

Jedná se o mikronizovanou formulaci s obsahem 25 % kurkuminoidů v patentované matici s postupným uvolňováním, která se skládá z polyglycerolesterů mastných kyselin, triglyceridy se středně dlouhým řetězcem, hydroxypropylmethylcelulózou, alginát sodný a mikrokrystalická celulóza. [65] Povrchově aktivní látky, olej a polymery ve formulaci byly

navrženy tak, aby se kurkuminoidy neuvolňovaly v prostředí o pH 2 typické pro žaludek, ale při prostředí s výrazně vyšším pH, které odpovídá střevům.

d) Micely

Tvorba micel je běžná technika pro zlepšení rozpustnosti hydrofobních léčiv. Byly vytvořeny micely kurkuminu NovaSol s obsahem 7 % kurkuminového prášku (6 % kurkuminu) a 93 % Tween-80. [66] Kurkumin začleněný s neiontovou povrchově aktivní látkou Tween 80 (polysorbát 80) vede k tvorbě tekutých micel, které výrazně zvýšily rozpustnost a koncentraci kurkuminu v plasmě.

e) PVP modifikace

PVP modifikace na bázi ve vodě rozpustné kurkuminové formulace obsahující 20 –28 % kurkuminového prášku, 63 –75 % polyvinylpyrrolidinu (hydrofilní nosič), 10 –40 % derivátů celulózy a 1–3 % přírodních antioxidantů, daná formulace vykazala přibližně padesátkrát vyšší maximální koncentraci v plasmě než normální standardizovaný kurkumin. [67]

f) Formulace na bázi esenciálních olejů

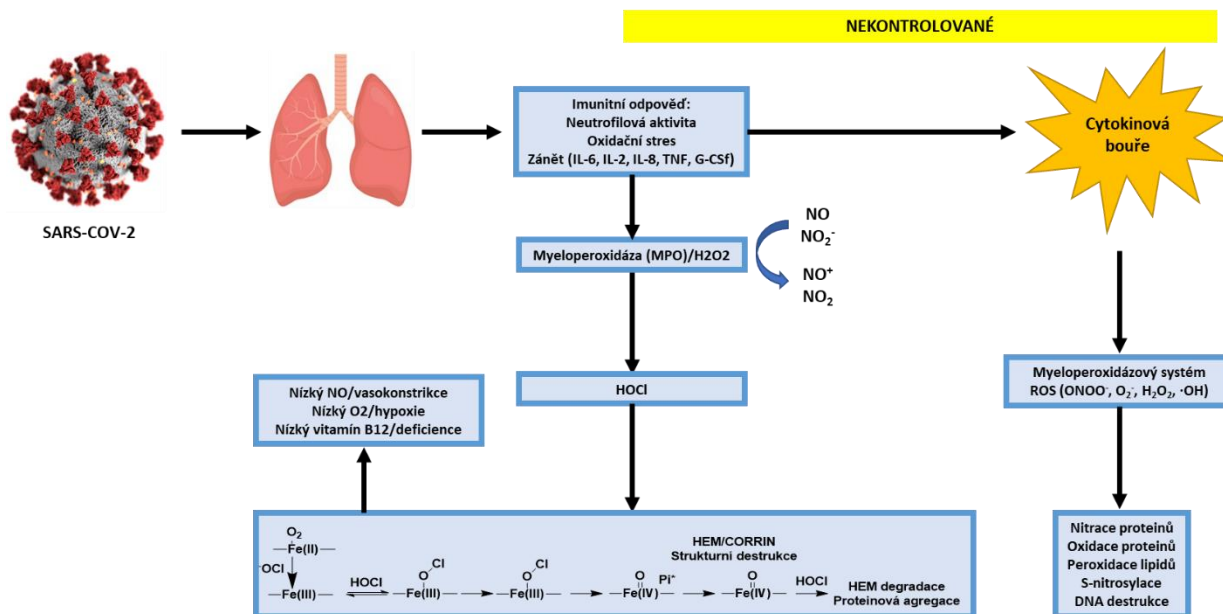
Formulace pod obchodním názvem Biocurcumax™ (BCM-95), formulace prášku z kurkumy a esenciálního oleje z kurkumy (45 % ar-turmeronu) vykazala zhruba sedmkrát vyšší celkovou koncentraci v plasmě oproti normálnímu kurkuminu. [63]

3. INHIBITORY SIGNALIZACE IL-6/IL-6R/GP130

IL-6 (interleukin 6) je prozánětlivý cytokin, který hraje významnou roli v patogenezi mnoha onemocnění např. onkologických, neurodegenerativních a infekčních a je produkován různými typy buněk imunitního systému i některými dalšími typy buněk, včetně fibroblastů. [68, 69] Jeho zvýšená hladina je spojená s chronickými zánětlivými procesy. Blíže popsáno v příloze práce (Brábek 2020). IL-6 také představuje jeden z hlavních signálů v komunikaci mezi nádorovými buňkami a nádorově asociovanými fibroblasty v rámci nádorového mikroprostředí. IL-6 se také podílí na vývoji premetastatické niche a na deregulaci metabolismu u pacientů v pokročilém stádiu nádorových onemocnění.

IL-6 je rovněž klíčovou molekulou v rozvoji cytokinové bouře u pacientů s těžkým onemocněním COVID-19, kde je zodpovědný za závažný průběh tohoto onemocnění. [70] COVID 19 vykazuje řadu klinických projevů od asymptomatických příznaků v závislosti na genetické predispozici až po život ohrožující multiorgánové selhání. Infekce SARS-CoV-2 se zpočátku projevuje horečkou, kašlem a únavou, kromě jiných symptomů, které mohou přejít do závažné pneumonie a hypoxemického respiračního selhání. [71] Tyto závažné projevy silně korelují s vyšší hladinou prozánětlivých cytokinů (např. IL-6, tumor nekrotizující faktor alpha (TNF- α), interleukin 17 (IL-17) a faktor stimuluující granulocytární kolonie (G-CSF)). [72]

Zvýšená aktivita prozánětlivých cytokinů/cytokinová bouře při onemocnění COVID - 19 může vést k syndromu akutní respirační tísně (ARDS), což je zánětlivý stav, kdy zvýšená vaskulární permeabilita vede k plicnímu edému a destrukci tkáně. [72-74] Hlavní příčinou ARDS je sepse způsobená bakteriální infekcí. ARDS se vyznačuje primárním symptomem (např. infekce) vedoucí k sekundárním projevům zánětu a poškození tkáně. Makrofágy, endoteliální buňky, epiteliální buňky a neutrofilů uvolňují prozánětlivé cytokiny (např. IL -6, IL - 8, TNF- α a IL-1 β) a dále zvyšují poškození tkáně (obrázek 8). Více zánětlivých buněk je rekrutováno a aktivováno, což stimuluje a prohlubuje zánětlivou reakci.



Obrázek 8 Navrhovaná cesta infekce SARS-CoV-2 spojená s nekontrolovanou imunitní odpovědí a cytokinovou bouří generující myeloperoxidázu (MPO) a ROS vedoucí ke snížení NO a vazokonstrikci, snížení O₂ a hypoxii a nedostatku vitaminu B12. Obrázek sestaven na základě literatury [75].

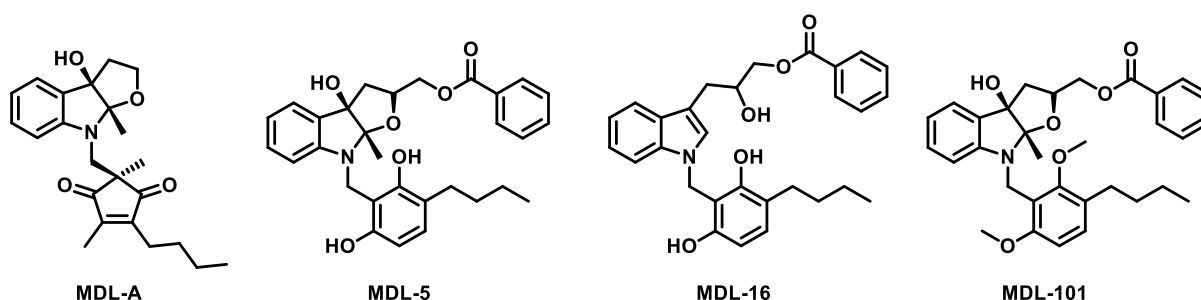
Z těchto důvodů jsou intenzivně studovány metody inhibice jeho signální dráhy např. cílení jeho receptoru (monoklonální protilátky a nízkomolekulární inhibitory). Alternativně lze inhibici IL-6 signální dráhy dosáhnout také aplikací dalších terapeuticky dostupných látek např. kurkuminu, nebo chelátorů iontů železa, [76], popřípadě vyřazením genu pro TET1 protein [77].

3.1 PROTILÁTKY

Bylo prokázáno, že cílení IL-6 receptoru (IL-6R) monoklonálními protilátkami je slibnou terapií pro řadu onemocnění spojených s vyšší aktivitou zánětlivých onemocnění. Avšak monoklonální protilátky mají určité limity (vysoké náklady, invazivní způsob podávání a vysoká míra imunogenicity) pro jejich klinickou použitelnost. [78] Z těchto důvodů je vývoj inhibitorů s nízkou molekulovou hmotností velmi žádaný pro jejich výhody spojené s možností orální aplikace, nízkou toxicitou a nízkou antigenicitou. I přes velmi intenzivní výzkum v této oblasti je známých sloučenin pouze několik. [79-89]

3.2 MADINDOLINOVÁ ANALOGA

Madindoliny jsou nízkomolekulární sloučeniny produkované *Streptomyces* sp., které mohou silně inhibovat IL-6R. Např. hodnoty IC_{50} madindolinu A a B pro proliferaci buněk MH60 (buněčná linie závislá na IL-6) v přítomnosti IL-6 (0,1 U/ml) byly 8 a 30 $\mu\text{mol/l}$. [82] Rychlost růstu nezávislých linií na IL-6 nebyla ovlivněna.



Obrázek 9 Příklady madindolinů

Následné studie ukázaly, že účinek madindolinu je založen pouze na jeho vazbě na gp130 (podjednotka IL-6R typu I) bez inhibice signální kaskády JAK2/STAT3 (fosforylace, transkripce). Jeho účinek neovlivňuje ani tvorba trimerního komplexu IL-6 IL-6R-gp130. [83] Dalším příkladem inhibičních vlastností madindolinu A na myším modelu C3H-HeJ (necitlivém na lypolysacharid (LPS)) byla sekrece sérového amyloidu indukovaná IL-6 (1 μg na myš) v závislosti na dávce. [83] Sekrece sérového amyloidu indukovaná LPS (myši C3H-HeN citlivé na LPS) nebyla snížena madindolinem A. Tyto výsledky byly potvrzeny povrchovou plazmonovou rezonancí, která našla silnou afinitu mezi madindolinem A a doménou D1 (extracelulární částí gp130) ($K_d = 288 \mu\text{M}$). [87] Nicméně v případě tricyklické 3a-hydroxytetrahydrofuro[2,3-*b*]indolového strukturního motivu nebo madindolinu B nebyla pozorována žádná interakce.

Tato fakta vedla také k vývoji nových syntetických analogů madindolinu. Například Yamamoto a kol., připravili knihovnu potencionálních inhibitorů a testovali jejich účinek na růst buněk 7TD1 (buněčná linie B lymfocytů závislá na IL-6). [89] Autoři zjistili, že hydrofobní substituce acylovými řetězci může zlepšit inhibiční aktivitu proti výchozímu madindolinu A.

Slibný terapeutický potenciál aplikace analogů madindolinu pro léčbu neurodegenerativních onemocnění byla ukázaná Agel a kol. [79] Pozorované výsledky naznačily, že testovaný strukturní motiv by mohl potlačit produkci IL-17 CD4 T lymfocyty a

zvýšit zastoupení Treg fenotypu. Podle výsledků na zvířecím modelu (myši s autoimunitní encefalomyelitidou) jejich aplikace vedla ke zmírnění projevu onemocnění (tabulka 3).

Tabulka 3 Příklady terapeutických efektů inhibitorů IL-6 v *in vitro* modelech

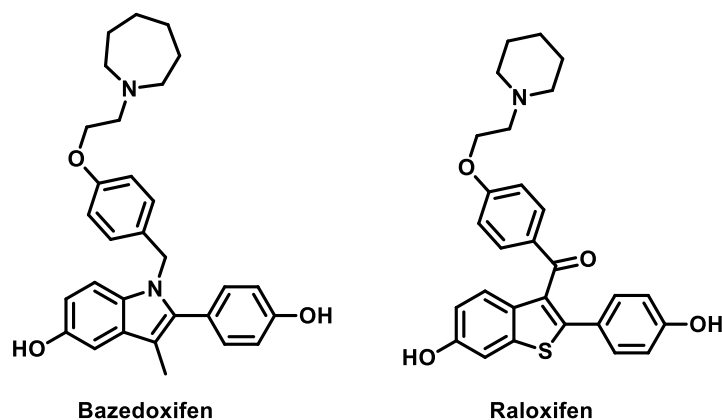
Testovaná látka	Inhibice IL-6 receptorů <i>in vitro</i>	
	Efekt na proliferaci buněk, indukované faktory-typ buňky	
	IL-6 and IL-6 závislý	IL-6 nezávislý
Madindolin A [82]	↓MH60, IC ₅₀ =8 μmol/l	↔IL-6-(B16, SC- 115 P388/ADM, CPAE, HUVEC a HL60)
Madindolin B	↓MH60, IC ₅₀ =30 μmol/l	
Madindolin A [83] /(10-100μmol/l)	↓MH 60, paralelní posun křivek růstu v závislosti na IL-6 (2–8 ng/ml)	↔IL2-CTLL-2, ↔IL-3-Baf3 a ↔TNF-L929
Testovaná látka	Efekt na buněčný fenotyp, faktor (cíloví protein a jev) typ buňky	
Madindoline A [83]	↓IL6-(diferenciace) M1 fenotyp a ↓IL6-(pSTAT3) Baf3-GCSFRgp130 buňky	
MDL-101[79]	↓IL6 (exprese IL-17 a pSTAT-3 a Th17 vývoj) myelin-specifické CD4+ T lymfocyty	
Testovaná látka	Tvorba Osteoklastů (kocultura of osteoblastických buněk a buněk kostní dřeně)	
Madindolin A [83]	↓IL-6, ↓IL-11, OLIF a 01α,25(OH) ₂ D ₃	
Testovaná látka	Myší model	
Madindolin A (60 mg/kg /den; orální) [83]	OVX Myši	↓redukce kostní hmotnosti a ↑koncentrace sérového Ca ²⁺
Madindolin A (10, nebo 60mg/kg; orální) [83]	LPS-necitlivé C3H-HeJ myši s IL-6	↓SAA sekrece, koncentrační závislost
MDL-101 (splenocyty) [79]	naivní B10PL myši s encefalitogenními splenocyty	↓myelin-specifické CD4+ T lymfocyty
	SJL/J myši s encefalitogenními splenocyty	↓EA progres
MDL-101 (50 mg/kg x7/ den; injekční) [79]		bez efektu

Poznámka: ↔=žádný účinek, ↓=redukce aktivity/exprese kontrolovaného proteinu, nebo jevu, ↑=zvýšení aktivity/exprese kontrolovaného proteinu, nebo jevu

3.3 ESTROGENOVÁ ANALOGA

Vedle experimentálně vyvíjených látek byla inhibice IL-6R také pozorována pro klinicky používaná léčiva na molekulárním motivu syntetických analogů estrogenů – raloxifen a bazedoxifen (obrázek 10). [90, 91] Tato terapeutika jsou také schopna interagovat s gp130 a tím inhibovat ukotvení IL-6 k jeho receptoru. [92, 93] Kvůli jejich nízké ceně a minimálním nežádoucím účinkům byly tyto látky testovány pro terapii některých maligních nádorů, jako je rhabdomyosarkom, [92] spinocelulární karcinomy hlavy a krku, [94] adenokarcinom

pankreatu [95, 96], kolorektální karcinom, [97] a hepatocelulární karcinom. [98] Byly také navrženy pro léčbu cytokinové bouře u pacientů trpících COVID-19. [99, 100].



Obrázek 10 Struktury SERM inhibitorů Bazedoxifenu a Raloxifenu

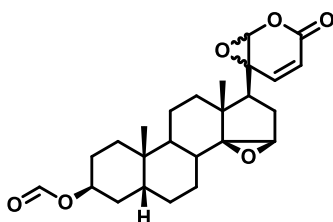
Bazedoxifen je řazen mezi třetí generaci selektivních modulátorů estrogenového receptoru (SERM). [101] Bazedoxifen se v současnosti také používá k léčbě středně těžkých až těžkých vazomotorických symptomů spojených s menopauzou (návaly tepla, pocení). Velká výhoda bazedoxifenu tkví v jeho tkáňově selektivním účinkům; agonistický účinek na kosti a kardiovaskulární systém, ale antagonistický na tkáň prsu a dělohy. To umožňuje dosáhnout pozitivních účinků estrogenů na kosti, tj. snižování kostní resorpce a obratu, a tím i prevenci osteoporózy, bez estrogenové stimulace prsní a děložní tkáně. Kromě toho se ukazuje, že bazedoxifen je silný inhibitor GP130 proteinu a dokáže efektivně inhibovat IL-6 signální dráhu. [94, 97, 102] Díky svým vlastnostem je bazedoxifen intenzivně studován jako látka využitelná pro léčbu celé řady onkologických onemocnění např. karcinomy prsu, tlustého střevu, pankreatu, žaludku, endometria, hlavy a krku. [94, 97, 102-105]. Vedle toho by bazedoxifen díky svému efektu na cytokinovou bouři mohl mít příznivé účinky i pro pacienty s COVID 19. [106] Mimo to by další příznivý efekt SERM, včetně bazedoxifenu při léčbě COVID 19 mohl také zahrnovat modulaci estrogenového receptoru. Některé studie naznačují, že příznivější průběh onemocnění u žen by mohl souviset s vyšším zastoupením estrogenových receptorů. [107] Některé práce naznačují, že modulátory estrogenových receptorů by mohly být také silnými inhibitory proteáz SARS-CoV-2, např. flavonoidy a raloxifen. [108-111]. Virové proteázy, jako je hlavní proteáza (Mpro) a papain-podobná proteáza (PLpro), jsou kriticky důležité při replikaci viru SARS-CoV-2. [112, 113] Chiou a kol. uvedli, že raloxifen je silným inhibitorem

SARS-CoV-2 Mpro ($IC_{50} = 5,61 \mu\text{mol/l}$). [111] Detailněji je potenciál modulátorů estrogenových receptorů v terapii COVID-19 popsán v příloze této práce (Abramenko 2021-estrogen).

Bohužel však existuje několik vážných překážek pro jeho použití, jako např. nízká rozpustnost léčiva ve vodných systémech ($0,000564 \text{ mg/mL}$; drugbank.ca) a tím pádem i jeho nízká bioaktivita. Pro daný účel byly již testovány formulace basedoxifenu pomocí vhodných excipientů např. polymerů. [114, 115] Ačkoliv vykazaly podstatné zvýšení rozpustnosti, dané studie byly provedeny pro $0,5 \text{ mmol}$ acetátový pufr o pH 4.2, který je ale nevhodný pro klinické aplikace.

3.4 DERIVÁTY BUFADIENOLIDŮ

Další sloučeniny se schopností cílení na IL-6R jsou deriváty bufadienolidů (přírodní protinádorové sloučeniny z čínského léčiva, extrahovaného z kůže ropuchy Ch'an Su) [116], např. 20S,21-epoxy-resibufogenin-3-formiát (ERBF). [84]



Obrázek 11 Struktura derivátu ERBF

Aplikace ERBF ($70 \mu\text{mol/l}$) v případě linie závislé na IL-6, vedla k potlačení proliferace v přítomnosti IL-6. [84] Na rozdíl od madindolinu A, efekt IL-11 nebyl potlačen. Enomoto a kol. ukázali, že mechanismus jeho účinku je založen na blokování interakce IL-6 s jeho receptorem. [80] Lze se tedy domnívat, že některé patologické stavy, jako je nádorová kachexie spojená s hyperaktivitou IL-6, lze léčit pomocí ERBF. V experimentálním modelu kachexie spojené s karcinomem tlustého střeva, 20S,21-epoxy-resibufogenin-3-acetat (ERBA; $10\text{-}30 \text{ mg/kg}$ denně) výrazně inhiboval úbytek tělesné hmotnosti, ale nikoli růst nádoru.

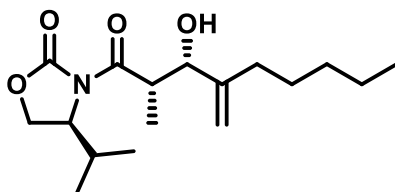
Vztah mezi strukturou bufadienolidových derivátů a jejich inhibiční aktivitou byl studován pomocí linie MH-60 (závislé i nezávislé na IL-6). [81] Zjištěné výsledky naznačují, že jak epoxidy v polohách C-14, C-15, tak C-20, C-21 ve struktuře jsou nutné k inhibiční aktivitě. Poloha C-16 musí být nesubstituována pro inhibiční aktivitu. Zavedení alifatické organické kyseliny do polohy C-3 zvyšuje inhibiční aktivitu na buňkách závislých na IL-6. Tato aktivita se snížila při zvýšení délky uhlíkového řetězce mastné kyseliny v poloze C-3 (propionát – butyrát

nebo isobutyryát). Látky s karbonylovou skupinou v poloze C-3 vykazovaly cytotoxickou aktivitu pro oba typy buněk MH-60.

Výše uvedená fakta inspirovala Kino a kol. ke studii účinků bufadienolidových derivátů (např. 3-O-formyl-20R,21-epoxyresibufogenin) na signalizaci IL-6 v buněčných liniích hepatocytů. [86] Podle očekávání autoři pozorovali sníženou expresi genů regulovaných IL-6 (např. α 1-antichymotrypsin α 1-kyselý glykoprotein, α 2-makroglobulin a β -fibrinogen) a nižší sekreci C-reaktivního proteinu. Skutečnost, že IL-11 indukovaná exprese α 1-antichymotrypsinu byla také potlačena, znamená, že účinky testované sloučeniny jsou založeny na inhibici gp130.

3.5 DERIVÁTY PEPTIDŮ

Další inhibitor cílení gp130 LMT-28 byl navržen Hong a kol. [85] a využívá strukturní motiv syntetického peptidu (Obrázek 12). Jeho interakce s gp130 byla potvrzena povrchovou plasmonovou resonancí. V souladu s předpokladem, jeho aplikace vede ke snížení aktivace/fosforylace STAT3 indukované IL-6. Také v myším modelu LMT-28 (0,8 mg/kg, orálně) se snížila hladina TNF- α (indukovanou IL-6) na polovinu.



Obrázek 12 Struktura derivátu LMT-28

Slibné výsledky byly pozorovány i u modelu artritidy a akutní pankreatitidy. Například aplikace LMT-28 (0,25 mg/kg) u myši s artritidou významně snižuje klinické projevy této patologie oproti kontrolní skupině. Pro srovnání je k dosažení ekvivalentních účinku MTX zapotřebí přibližně sedminásobná molární dávka MTX oproti LMT-28. V případě myši s akutní pankreatitidou snížila LMT-28 tvorbu otoků, infiltraci zánětlivých buněk a nekrózu ve tkáni pankreatu (tabulka 4.). Na molekulární úrovni byl tento účinek spojen s nižší hladinou IL-1 β , TNF- α a IL-6.

Tabulka 4 efekt inhibitorů IL-6 v *in vitro* a *in vivo* modelech

Testovaná látka	Inhibice IL-6 receptorů <i>in vitro</i>
-----------------	---

	Efekt na proliferaci buněk, indukované faktory-typ buňky	
	IL-6 na IL-6 závislý	IL-6 nezávislý
ERBF (15μmol) [84]	↓MH-60, paralelní posun křivek růstu v závislosti na IL-6 (0.03 to 10 ng/ml)	↔IL-2-(CTLL-2 and MH-60 ^a), ↔IL-3-(Baf3 a Baf3/GCSFR-gp130) a ↔GCSF-Baf3/GCSFR-gp130 ↔TNF-α-L929
ERBF [80]	↓MH-60, IC ₅₀ =5.3 μmol/l, paralelní posun křivek růstu v závislosti na IL-6	
LMT-28 [85]	↓HEPG2, IC ₅₀ =5.9 μmol/l	↔LIF-HEPG2 a ↓IL-11-HEPG
Testovaná látka	Efekt na buněčný fenotyp, faktor (cíloví protein a jev) typ buňky	
[79]	↓IL6 (exprese IL-17 a pSTAT-3 a Th17 vývoj) myelin-specifické CD4+ T lymfocyty	
[84] ERBF	↔IL-4-(exprese CD23) U937, ↔IL-8-(chemotaxis) PMNLs a ↔NGF-(neurální diferenciaci) PC-12	
ERBF [86]	↓IL-6 (AACT mRNA a pSTAT3) HepG2, ↓IL-6 (AGP mRNA, α2-macro, and β-fibrinogen and CRP sekrece) primární kryší hepatocyty, ↔TNF-α-(MAT2A mRNA)HepG2, ↓IL-11 and ↓OSM-(AACT mRNA) HepG2	
LMT-28[85]	↓IL-6(p STAT3, gp130, a JAK2 protein, TNF-α, proliferace) TF-1, a ↓IL-6(pSTAT3) HepG2	
Testovaná látka	Tvorba Osteoklastů (kokultura osteoblastických buněk a buněk kostní dřevě)	
ERBF [80, 84]	↓IL-6, ↔IL-11, ↔LIF, a ↔1α01α,25(OH) ₂ D ₃	
Testovaná látka	Myší model	
ERBA (10, nebo 30 mg/kg; orální) [80]	BALB/c myši s rakovinou střev	↓redukce tělesné váhy, v závislosti na dávce
LMT-28 (0.4 nebo 0.8 mg/kg; orální) [85]	C57BL/6 myši	↓TNF-α, závislosti na dávce
LMT-28 0.25 [85]	DBA/1J myši s CIA	↓ artritidové skóre (50% COMP, 55% SAP, 62% anti-CII IgG)
LMT-28 (1 mg/kg; orální) [85]	Male BALB/c myši s pankreatitidou indukovanou ceruleinem	↓IL-1β, ↓TNF-α, ↓IL-6, ↓edém, ↓ infiltrace zánětlivých buněk a ↓nekróza

↔=žádný účinek, ↓=redukce aktivity/exprese kontrolovaného proteinu, nebo jevu, ↑=zvýšení aktivity/exprese kontrolovaného proteinu, nebo jevu

4. CHELÁTORY PŘECHODNÝCH KOVŮ

Přechodné kovy, jako jsou selen, měď, zinek a železo, jsou životně důležité pro správné buněčné funkce. [117, 118] Jejich ionty se jako kofaktory účastní různých enzymatických reakcí a ovlivňují mnoho biologických procesů interakcí s receptory a transkripčními faktory. Kromě toho jsou nezbytné pro stabilizaci buněčných struktur a pro udržení stability genomu.

Intracelulární hladiny biologicky aktivních iontů jsou udržovány sítí transportních a skladovacích proteinů, které kontrolují jejich homeostázu. [118] Uvádí se, že u patologických stavů se nerovnováha nemusí týkat pouze jednoho iontu, ale je častěji spojena se změnou koncentrace více iontů kovů. Poruchy jejich homeostázy mohou souviset s genetickými mutacemi, poruchou nutričního příjmu, oxidačním stresem a deregulací imunitního systému. [119-121]

Železo (Fe) je nezbytným kovem pro katalytické aktivity mnoha enzymů nezbytných pro stabilizaci heterochromatinu, epigenetické modulace, mitochondriální dýchání, citrátový cyklus atd. [120] Nízké koncentrace volného železa podporují buněčnou proliferaci a růst. Ve zvýšených koncentracích může indukovat oxidační poškození DNA, proteinů, lipidových membrán produkcí reaktivních kyslíkových částic (ROS) Fentonovou reakcí. [121].

Měď (Cu) hraje důležitou roli v základních metabolických procesech, ale ve vyšších koncentracích může být toxická. [122] Jako katalytický kofaktor mnoha enzymů se podílí na mitochondriálním elektronovém transportním řetězci (cytochrom c oxidáza), na detoxikaci reaktivních kyslíkových radikálů (superoxiddismutáza 1 a 3), na přeměně hydroperoxidů na hydroxidy (glutathionperoxidáza), v tvorbě melaninu (tyrosináza). Ionty mědi jsou nezbytné pro buněčnou diferenciaci, regulaci apoptózy, a fungování imunitního systému. [122-124] Jej nedostatek koreluje se sníženým počtem myeloidních prekurzorů v kostní dřeni a vyšší náchylností k infekcím. [123, 124]

4.1. MEDICINÁLNÍ POTENCIÁL

a) **Dysregulace koncentrace přechodných kovů v patogenezi neurodegenerativních onemocnění**

Neurodegenerativní onemocnění představují závažné patologie charakterizované úbytkem specifických skupin neuronů. Navzdory intenzivnímu vědeckému bádání neexistuje na tyto nemoci žádný lék, proto se incidence a úmrtnost neustále zvyšují. Mezi nejčastěji se

vyskytující neurodegenerativní poruchy patří Alzheimerova choroba a Parkinsonova choroba. Obě tyto patologie vykazují postupnou ztrátu neuronů ve specifických částech mozku a mezi typické příznaky patří progresivní motorická a kognitivní porucha. [125]

Dysregulace koncentrace přechodných kovů byla prokázána u řady neurodegenerativních onemocnění, např. Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby. [126]. Například pokles Zn^{2+} iontů a zvýšení Cu^{2+} iontů vede k vyšším úrovním oxidačního stresu, zánětlivým procesům v nervové tkáni a progresi neurodegenerativního onemocnění. [127] Rovněž vyšší hladina Fe^{2+}/Fe^{3+} iontů jsou spojeny s vyšší incidencí a progresí těchto onemocnění. Produkce ROS je úzce spojena s prozánětlivými procesy. Zinek může snižovat produkci zánětlivých cytokinů (IL-1 β , IL-2, IL-6, and TNF- α ,) prostřednictvím signalizace nukleárního faktoru kappa B (NF- κ B). [128] Na druhou stranu vyšší hladina železa a mědi vede k produkci zánětlivých cytokinů skrze aktivaci mikroglie a následné ztrátě nervové tkáně. [129] Nicméně v daném procesu hraje významnou roli řada dalších vlivů např. mitochondriální poruchy. Četné studie prokázaly souvislost mezi poruchami mitochondriálními DNA (mtDNA) např. oxidačním poškozením, mutacemi a posuny methylace a zahájením a progresí neurodegenerativních onemocnění. [69] Blíže je tato problematika popsána v příloze této práce (Antonyova 2020).

b) Dysregulace přechodných kovů v karcinogenezi

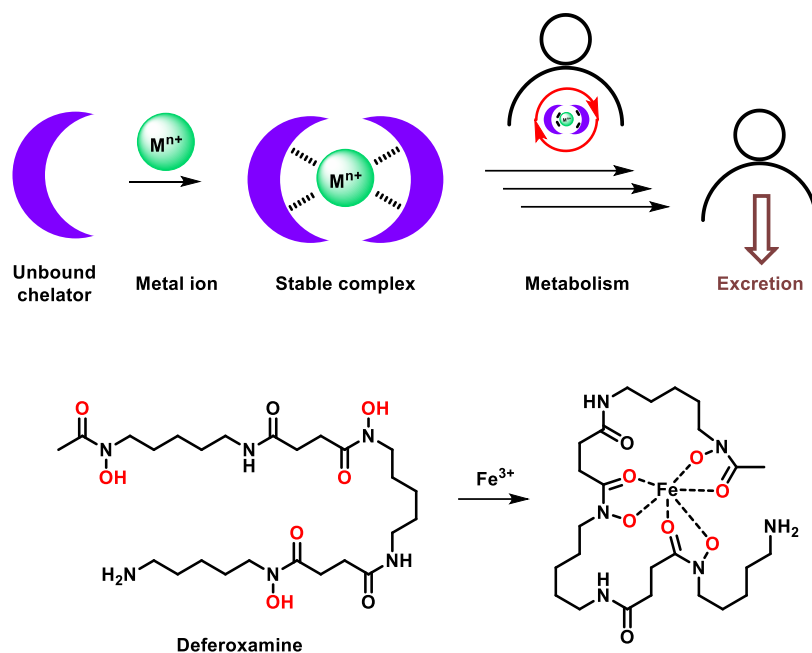
Dysregulace metabolismu železa hraje významnou roli v karcinogenezi, podporuje přežití a proliferaci nádorových buněk a stimuluje metastatickou aktivitu např. migraci a invazivitu [120, 130]. Zvýšená koncentrace železa je tak spojena s horší terapeutickou prognózou. [120, 131] Naopak na myším modelu karcinomu prsu bylo prokázáno, že dieta s nízkým obsahem železa vede ke snížení růstu nádoru a také zvýšené délce přežití. [132] Zhoubné nádory vykazují zvýšenou akumulaci železa, což vede k neadekvátní erytropoéze a nakonec sekundárně k anémii. [133] Zvýšená exprese receptoru pro transferin (TfR1), lehkého řetězce feritinu (FTL) je spojena s horší prognózou, pokročilým stádiem tumoru a zvýšenou rezistencí vůči chemoterapii. [134, 135] Vzhledem k roli železa v regulaci funkce imunitního systému a také vzniku nádorových buněk, je nasnadě uvažovat o železe jako potenciálním cíli protinádorové terapie. [136] V souladu s tímto konceptem představuje aplikace chelátorů železa slibnou metodu v léčbě onkologických chorob.

Zvýšená hladina mědi může vést k vysoké produkce ROS a tím iniciovat kancerogenezi nebo tvorbu metastáz. [122, 137] Mnoho typů nádorů (mozek, mnohočetný myelom, akutní

lymfoblastická leukémie, nádory plic, retikulární buněčný sarkom, rakovina děložního čípku, prsu a žaludku) vykazují zvýšené intratumorální hladiny a/nebo změněnou celkovou distribuci mědi. [138] Měď inhibuje stabilizaci HIF-1 α skrze inhibici prolylhydroxylázy, čímž zvyšuje transkripci různých genů (např. VEGF) [139] a genů zapojených do epiteliálně-mezenchymální tranzice (např. LOX) [140]. Lysyl oxidáza (LOX; měď dependentní enzym) katalyzuje zesíťování kolagenu a elastinu v extracelulárním matrixu (ECM) a interaguje s MEMO1 (mediátor buněčné motility 1; měď dependentní enzym). [141] MEMO1 moduluje migraci buněk prostřednictvím modulace cytoskeletu a adheze.

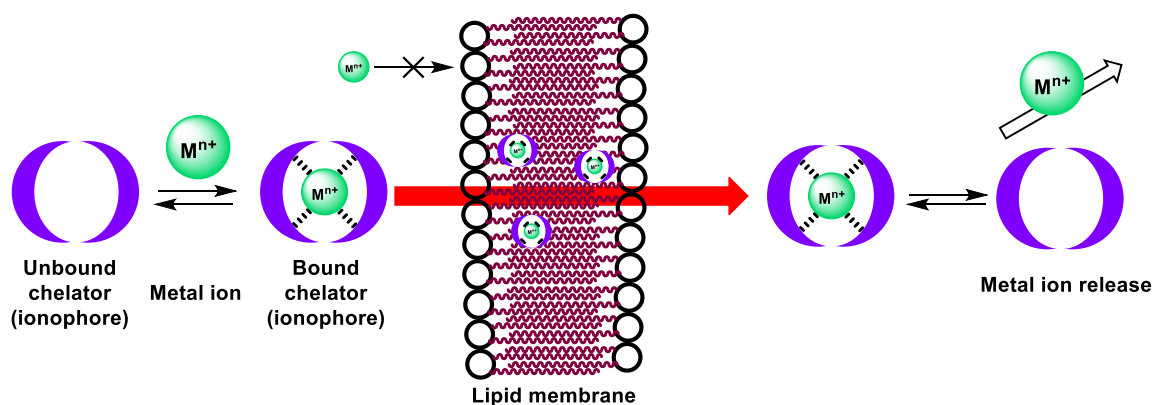
4.2. CHELÁTORY A IONOFORY

Funkce obou typů molekul je založena na tvorbě komplexů s daným kovem. U chelátoru je snaha docílit tvorby stabilních komplexů, které se za fyziologických podmínek v žádném znatelném rozsahu nerozdělí. Většina ligandů chelatujících kovy uvažovaných v tomto přehledu tvoří inertní komplexy se specifickou molekulární strukturou. Chelatace kovů může být použita k odstranění toxických/karcinogenních kovových kationtů, nebo k indukci stresu v rakovinných buňkách, a následné buněčné smrti. Principy chelatace kovů jsou ilustrovány v obrázku 13, na deferoxaminu (pro chelataci Fe³⁺; klinicky schválený chelátor kovů). Deferoxamin se používá pro léčbu nemoci z přebytku/předávkování ionty Fe²⁺/Fe³⁺. V klinickém výzkumu je studován díky tvorbě stabilních komplexů 1: 1 s kationty přechodných kovů jako protinádorové činidlo.



Obrázek 13 Koncept chelatace kovů a jejich aplikace. Koncept chelatace kovů: (a) ligandy se vážou na konkrétní cílový kov a účinně jej odstraňují z biologického prostředí. (b) Příklad chelátátoru kovů: deferoxamin tvoří stabilní komplex s Fe^{3+} prostřednictvím více donorových míst zvýrazněných červeně, což pomáhá při odstraňování Fe^{3+} z těla. Obrázek sestaven na základě literatury [142].

Naproti tomu ionofory jsou ligandy, které za fyziologických podmínek reverzibilně váží ionty kovů (obrázek 14). Vzniklý komplex je obvykle nábojově neutrální a dostatečně lipofilní, což usnadnění průchodu membránou. Uvolnění iontu kovu, může být indukováno nízkou lokální koncentrací kationtu kovu nebo konkrétním stimulem.



Obrázek 14 Ilustrační schéma ionoforu a jeho význam pro transport iontů kovů. Obrázek sestaven na základě literatury [142].

Koncept kovových ionoforů: ligand se váže na kovový kationt reverzibilně. Ve vázaném stavu je kovový komplex dostatečně hydrofobní, aby umožňoval průchod přes lipidové membrány. Reverzibilita vazby na kov umožňuje ionoforu opakovaně přenášet kationty kovů přes membrány.

4.3. KOMPLEXACE A VLASTNOSTI BIOAKTIVNÍCH LÁTEK

Například flavonoidy, přírodní polyfenolické látky, které jsou studovány jako potenciální terapeutika pro léčbu a prevenci celé řady vážných chorob např. onkologických a neurodegenerativních onemocnění, jsou silnými chelatačními činidly. [143-145] Řada jejich biologických a medicínských účinků, zejména potlačení ROS, je spojena s komplexací iontů přechodných kovů, především železa. Nicméně chelatovaný kov může výrazně ovlivnit vlastnosti samotného flavonoidu: rozpustnost, prostupnost přes buněčnou membránu, antioxidační/oxidační účinky, toxicitu a další. [146-151] Blíže tato problematika popsána Kejík a kol. [152]

V případě klinicky používaných léčiv, ionty kovů mohou ovlivnit jejich klinický efekt, např. snížení biologické dostupnosti tetracyklinů prostřednictvím tvorby komplexů léčiva s ionty. [153] Bylo prokázáno, že velké množství dalších důležitých a běžně používaných léčiv, jako je tyroxin, kaptopril a kyselina listová, tvoří stabilní komplexy se železem. Některé práce naznačují, že by se tento jev mohl také týkat účinku inhibitorů protonových pump.

Inhibitory protonových pump (např. omeprazol, pantoprazol a lansoprazol) se používají k léčbě gastrointestinálních poruch (např. dyspepsie, peptické vředy, infekce *Helicobacter pylori*, gastroezofageální refluxová choroba, gastrointestinální komplikace a Zollinger-Ellisonův syndrom). [154] Jejich fyziologický účinek je založen na potlačení sekrece žaludeční kyseliny inhibicí H^+/K^+ -adenosintrifosfatázy (ATPázy). Ačkoliv jsou považovány za bezpečné bez přímé toxicity. Jejich dlouhodobé užívání může být spojeno se zvýšeným rizikem vzniku karcinomu žaludku (omeprazol a pantoprazol) [155], neurologickými nežádoucími účinky, jako je demence (omeprazol, pantoprazol a lansoprazol) [156], anémie z nedostatku železa (omeprazol) [157] a kardiovaskulární komplikace (pantoprazol, lansoprazol a zejména omeprazol) [158]. Mimo to bylo pozorováno, že inhibitory protonových pump mají protizánětlivé účinky, např. potlačení produkce zánětlivých cytokinů jako jsou IL-6, IL-8 and TNF- α . [159]

V souladu s chelatační hypotézou bylo pozorováno, že vazebná konstanta omeprazolu v komplexu se sérovým albuminem je významně vyšší v přítomnosti iontů Cu^{2+} a Fe^{3+} . [160] V případě pantoprazolu ionty Fe^{3+} zvyšují jeho afinitu; nicméně ionty Cu^{2+} ji snižují. Navíc komplexovaný kov může značně ovlivnit jeho účinnost. Například komplex omeprazolu s ionty

Co^{2+} má vyšší cytotoxicitu proti *H. pylori* než samotný lék. [161] Tato fakta naznačují, že studium interakce inhibitorů protonové pumpy s ionty kovů může být velmi důležitým tématem v medicíně. V současné době je popsána tvorba komplexů omeprazolu s ionty přechodných kovů, jako jsou Co^{2+} , Cu^{2+} a Fe^{3+} , nebo lansoprazol s ionty Fe^{3+} a Zn^{2+} . [161-163] Tyto komplexy byly připraveny v organických rozpouštědlech, jako je methanol, nebo ve směsi ethanolu s vodou při vysoké teplotě (60°C). To limituje získaná data pro posouzení vlivu výše uvedeného jevu vlastnosti těchto léčiv.

5. INHIBITORY TET1 PROTEINU

Methylace DNA (pátá pozice cytosinu) je prvním popsáným a nejlépe prostudovaným epigenetickým mechanismem. [164] V roce 2009 byl 5-hydroxymethylcytosin (5hmC) poprvé identifikován jako nová modifikace cytosinu. Ukázalo se, že 5-methylcytosin (5mC) je oxidován prostřednictvím TET proteinů (tet methylcytosin dioxygenáza; ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase; struktura TET1-3) za vzniku 5-hmC na 5-formylcytosin (5fC) a 5-karboxylcytosin (5caC) [165, 166]. 5fC a 5caC jsou poté převedeny zpět na nemodifikovaný cytosin thymin-DNA glykosylázou a mechanismem opravy excize báze. [167, 168] Kromě aktivity TET enzymů v aktivní demethylaci působí TET1 jak jako transkripční koaktivátor, tak jako korepresor, přičemž jeho transkripční aktivita je buď závislá nebo nezávislá na její demethylázové aktivitě. [169-171]

5-hmC, podobně jako 5mC, je důležitý pro regulaci genové exprese, ale na rozdíl od 5mC je spojen s jeho aktivací. [172] 5hmC hraje důležitou roli v kontrole apoptotických, antiapoptotických signálních drah a dalších klíčových buněčných procesů. Dysregulace těchto procesů má vážné zdravotní důsledky a může vést k závažným patologickým stavům. Někteří autoři ukázali, že nerovnováha v hladině 5hmC je spojena mimo jiné s patogenezí některých závažných onemocnění, jako je akutní myeloidní leukémie [173], Retův syndrom [174] a Parkinsonova a Alzheimerova choroba [175, 176]. Rovněž i u nádorových onemocnění dochází ke změnám v methylaci DNA. [177] Některé studie naznačují, že zvýšená aktivita TET1 proteinu by mohla souviset s progresí některých onkologických onemocnění. U pacientek s triple-negativním karcinomem prsu (TNBC) byla pozorována nadměrná exprese proteinu TET1 spojená s horším přežitím. [178] Podobně Zhang et al. uvádí, že hypomethylace promotoru aktivovala expresi onkogenů u pacientek s nádory vaječníků. [179] Ve vzorcích proneurálních glioblastomů byly nalezeny vysoké hladiny proteinu 5-hmC a TET1. [180]

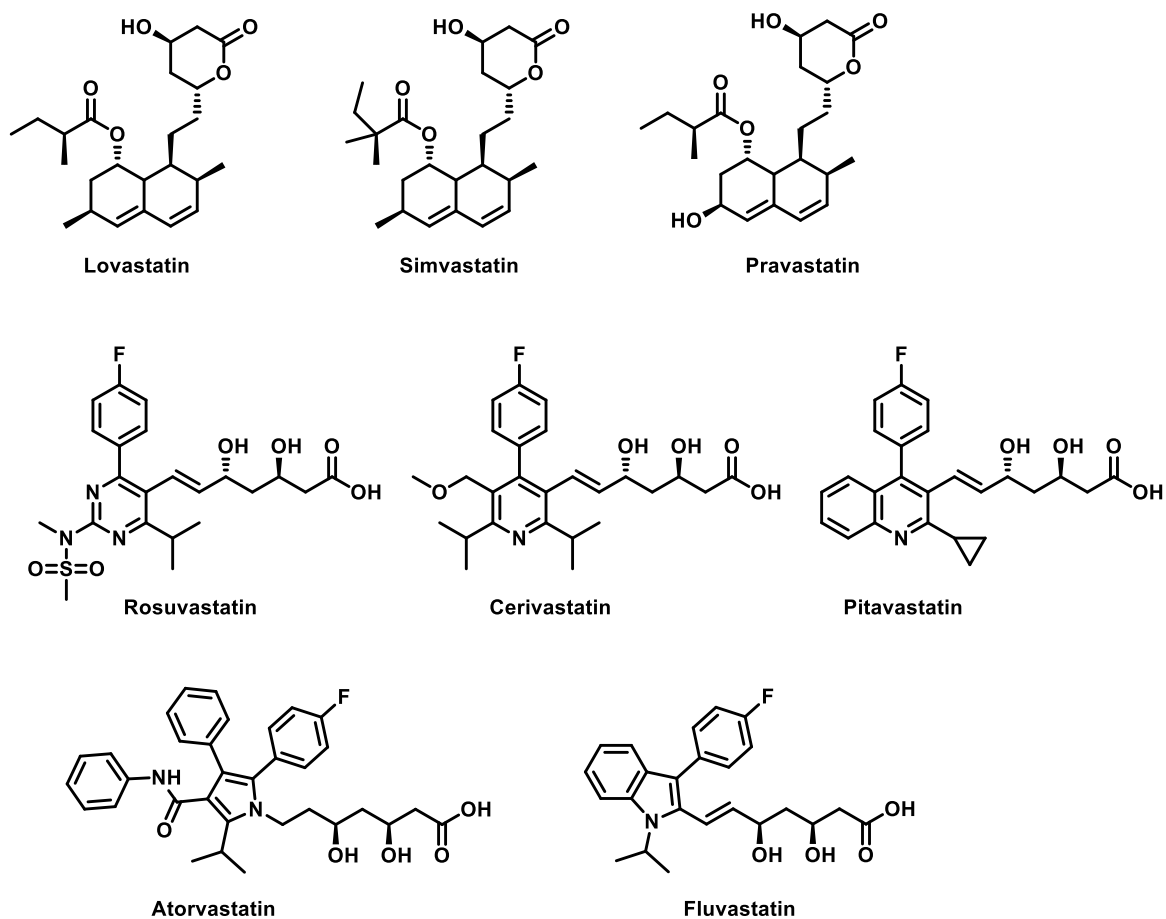
Je možné, že zvýšená aktivita TET1 proteinu by mohla souviset i se zánětlivými procesy. Například derivatizace monocytů na makrofágy liposacharidovou stimulací je spojena s poklesem hladiny methylcytosinu a hydroxymethylcytosinu v promotoru TNF- α . [181] Knock out genu TET1 proteinu vedl k poklesu mRNA a expresi TNF- α .

6. STATINY

Cholesterol, sterolový derivát nezbytný pro udržení normální fyziologické homeostázy, je prekurzor vitamínu D, žlučových kyselin a hormonů, včetně estrogenů, androgenů, gestagenů a kortikosteroidů. [182] Cholesterol má také zásadní roli při vytváření a stabilizaci lipidových mikrodomén spolu s fosfolipidy, sfingolipidy a glykosylfosfatidylinositolem modifikovanými proteiny. [183] Na druhou stranu, vysoké koncentrace cholesterolu jsou spojeny s vysokým rizikem onkologických chorob. [184]

Výše uvedené naznačuje, že cílení na syntézu cholesterolu by mohla být perspektivní metoda v léčbě onkologických chorob. [185] Klíčový enzym v syntéze cholesterolu je HMG-CoA reductáza (HMGCR). Její kompetitivní inhibitory statiny jsou klinicky používány pro snížení cholesterolu a kardiovaskulárního rizika. Statiny snižují hladinu cholesterolu v plazmě snížením *de novo* biosyntézy cholesterolu a indukci změn v expresi receptoru pro lipoproteiny s nízkou hustotou (LDL). V současnosti jsou statiny intenzivně studovány pro léčbu dalších chorob, např. nádorových onemocnění. Například Kodach a kol. zjistili, že statiny působí jako inhibitory DNA metyltransferázy (DNMT), demethylují promotor kostního morfogenetického proteinu 2, aktivují jeho signalizaci, indukují diferenciaci buněk kolorektálního karcinomu a tím snižují fenotyp rakovinových kmenových buněk. [186]

Chemické struktury používaných statinů jsou ukázány na Obrázku 15. Simvastatin, lovastatin a pravastatin jsou sloučeniny odvozené od plísňových metabolitů [187], např. lovastatin je produkován *Monascus purpureus*. Naproti tomu fluvastatin, pitavastatin, cerivastatin, atorvastatin a rosuvastatin jsou syntetické deriváty s odlišnou strukturou od přírodních statinů. Statiny mohou mít různou účinnost v závislosti na jejich chemické struktuře. Ve srovnání s hydrofilními statiny (jako je pravastatin a rosuvastatin) vykazují lipofilní statiny (jako je simvastatin) větší schopnost pronikat buněčnou membránou a vstupovat do hepatocytů pasivní difúzí. [188, 189] Kromě toho mají lipofilní statiny vyšší proapoptotickou aktivitu než hydrofilní statiny. [190] Vzhledem k vyššímu cytotoxickému potenciálu mohou být lipofilní statiny přínosné v léčbě nádorových chorob. [191]



Obrázek 15 Struktura vybraných statinů

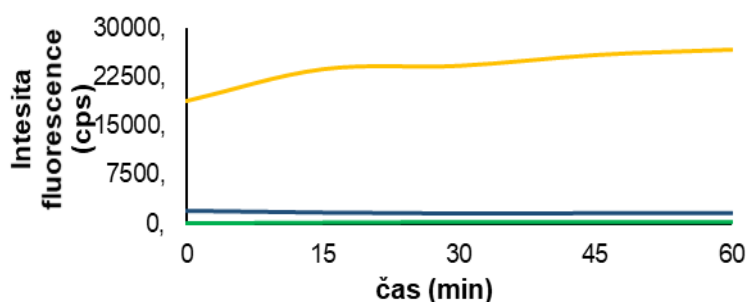
Další studium extraktu z *Monascus purpureus* naznačuje, že produkty této plísně, zejména její pigmenty, by mohly mít velmi slibné terapeutické vlastnosti a vysoký potenciál pro adjuvantní terapii onkologických chorob. [192] Nicméně, vzhledem k jejich velmi nízké dostupnosti, získané poznatky jsou zatím velmi limitované.

7. VÝSLEDKY A DISKUSE

7.1 FORMULACE KURKUMINU

Naším cílem bylo připravit orodispergovatelne tablety obsahující vysoce rozpustnou, a tedy bioaktivní formu kurkuminu. Pro přípravu byl použit kurkuminový extrakt, který byl nanoformulován manitolem. V souladu s naším očekáváním jsme pozorovali, že připravená formulace vykazuje vysokou rozpustnost ve vodném prostředí. Tohoto fyzikálního parametru bylo dosaženo právě díky nanoformulaci kurkuminu; v závislosti na parametrech formulace se dají připravit nanočástice o velikosti 100-250 nm. [193-195]

Ve spolupráci s komerčním partnerem mcePharma se podařilo vyvinout metodu pro přípravu výše uvedených orodispergovatelných tablet, které zachovávají unikátní vlastnosti dané formulace. Daný produkt se v současnosti prodává pod komerčním názvem NeoCurcumin (obrázek 16).



Obrázek 16 Intenzita fluorescence uvolňování ODT formulace do vodného roztoku. Žlutá křivka - nanoformulace kurkuminu; modrá křivka - mikronizovaný kurkumin; zelená křivka - nativní kurkumin.

7.2 FORMULACE BAZEDOXIFENU

Připravená formulace je založena na tvorbě inkluzního cyklodextrinového komplexu basedoxifenu, která je rozpustná ve vodných systémech. Pozorovali jsme v závislosti na zvoleném typu a množství cyklodextrinu (alfa-, beta-, gama- a jejich derivátů) výrazné, až řádové, zvýšení rozpustnosti. Např. v případě destilované vody a γ -cyclodextrinu (40 mg/ml) je možné rozpustit zhruba 10 mg/ml basedoxifenu. Bez přítomnosti cyklodextrinu je rozpustnost basedoxifenu zhruba 0,01 mg/ml. Bližší popis přípravy a technologie izolace je popsána v aktuální patentové přihlášce, která byla licencována Univerzitou Karlovou.

a) Instrumentální charakterizace

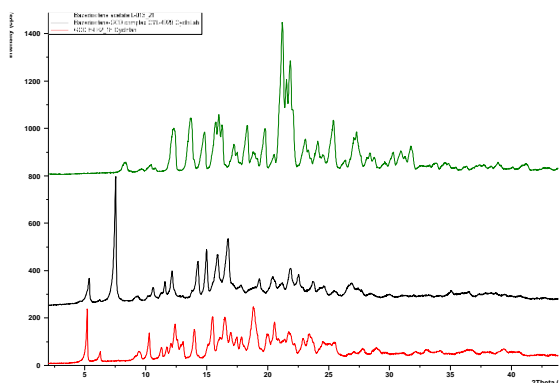
Vzniklý komplex byl potvrzen rentgenovou difrakcí a diferenciální skenovací kalorimetrií a pokročilou NMR spektroskopií.

Prášková rentgenová difrakční analýza (PXRD)

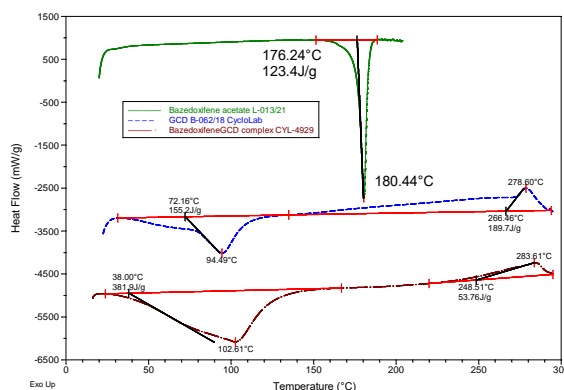
Prášková rentgenová difrakční (PXRD) analýza výchozích složek (bazedoxifen acetát a γ -cyclodextrin) a směsi BAZ/GCD jsou znázorněny na obrázku 17. Technika PXRD prokázala, že výchozí složky jsou krystalické látky. Daná analýza také ukázala, že jejich směs má krystalický profil, a že se výrazně liší od profilu obou výchozích složek, což potvrzuje vznik komplexu.

Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC)

Termogramy výchozích složek a vzniklého komplexu byly zaznamenány pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC; obrázek 17). Termální analýza ukázala, že krystalický bazedoxifen má pík entalpie tání při 180,4°C. γ -CD nemá ve studovaném teplotním rozsahu takový charakteristický fázový přechod, je pozorován pouze široký endotermický efekt v důsledku ztráty vody kolem 100°C a tepelného rozkladu nad 250°C. DSC profil složení vzniklého komplexu ukazuje, že bazedoxifen je v molekulárně dispergovaném stavu. Krystalický bazedoxifen typický pro čisté léčivo v termogramu komplexu nebyl pozorován, což poskytuje instrumentální důkaz o vzniku komplexu.



Prášková rentgenová difrakční analýza bazedoxifen (zelená čára), komplex bazedoxifenu s γ -CD (černá čára) a γ -CD (červená čára).



Termogramy (DSC) Bazedoxifen (BAZ, zelená čára), γ -CD (GCD, modrá čára) a komplexu BAZ/GCD (hnědá čára)

Obrázek 17 PRXD a DSC analýza nativních forem a komplexů

1D a 2D NMR spektrometrie

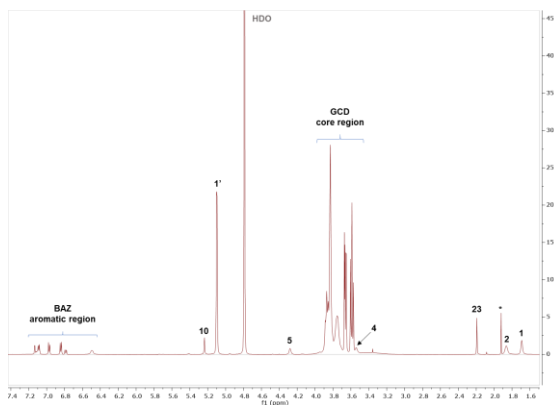
Pro nativní formy látek a komplexy byla provedena 1D a 2D NMR analýza. ^1H NMR spektrum komplexu bazedoxifenu s γ -CD je ukázáno na obrázku 18. Signály nativního γ -CD leží mezi $\delta \text{ } ^1\text{H} = 3,5\text{-}4,0$ ppm, kromě glukopyranózového kruhu, jsou všechny protony anomerní. Anomerní signál se objevuje mezi 5,0-5,2 ppm, v oddělené oblasti spektra. Další dobře oddělenou oblastí ve spektru je aromatická oblast bazedoxifenu na vysokofrekvenčním okraji ^1H NMR spektra. Přiřazení dvou výše uvedených oblastí je znázorněno níže na obrázku 18.

V oblasti kavity γ -CD lze jasně identifikovat rozšíření 3', 5' a 6' signálů, zatímco signály 2' a 4' jsou ostré, dobře definované multiplety, naznačující interakci s bazedoxifenem. Vzhledem k 3D struktuře cyclodextrinu lze očekávat vznik inkluzního komplexu, protože 3' a 5' protony směřují dovnitř kavity a 6' protony jsou umístěny v těsné blízkosti, zatímco 2' a 4' protony směřují k vnějšímu povrchu cyclodextrinu. Pokud jde o aromatické signály bazedoxifenu, je vidět, že v přítomnosti γ -CD signály jsou více rozšířené ve srovnání s ^1H NMR spektrem samotného bazedoxifenu.

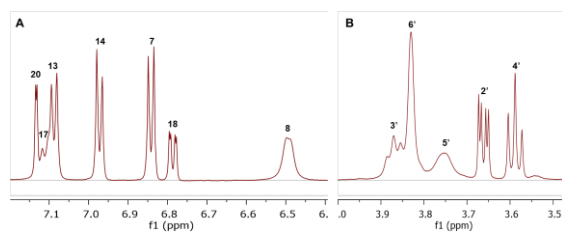
Ve spektru 2D ROESY spektrum komplexu bazedoxifenu s γ -CD. Zápis používá stejné barevné kódování jako dříve. Mezimolekulární interakce bazedoxifenu a γ -CD jsou zdůrazněny přerušovanými kruhy a intramolekulární korelace bazedoxifenu plnými čtverci.

Intermolekulární interakce byly pozorovány mezi aromatickou oblastí bazedoxifenu a oblastí kavity γ -CD (obrázek 18, růžový kroužek) a mezi methylovými protony bazedoxifenu (signál 23) a protony γ -CD kavity (obrázek 18, černý kruh). Částečné 2D ROESY spektrum bazedoxifenu znázorňující oblast intermolekulárních interakcí mezi oblastí kavity γ -CD (f1) a anomerní oblastí bazedoxifenu (f2) je znázorněno na obrázku XXX. Pozorované cross píky potvrzují předpoklad získaný z ^1H spektra vzorku: vnitřní protony γ -CD (3', 5' a 6') jsou v prostoru blízko skupinám bazedoxinu. Tři sady cross píků patřících k protonu γ -CD lze snadno rozlišit podél osy f1 (obrázek 18, modré přerušované čáry).

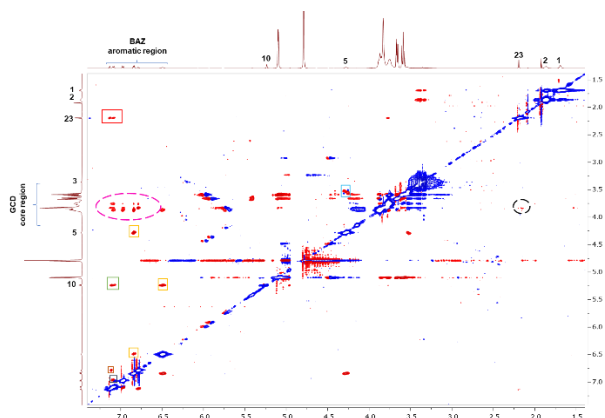
Z hlediska bazedoxifenu jsou nejvíce intenzivní signály 13, 14 a 7 s 3' protonem γ -CD. Existuje podobná, ale mnohem slabší skupina cross píků mezi stejnými signály bazedoxifenu a druhým vnitřním protonem, 5' γ -CD, zatímco protony 20, 13, 14 a 18 jsou v prostorové blízkosti 6' protonu γ -CD na okraji kavity. Rozšířený úsek intermolekulárních korelací detekovaných mezi methylovou skupinou bazedoxifenu (23) a 5' a 6' protony γ -CD.



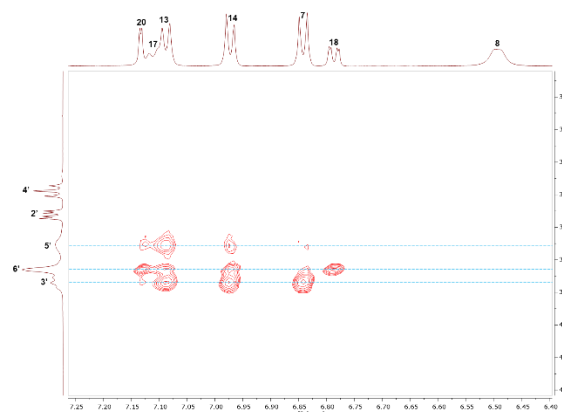
^1H NMR spektrum komplexu bazedoxifenu s γ -CD s částečným přiřazením



Rozšířené ^1H spektrum komplexu bazedoxifenu s β -CD zobrazující A) aromatickou oblast BAZ a B) kavitu γ -CD



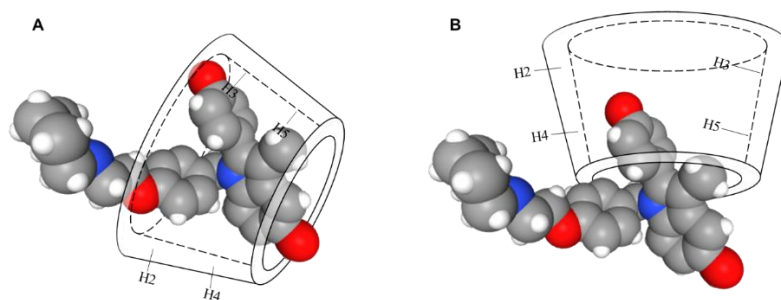
2D ROESY spektrum komplexu bazedoxifenu s γ -CD 1:1 se zdůrazněnými intramolekulárními korelacemi bazedoxifenu (plně čtverce) a mezimolekulárními interakcemi bazedoxifenu a γ -CD (přerušovaná kolečka)



Částečné 2D ROESY spektrum komplexu bazedoxifenu s γ -CD zobrazující oblast intermolekulárních interakcí mezi oblastí γ -CD (f1) a anomerní oblastí bazedoxifenu (f2)

Obrázek 18 1D a 2D NMR spektra komplexu bazedoxifenu s cyklodextrinem

Podle těchto zjištění je bazedoxifenu schopna proniknout do kavity γ -CD a vytvořit inkluzní komplex s navrženou strukturou znázorněnou na obrázku 19. Současná přítomnost příčných píků mezi 3' a 13/14, stejně jako 6' a 13/14 naznačuje, že se může vytvořit další komplex s navrženou strukturou znázorněnou na obrázku 14/B, když kruh B pronikne do kavity. Abychom získali realističtější obrázek o struktuře inkluzních komplexů, byl k zobrazení navrhovaných komplexů použit 3D model BAZ (pocházející z databáze PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bazedoxifene>))



Obrázek 19 Možné strukturní pozice bazedoxifenu v kavitě cyklodextrinu

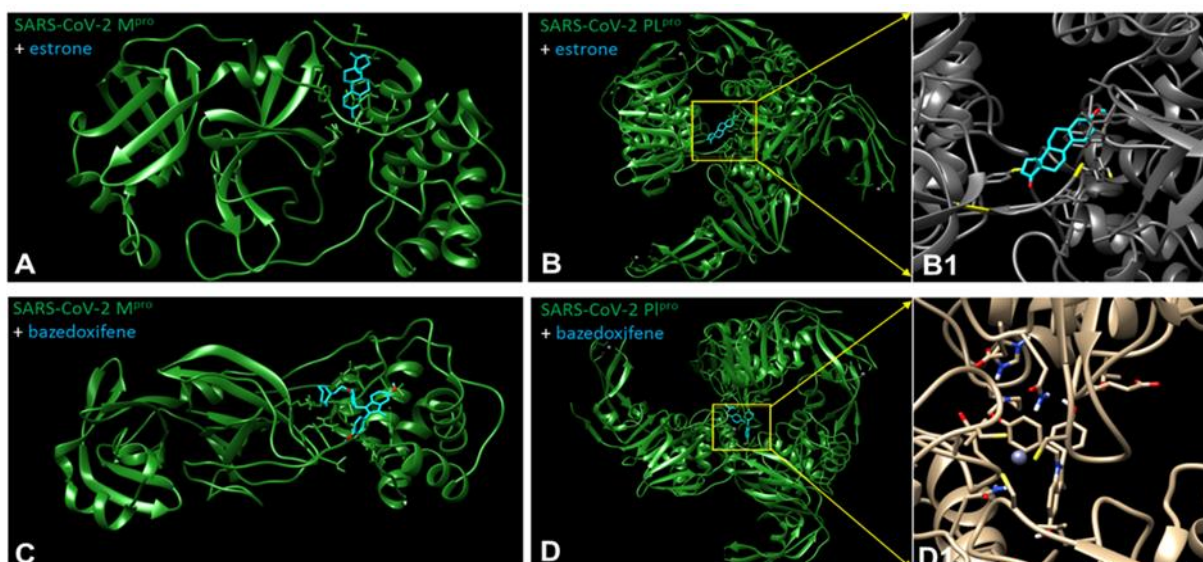
Jako modelový příklad pro testování biologické aktivity byla vybrána infekce virem SARS-CoV-2. *In vitro* bylo pozorováno na tkáňových kulturách (Vero buňky), že vodný roztok bazedoxifenu (10 μ M) rozpuštěného pomocí cyklodextrinu, připraveného ze zásobního 10 mM roztoku (5,3 mg/ml) má stejný účinek jako roztok bazedoxifenu rozpuštěného pomocí DMSO o stejné koncentraci. Bylo tedy prokázáno, že přítomnost cyklodextrinu neovlivňuje účinek bazedoxifenu. V přítomnosti bazedoxifenu došlo k poklesu virové RNA pod jedno procento. Což znamená, že námi připravená formulace bazedoxifenu je vhodná pro klinickou aplikaci, zejména v případech, kdy není možné použít organická rozpouštědla, např. při inhalační aplikaci.

b) Studium interakce bazedoxifenu se SARS-CoV-2 proteasami

Vzhledem k slibnému potenciálu tekuté formy bazedoxifenu pro léčbu COVID-19, zaměřili jsme se na možný účinek bazedoxifenu a dalších modulátorů estrogenových receptorů pro virové proteázy, nezbytné pro virovou replikaci. Hodnoty vypočtených interakčních energií naznačují (tabulka 5), že jejich afinita a tím pádem inhibiční aktivita, by mohla být plně srovnatelná s raloxifenem ($IC_{50} = 5,61 \mu\text{mol/l}$). [111] Model interakce estronu a bazedoxifenu s SARS-CoV-2 proteasami je znázorněn na obrázku 20. Detailněji je tato problematika popsána v příloze této práce (Abramenko 2021).

Tabulka 5 Vypočtená interakční energie mezi SARS-CoV-2 proteasami a estrogeny nebo modulatory estrogenových receptorů (kcal/mol)

Látka	Main Proteáza	Papain-Like Proteáza (Monomer)	Papain-Like Proteáza (Trimer)
Estradiol	-7.14	-6.86	-7.32
Estrane	-7.59	-6.28	-7.51
Estriol	-7.90	-6.43	-7.82
Estrone	-8.96	-6.94	-7.61
Bazedoxifene	-10.13	-5.54	-7.69
Genistine	-7.70	-6.07	-6.25
Raloxifene	-8.61	-6.14	-7.49



Obrázek 20 Strukturální pozice z dokovací studie estronu (nahore) a bazedoxifenu (dole) pro SARS-CoV-2 main proteáza (Mpro) (A, C) and papain-like proteáza (PLpro) trimer (B, B1, D, D1). Obrázek převzat z literatury [107].

7.3 SYNTETICKÉ CHELÁTORY

a) Studium komplexace iontů přechodných kovů pro cílení nádorových buněk

První část naší práce byla založena na přípravě těchto látek a studium jejich selektivity. Známé strukturální motivy zahrnují heteroaromatické skupiny [196-199], aromatické hydroxylové skupiny [200]. Jednou z možných strategií pro návrh látek, které účinně vážou přechodné kovy je kombinace *N*- anebo *O*- motivu, s hydrazonem. V závislosti na cílovém kovu a zvoleném médiu lze vazebné vlastnosti jemně doladit jejich kombinací s jinými vhodnými skupinami s vazebnou afinitou pro ionty kovů např. hydrazony. Řada z testovaných látek vykazala významnou afinitu pro biologicky aktivní ionty (např. Zn^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} a Al^{3+}). [201-203] Získané výsledky jsou popsány v přílohách této práce (Kaplánek 2015, Jakubek 2018, Jakubek 2019). Některé z nich vykazaly dokonce *in vitro* slibnou protinádorovou aktivitu vůči nádorovým buněčným liniím.

Připravili jsme sérii nových derivátů kofein-hydrazonů s 2-hydroxyarylovou a 2-N-heterocyklickou skupinou. Výchozí sloučeninou byl kofein, který reakcí s chlorem v chloroformu poskytl 8-chlorkofein (8-chlor-1,3,7-trimethyl-3,7-dihydro-1*H*-purin-2,6-dion) v kvantitativním výtěžku. Ten byl následně reakcí s hydrazin hydrátem v ethanolu převeden na klíčový 8-hydrazinkofein. Reakcí hydrazinového derivátu s 2-hydroxyfenyl- a 2-N-heteroaryl karbaldehydy a methylketony byla získána série 36 cílových hydrazonů (Schéma 1).

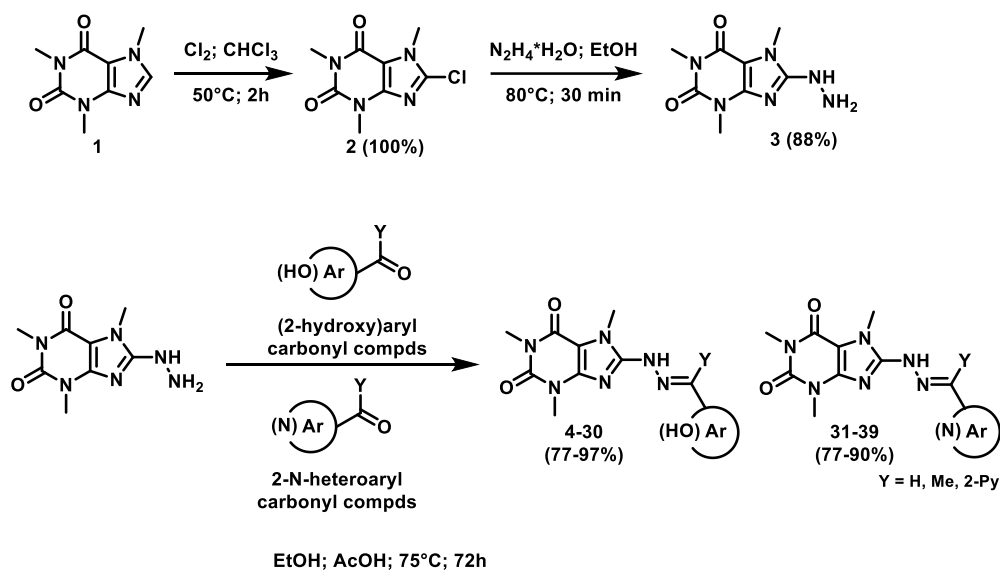
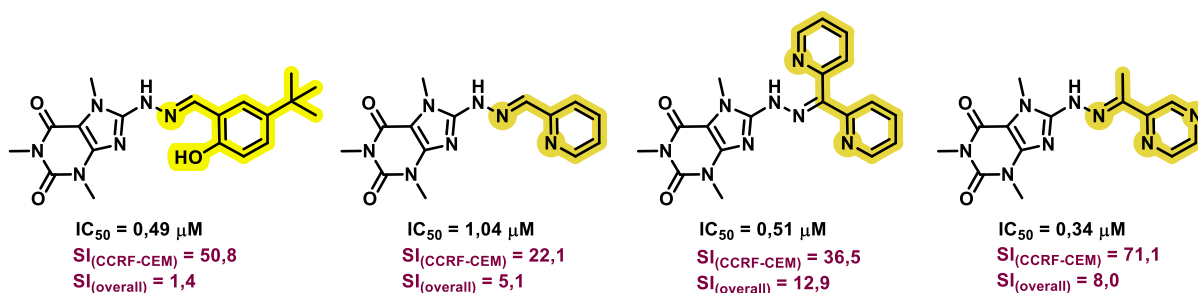


Schéma 21 Schéma syntetické přípravy kofeinových hydrazonů.

Protinádorová aktivita připravených látek byla měřena na panelu 7 nádorových buněčných linií a dvou buněčných liniích odvozených ze zdravého epitelu: CCRF-CEM (T-lymfoblastická leukemie), CEM-DNR (T-lymfoblastická leukemie, daunorubicin rezistentní forma), K562 (akutní myeloidní leukemie), K562-TAX (akutní myeloidní leukemie, paclitaxel rezistentní forma), HCT116 (kolorektální karcinom), HCT116p53-/- (kolorektální karcinom, p53-deficientní), A549 (plicní adenokarcinom); BJ (lidské fibroblasty) a MRC-5 (lidské plicní fibroblasty). Výsledky ukázaly, že většina připravených chelátorů vykazuje výraznou aktivitu a vysokou selektivitu vůči CCRF-CEM buněčné linii. Neaktivnější deriváty a jejich IC_{50} a selektivní index vůči dané linii/celkový jsou uvedeny na obrázek 22.



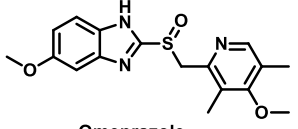
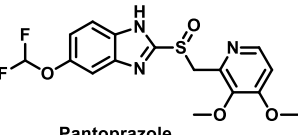
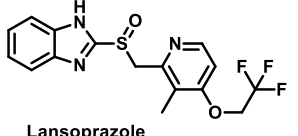
Obrázek 22 Srovnání kofeinových hydrazonů s vysokou aktivitou a selektivitou

Obecně jsou 2-N-heteroarylované deriváty účinnější a selektivnější než 2-hydroxyarylované. Z výsledků analýzy vlivu látek na buněčný cyklus bylo zjištěno, že látky vykazují koncentračně závislou inhibici DNA a RNA syntézy a indukci apoptózy.

b) Studium afinity prazolových derivátů pro ionty přechodných kovů

Studium interakce prazolových léčiv s ionty kovů byla provedena pomocí UV-Vis spektroskopie, získané výsledky byly shrnuty do tabulky 6. Blíže použitý experimentální přístup a dosažené výsledky jsou popsány v příloze této práce (Abramenko 2021).

Tabulka 6 Hodnoty asociační konstanty ($\log K$) a stechiometrie komplexů přechodných kovů ve vodném prostředí ($\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO}$, 99:1, v/v).

Léčivo	Kationt	Log (K)	Stechiometrie (kationt: léčivo)
 Omeprazole	Fe^{3+}	6.7	1:1
	Al^{3+}	12.1	1:2
 Pantoprazole	Fe^{3+}	5.0	1:1
		11.5	1:2
 Lansoprazole	Fe^{3+}	4.5	1:1
	Al^{3+}	9.3	1:2
	Fe^{2+}	8.1	1:2

Výše uvedená data ukazují, že testovaná léčiva na bázi prazolů mohou tvořit silné komplexy s přechodnými kovy, zejména s ionty Fe^{3+} . [204] Při jeho aplikaci se doporučuje, že by neměl být užíván s potravinovými doplňky obsahujícími kovy, jako je železo. Otázkou je, zda mohou být prazolová léčiva ovlivněna interakcí s ionty kovů (např. Fe^{3+}), a do jaké míry tato interakce ovlivňuje terapeutický účinek a potenciální vedlejší účinky. V tomto případě můžeme obvykle očekávat, že tento jev může způsobit nižší bioabsorpci železa a pravděpodobně i samotných léčiv. [205] Na druhé straně, použití inhibitorů protonové pumpy, jako je omeprazol, pantoprazol a lansoprazol, může vést k nižší sekreci žaludeční kyseliny a tím výrazně snížit příjem železa z potravy, následně způsobit anémii. [206]

Mimoto existují další závažné důvody ke studiu interakcí železa s inhibitory protonové pumpy. Je dobře známo, že vyšší hladiny iontů železa mohou hrát důležitou roli v řadě patologických stavů, jako jsou onkologická, metabolická a neurodegenerativní onemocnění. [207-209] Některé z těchto patologických stavů jsou spojeny s dlouhodobým užíváním výše testovaných léků. [155, 156] Bylo publikováno, že metalokomplexy, obsahující tato léčiva, mohou vykazovat výrazně vyšší terapeutickou účinnost než původní léčiva (např. Omeprazol v komplexu s Co^{2+} proti *H. pylori*). [161] Nelze však vyloučit, že některé jejich vedlejší účinky

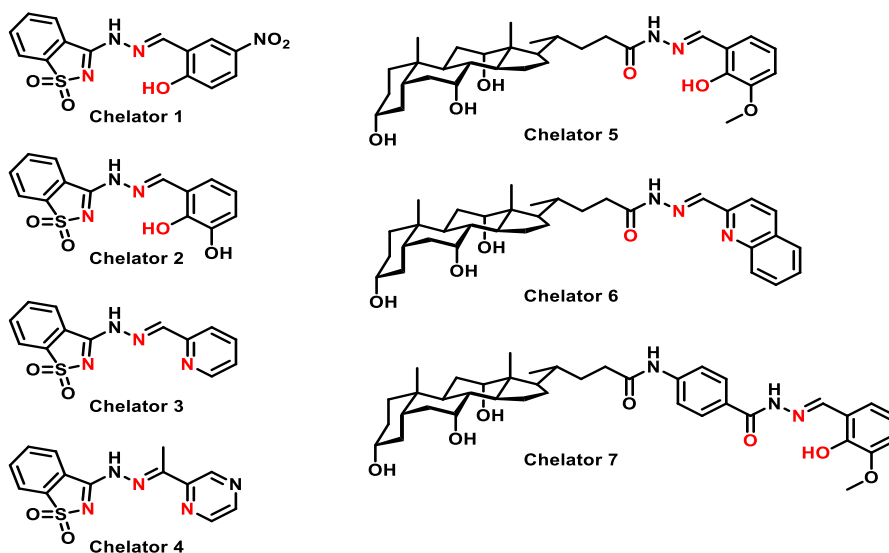
mohou být také způsobeny chelatací iontů přechodných kovů. Doplnky železa navíc patří mezi nejčastěji předepisované a používané léky [210], a proto nelze vyloučit jejich interakci s inhibitory protonové pumpy.

Na druhé straně inhibitory proteinové pumpy, jako je pantoprazol, začaly být v klinických studiích testovány jako chelátory železa k cílení metabolismu železa (např. snížení hladiny sérového feritinu) u pacientů s talasemií. [29] Z výše uvedeného vyplývá počet kontaktních bodů mezi metabolismem železa a terapeutickými vlastnostmi inhibitorů protonové pumpy. Naše studie ukazuje, že tyto léky tvoří ve vodném prostředí komplexy železa. Předpokládalo se, že studovaná léčiva by mohla vykazovat chelatační schopnosti *in vivo* a tento jev by mohl částečně vysvětlit některé jejich vedlejší účinky. Nicméně pro potvrzení nebo vyvrácení tohoto jevu je zapotřebí řada dalších studií. [211]

7.4 KOMPLEXACE ŽELEZA V INHIBICI TET1 PROTEINU

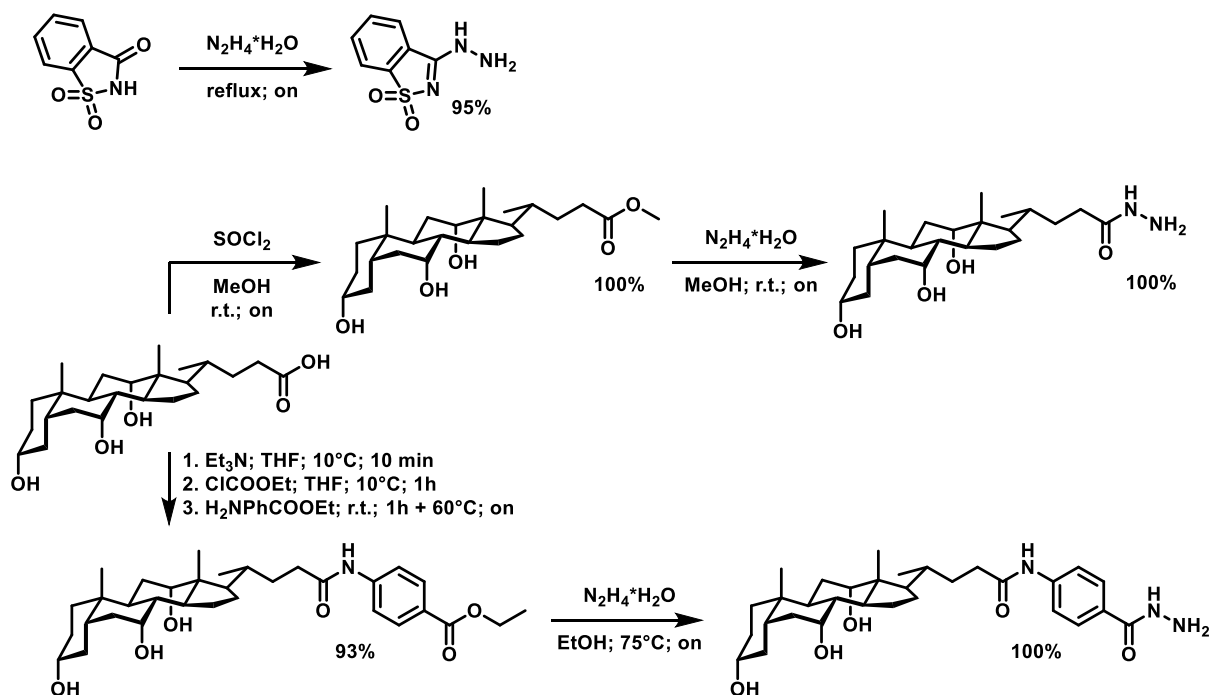
Je známo, že funkce TET1 proteinu, je závislá na přítomnosti Fe^{2+} iontu v aktivním centru enzymu. To implikuje, že blokace vhodnými molekulami by mohla být efektivní cesta pro inhibici TET1 proteinu.

Kationt Fe^{2+} s nižší nábojovou hustotou preferuje interakci s vazebnými skupinami obsahujícími „měkké“ donorové atomy [212], např. heteroaromatické [196-199] a aromatické hydroxylové skupiny [200] Např. Fria a kol. úspěšně testovali deriváty benzoisothiazol-1,1-dioxidu pro chelataci Fe^{2+} . [213] Vasta a kol. publikovali, že pyrimidinové deriváty vykazovaly nejen významnou inhibiční aktivitu prolyl 4-hydroxyláz (dioxygenázy závislé na Fe^{2+} a α -ketoglutarátu) prostřednictvím chelatace Fe^{2+} . [214] Dokonce pro některé z nich byl nalezen selektivní způsob inhibice založený na tvorbě metalokomplexu s aktivním místem enzymu. Další důležitou součástí návrhu chelátoru je optimalizace jejich rozpustnosti a hydrofilnosti. Začlenění strukturních motivů žlučových kyselin do chelátorů může zlepšit jejich rozpustnost ve vodném prostředí a jejich biologickou dostupnost [215-217] Proto jsme v této práci studovali heterocyklické hydrazony, acyl- a aroylhydrazony obsahující buď benzoisothiazol-1,1-dioxidovou skupinu nebo zbytek kyseliny cholové jako novou třídu potenciálních inhibitorů proteinu TET1. Jejich struktury jsou ukázané na obrázku níže.



Obrázek 23 Struktura testovaných inhibitoru TET1 proteinu

Látky byly připraveny několika krokovou syntézou. Klíčovým intermediátem byly deriváty hydrazinu – heterocyklický hydrazin (prekurzor pro chelátory 1-4) a hydrazidové deriváty kyseliny cholové (prekurzor pro chelátory 5-7). Benzo[*d*]isothiazol-1,1-dioxid-3-hydrazin byl připraven ze sacharinu jeho reakcí s hydrazin hydrátem. Cholylhydrazid byl připraven z příslušného methylesteru; derivát s benzhydrazidovou skupinou byl připraven z ester-amidu kyseliny cholové (schéma 2). Vlastní chelátory (hydrazony) byly připraveny reakcí hydrazinového derivátu se substituovanými 2-hydroxybenzaldehydy nebo 2-N-heterocyklickými aldehydy a methylketony. Výtěžky syntéz byly vysoké (Obrázek 24).



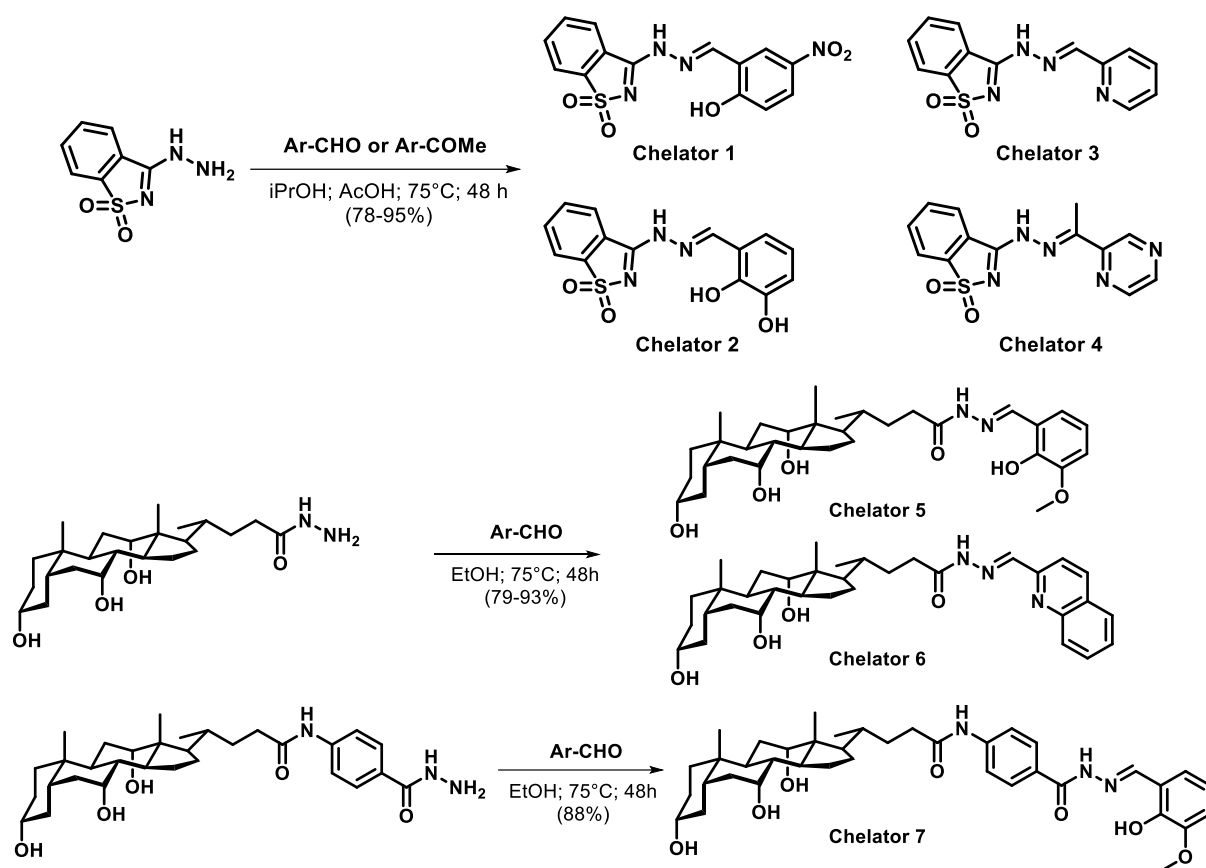


Schéma 2 Syntetická schémata syntézy jednotlivých inhibitorů TET1 proteinu

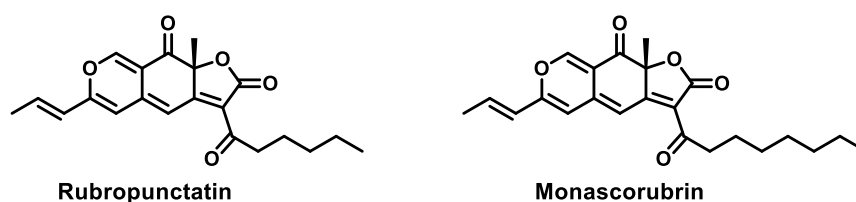
Výsledky potvrdily vysokou afinitu testovaných chelátorů k Fe^{2+} . Studie jasně ukázala významnou korelaci mezi afinitou chelátoru k iontům železa (II) (reprezentovanou vazebnou konstantou) a inhibiční aktivitou proteinu TET1 (reprezentovanou hodnotami IC_{50}) viz tabulka 7. Blíže je daná problematika popsána v příloze této práce (Jakubek-2019).

Tabulka 7 Komplexace Fe^{2+} studovaných chelátorů a jejich inhibiční aktivita pro TET1 protein

Chelátor	Log(K)	Stechiometrie (Fe^{2+} : Inhibitor)	IC_{50} [μM]
Chelátor 1	6,8	1:1	0,79
	15	1:2	
Chelátor 2	7,3	1:1	9,1
	14	1:2	
Chelátor 3	-	-	-
Chelátor 4	-	-	-
Chelátor 5	3,8	1:1	8,0
Chelátor 6	3,3	1:1	-
Chelátor 7	3,8	1:1	15

7.5 BIOLOGICKY AKTIVNÍ LÁTKY Z HUB

V této části bylo cílem připravit produkt pro adjuvantní terapii u onkologických onemocnění na bázi pigmentů z hub Filamentous Ascomycetes z kmene *Monascus purpureus*. Biologicky aktivní látky byly získány za využití biotechnologických procesů a následné separace. Druhou cestou byla totální syntéza biologicky účinných látek, zejména rubropunctatinu, monascorubrinu a jejich derivátů. Totální syntéza nebyla dosud popsána; bylo popsáno pouze syntetické opracování určité části molekuly. [218]



Obrázek 24 Molekulární struktura derivátu Rubropunctatinu a Monascorubinu

Námi navržený postup přípravy cílových struktur a jejich analog je založen na čistě chemickém (syntetickém) provedení, odvozeném od jejich biosyntézy. Biosyntéza barviv (pigmentů) byla zkoumána od 60. let 20. století; v posledních několika letech byla relativně detailně prozkoumána a publikována, včetně klíčových enzymatických reakcí. [219, 220]

Klíčovým intermediátem syntézy je substituovaný azaphilon. Příprava těchto sloučenin byla popsána. [221-223] Syntéza vychází z komerčně dostupného 2,4-dimethoxy-3-methylbenzaldehydu. Ten je nejprve nitrován pomocí dusičnanu měďnatého v acetanhydridu, kdy dojde i k ochránění formylové skupiny ve formě diacetyl benzalu. Dalším krokem je bromace aromatického jádra, následovaná redukcí nitroskupiny vodíkem na palladiu na aminoskupinu a ta je přes diazoniovou sůl odstraněna, dojde zároveň i k ochránění formylu. Pomocí BBr_3 jsou obě methoxyskupiny převedeny na hydroxyskupiny. Pomocí Sonogashirova coupling se připraví alkynylovaný benzaldehyd (schéma 3).

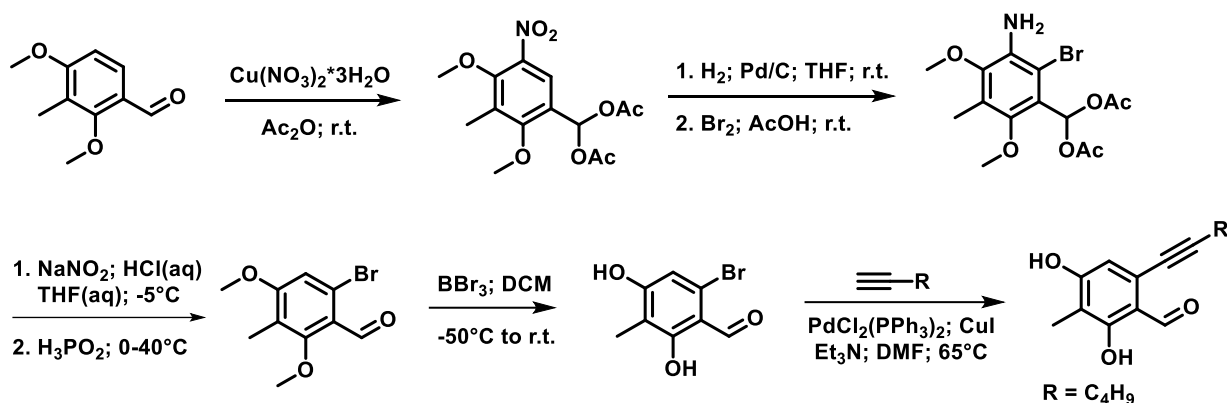


Schéma 3 Příprava 2,4-dihydroxy-3-methyl-6-(1-alkyn-1-yl)benzaldehydu

Cykloisomerace a oxidace alkynylovaných benzaldehydů vede ke klíčovým azaphilonům. Cyklizaci lze provést pomocí octanu zlatitého v trifluoroctové kyselině, kdy je vzniklý intermediát oxidován 2-jodoxybenzoovou kyselinou (IBX). Tato cesta je tzv. one-pot. Alternativní cesta je založena na oxidativní dearomatizaci alkynylovaného benzaldehydu v přítomnosti spartein-Cu komplexu. Vzniklý intermediát je následně cykloisomerizován za katalýzy jodidem měďným (schéma 4).

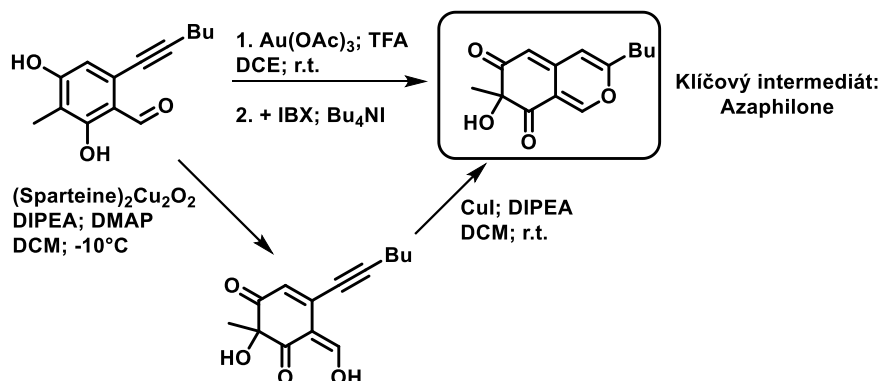


Schéma 4 Schéma přípravy azaphilonu

Následující chemické syntézy jsou založeny na biosyntéze rubropunctatinu a monascorubrinu; klasickou chemickou syntézou nebyly dosud popsány. Klíčový krok je intramolekulární C5-C2' Knoevenagelova kondenzace azaphilonu s β -ketoestery nebo jejich deriváty. Pokusy o kondenzaci s methyl acetoacetáty nebyly úspěšné, byla získána pestrá směs látek. Je třeba další optimalizace kondenzační reakce (jiná báze/katalyzátor, solvent, teploty). Pro kondenzaci byl také použit dioxinon, tedy chráněná β -ketokyselina. Ten byl připraven čtyřkrokovou syntézou z příslušné karboxylové kyseliny. Vznikala směs látek, kde majoritním produktem byl C3-C2' cyklizační produkt (schéma 5). U připravených derivátů je v současné době testována jejich biologická aktivita.

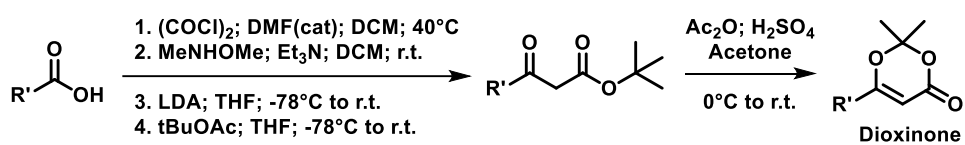
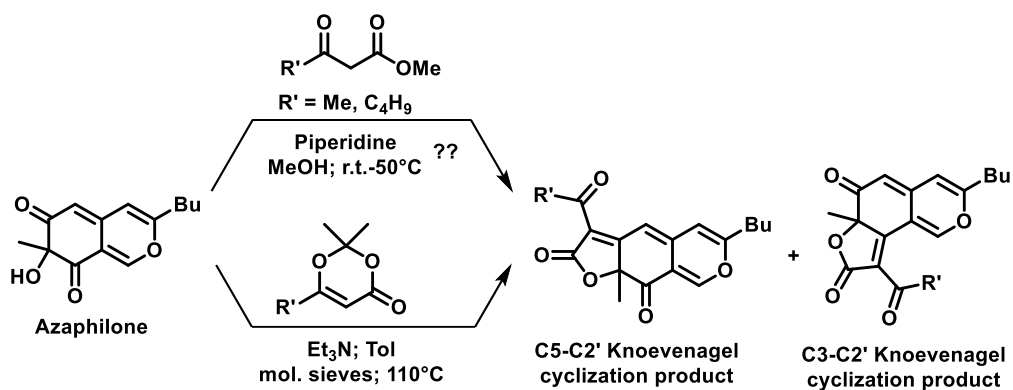


Schéma 5 Knoevenagelova kondenzace azaphilonu s deriváty β -ketokyselín

8. ZÁVĚR

- V případě formulace bazedoxifenu byla potvrzena tvorba cyklodextrinového komplexu a stanovena jeho struktura řadou pokročilých analytických metod, zejména rentgenovou difrakcí a diferenciální skenovací kalorimetrií a pokročilou NMR spektroskopií. Aplikace γ -cyclodextrinového excipientu vedla ke zvýšení rozpustnosti bazedoxifenu ve vodném prostředí o několik řádů. Na modelu VERO buněk byl pozorován klinicky aplikovatelný efekt proti SARS-CoV-2. V současnosti je cyklodextrinová formulace bazedoxifenu testována v klinických studiích. Vedle tohoto efektu výpočetní studie ukázaly, že bazedoxifen spolu s dalšími estrogenovými modulátory mohl být potentní inhibitor SARS-CoV-2 proteáz.
- Testy připravených formulací kurkuminového extraktu ukázaly výrazné zvýšení rozpustnosti ve vodných systémech a řádové zvýšení biodostupnosti. V současnosti je již daná formulace komerčně dostupná aplikace (*NeoCurcumin*[®]).
- Byly připraveny série chelátorů několika strukturních motivů (např. kofeinové hydrazony) s prokázanou afinitou pro biologicky významné přechodné kovy. Pro vybrané strukturní motivy byl stanoven vztah mezi jejich strukturním motivem a biologickou aktivitou. Větší cytotoxicita a selektivita pro nádorové buněčné linie byla pozorována pro 2-N-heteroarylované deriváty.
- Studium afinity prazolových léčiv pro ionty přechodných kovů ve vodném prostředí ukázalo, že všechna testovaná léčiva mají silnou afinitu pro hlinité ionty a ionty železa.
- Bylo prokázáno, že deriváty arylhydrazinonů reprezentují slibný strukturní motiv pro přípravu inhibitorů TET1 proteinu. Byla pozorována pozitivní korelace mezi inhibiční aktivitou testovaných chelátorů a jejich afinitou pro železnaté ionty.
- V případě statinů byl vypracován syntetický protokol pro jejich přípravu a modifikaci.

9. SEZNAM PUBLIKACÍ SOUVISEJÍCÍCH S PRACÍ

1. Z. Kejík, R. Kaplánek, P. Dytrych, M. Masařík, K. Veselá, N. Abramenko, D. Hoskovec, M. Vašáková, J. Králová, P. Martásek, **M. Jakubek**: Circulating Tumour Cells (CTCs) in NSCLC: From Prognosis to Therapy Design, *Pharmaceutics* 13 (2021) 34834295 doi: 10.3390/pharmaceutics13111879
2. J. Brábek, **M. Jakubek**, F. Vellieux, J. Novotný, M. Kolář, L. Lacina, P. Szabo, K. Strnadová, D. Rösel, B. Dvořánková, K. Smetana Jr.: Interleukin-6: Molecule in the Intersection of Cancer, Ageing and COVID-19. *Int. J. Mol. Sci.* 26 (2020) 7937. doi: 10.3390/ijms21217937
3. N. Abramenko, F. Vellieux, P. Tesařová, Z. Kejík, R. Kaplánek, L. Lacina, B. Dvořánková, D. Rösel, J. Brábek, A. Tesař, **M. Jakubek**, K. Smetana Jr.: Estrogen Receptor Modulators in Viral Infections Such as SARS-CoV-2: Therapeutic Consequences. *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 6551. doi: 10.3390/ijms22126551
4. V. Antonyová, Z. Kejík, T. Brogyányi, R. Kaplánek, M. Pajková, V. Talianová, R. Hromádka, M. Masařík, D. Sýkora, L. Mikšátková, P. Martásek, **M. Jakubek**: Role of mtDNA disturbances in the pathogenesis of Alzheimer's and Parkinson's disease. *DNA Repair* 91-92 (2020) 102871 doi: 10.1016/j.dnarep.2020.102871
5. R. Kaplánek, **M. Jakubek**, J. Rak, Z. Kejík, M. Havlík, B. Dolenský, I. Frydrych, M. Hajduch, M. Kolar, K. Bogdanová, J. Králová, P. Džubák, V. Král: Caffeine-hydrazones as anticancer agents with pronounced selectivity toward T-lymphoblastic leukaemia cells. *Bioorg. Chem.* 60 (2015) 19-29. doi: 10.1016/j.bioorg.2015.03.003
6. **M. Jakubek**, Z. Kejík, R. Kaplánek, H. Veselá, D. Sýkora, P. Martásek, V. Král: Perimidine-based synthetic receptors for determination of copper(II) in water solution. *Supramol. Chem.* 30 (2018) 218-226. doi: 10.1080/10610278.2017.1414216
7. **M. Jakubek**, Z. Kejík, V. Antonyová, R. Kaplánek, D. Sýkora, R. Hromádka, K. Vyhliďalová, P. Martásek, V. Král: Benzoisothiazole-1,1-dioxide-based synthetic receptor for zinc ion recognition in aqueous medium and its interaction with nucleic acids. *Supramol. Chem.* 31 (2019) 19-27. doi: 10.1080/10610278.2018.1523409
8. N. Abramenko, Z. Kejík, R. Kaplánek, A. Tatar, T. Brogyányi, M. Pajková, D. Sýkora, K. Veselá V. Antonyová, P. Dytrych. M. Ikeda-Saito, P. Martásek and **M. Jakubek**:

Spectroscopic study of in situ-formed metallocomplexes of proton pump inhibitors in water. *Chem. Biol. Drug Des.* 97 (2021) 305-314. doi: 10.1111/cbdd.13782,

9. **M. Jakubek**, Z. Kejík, R. Kaplánek, V. Antonyová, R. Hromádka, D. Šandriková, D. Sýkora, P. Martásek, V. Král: Hydrazones as novel epigenetic modulators: correlation between TET 1 protein inhibition activity and their iron(II) binding ability. *Bioorg. Chem.* 88 (2019) 102809. doi j.bioorg.2019.02.034

10. PŘEHLED ZKRATEK

5-cAC	5-karboxylcytosin
5-fC	5-formylcytosin
5-hmC	5-hydroxymethylcytosin
5-mC	5-methylcytosin
A549	buněčná linie plicního adenokarcinomu
ADMET	absorpce, distribuce, metabolismus, vylučování a toxikologie
AMPK	AMP-aktivovaná protein kináza
Akt	proteinkináza B
BDMC	bisdemethoxykurkumin
Bcl-2,	B cell lymphoma 2
Bcl-xL,	B-cell lymphoma-extra large
BJ	buněčná linie lidských fibroblastů
CCRF-CEM	buněčná linie T-lymfoblastická leukemie
CEM-DNR	buněčná linie T-lymfoblastická leukemie, daunorubicin resistantní forma
cFLIP	cellular FLICE-like inhibitory protein
c-IAP1	cellular inhibitor of apoptosis protein 1
CH ₃ CN	acetonitril
CTC	cirkulujících nádorových buněk
DSC	diferenční skenovací kalorimetrie
DMC	demethoxykurkumin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
DNMT	DNA metyltransferáza
EGF	epidermální růstový faktor
EGFR	receptoru epidermálního růstového faktoru
ERK2	extracelulárním signálem regulovaná kináza 2
HCT116	buněčná linie kolorektálního karcinomu
HCT116p53 ^{-/-}	p53-deficientní buněčná linie kolorektálního karcinomu
HMGCR	HMG-CoA reduktáza
IL-6	interleukin 6
IL-6R	IL-6 receptor
IL-8	interleukin 8
JAK	Janusova kináza
JNK	c-Jun N-terminální kináza
K562	buněčná linie akutní myeloidní leukemie
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza
PXRD	prášková rentgenová difrakční analýza
PGE2	prostaglandin E2
MRC-5	buněčná linie lidských plicních fibroblastů
NMR	Nukleární magnetická rezonance
NSCLC	Nemalobuněčný karcinom plic,
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein
STAT3	signální transduktor a aktivátor transkripce 3

TET1 protein	Tet metylcytosin dioxygenáza 1
TGF- β	transformující růstový faktor beta
TNF- α	tumor nekrotizující faktor alfa
TrxR1	thioredoxin reduktáza 1
UV-Vis	ultrafialová-viditelná spektroskopie
VEGF	vaskulární endotelový růstový faktor

11. LITERATURA

1. Imming, P., *Chapter 1 - Medicinal Chemistry: Definitions and Objectives, Drug Activity Phases, Drug Classification Systems*, in *The Practice of Medicinal Chemistry (Fourth Edition)*, C.G. Wermuth, et al., Editors. 2015, Academic Press: San Diego. p. 3-13.
2. Veale, C.G.L., *Into the Fray! A Beginner's Guide to Medicinal Chemistry*. ChemMedChem, 2021. **16**(8): p. 1199-1225.
3. Hughes, J.P., et al., *Principles of early drug discovery*. Br J Pharmacol, 2011. **162**(6): p. 1239-49.
4. Veale, C.G., R.W. Krause, and J.D. Sewry, *Blending problem-based learning and peer-led team learning, in an open ended 'home-grown' pharmaceutical chemistry case study*. Chemistry Education Research and Practice, 2018. **19**(1): p. 68-79.
5. Abdullah, M.A., S.M. Mohd Faudzi, and N.M. Nasir, *A Review on Biological Properties and Synthetic Methodologies of Diarylpentadienones*. Mini Rev Med Chem, 2021. **21**(9): p. 1058-1070.
6. Mahmood, K., et al., *Recent developments in curcumin and curcumin based polymeric materials for biomedical applications: A review*. International Journal of Biological Macromolecules, 2015. **81**: p. 877-890.
7. Siviero, A., et al., *Curcumin, a golden spice with a low bioavailability*. Journal of Herbal Medicine, 2015. **5**(2): p. 57-70.
8. Suresh, K. and A. Nangia, *Curcumin: pharmaceutical solids as a platform to improve solubility and bioavailability*. CrystEngComm, 2018. **20**(24): p. 3277-3296.
9. Anand, P., et al., *Bioavailability of curcumin: problems and promises*. Mol Pharm, 2007. **4**(6): p. 807-18.
10. Salem, M., S. Rohani, and E.R. Gillies, *Curcumin, a promising anti-cancer therapeutic: a review of its chemical properties, bioactivity and approaches to cancer cell delivery*. Rsc Advances, 2014. **4**(21): p. 10815-10829.
11. Tonnesen, H.H., J. Karlsen, and A. Mostad, *STRUCTURAL STUDIES OF CURCUMINOIDS .1. THE CRYSTAL-STRUCTURE OF CURCUMIN*. ACTA CHEMICA SCANDINAVICA SERIES B-ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY, 1982. **36**(7): p. 475-479.
12. Ishigami, Y., et al., *The Crystal Structure and the Fluorescent Properties of Curcumin*. Journal of the Japan Society of Colour Material, 1999. **72**(2): p. 71-77.
13. Parimita, S.P., et al., *Redetermination of curcumin: (1E,4Z,6E)-5-hydr-oxy-1,7-bis-(4-hydr-oxy-3-methoxy-phen-yl)hepta-1,4,6-trien-3-one*. Acta Crystallographica Section E, 2007. **63**(2): p. o860-o862.
14. Liu, Y., et al., *Curcumin attenuates prostatic hyperplasia caused by inflammation via up-regulation of bone morphogenetic protein and activin membrane-bound inhibitor*. Pharm Biol, 2021. **59**(1): p. 1026-1035.
15. Zhang, M., et al., *Anti-inflammatory activity of curcumin-loaded tetrahedral framework nucleic acids on acute gouty arthritis*. Bioact Mater, 2022. **8**: p. 368-380.
16. Zhang, J., et al., *Curcumin Reduced H(2)O(2)- and G2385R-LRRK2-Induced Neurodegeneration*. Front Aging Neurosci, 2021. **13**: p. 754956.
17. Li, L., et al., *Indispensable role of mitochondria in maintaining the therapeutic potential of curcumin in acute kidney injury*. J Cell Mol Med, 2021. **25**(20): p. 9863-9877.
18. Nocito, M.C., et al., *Antitumoral Activities of Curcumin and Recent Advances to Improve Its Oral Bioavailability*. Biomedicines, 2021. **9**(10).
19. Kumar, A., et al., *Current clinical developments in curcumin-based therapeutics for cancer and chronic diseases*. Phytother Res, 2021.
20. Ghorbani, Z., A. Hekmatdoost, and P. Mirmiran, *Anti-hyperglycemic and insulin sensitizer effects of turmeric and its principle constituent curcumin*. International journal of endocrinology and metabolism, 2014. **12**(4): p. e18081-e18081.

21. Mimche, P.N., D. Taramelli, and L. Vivas, *The plant-based immunomodulator curcumin as a potential candidate for the development of an adjunctive therapy for cerebral malaria*. Malar J, 2011. **10 Suppl 1**(Suppl 1): p. S10.
22. Hampannavar, G.A., et al., *An appraisal on recent medicinal perspective of curcumin degradant: Dehydrozingerone (DZG)*. Bioorg Med Chem, 2016. **24**(4): p. 501-20.
23. Barua, N. and A.K. Buragohain, *Therapeutic Potential of Curcumin as an Antimycobacterial Agent*. Biomolecules, 2021. **11**(9).
24. Jafari, F. and S. Elyasi, *Prevention of colistin induced nephrotoxicity: a review of preclinical and clinical data*. Expert Rev Clin Pharmacol, 2021. **14**(9): p. 1113-1131.
25. Peng, Y., et al., *Anti-Inflammatory Effects of Curcumin in the Inflammatory Diseases: Status, Limitations and Countermeasures*. Drug Des Devel Ther, 2021. **15**: p. 4503-4525.
26. Heidari, Z., et al., *Probiotics/Prebiotics in Viral Respiratory Infections: Implication for Emerging Pathogens*. Recent Pat Biotechnol, 2021. **15**(2): p. 112-136.
27. Gharibpour, F., et al., *The Effects of Nutraceuticals and Herbal Medicine on Candida albicans in Oral Candidiasis: A Comprehensive Review*. Adv Exp Med Biol, 2021. **1308**: p. 225-248.
28. Albalawi, A.E., et al., *A Systematic Review of Curcumin and its Derivatives as Valuable Sources of Antileishmanial Agents*. Acta Parasitol, 2021. **66**(3): p. 797-811.
29. Ege, D., *Action Mechanisms of Curcumin in Alzheimer's Disease and Its Brain Targeted Delivery*. Materials (Basel), 2021. **14**(12).
30. Mohammadi, A., et al., *The Functional Roles of Curcumin on Astrocytes in Neurodegenerative Diseases*. Neuroimmunomodulation, 2021: p. 1-11.
31. Sultana, S., et al., *Molecular targets for the management of cancer using Curcuma longa Linn. phytoconstituents: A Review*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2021. **135**: p. 111078.
32. Biswas, J., et al., *Curcumin protects DNA damage in a chronically arsenic-exposed population of West Bengal*. Human & experimental toxicology, 2010. **29**: p. 513-24.
33. Kejik, Z., et al., *Circulating Tumour Cells (CTCs) in NSCLC: From Prognosis to Therapy Design*. Pharmaceutics, 2021. **13**(11): p. 1879.
34. Naksuriya, O., et al., *Curcumin nanoformulations: a review of pharmaceutical properties and preclinical studies and clinical data related to cancer treatment*. Biomaterials, 2014. **35**(10): p. 3365-3383.
35. Nelson, K.M., et al., *The Essential Medicinal Chemistry of Curcumin*. Journal of Medicinal Chemistry, 2017. **60**(5): p. 1620-1637.
36. Wahlang, B., Y.B. Pawar, and A.K. Bansal, *Identification of permeability-related hurdles in oral delivery of curcumin using the Caco-2 cell model*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2011. **77**(2): p. 275-282.
37. Sasaki, H., et al., *Innovative Preparation of Curcumin for Improved Oral Bioavailability*. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2011. **34**(5): p. 660-665.
38. Heger, M., et al., *The Molecular Basis for the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Curcumin and Its Metabolites in Relation to Cancer*. Pharmacological Reviews, 2014. **66**(1): p. 222-307.
39. Gupta, S.C., et al., *Discovery of curcumin, a component of golden spice, and its miraculous biological activities*. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2012. **39**(3): p. 283-299.
40. Esatbeyoglu, T., et al., *Curcumin—From Molecule to Biological Function*. Angewandte Chemie International Edition, 2012. **51**(22): p. 5308-5332.
41. Kurien, B.T., et al., *Improving the solubility and pharmacological efficacy of curcumin by heat treatment*. Assay Drug Dev Technol, 2007. **5**(4): p. 567-76.
42. Liang, G., et al., *Exploration and synthesis of curcumin analogues with improved structural stability both in vitro and in vivo as cytotoxic agents*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2009. **17**(6): p. 2623-2631.
43. Gryniewicz, G. and P. Ślifirski, *Curcumin and curcuminoids in quest for medicinal status*. Acta Biochim Pol, 2012. **59**(2): p. 201-12.

44. Vyas, A., et al., *Perspectives on new synthetic curcumin analogs and their potential anticancer properties*. *Curr Pharm Des*, 2013. **19**(11): p. 2047-69.
45. Tønnesen, H.H. and J. Karlsen, *Studies on curcumin and curcuminoids. VI. Kinetics of curcumin degradation in aqueous solution*. *Z Lebensm Unters Forsch*, 1985. **180**(5): p. 402-4.
46. Zebib, B., Z. Mouloungui, and V. Noiro, *Stabilization of curcumin by complexation with divalent cations in glycerol/water system*. *Bioinorg Chem Appl*, 2010. **2010**: p. 292760.
47. Liang, G., et al., *Exploration and synthesis of curcumin analogues with improved structural stability both in vitro and in vivo as cytotoxic agents*. *Bioorg Med Chem*, 2009. **17**(6): p. 2623-31.
48. Jakubek, M., et al., *Strategy for improved therapeutic efficiency of curcumin in the treatment of gastric cancer*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019. **118**: p. 109278.
49. Uehara, Y., et al., *Inhibition of beta-catenin and STAT3 with a curcumin analog suppresses gastric carcinogenesis in vivo*. *Gastric Cancer*, 2015. **18**(4): p. 774-83.
50. Zou, P., et al., *EF24 induces ROS-mediated apoptosis via targeting thioredoxin reductase 1 in gastric cancer cells*. *Oncotarget*, 2016. **7**(14): p. 18050-18064.
51. Chen, W.Q., et al., *Selective killing of gastric cancer cells by a small molecule via targeting TrxR1 and ROS-mediated ER stress activation*. *Oncotarget*, 2016. **7**(13): p. 16593-16609.
52. Jin, R., et al., *Da0324, an inhibitor of nuclear factor-kappaB activation, demonstrates selective antitumor activity on human gastric cancer cells*. *Drug Des Devel Ther*, 2016. **10**: p. 979-95.
53. Xia, Y., et al., *W346 inhibits cell growth, invasion, induces cycle arrest and potentiates apoptosis in human gastric cancer cells in vitro through the NF-kappaB signaling pathway*. *Tumour Biol*, 2016. **37**(4): p. 4791-801.
54. Qiu, P., et al., *Synthesis and evaluation of asymmetric curcuminoid analogs as potential anticancer agents that downregulate NF-kappaB activation and enhance the sensitivity of gastric cancer cell lines to irinotecan chemotherapy*. *Eur J Med Chem*, 2017. **139**: p. 917-925.
55. Zou, P., et al., *ROS generation mediates the anti-cancer effects of WZ35 via activating JNK and ER stress apoptotic pathways in gastric cancer*. *Oncotarget*, 2015. **6**(8): p. 5860-5876.
56. Zou, P., et al., *Selective killing of gastric cancer cells by a small molecule targeting ROS-mediated ER stress activation*. *Mol Carcinog*, 2016. **55**(6): p. 1073-86.
57. Dhivya, R., et al., *Biocompatible curcumin loaded PMMA-PEG/ZnO nanocomposite induce apoptosis and cytotoxicity in human gastric cancer cells*. *Materials Science and Engineering: C*, 2017. **80**: p. 59-68.
58. Jiang, H., et al., *Co-delivery of etoposide and curcumin by lipid nanoparticulate drug delivery system for the treatment of gastric tumors*. *Drug Delivery*, 2016. **23**(9): p. 3665-3673.
59. Suwannateep, N., et al., *Mucoadhesive curcumin nanospheres: Biological activity, adhesion to stomach mucosa and release of curcumin into the circulation*. *Journal of Controlled Release*, 2011. **151**(2): p. 176-182.
60. Shishu, N. Gupta, and N. Aggarwal, *Bioavailability Enhancement and Targeting of Stomach Tumors Using Gastro-Retentive Floating Drug Delivery System of Curcumin—“A Technical Note”*. *AAPS PharmSciTech*, 2008. **9**(3): p. 810-813.
61. Tønnesen, H.H., M. Måsson, and T. Loftsson, *Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability*. *Int J Pharm*, 2002. **244**(1-2): p. 127-35.
62. Cuomo, J., et al., *Comparative Absorption of a Standardized Curcuminoid Mixture and Its Lecithin Formulation*. *Journal of Natural Products*, 2011. **74**(4): p. 664-669.
63. Antony, B., et al., *A Pilot Cross-Over Study to Evaluate Human Oral Bioavailability of BCM-95CG (Biocurcmax), A Novel Bioenhanced Preparation of Curcumin*. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 2008. **70**(4): p. 445-449.
64. Gota, V.S., et al., *Safety and Pharmacokinetics of a Solid Lipid Curcumin Particle Formulation in Osteosarcoma Patients and Healthy Volunteers*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010. **58**(4): p. 2095-2099.

65. Madhavi, D. and D. Kagan, *Bioavailability of a Sustained Release Formulation of Curcumin*. Integrative medicine (Encinitas, Calif.), 2014. **13**(3): p. 24-30.
66. Schiborr, C., et al., *The oral bioavailability of curcumin from micronized powder and liquid micelles is significantly increased in healthy humans and differs between sexes*. Molecular Nutrition & Food Research, 2014. **58**(3): p. 516-527.
67. Jäger, R., et al., *Comparative absorption of curcumin formulations*. Nutrition Journal, 2014. **13**(1): p. 11.
68. Brábek, J., et al., *Interleukin-6: Molecule in the Intersection of Cancer, Ageing and COVID-19*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(21).
69. Antonyová, V., et al., *Role of mtDNA disturbances in the pathogenesis of Alzheimer's and Parkinson's disease*. DNA Repair (Amst), 2020. **91-92**: p. 102871.
70. Mokhtari, T., et al., *COVID-19 and multiorgan failure: A narrative review on potential mechanisms*. Journal of Molecular Histology, 2020. **51**(6): p. 613-628.
71. Rothan, H.A. and S.N. Byrareddy, *The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak*. J Autoimmun, 2020. **109**: p. 102433.
72. Meikle, C.K.S., et al., *SSRIs: Applications in inflammatory lung disease and implications for COVID-19*. Neuropsychopharmacology reports, 2021. **41**(3): p. 325-335.
73. Huppert, L.A., M.A. Matthay, and L.B. Ware, *Pathogenesis of Acute Respiratory Distress Syndrome*. Semin Respir Crit Care Med, 2019. **40**(1): p. 31-39.
74. Bauer, T.T., et al., *Acute respiratory distress syndrome and pneumonia: a comprehensive review of clinical data*. Clin Infect Dis, 2006. **43**(6): p. 748-56.
75. Camp, O.G., et al., *Melatonin interferes with COVID-19 at several distinct ROS-related steps*. Journal of inorganic biochemistry, 2021. **223**: p. 111546-111546.
76. Perricone, C., et al., *COVID-19 as part of the hyperferritinemic syndromes: the role of iron depletion therapy*. Immunol Res, 2020. **68**(4): p. 213-224.
77. Huang, Y., et al., *TET1 Knockdown Inhibits Porphyromonas gingivalis LPS/IFN- γ -Induced M1 Macrophage Polarization through the NF- κ B Pathway in THP-1 Cells*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(8).
78. Mintz, C.S. and R. Crea, *Protein scaffolds: The next generation of protein therapeutics?* BioProcess International, 2013. **11**: p. 40-48+51.
79. Aqel, S.I., et al., *Novel small molecule IL-6 inhibitor suppresses autoreactive Th17 development and promotes Treg development*. Clin Exp Immunol, 2019. **196**(2): p. 215-225.
80. Enomoto, A., et al., *Suppression of cancer cachexia by 20S,21-epoxy-resibufogenin-3-acetate-a novel nonpeptide IL-6 receptor antagonist*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **323**(3): p. 1096-102.
81. Enomoto, A., et al., *Inhibitory effects of bufadienolides on interleukin-6 in MH-60 cells*. J Nat Prod, 2004. **67**(12): p. 2070-2.
82. Hayashi, M., et al., *Madindoline, a novel inhibitor of IL-6 activity from Streptomyces sp. K93-0711. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities*. J Antibiot (Tokyo), 1996. **49**(11): p. 1091-5.
83. Hayashi, M., et al., *Suppression of bone resorption by madindoline A, a novel nonpeptide antagonist to gp130*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(23): p. 14728-33.
84. Hayashi, M., et al., *Biological activity of a novel nonpeptide antagonist to the interleukin-6 receptor 20S,21-epoxy-resibufogenin-3-formate*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **303**(1): p. 104-9.
85. Hong, S.S., et al., *A Novel Small-Molecule Inhibitor Targeting the IL-6 Receptor beta Subunit, Glycoprotein 130*. J Immunol, 2015. **195**(1): p. 237-45.
86. Kino, T., et al., *3-O-Formyl-20R,21-epoxyresibufogenin suppresses IL-6-type cytokine actions by targeting the glycoprotein 130 subunit: potential clinical implications*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(2): p. 437-44.
87. Saleh, A.Z., et al., *Binding of madindoline A to the extracellular domain of gp130*. Biochemistry, 2005. **44**(32): p. 10822-7.

88. Wang, J., et al., *Structure-based virtual screening and characterization of a novel IL-6 antagonistic compound from synthetic compound database*. Drug Des Devel Ther, 2016. **10**: p. 4091-4100.
89. Yamamoto, D., et al., *Design, synthesis, and biological activities of madindoline analogues*. Bioorg Med Chem Lett, 2006. **16**(10): p. 2807-11.
90. Gennari, L., et al., *Bazedoxifene for the prevention of postmenopausal osteoporosis*. Therapeutics and clinical risk management, 2008. **4**(6): p. 1229-1242.
91. Quintanilla Rodriguez, B.S. and R. Correa, *Raloxifene*, in *StatPearls*. 2021, StatPearls Publishing

Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).

92. Xiao, H., et al., *Repositioning Bazedoxifene as a novel IL-6/GP130 signaling antagonist for human rhabdomyosarcoma therapy*. PLOS ONE, 2017. **12**(7): p. e0180297.
93. Song, D., et al., *Discovery of bazedoxifene analogues targeting glycoprotein 130*. Eur J Med Chem, 2020. **199**: p. 112375.
94. Yadav, A., et al., *Bazedoxifene enhances the anti-tumor effects of cisplatin and radiation treatment by blocking IL-6 signaling in head and neck cancer*. Oncotarget, 2017. **8**(40): p. 66912-66924.
95. Wu, X., et al., *Bazedoxifene as a Novel GP130 Inhibitor for Pancreatic Cancer Therapy*. Molecular Cancer Therapeutics, 2016. **15**(11): p. 2609-2619.
96. Chen, X., et al., *Blocking IL-6/GP130 Signaling Inhibits Cell Viability/Proliferation, Glycolysis, and Colony Forming Activity in Human Pancreatic Cancer Cells*. Curr Cancer Drug Targets, 2019. **19**(5): p. 417-427.
97. Wei, J., et al., *Correction to: Bazedoxifene as a novel GP130 inhibitor for Colon Cancer therapy*. J Exp Clin Cancer Res, 2019. **38**(1): p. 374.
98. Ma, H., et al., *Bazedoxifene exhibits growth suppressive activity by targeting interleukin-6/glycoprotein 130/signal transducer and activator of transcription 3 signaling in hepatocellular carcinoma*. Cancer Science, 2019. **110**(3): p. 950-961.
99. SMETANA, K., D. ROSEL, and J. BRÁBEK, *Raloxifene and Bazedoxifene Could Be Promising Candidates for Preventing the COVID-19 Related Cytokine Storm, ARDS and Mortality*. In Vivo, 2020. **34**(5): p. 3027-3028.
100. SMETANA, K. and J. BRÁBEK, *Role of Interleukin-6 in Lung Complications in Patients With COVID-19: Therapeutic Implications*. In Vivo, 2020. **34**(3 suppl): p. 1589-1592.
101. Yavropoulou, M.P., P. Makras, and A.D. Anastasilakis, *Bazedoxifene for the treatment of osteoporosis*. Expert Opin Pharmacother, 2019. **20**(10): p. 1201-1210.
102. Fu, S. and J. Lin, *Blocking Interleukin-6 and Interleukin-8 Signaling Inhibits Cell Viability, Colony-forming Activity, and Cell Migration in Human Triple-negative Breast Cancer and Pancreatic Cancer Cells*. Anticancer Res, 2018. **38**(11): p. 6271-6279.
103. Fabian, C.J., et al., *Effect of Bazedoxifene and Conjugated Estrogen (Duavee) on Breast Cancer Risk Biomarkers in High-Risk Women: A Pilot Study*. Cancer Prev Res (Phila), 2019. **12**(10): p. 711-720.
104. Burkhardt, C., et al., *Bazedoxifene as a novel strategy for treatment of pancreatic and gastric adenocarcinoma*. Oncotarget, 2019. **10**(34): p. 3198-3202.
105. MacKintosh, M.L. and E.J. Crosbie, *Prevention Strategies in Endometrial Carcinoma*. Curr Oncol Rep, 2018. **20**(12): p. 101.
106. Brábek, J., et al., *Repurposing of bazedoxifene to prevent cytokine storm in COVID-19 patients*. 2020.
107. Abramenko, N., et al., *Estrogen Receptor Modulators in Viral Infections Such as SARS-CoV-2: Therapeutic Consequences*. International Journal of Molecular Sciences, 2021. **22**(12).
108. Cherrak, S.A., H. Merzouk, and N. Mokhtari-Soulimane, *Potential bioactive glycosylated flavonoids as SARS-CoV-2 main protease inhibitors: A molecular docking and simulation studies*. PLOS ONE, 2020. **15**(10): p. e0240653.

109. Banerjee, R., L. Perera, and L.M.V. Tillekeratne, *Potential SARS-CoV-2 main protease inhibitors*. Drug Discov Today, 2021. **26**(3): p. 804-816.
110. Mouffouk, C., et al., *Flavonols as potential antiviral drugs targeting SARS-CoV-2 proteases (3CL(pro) and PL(pro)), spike protein, RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and angiotensin-converting enzyme II receptor (ACE2)*. Eur J Pharmacol, 2021. **891**: p. 173759.
111. Chiou, W.C., et al., *Repurposing existing drugs: identification of SARS-CoV-2 3C-like protease inhibitors*. J Enzyme Inhib Med Chem, 2021. **36**(1): p. 147-153.
112. Ghanbari, R., et al., *Existing antiviral options against SARS-CoV-2 replication in COVID-19 patients*. Future Microbiology, 2020. **15**(18): p. 1747-1758.
113. Mengist, H.M., et al., *Potency, Safety, and Pharmacokinetic Profiles of Potential Inhibitors Targeting SARS-CoV-2 Main Protease*. Frontiers in Pharmacology, 2021. **11**(2495).
114. Shah S., et al., *Bazedoxifene acetate formulations*. 2004.
115. M.B., F., Ali K. A., and S.S. M., *Bazedoxifene ascorbate*. 2004.
116. Kamano, Y., et al., *Isolation and Structure of a 20,21-Epoxybufenolide Series from "Ch'an Su"*. Journal of Natural Products, 2002. **65**(7): p. 1001-1005.
117. Serra, M., et al., *Understanding Metal Dynamics Between Cancer Cells and Macrophages: Competition or Synergism?* Front Oncol, 2020. **10**: p. 646.
118. Stanton, J.E., et al., *The Metallome as a Link Between the "Omes" in Autism Spectrum Disorders*. Front Mol Neurosci, 2021. **14**: p. 695873.
119. Greenough, M.A., J. Camakaris, and A.I. Bush, *Metal dyshomeostasis and oxidative stress in Alzheimer's disease*. Neurochemistry International, 2013. **62**(5): p. 540-555.
120. Pfeifhofer-Obermair, C., et al., *Iron in the Tumor Microenvironment-Connecting the Dots*. Front Oncol, 2018. **8**: p. 549.
121. Jung, M., et al., *Iron as a Central Player and Promising Target in Cancer Progression*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(2).
122. De Luca, A., et al., *Copper homeostasis as target of both consolidated and innovative strategies of anti-tumor therapy*. J Trace Elem Med Biol, 2019. **55**: p. 204-213.
123. Stafford, S.L., et al., *Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: emerging roles for zinc and copper*. Biosci Rep, 2013. **33**(4).
124. Halfdanarson, T.R., et al., *Hematological manifestations of copper deficiency: a retrospective review*. Eur J Haematol, 2008. **80**(6): p. 523-31.
125. Silberberg, D., *The High Impact of Neurologic Disorders in Developing Countries: The Struggle for Global Recognition*. Neurology, 2011. **77**(3): p. 307.
126. Scholefield, M., R.D. Unwin, and G.J.S. Cooper, *Shared perturbations in the metallome and metabolome of Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's, and dementia with Lewy bodies: A systematic review*. Ageing Research Reviews, 2020. **63**: p. 101152.
127. Singh, A., et al., *Oxidative Stress: A Key Modulator in Neurodegenerative Diseases*. Molecules, 2019. **24**(8).
128. Foster, M. and S. Samman, *Zinc and regulation of inflammatory cytokines: implications for cardiometabolic disease*. Nutrients, 2012. **4**(7): p. 676-94.
129. Ward, R.J., D.T. Dexter, and R.R. Crichton, *Neurodegenerative diseases and therapeutic strategies using iron chelators*. J Trace Elem Med Biol, 2015. **31**: p. 267-73.
130. Fischer-Fodor, E., et al., *Iron, inflammation and invasion of cancer cells*. Clujul Med, 2015. **88**(3): p. 272-7.
131. Wang, Y., et al., *Iron Metabolism in Cancer*. Int J Mol Sci, 2018. **20**(1).
132. Jian, J., et al., *A link between premenopausal iron deficiency and breast cancer malignancy*. BMC Cancer, 2013. **13**: p. 307.
133. Ganz, T. and E. Nemeth, *Iron Sequestration and Anemia of Inflammation*. Seminars in hematology, 2009. **46**: p. 387-93.
134. Candelaria, P.V., et al., *Antibodies Targeting the Transferrin Receptor 1 (TfR1) as Direct Anti-cancer Agents*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 607692.

135. Tang, X., *Tumor-associated macrophages as potential diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer*. *Cancer Lett*, 2013. **332**(1): p. 3-10.
136. Morales, M. and X. Xue, *Targeting iron metabolism in cancer therapy*. *Theranostics*, 2021. **11**(17): p. 8412-8429.
137. Prasad, S., S.C. Gupta, and A.K. Tyagi, *Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals*. *Cancer Lett*, 2017. **387**: p. 95-105.
138. Denoyer, D., et al., *Targeting copper in cancer therapy: 'Copper That Cancer'*. *Metallomics*, 2015. **7**(11): p. 1459-76.
139. Rigracciolo, D.C., et al., *Copper activates HIF-1 α /GPER/VEGF signalling in cancer cells*. *Oncotarget*, 2015. **6**(33): p. 34158-77.
140. Lin, W., L. Xu, and G. Li, *Molecular Insights Into Lysyl Oxidases in Cartilage Regeneration and Rejuvenation*. *Front Bioeng Biotechnol*, 2020. **8**: p. 359.
141. MacDonald, G., et al., *Memo is a copper-dependent redox protein with an essential role in migration and metastasis*. *Sci Signal*, 2014. **7**(329): p. ra56.
142. Steinbrueck, A., et al., *Transition metal chelators, pro-chelators, and ionophores as small molecule cancer chemotherapeutic agents*. *Chemical Society Reviews*, 2020. **49**(12): p. 3726-3747.
143. Mathesius, U., *Flavonoid Functions in Plants and Their Interactions with Other Organisms*. *Plants (Basel)*, 2018. **7**(2).
144. Putteeraj, M., et al., *Flavonoids and its Neuroprotective Effects on Brain Ischemia and Neurodegenerative Diseases*. *Curr Drug Targets*, 2018. **19**(14): p. 1710-1720.
145. Cherrak, S.A., et al., *In Vitro Antioxidant versus Metal Ion Chelating Properties of Flavonoids: A Structure-Activity Investigation*. *PLoS One*, 2016. **11**(10): p. e0165575.
146. Macáková, K., et al., *Iron reduction potentiates hydroxyl radical formation only in flavonols*. *Food Chem*, 2012. **135**(4): p. 2584-92.
147. Vlachodimitropoulou, E., P.A. Sharp, and R.J. Naftalin, *Quercetin-iron chelates are transported via glucose transporters*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2011. **50**(8): p. 934-944.
148. Melidou, M., K. Riganakos, and D. Galaris, *Protection against nuclear DNA damage offered by flavonoids in cells exposed to hydrogen peroxide: The role of iron chelation*. *Free Radical Biology and Medicine*, 2005. **39**(12): p. 1591-1600.
149. Kim, Y.A., et al., *Lipophilicity of flavonoid complexes with iron(II) and their interaction with liposomes*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013. **431**(4): p. 680-5.
150. Raza, A., et al., *Quercetin-Iron Complex: Synthesis, Characterization, Antioxidant, DNA Binding, DNA Cleavage, and Antibacterial Activity Studies*. *Journal of Fluorescence*, 2016. **26**(6): p. 2023-2031.
151. Yen, G.C., et al., *Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2003. **67**(6): p. 1215-22.
152. Kejík, Z., et al., *Iron Complexes of Flavonoids-Antioxidant Capacity and Beyond*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(2).
153. Campbell, N.R. and B.B. Hasinoff, *Iron supplements: a common cause of drug interactions*. *British journal of clinical pharmacology*, 1991. **31**(3): p. 251-255.
154. Robinson, M. and J. Horn, *Clinical pharmacology of proton pump inhibitors - What the practising physician needs to know*. *Drugs*, 2003. **63**(24): p. 2739-2754.
155. Abbas, M.K., et al., *The Safety of Long-term Daily Usage of a Proton Pump Inhibitor: A Literature Review*. *Cureus*, 2019. **11**(9): p. e5563.
156. Novotny, M., B. Klimova, and M. Valis, *PPI Long Term Use: Risk of Neurological Adverse Events?* *Frontiers in Neurology*, 2019. **9**.
157. Imai, R., et al., *Iron Deficiency Anemia Due to the Long-term Use of a Proton Pump Inhibitor*. *Internal Medicine*, 2018. **57**(6): p. 899-901.

158. Sun, S., et al., *Proton pump inhibitor monotherapy and the risk of cardiovascular events in patients with gastro-esophageal reflux disease: a meta-analysis*. Neurogastroenterology and Motility, 2017. **29**(2).
159. Kedika, R.R., R.F. Souza, and S.J. Spechler, *Potential anti-inflammatory effects of proton pump inhibitors: a review and discussion of the clinical implications*. Digestive diseases and sciences, 2009. **54**(11): p. 2312-2317.
160. Zhang, Y., et al., *Differential effects of Cu(II) and Fe(III) on the binding of omeprazole and pantoprazole to bovine serum albumin: toxic effect of metal ions on drugs*. J Pharm Biomed Anal, 2011. **56**(5): p. 1064-8.
161. Russo, M.G., et al., *Synthesis, physicochemical characterization, DFT calculation and biological activities of Fe(III) and Co(II)-omeprazole complexes. Potential application in the Helicobacter pylori eradication*. Journal of Molecular Structure, 2014. **1061**: p. 5-13.
162. Mohamed, G.G., et al., *Metal complexes of omeprazole. Preparation, spectroscopic and thermal characterization and biological activity*. Journal of Coordination Chemistry, 2009. **62**(4): p. 645-654.
163. Rahman, N. and M. Kashif, *Hypothesis testing for the validation of the kinetic spectrophotometric methods for the determination of lansoprazole in bulk and drug formulations via Fe(III) and Zn(II) chelates*. Drug Test Anal, 2010. **2**(3): p. 137-43.
164. Dean, W., et al., *Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: Aberrant reprogramming in cloned embryos*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. **98**(24): p. 13734-13738.
165. Tahiliani, M., et al., *Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1*. Science, 2009. **324**(5929): p. 930-5.
166. Kriaucionis, S. and N. Heintz, *The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain*. Science, 2009. **324**(5929): p. 929-30.
167. He, Y.-F., et al., *Tet-Mediated Formation of 5-Carboxylcytosine and Its Excision by TDG in Mammalian DNA*. Science, 2011. **333**(6047): p. 1303-1307.
168. Guo, J.U., et al., *Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain*. Cell, 2011. **145**(3): p. 423-34.
169. Williams, K., et al., *TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 343-348.
170. Jin, C., et al., *TET1 is a maintenance DNA demethylase that prevents methylation spreading in differentiated cells*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(11): p. 6956-71.
171. Wu, H., et al., *Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells*. Nature, 2011. **473**(7347): p. 389-93.
172. Shi, D.Q., et al., *New Insights into 5hmC DNA Modification: Generation, Distribution and Function*. Frontiers in Genetics, 2017. **8**.
173. Huang, H., et al., *TET1 plays an essential oncogenic role in MLL-rearranged leukemia*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013. **110**(29): p. 11994-11999.
174. Cheng, T.L., et al., *Regulation of mRNA splicing by MeCP2 via epigenetic modifications in the brain*. Scientific Reports, 2017. **7**.
175. Ellison, E.M., E.L. Abner, and M.A. Lovell, *Multiregional analysis of global 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine throughout the progression of Alzheimer's disease*. J Neurochem, 2017. **140**(3): p. 383-394.
176. Zhao, J.Y., et al., *A genome-wide profiling of brain DNA hydroxymethylation in Alzheimer's disease*. Alzheimers & Dementia, 2017. **13**(6): p. 674-688.
177. Liang, Y., et al., *An epigenetic perspective on tumorigenesis: Loss of cell identity, enhancer switching, and NamiRNA network*. Semin Cancer Biol, 2018.
178. Good, C.R., et al., *TET1-Mediated Hypomethylation Activates Oncogenic Signaling in Triple-Negative Breast Cancer*. Cancer Res, 2018. **78**(15): p. 4126-4137.

179. Zhang, W., et al., *DNA hypomethylation-mediated activation of Cancer/Testis Antigen 45 (CT45) genes is associated with disease progression and reduced survival in epithelial ovarian cancer*. Epigenetics, 2015. **10**(8): p. 736-748.
180. Takai, H., et al., *5-Hydroxymethylcytosine plays a critical role in glioblastomagenesis by recruiting the CHTOP-methylosome complex*. Cell Rep, 2014. **9**(1): p. 48-60.
181. Sun, F., et al., *TET1 is an important transcriptional activator of TNF α expression in macrophages*. PLOS ONE, 2019. **14**(6): p. e0218551.
182. Luo, J., H. Yang, and B.-L. Song, *Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2020. **21**(4): p. 225-245.
183. Simons, K. and R. Ehehalt, *Cholesterol, lipid rafts, and disease*. The Journal of Clinical Investigation, 2002. **110**(5): p. 597-603.
184. Patel, K.K. and K. Kashfi, *Lipoproteins and cancer: The role of HDL-C, LDL-C, and cholesterol-lowering drugs*. Biochemical Pharmacology, 2021: p. 114654.
185. Jiang, W., et al., *Statins: a repurposed drug to fight cancer*. Journal of experimental & clinical cancer research : CR, 2021. **40**(1): p. 241-241.
186. Kodach, L.L., et al., *Statins augment the chemosensitivity of colorectal cancer cells inducing epigenetic reprogramming and reducing colorectal cancer cell 'stemness' via the bone morphogenetic protein pathway*. Gut, 2011. **60**(11): p. 1544-53.
187. Neto, R.N.M., et al., *Biotechnological Production of Statins: Metabolic Aspects and Genetic Approaches*. Curr Pharm Biotechnol, 2019. **20**(15): p. 1244-1259.
188. Dulak, J. and A. Józkwicz, *Anti-angiogenic and anti-inflammatory effects of statins: relevance to anti-cancer therapy*. Current cancer drug targets, 2005. **5**(8): p. 579-594.
189. Hamelin, B.A. and J. Turgeon, *Hydrophilicity/lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors*. Trends Pharmacol Sci, 1998. **19**(1): p. 26-37.
190. Kato, S., et al., *Lipophilic but not hydrophilic statins selectively induce cell death in gynaecological cancers expressing high levels of HMGCoA reductase*. J Cell Mol Med, 2010. **14**(5): p. 1180-93.
191. Menter, D.G., et al., *Differential effects of pravastatin and simvastatin on the growth of tumor cells from different organ sites*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28813.
192. Hromádka, R., et al., *Pigments from Filamentous Ascomycetes for Combination Therapy*. Curr Med Chem, 2019. **26**(20): p. 3812-3834.
193. Stonis, J., et al., *Mixture of stabilized biologically available curcumin for orodispersible formulations, formulations of biologically available curcumin, and an orodispersible tablet with biologically available curcumin, and its application*. 2018. p. US 2018/0325842 A1.
194. Stonis, J., et al., *Mixture of stabilized biologically available curcumin for orodispersible formulations, formulations of biologically available curcumin, and an orodispersible tablet with biologically available curcumin, and its application*. 2017. p. (2017-260) EP 3400932 A1 20181114.
195. Stonis, J., et al., *Orodispergovatelná tableta s biodostupným kurkuminem a její použití* 2017. p. (2017-260).
196. Tsugama, D., S.K. Liu, and T. Takano, *Evaluation of Fe(III) reduction by mitochondria induced with a respiratory substrate NADH or succinate, using a Fe(II)-specific chelator bathophenanthroline disulfonate in Saccharomyces cerevisiae*. Biologia, 2009. **64**(5): p. 877-880.
197. Stauffer, M.T., L.J. Hunter, and S.K. Troncone, *Determination of iron in abandoned mine drainage by UV-Vis spectrophotometry and flame atomic absorption spectrophotometry*. Spectroscopy Letters, 2007. **40**(3): p. 429-437.
198. Hamada-Kanazawa, M., et al., *beta-Citryl-L-glutamate Is an Endogenous Iron Chelator That Occurs Naturally in the Developing Brain*. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2010. **33**(5): p. 729-737.

199. Park, G., et al., *Novel iron complexes and chelators based on cis,cis-1,3,5-triaminocyclohexane: iron-mediated ligand oxidation and biochemical properties*. Journal of Biological Inorganic Chemistry, 1998. **3**(5): p. 449-457.
200. Phonsri, W., et al., *Halogen Substitution Effects on N2O Schiff Base Ligands in Unprecedented Abrupt Fe-II Spin Crossover Complexes*. Chemistry-a European Journal, 2017. **23**(29): p. 7052-7065.
201. Kaplánek, R., et al., *Caffeine-hydrazones as anticancer agents with pronounced selectivity toward T-lymphoblastic leukaemia cells*. Bioorg Chem, 2015. **60**: p. 19-29.
202. Jakubek, M., et al., *Perimidine-based synthetic receptors for determination of copper(II) in water solution*. Supramolecular Chemistry, 2018. **30**(3): p. 218-226.
203. Jakubek, M., et al., *Benzoisothiazole-1,1-dioxide-based synthetic receptor for zinc ion recognition in aqueous medium and its interaction with nucleic acids*. Supramolecular Chemistry, 2019. **31**(1): p. 19-27.
204. Siddiqi, K., et al., *Binding Constant: Fluorescence Quenching of Ciprofloxacin with Fe (III) and Zn (II)*. ASIAN JOURNAL OF CHEMISTRY, 2010. **22**: p. 1957-1965.
205. Campbell, N.R.C. and B.B. Hasinoff, *Iron Supplements - a Common Cause of Drug-Interactions*. British Journal of Clinical Pharmacology, 1991. **31**(3): p. 251-255.
206. Sarzynski, E., et al., *Association Between Proton Pump Inhibitor Use and Anemia: A Retrospective Cohort Study*. Digestive Diseases and Sciences, 2011. **56**(8): p. 2349-2353.
207. Schneider, S.A., G. Zorzi, and N. Nardocci, *Pathophysiology and Treatment of Neurodegeneration With Brain Iron Accumulation in the Pediatric Population*. Current Treatment Options in Neurology, 2013. **15**(5): p. 652-667.
208. Petronek, M.S., et al., *Linking Cancer Metabolic Dysfunction and Genetic Instability through the Lens of Iron Metabolism*. Cancers, 2019. **11**(8).
209. Fernandez-Real, J.M., D. McClain, and M. Manco, *Mechanisms Linking Glucose Homeostasis and Iron Metabolism Toward the Onset and Progression of Type 2 Diabetes*. Diabetes Care, 2015. **38**(11): p. 2169-76.
210. Fuentes, A.V., M.D. Pineda, and K.C.N. Venkata, *Comprehension of Top 200 Prescribed Drugs in the US as a Resource for Pharmacy Teaching, Training and Practice*. Pharmacy (Basel), 2018. **6**(2).
211. Eghbali, A., et al., *Pantoprazole reduces serum ferritin in patients with thalassemia major and intermedia: A randomized, controlled study*. Therapie, 2019.
212. Zhou, T., et al., *Design of iron chelators with therapeutic application*. Dalton Transactions, 2012. **41**(21): p. 6371-6389.
213. Frija, L.M.T., et al., *Synthesis and structure of novel benzisothiazole-tetrazolyl derivatives for potential application as nitrogen ligands*. Journal of Molecular Catalysis a-Chemical, 2009. **305**(1-2): p. 142-146.
214. Vasta, J.D. and R.T. Raines, *Selective inhibition of prolyl 4-hydroxylases by bipyridinedicarboxylates*. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2015. **23**(13): p. 3081-3090.
215. Chong, H.S., et al., *Novel Cu-64-radiolabeled bile acid conjugates for targeted PET imaging*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2015. **25**(5): p. 1082-1085.
216. Anelli, P.L., et al., *Conjugates of gadolinium complexes to bile acids as hepatocyte-directed contrast agents for magnetic resonance Imaging*. Journal of Medicinal Chemistry, 2004. **47**(14): p. 3629-3641.
217. Campazzi, E., et al., *Organometallic radiopharmaceuticals: rhenium(I) carbonyl complexes of natural bile acids and derivatives*. Inorganica Chimica Acta, 1999. **286**(1): p. 46-54.
218. Stierle, D.B., A.A. Stierle, and T. Bugni, *Sequoiamonascins A-D: Novel Anticancer Metabolites Isolated from a Redwood Endophyte*. The Journal of Organic Chemistry, 2003. **68**(12): p. 4966-4969.
219. Woo, P.C.Y., et al., *The biosynthetic pathway for a thousand-year-old natural food colorant and citrinin in Penicillium marneffeii*. Scientific Reports, 2014. **4**.

220. Chen, W., et al., *Orange, red, yellow: biosynthesis of azaphilone pigments in Monascus fungi*. *Chemical Science*, 2017. **8**(7): p. 4917-4925.
221. Zhu, J., A.R. Germain, and J.A. Porco, Jr., *Synthesis of azaphilones and related molecules by employing cycloisomerization of o-alkynylbenzaldehydes*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2004. **43**(10): p. 1239-43.
222. Zhu, J. and J.A. Porco, *Asymmetric Syntheses of (-)-Mitorubrin and Related Azaphilone Natural Products*. *Organic Letters*, 2006. **8**(22): p. 5169-5171.
223. Achard, M., A.B. Beeler, and J.A. Porco, Jr., *Synthesis of azaphilone-based chemical libraries*. *ACS combinatorial science*, 2012. **14**(3): p. 236-244.