



# Možnosti uporabe protimikrobnih učinkovin pri zdravljenju raka

Possible use of antimicrobial agents in cancer therapy

Ana Mitrović,<sup>1</sup> Janko Kos<sup>1,2</sup>

## Izvleček

Rak je veliko breme za zdravstvene sisteme in še vedno drugi najpogostejši vzrok smrti v razvitem svetu. Zato se, kljub velikem napredku v zadnjih letih, še vedno veliko sredstev usmerja v iskanje novih učinkovitejših protitumorskih zdravil, ki bi omogočila bolj učinkovito zdravljenje, daljše preživetje bolnikov z rakom, preprečila ponovni pojav raka in zmanjšala stranske učinke, povezane z zdravljenjem raka, s tem pa povečala kakovost življenja bolnikov z rakom. Uvajanje novih zdravil v klinično uporabo pa je hkrati povezano z vse večjimi stroški. Zato je zaradi velike potrebe po prepoznavanju novih protitumorskih zdravil iskanje novih indikacij za že obstoječa zdravila na področju onkologije pritegnilo veliko pozornosti. Pri tem se je med drugim protitumorsko delovanje pokazalo tudi za nekatere antibiotike in druge protimikrobne učinkovine. Slednje se je med drugim izkazalo za doksiciklin, klorokin, nitroksolin in nekatere predstavnike fluorokinolonov. V preglednem članku povzemamo različne molekulske mehanizme, uporabljene tumorske modele in raziskave, ki opredeljujejo njihovo protitumorsko delovanje. To so prikazale številne neodvisne študije tako *in vitro* kot *in vivo*, strukture obstoječih učinkovin pa so se hkrati uporabile kot spojine za razvoj novih derivatov in identificiranje strukturnih elementov, ki izboljšajo protitumorsko delovanje. Te raziskave tako kažejo na nove možnosti za uporabo že dobro znanih učinkovin, ki bi lahko razširile svoj spekter uporabe in samostojno ali v kombinaciji z že obstoječim zdravljenjem izboljšale uspešnost protitumorskega zdravljenja.

## Abstract

Cancer represents a major burden for health systems and is the second leading cause of death in the developed world. Despite major progress during past years, a lot of resources are still directed towards the identification of new antitumour drugs that would allow more efficient treatment, and prolonged patients' survival, lower cancer recurrence rate, and decreased side effects associated with cancer therapy, thus increased quality of life for cancer patients. However, the introduction of new drugs to clinical practice is associated with high costs. To keep the health system sustainable, the search for

<sup>1</sup> Odsek za biotehnologijo, Inštitut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija

<sup>2</sup> Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

**Korespondenca / Correspondence:** Ana Mitrović, e: [ana.mitrovic@ijs.si](mailto:ana.mitrovic@ijs.si)

**Ključne besede:** premeščanje zdravil; protitumorska terapija; protimikrobne učinkovine; rak; iskanje novih učinkovin

**Key words:** drug repurposing; antitumour therapy; antimicrobial agents; cancer; drug discovery

**Prispelo / Received:** 2. 11. 2020 | **Sprejeto / Accepted:** 16. 3. 2021

**Citirajte kot/Cite as:** Mitrović A, Kos J. Možnosti uporabe protimikrobnih učinkovin pri zdravljenju raka. Zdrav Vestn. 2022;91(5–6):215–25.

**DOI:** <https://doi.org/10.6016/ZdravVestn.3188>



Avtorske pravice (c) 2022 Zdravniški Vestnik. To delo je licencirano pod Creative Commons Priznanje avtorstva-Nekomercialno 4.0 mednarodno licenco.

new indications of existing drugs has attracted a lot of attention in the field of oncology. Among others, antitumour activity has been shown for some antibiotics and other antimicrobial agents, including doxycycline, chloroquine, nitroxoline, and certain fluoroquinolones. In this review, we summarize various molecular mechanisms and tumour models used to define their antitumour activity. The latter has been demonstrated in a number of independent studies both *in vitro* as well as *in vivo*. Moreover, structures of existing compounds were used as lead compounds for the development of new derivatives and the identification of structural elements that improve antitumour activity. Together, these studies point to new possibilities for the use of already well-established drugs, which could expand their range, and, either, alone or in combination with existing therapy, improve the effectiveness of antitumour therapy.

## 1 Uvod

Pri raku gre za eno največjih zdravstvenih težav takoj za srčno-žilnimi boleznimi in je drugi najpogostejši vzrok smrti v razvitem svetu, vključno s Slovenijo. Po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije, SZO (*angl.* WHO) je leta 2018 po svetu za rakom umrlo 9,6 milijonov ljudi (1). Poleg velikega zdravstvenega problema pa je rak danes v sodobni družbi tudi veliko socialno in ekonomsko breme (1). Kljub velikemu napredku v zadnjih letih se pri zdravljenju raka še vedno spopadamo s številnimi izzivi (2). Ključni izzivi pri razvoju učinkovitejše terapije so preprečevanje ponovnega pojava raka, izogibanje odpornosti na terapijo in zmanjšanje številnih stranskih učinkov, ki so povezani z večino terapevtskih pristopov, ki se trenutno uporabljajo v klinični praksi in še dodatno zmanjšujejo kakovost življenja bolnikov z rakom (3). Razvoj novih zdravil je povezan z izredno visokimi stroški, ki se samo še povečujejo, zaradi česar se je v zadnjem desetletju, kljub visokim investicijam v raziskave in razvoj, število novih zdravil na trgu zmanjšalo (4).

Kot odgovor na visoke stroške in majhno število zdravil, ki uspešno prestanejo vse faze testiranja in pridejo na trg, se vedno več pozornosti posveča iskanju novih indikacij in možnosti uporabe zdravil, ki so že na trgu (*angl.* drug repurposing, repositioning) (5,6). Pri teh zdravilih so že dobro znani njihovi toksikološki profili, toleranca, farmakokinetične in farmakodinamične lastnosti, kar so tudi glavne prednosti, ki povečujejo njihove možnosti za uporabo pri zdravljenju raka. Za obstoječa zdravila poleg tega poznamo njihov način odmerjanja, farmakološke lastnosti in njihove interakcije z drugimi zdravili (2,5-7). Zaradi številnih že znanih podatkov je uporaba že obstoječih zdravilnih učinkovin za nove indikacije tako povezana s krajšim časom in manjšimi stroški, ki so potrebni za njihov uspešen prenos v klinično uporabo (2,5,6).

Pri iskanju novih indikacij za že obstoječa zdravila je v prvi vrsti najprej potrebno podrobno raziskati njihov mehanizem delovanja na nove tarče ter njihovo učinkovitost in varnost preveriti v kliničnih študijah, saj je

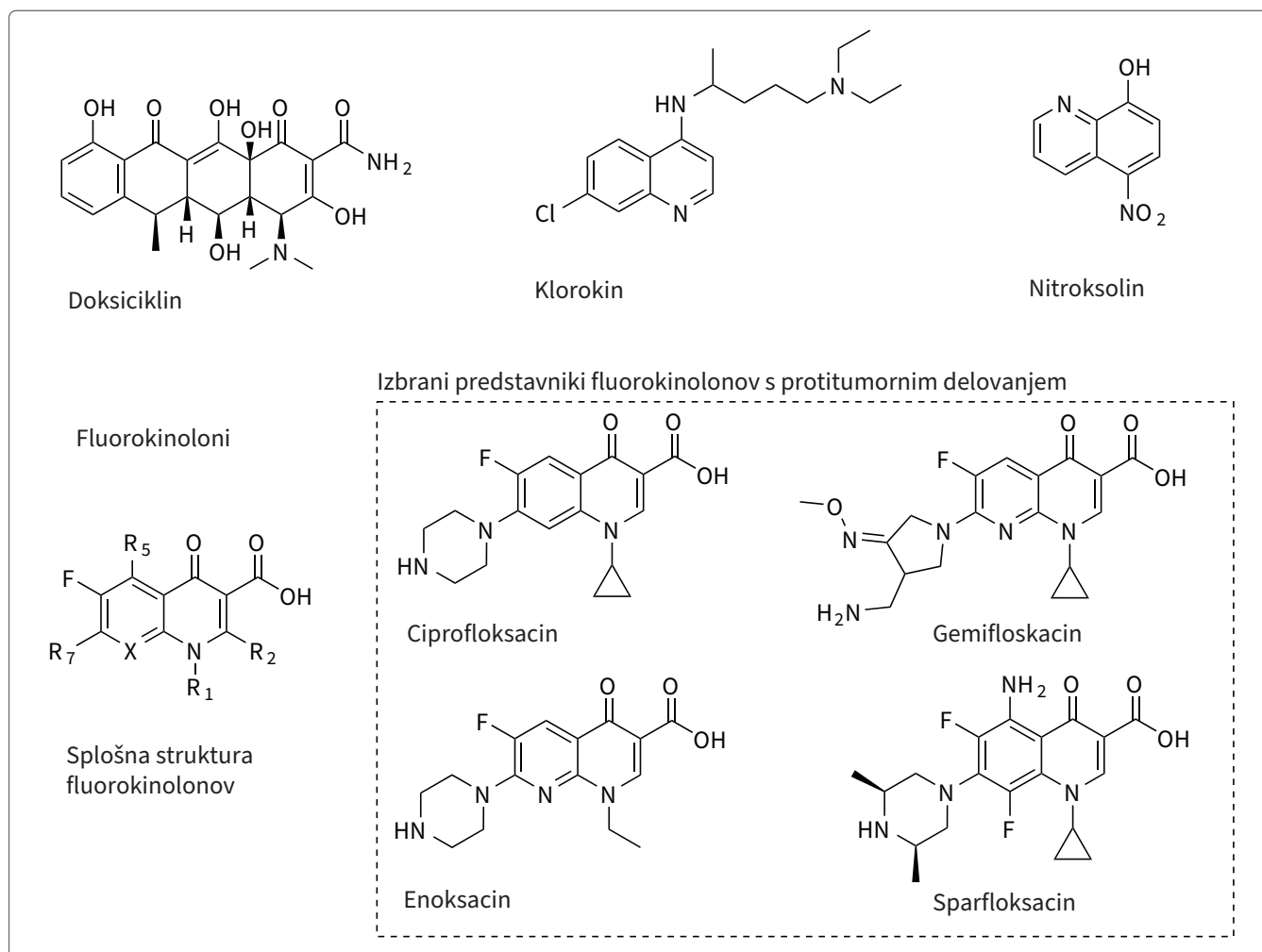
lahko uporaba zdravila za novo indikacijo povezana z novimi še nepoznanimi stranskimi učinki (5,6). Vendar pa je pri obstoječih zdravilih možen hitrejši prehod v 2. in 3. fazo kliničnih testiranj zaradi številnih znanih informacij, pridobljenih že v predhodnih predkliničnih in kliničnih testiranjih (2). Poleg zdravil, ki so v klinični uporabi, pa so za iskanje novih indikacij zelo primerne tudi zdravilne učinkovine, ki so se v kliničnih testiranjih izkazale kot varne, vendar zaradi drugih razlogov niso prišle v klinično uporabo (6).

Zaradi velike potrebe po prepoznavanju novih bolj učinkovitih učinkovin je iskanje novih indikacij pri že obstoječih zdravilih posebej veliko pozornosti pritegnilo na področju onkologije (3,5). Danes je tako znano, da številne učinkovine, ki so v uporabi za zdravljenje drugih indikacij in se razlikujejo tako po svoji strukturi kot mehanizmu delovanja, lahko pokažejo tudi protitumorsko delovanje. Med drugim so protitumorsko delovanje že dokazali za talidomid, metformin, acetilsalicilno kislino, statine, raloksifen, tamoksifen, nekatere antidepresive in antipsihotike in mnoga druga zdravila (2,5).

Poleg teh se je protitumorsko delovanje pokazalo tudi pri nekaterih antibiotikih in protimikrobnih učinkovinah, med drugim za doksiciklin, klorokin, nitroksolin in florokinolone (Slika 1). V preglednem članku se bomo osredotočili na možnost uporabe nekaterih protimikrobnih učinkovin za zdravljenje raka in predstavili možne mehanizme za njihovo protitumorsko delovanje.

## 2 Doksiciklin

Doksiciklin (Slika 1) je antibiotik iz skupine tetraciklinov, ki se uporablja za zdravljenje širokega spektra bakterijskih okužb (5,8). Uporablja se tudi profilaktično za preprečevanje malarije, v kombinaciji s kininom, pa je učinkovit tudi pri zdravljenju malarije. Doksiciklin se po peroralnem jemanju hitro absorbira in prestopi krvno-možgansko pregrado, znane so njegove farmakokinetične lastnosti in razpolovni čas, bolniki pa ga po



**Slika 1:** Strukture protimikrobnih učinkovin, ki izkazujejo protitumorsko delovanje.

jemanju načeloma dobro prenašajo (8).

V zadnjih letih je več raziskav pokazalo, da ima doksiciklin poleg močnega protibakterijskega delovanja tudi protitumorsko delovanje. Protitumorsko delovanje doksiciklina so pokazali pri različnih vrstah raka, vključno z rakom dojk, materničnega vratu, jajčnikov, prostate, pljuč, ustne votline, trebušne slinavke in dvanajstnika, rakom debelega črevesa in danke, melanomom in levkemijo (5,8). Pri celicah levkemije so že pred več kot 30 leti pokazali, da zdravljenje z doksiciklinom zavira proliferiranje celic T in vodi v njihovo popolno uničenje, pri čemer so pokazali, da je mehanizem delovanja doksiciklina odvisen od njegove koncentracije in stopnje napredovanja tumorja (9).

Skupaj je bilo opisanih več mehanizmov, preko katerih doksiciklin zavira nastanek in napredovanje tumorjev (8). Kot eden od njegovih mehanizmov delovanja doksiciklin zavira matriks metalopeptidazi MMP-2 in MMP-9, ki sta pomembno udeleženi v različnih procesih

nastanka in napredovanja raka. Dodatno zavira aktivnost MMP še s povečanjem izražanja tkivnega inhibitorja MMP-2 (TIMP-2) (5,10-12). Na živalskih modelih so pokazali, da doksiciklin z inhibiranjem MMP-2 in MMP-9 zavira nastanek metastaz (5,13,14). Nadalje doksiciklin zavira napredovanje raka preko številnih signalnih poti (5,8). Med drugim neposredno zavira signalizacijo s proteazami aktiviranega receptorja 1 (PAR-1) in zniža signalizacijo VEGF (10,15,16). Doksiciklin zavira adhezijo, migracijo in invazijo tumorskih celic tudi z zaviranjem izražanja in fosforilacije adhezijskih molekul, kot je središčna adhezijska kinaza (FAK) pri celicah levkemije in pri celicah melanoma (11,12). Angiogenezo in migracijo rakavih celic zmanjša tudi z inhibiranjem izražanja interleukina 8 (IL-8) (17). Z inhibiranjem signalnih poti doksiciklin inhibira invazijo tumorskih celic, epitelno-mezenhimski prehod tumorskih celic in nastanek metastaz (5,8,14).

Doksiciklin sproži apoptozo in zavira proliferiranje

celic (8,17). Pri zaviranju apoptoze je udeležen tako v poti, odvisni od mitohondrijev, kakor tudi poti, odvisni od kaspaz (8,18). Za celice raka prostate so pokazali, da doksiciklin povzroči zastoj celičnega cikla v fazi G2/M (19). Glede na rezultate pri različnih tipih raka, doksiciklin spodbuja apoptozo in zavira proliferacijo celic z zaviranjem različnih molekularskih tarč, ki so pomembno udeležene v teh procesih (8).

Kot protitumorska učinkovina je doksiciklin predvsem zanimiv zaradi delovanja proti tumorskim matičnim celicam (8). Pri raku materničnega vratu so pokazali, da doksiciklin zmanjša izražanje označevalcev tumorskih matičnih celic, kot so SOX-2, OCT-4, NANOG in NOTCH (20).

Protitumorsko delovanje doksiciklina so ovrednotile tudi klinične študije. Pri tem pa v 2. fazi klinične študije na bolnikih z rakom dojke in metastazami na kosteh doksiciklin ni pokazal značilnih učinkov (21), medtem ko se je v majhni pilotni klinični študiji, ki je vključevala 15 bolnikov, njegov pozitiven učinek pokazal pri skoraj 90 % oseb z zgodnjo obliko raka dojke, ki so prejeli doksiciklin 14 dni pred operacijo. Pri tem se je v vzorcih tumorjev po jemanju doksiciklina zmanjšalo izražanje označevalcev tumorskih matičnih celic (22), kar ponuja obetavne možnosti za njegovo uporabo pri zdravljenju raka. To pa je potrebno še dodatno ovrednotiti v bolj obsežni klinični študiji.

Doksiciklin je učinkovit tudi v kombinaciji z drugimi znanimi kemoterapevtiki, zato je obetavna učinkovina, ki se že uporablja v klinični praksi in bi se lahko uporabila v onkologiji za zdravljenje raka samostojno ali skupaj s skupaj z že običajno terapijo za zdravljenje raka in preprečevanje, da se ta ponovno pojavi (8).

### 3 Klorokin

Klorokin (7-kloro-4-(4-dietilamino-1-metilbutilamino)-kinolin) (Slika 1) in njegov analog hidroksiklorokin se uporabljata za preprečevanje in zdravljenje malarije (23-25). Klorokin je stara učinkovina, sintetizirana že leta 1934. Uporabljala se je kot učinkovina izbire pri zdravljenju malarije, dokler se niso pojavili nanjo odporni sevi (24). Pozneje se je uporaba razširila tudi za zdravljenje revmatoidnega artritis in lupusa eritematozusa (23,25). Protitumorsko delovanje klorokina so prvič opazili že v 70. letih, ko se je med študijo njegovega učinka proti malariji v skupini, ki je prejela klorokin, zmanjšala pojavnost Burkittovega limfoma. Slednje je šele pozneje pritegnilo več zanimanja (26). Do danes pa so protitumorsko delovanje klorokina in hidroksiklorokina prikazali v več *in vitro* in *in vivo* študijah na mišjih

modelih z različnimi tipi raka, vključno z rakom dojke, jeter, debelega črevesa, glioblastomom in z melanomom. Zmanjšal je napredovanje tumorjev in upočasnil njihovo rast (25). Na mišjem modelu raka jeter pa so pokazali tudi zmanjšanje števila in velikosti metastaz v pljučih (27).

Kot protitumorski učinkovini se lahko klorokin in hidroksiklorokin uporabljata samostojno ali kot podporno zdravljenje za izboljšanje učinka kemoterapije in radioterapije pri različnih tipih raka. Trenutno sta vključena v več kliničnih študij (23-25). Na naslovu [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) je bilo februarja 2021 registriranih 21 kliničnih študij za uporabo klorokina pri raku in 89 kliničnih študij za hidroksiklorokin, ki se nahajajo v različnih stopnjah, mnoge od njih še potekajo, rezultati pa so že dostopni le za nekatere študije (28). V kliničnih študijah so bolniki klorokin in hidroksiklorokin večinoma prejeli v kombinaciji z drugimi protitumorskimi učinkovinami (25,28). Dosedanji rezultati kažejo, da se je pri nekaterih vrstah raka pri bolnikih, ki so kot podporno terapijo prejeli klorokin ali hidroksiklorokin, podaljšalo preživetje v primerjavi s kontrolno skupino (25,29). Znatno izboljšanje preživetja bolnikov, ki so poleg radioterapije in kemoterapije prejeli klorokin, so opazili že v eni prvih kliničnih študij, ki so jo začeli maja 1998 pri 18 bolnikih z glioblastomom (30). Podobno izboljšanje v preživetju bolnikov z glioblastomom, ki so poleg običajne kemoterapije in obsevanja prejeli klorokin, v primerjavi s tistimi, ki so prejeli placebo, so opazili tudi v klinični študiji, izvedeni oktobra 2000. V študiji je bilo v vsako skupino vključenih 15 bolnikov (31). V retrospektivni študiji so zbrali vse podatke, pridobljene v obdobju 5 let, od 41 bolnikov z glioblastomom, ki so prejeli klorokin kot pomožno terapijo in niso bili vključeni v prej omenjeni študiji (31). V dveh neodvisnih študijah 2. faze klinične študije (32) in prospektivni študiji so na eni skupini (33) pri bolnikih z metastazami na možganih pokazali, da klorokin poveča občutljivost celic na radioterapijo pri bolnikih z možganskimi metastazami. Podaljša tako obdobje brez napredovanja metastaz in celokupno preživetje, kar nakazuje možnost za njegovo uporabo kot podporno zdravljenje pri obsevanju (25). Nadalje je več kliničnih študij na različnih tipih raka pokazalo, da dodatek hidroksiklorokina k običajni terapiji izboljša odziv na terapijo z zaviranjem avtofagije (25).

Zaradi dolgotrajne uporabe v klinični praksi so stranski učinki klorokina in hidroksiklorokina dobro znani. Po njuni kratkotrajni uporabi se redko pojavijo resni stranski učinki. Lahko pa se pojavijo neželeni toksični učinki, zlasti nefrotoksičnosti, po daljšem jemanju višjih odmerkov in jemanju hkrati z drugimi protitumorskimi učinkovinami (23,25,34). Prisotnost dodatne skupine

hidroksi pri hidroksiklorokinu značilno zmanjša toksičnost in vpliva na farmakokinetične lastnosti spojine, medtem ko razlike v protitumorskem delovanju klorokina in hidroksiklorokina niso povsem znane (25,35).

Klorokin in hidroksiklorokin sta dobro topna in se hitro ter dobro absorbirata že po peroralnem jemanju (24,25). Klorokin je šibka baza in se pri fiziološkem pH 7,4 nahaja v neprotonirani ali delno protonirani obliki, zaradi česar dobro prehaja celične membrane in vstopa v kisle predele celic. Kot šibka baza se klorokin po vstopu v kislino okolje lizosomov protonira in zadržuje v lizosomih. Pri tem pride tudi po povišanju pH v lizosomih, zaradi česar se zmanjša njihovo delovanje, saj ima večina proteinov, prisotnih v lizosomih, svoj optimum delovanja pri kislem pH (23-25).

Zadrževanje klorokina znotraj celic vodi k inhibiciji avtofagije, ki je eden ključnih mehanizmov njegovega protitumorskega delovanja (23-25,34). Klorokin in hidroksiklorokin zavirata avtofagijo z inhibiranjem zlitja avtofagosomov in razgradnje znotraj lizosomov zaradi zvišanja pH (25,36). Na avtofagijo vpliva tudi preko PI3K/Akt/mTOR signalne poti, pri kateri ima sinergistični učinek skupaj z inhibitorji AMPK signalne poti in aktivirane kinaze signalne poti Janus 2 (JAK2) / STAT3 (23,25,37). Poleg zgodnje avtofagije klorokin zavira tudi pozne faze avtofagije in lahko sproži celično smrt tudi pri pogojih, pri katerih inhibitorji zgodnjih stopenj avtofagije tega ne zmorejo (23).

Več neodvisnih študij je pokazalo tudi protitumorsko delovanje klorokina v neodvisnosti od inhibiranja avtofagije (24). Eden od mehanizmov je tako modulacija celičnega metabolizma, kar vpliva na metabolizem aminokislin, glukoze in na metabolizem v mitohondrijih (23,24). Klorokin in hidroksiklorokin vplivata tudi na apoptozo in zaustavitev celičnega cikla z regulacijo molekul, ki so pomembno udeležene pri teh procesih (25). Med drugim lahko klorokin sproži celično smrt tudi preko z lizosomi spodbujene apoptoze z delovanjem na katepsine (24). Pri reguliranju celičnega stresa in modulatorjev vnetja je klorokin udeležen tudi z reguliranjem proteostaze preko sistema ubikvitin/proteasom (23). Na proliferacijo celic in njihovo preživetje pa vpliva tudi z delovanjem na aktivnost glutamat dehidrogenaze (25). Dodatno klorokin deluje protitumorsko z normalizacijo tumorskih žil z zmanjšanjem gostote žil in s povečano tvorbo tesnih stikov (25,38).

Znanih je več molekularskih tarč protitumorskega delovanja klorokina in hidroksiklorokina, vključno s signalnimi potmi transkripcijskega faktorja NF- $\kappa$ B, tumor supresorskega dejavnika p53 in signalno potjo CXCL12/CXCR4 (24,25). Z inhibiranjem signalne poti CXCL12/

CXCR4 klorokin zmanjša fosforiliranjesignalnih molekul ERK in STAT3 (25) in s tem deluje tudi na tumorske matične celice (23). Poleg tega na celični liniji raka žolčnih vodov klorokin zavira metastaziranje tumorskih celic z vplivom na s hipoksijo induciran faktor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), VEGF in na proces epitelno-mehenhimskega prehoda (25).

Z inhibiranjem avtofagije lahko klorokin obide omejitve obstoječe kemoterapije, saj je avtofagija med drugim eden ključnih procesov za preživetje in odpornost na obstoječo kemoterapijo pri tumorskih matičnih celicah in omogoča epitelno-mezenhimski prehod tumorskih celic. To je eden od procesov, pri katerem lahko celice pridobijo lastnosti tumorskih matičnih celic (23,25). Pri tumorskih matičnih celicah so pokazali, da klorokin pri koncentraciji 20  $\mu$ M s specifičnim delovanjem na avtofagijo vpliva na matičnost (23,39). Nadalje so pokazali, da pri tumorskih matičnih celicah v nizkih mikromolarnih koncentracijah vpliva na signalne poti JAK2/STAT3, Hedgehog in CXCR4, izražanje DNA metil transferaze ter izražanje označevalcev matičnosti (23,25,40). Poleg tega so za klorokin v več študijah pokazali, da je udeležen tudi pri uravnavanju imunskega sistema in vnetnega odziva preko različnih mehanizmov (23,24).

Klorokin ob sočasni uporabi izboljša učinek kemoterapije in radioterapije. Z inhibiranjem avtofagije poveča občutljivost tumorskih celic na radioterapijo, kar so pokazali pri različnih tipih raka vključno z rakom dojke, pljuč in gliomom. Metaanaliza opravljenih raziskav je pokazala, da dodatek klorokina h kemoterapiji ali k radioterapiji poveča preživetje bolnikov in podaljša čas brez bolezni (23). Klorokin in hidroksiklorokin imata sinergistični učinek z inhibitorji BET že v nizkih koncentracijah in povzročita apoptozo tumorskih matičnih celic pri raku trebušne slinavke in akutni mieloidni levkemiji (23,41,42). Klorokin poveča učinkovitost in ubijanje tumorskih celic tudi v kombinaciji z inhibitorji celičnega cikla in vodi v apoptozo skupaj z inhibitorji proteasoma, kot so pokazali na mišjem modelu raka jeter (23,43). Nadalje so sinergističen učinek na celično smrt pokazali tudi z inhibitorji signalne poti AMPK in signalne poti STAT3 (23).

Kljub obetavnim rezultatom predkliničnih študij se v kliničnih študijah še ni pokazal zadosten protitumorski učinek klorokina. Ključna vzroka za to bi bila lahko slabše prehajanje klorokina v tumorske celice zaradi kislega zunajceličnega okolja tumorjev in pa dejstvo, da klorokin z inhibiranjem avtofagije v lizosomih pomembno vpliva na uravnavanje imunskega odziva (23,25). Poleg tega pa se zaradi različne odvisnosti tumorjev od avtofagije pri različnih tipih tumorjev razlikuje odziv na



terapijo s klorokinom (25). Hkrati pa so pokazali, da so za doseganje terapevtskega učinka na inhibiranje avtofagije pri levkemiji potrebne visoke koncentracije klorokina, kar omejuje njegovo uporabo. Ne glede na to pa so pokazali, da klorokin vpliva na tumorske celice, ki metastazirajo in se ne nahajajo v kislem tumorskem okolju ter so še posebej občutljive na inhibiranje lizosomov. Tako se zmanjša možnost nastanka metastaz (23). Pri trojno negativnem raku dojke klorokin uspešno ubija tumorske matične celice in zmanjša sposobnost tumorjev, da metastazirajo na mišjih modelih tako *in vitro* kot *in vivo* (44). Pokazalo se je, da klorokin deluje predvsem na tumorske celice z lastnostmi tumorskih matičnih celic. Zato je njegova uporaba smiselna predvsem ob sočasni uporabi učinkovin, ki so usmerjene proti diferenciranim tumorskim celicam (23,25).

#### 4 Nitroksolin

Nitroksolin (5-nitro-8-hidroksikinolin) (Slika 1) je dobro znana protimikrobna učinkovina, ki se uporablja pri zdravljenju okužb sečil. Protimikrobno delovanje nitroksolina so odkrili že v 50. letih prejšnjega stoletja in so ga kmalu začeli uporabljati v klinični praksi (45). Kljub dolgi uporabi bakterije še vedno niso razvile odpornosti za nitroksolin (45,46). Nitroksolin je učinkovit proti večini po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih patogenih bakterij sečil, mikoplazmam (*M. hominis*, *Ureaplasma urealyticum*) in humanim patogenom *Candida spp.* (45). Dodatno je nitroksolin izkazal učinkovitost proti večini drugih po Gramu negativnih bakterij in je bil učinkovit tudi proti Gramu pozitivnim bakterijam, kar poleg zdravljenja okužb sečil nakazuje na možnost uporabe kot protimikrobne učinkovine tudi za druge indikacije (47). Nitroksolin deluje protimikrobno predvsem s kelacijo različnih bivalentnih ionov (45,48,49). Na ta način stabilizira lipopolisharide na površini bakterij, kar poveča hidrofobnost njihove površine in zmanjša njihovo adhezijo (45,48,49). S tem nitroksolin zavira tudi sintezo RNA med celično delitvijo kvasovk (45,50), hkrati pa v nižjih koncentracijah zavira nastanek bakterijskih biofilmov (45,46,51). Kot uveljavljena protimikrobna učinkovina ima nitroksolin dobro znane farmakokinetične in farmakodinamične lastnosti (45,52-54). Nitroksolin se po peroralnem jemanju popolnoma in hitro absorbira v sečilih (52,54), pri tem pa so opazili le manjše in znosne stranske učinke, kar nakazuje, da je jemanje nitroksolina varno (45).

Protitumorsko delovanje nitroksolina je do danes prikazalo več raziskav. Prvič so njegovo protitumorsko delovanje prepoznali pri iskanju inhibitorjev metionin

aminopeptidaze tipa 2 (MetAP2), ki bi se lahko uporabljali kot nove učinkovine za zmanjšanje angiogeneze (55). Pokazali so, da je nitroksolin močan inhibitor MetAP2 *in vitro* in zavira proliferacijo in angiogenezo endotelnih celic tako *in vitro* kot *in vivo*. Dodatno sproži nitroksolin senescenco in zavira proliferacijo endotelnih celic HUVEC s hkratnim inhibiranjem MetAP2 in Sirtuina 1 (Sirt1). Z zaviranjem Sirt1 poveča nitroksolin količino aceteliranega tumorskega supresorja p53, zaradi česar se zmanjša angiogeneza. Hkrati nitroksolin značilno zmanjša velikost tumorjev dojke na mišjem modelu in zavira rast raka mehurja na ortotopnem mišjem modelu (55). Kasneje so pokazali še, da nitroksolin pri raku mehurja zmanjša izražanje proteinov, povezanih z epitelno-mezenhimskim preходом tumorskih celic, in delež mieloidnih supresorskih celic (MDSC) v periferni krvi (56). Poleg tega so nitroksolin v drugi, neodvisni, študiji z rešetanjem visoke zmogljivosti knjižnice spojini in biokemijskim vrednotenjem najboljših zadetkov prepoznali kot močan, reverzibilen in nekovalentni inhibitor lizosomske cisteinske peptidaze katepsina B (57), ki igra pomembno vlogo pri nastanku in napredovanju raka, njegovi invaziji in metastaziranju ter je znan kot obetavna tarča za razvoj novih protitumorskih učinkovin (58-60). Iz kristalne strukture kompleksa nitroksolina in katepsina B je razvidno, da se nitroksolin veže v režo aktivnega mesta katepsina B in s tem selektivno zavira njegovo endopeptidazno aktivnost v nizkih mikromolarnih koncentracijah (57). V različnih funkcijskih testih na celičnih linijah in mišjih tumorskih modelih je nitroksolin značilno zmanjšal razgradnjo zunajceličnega matriksa, invazijo tumorskih celic, metastaziranje in tvorbo endotelnih cevok v *in vitro* modelu angiogeneze (58).

Nitroksolin protitumorsko deluje in zavira migracijo tumorskih celic tudi z zmanjšanjem izražanja tumorskega transkripcijskega faktorja FOXM1, ki pomembno uravnava napredovanje raka. V isti študiji so pokazali, da nitroksolin prav tako zmanjša izražanje MMP-2 in MMP-9, ki so pomembno udeležene pri migraciji in invaziji tumorjev in katerih izražanje med drugim nadzoruje FOXM1. Poleg inhibiranja MMP-2 in MMP-9 z inhibicijo FOXM1 pa študije molekularnih interakcij nakazujejo, da nitroksolin tudi neposredno medsebojno deluje s katalitičnima domenama MMP-2 in MMP-9 (61).

Nadalje je več študij pokazalo, da nitroksolin zavira proliferacijo tumorskih celic. To so pokazali na celicah različnih tipov raka, vključno z malignim gliomom, multiplim mielomom, glioblastomom, levkemijo, rakom prostate, rakom žolčnih vodov (holangiokarcinom), rakom trebušne slinavke, drobnoceličnim pljučnim rakom

in rakom mehurja (56,62). Pokazalo se je, da je protitumorsko delovanje nitroksolina odvisno od odmerka kakor tudi od obdobja dajanja, saj nižji odmerki vodijo predvsem v zastoje celičnega cikla v fazi G0/G1, medtem ko višji odmerki spodbujajo apoptozo. Nitroksolin spodbuja apoptozo in zastoj celičnega cikla v fazi G0/G1 z delovanjem na različne molekulske tarče, ki so pomembno vpletene v te procese (62). Protitumorsko delovanje nitroksolina na celične linije trebušne slinavke se je še dodatno izboljšalo ob sočasni uporabi nitroksolina z nefinavirom, kompetitivnim inhibitorjem HIV aspartatne peptidaze in drugimi protivirusnimi učinkovinami za zdravljenje okužbe s HIV (63). Glede na podatke, dostopne na naslovu [clinicaltrials.gov](http://clinicaltrials.gov), pa protitumorsko delovanje nitroksolina še ni bilo ovrednoteno v kliničnih študijah (28).

Da bi še dodatno izboljšali protitumorsko delovanje nitroksolina, je bilo s strukturno podprto kemijsko sintezo, temelječo na strukturi nitroksolina, pripravljenih več novih derivatov z različnimi strukturnimi modifikacijami (62). S spreminjanjem različnih substituentov je bilo tako pripravljeno večje število derivatov nitroksolina z namenom izboljšati inhibiranje katepsina B (57,64-66), njegovo antiangiogeno delovanje z inhibiranjem MetAP2 in SIRT1 (67) ter inhibiranjem proteinov BET, ki se kompetitivno vežejo na BRD-BD1 in sodelujejo pri vzdrževanju stabilnosti kromatina in s tem nadzorujejo napredovanje celičnega cikla (62,68,69). Priprava novih derivatov je tudi razkrila strukturne značilnosti, potrebne za izboljšanje aktivnosti na posamezni tarči (62). Dodatno sta se protitumorsko delovanje nitroksolina in inhibicija katepsina B izboljšala tudi s pripravo organorutenijevih kompleksov z nitroksolinom in njegovimi derivati (70). Protitumorsko delovanje nitroksolina, predvsem njegov privzem v lizosome, pa je izboljšalo tudi njegovo vključevanje v nanodelce, sestavljene iz govejega serumskega albumina, bakrovih ionov in nitroksolina (BSA/Cu/NQ) (71).

Nitroksolin je obetavna že znana učinkovina, ki bi se lahko upodabljala tudi pri zdravljenju različnih vrst raka. Hkrati pa je nitroksolin tudi zanimiva spojina za razvoj novih derivatov z izboljšanim protitumorskim delovanjem in selektivnostjo za posamezne tarče.

## 5 Fluorokinoloni

Fluorokinoloni (Slika 1) so največja skupina protimikrobnih učinkovin. Fluorokinoloni zavirajo podvajanje in transkripcijo bakterijske DNA, bodisi z inhibiranjem bakterijske DNA giraze bodisi topoizomeraze II (4). Kot prvi kinolon s protimikrobnim delovanjem so odkrili

nalidiksno kislino že v 60. letih prejšnjega stoletja. Odkritju je sledil nadaljnji razvoj in optimiziranje kinolonov. Lahko jih razdelimo v štiri generacije na podlagi njihovih farmakokinetičnih in protimikrobnih lastnosti. Sprva so bili kinoloni učinkoviti le proti po Gramu negativnim bakterijam, z optimizacijo njihove strukture pa se je spekter njihovega delovanja razširil. Tako so fluorokinoloni iz četrte generacije učinkoviti proti po Gramu negativnim in po Gramu pozitivnim bakterijam, anaerobom *Pseudomonas sp.* in atipičnim bakterijam (72). Poleg protibakterijskega delovanja je bilo za nekatere fluorokinolone dokazano, da so v kombinaciji s klorokinom učinkoviti pri zdravljenju malarije. Dodatno so zanje prikazali, da delujejo tudi proti nekaterim drugim parazitom, kot so *Trypanosoma brucei* in *Toxoplasma gondii* (4). Poleg neposrednega vpliva na rast bakterij so za fluorokinolone prikazali, da k protimikrobnem delovanju prispevajo tudi imunomodulacijske lastnosti. Fluorokinoloni, predvsem novejša generacije, kot so ciprofloksacin, norfloksacin in ofloksacin, namreč zavirajo sintezo citokinov že v nizkih koncentracijah. Zanje pa so pokazali tudi protivnetni odziv in zaščitno vlogo proti z lipopolisaharidom povzročeni poškodbi jeter (4,73).

Več neodvisnih raziskav je pokazalo tudi protitumorsko delovanje fluorokinolonov, pri čemer je opisanih več različnih mehanizmov protitumorskega delovanja. Za več fluorokinolonov so pokazali, da zaustavijo napredovanje tumorjev z zaustavitvijo celičnega cikla predvsem v fazi S/G2 in s sprožitvijo apoptoze tumorskih celic (4). Kot najmočnejši sprožilec apoptoze se je izkazal ciprofloksacin, za katerega so pokazali, da sproži apoptozo pri celicah različnih tipov raka, vključno z rakom prostate, mehurja, trebušne slinavke, rakom debelega črevesa in danke in drugimi (4,74,75). Nasprotno pa so v novejši raziskavi za ciprofloksacin pokazali nasproten vpliv na napredovanje raka, pri tem so na celicah humanega drobnoceličnega raka pljuč pokazali, da spodbuja nastanek celic s fenotipom tumorskih matičnih celic. Pri tem so prikazali, da ciprofloksacin poveča izražanje označevalcev matičnosti in proteinov, potrebnih za samoobnovitev celic (76). Izmed fluorokinolonov so tako le za gemifloksacin dokazali, da zavira metastaziranje tumorskih celic z inhibiranjem migracije in invazije z zaviranjem s TNF $\alpha$  spodbujene aktivacije NF $\kappa$ B (77,78). Dodatno pa so vpliv na invazijo in migracijo tumorskih celic raka kolona pokazali še za sparfloksacin (79). Enoksacin zaradi svoje edinstvene strukture deluje tudi protitumorsko še z zaviranjem nastanka mikroRNA (miRNA), ker deluje onkogeno in prispeva k napredovanju tumorjev (4,80,81). Za fluorokinolone, med drugimi za ciprofloksacin, fleroksacin, moksifloksacin in enokascin,

so v več neodvisnih študijah pokazali, da pri sočasnem vnosu z obstoječimi kemoterapevtiki, ki se uporabljajo v klinični praksi, dodatno izboljšajo protitumorske učinke kemoterapevtikov (4). Trenutno poteka tudi več kliničnih študij za preverjanje protitumorskega delovanja fluorokinolonov v kombinaciji z uveljavljeno terapijo pri različnih tipih raka, kot sta rak mehurja in akutna mieloidna levkemija. Končni rezultati pa še niso objavljeni (28).

Protitumorsko delovanje fluorokinolonov lahko dodatno izboljša tvorba njihovih kompleksov s kovinskimi ioni. Slednje so najprej prikazali za komplekse norfloksacina z bakrom, ki je kazal boljše protitumorsko delovanje proti celicam leukemije (82). Na podlagi tega so pripravili kovinske komplekse še z drugimi fluorokinoloni, s čimer so dodatno izboljšali protitumorsko delovanje proti različnim celičnim linijam raka v primerjavi z izhodno spojino. Pri tem so se kot učinkoviti izkazali predvsem kompleksi z zlatom in rutenijem, ki so protitumorsko delovali predvsem proti metastatskim tumorskim celicam, niso pa toksično učinkovali na normalne, zdrave celice. Za komplekse z rutenijem se predvideva, da je protitumorsko delovanje posledica delovanja na več tarč, medtem ko naj bi bilo protitumorsko delovanje kompleksov z zlatom predvsem posledica spremembe funkcije mitohondrijev in inhibiranja sinteze proteinov. Dodatno uvedba aduktov z dušikom v kovinske komplekse s fluorokinoloni zavira njihovo izločanje iz celic in tako omogoča povečano zadrževanje učinkovin v tumorjih (4).

Poleg tega se raziskave na fluorokinolonih usmerjajo tudi v smeri iskanja strukturnih modifikacij na molekulah obstoječih fluorokinolonov, s katerimi bi bilo možno dodatno izboljšati njihovo protitumorsko delovanje. Pri tem se je izkazalo, da je za povečanje protitumorskega delovanja ugodna prisotnost večjih funkcionalnih skupin na mestu C-7 (4,83).

Obsežna skupina fluorokinolonov predstavlja obetavno skupino protimikrobnih zdravil, katerih uporabo bi bilo možno zaradi njihovega protitumorskega delovanja razširiti tudi za zdravljenje raka. Hkrati pa bi strukturne modifikacije obstoječih fluorokinolonov lahko

vodile k razvoju novih molekul z izboljšanim protitumorskim delovanjem.

## 6 Zaključek

Uspešno zdravljenje raka se še vedno sooča s številnimi izzivi. Pri tem je eden pomembnih korakov tudi razvijanje novih zdravil, ki bi omogočila, da se izognemo pomanjkljivostim trenutnih terapevtskih pristopov, kot so odpornost na terapijo in številni stranski učinki, ki so povezani z obstoječimi kemoterapevtiki. Zaradi visokih stroškov, povezanih s prihodom novega zdravila na trg, pa se v zadnjem času vedno več pozornosti namenja iskanju novih indikacij za že obstoječa zdravila. Pri tem se je med drugim pokazalo, da nekatera protimikrobna zdravila, ki se že dolgo uspešno uporabljajo v klinični praksi, delujejo protitumorsko. Izmed slednjih se je med drugim protitumorsko delovanje pokazalo za doksiciklin, klorokin, nitroksolin in fluorokinolone, kar podrobneje predstavi ta pregledni članek. Njihovo protitumorsko delovanje je bilo prikazano v številnih tumorskih modelih in pri različnih tipih raka, opisani pa so bili tudi različni mehanizmi protitumorskega delovanja. Znane protimikrobne učinkovine s protitumorskim delovanjem pa hkrati predstavljajo tudi zanimive spojine za razvoj novih derivatov z izboljšanim protitumorskim delovanjem. Kljub številnim raziskavam, ki potrjujejo protitumorsko delovanje protimikrobnih učinkovin, pa bodo potrebne še dodatne klinične študije, ki bodo potrdile učinkovitost in omogočile uspešno uvedbo v klinično prakso. Pri tem je treba nameniti pozornost tudi možnim interakcijam z obstoječimi terapijami, predvsem z imunskimi terapijami in z antibiotično terapijo, ki jo bolniki z rakom pogosto prejemajo zaradi okužb, ki so posledica njihovega oslabiljenega imunskega sistema. Iskanje novih indikacij za že obstoječa zdravila tako pomeni obetaven pristop, ki bo omogočil hitrejši in bolj učinkovit razvoj novih protitumorskih terapij in izboljšal uspešnost zdravljenja raka.

## Izjava o navzkrižju interesov

Avtorji nimamo navzkrižja interesov.

## Literatura

- World Health Organization. Cancer. Geneva: WHO; 2020 [cited 2021 Jan 17]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- Gupta SC, Sung B, Prasad S, Webb LJ, Aggarwal BB. Cancer drug discovery by repurposing: teaching new tricks to old dogs. *Trends Pharmacol Sci.* 2013;34(9):508-17. DOI: 10.1016/j.tips.2013.06.005 PMID: 23928289
- Shim JS, Liu JO. Recent advances in drug repositioning for the discovery of new anticancer drugs. *Int J Biol Sci.* 2014;10(7):654-63. DOI: 10.7150/ijbs.9224 PMID: 25013375
- Yadav V, Talwar P. Repositioning of fluoroquinolones from antibiotic to anti-cancer agents: an underestimated truth. *Biomed Pharmacother.* 2019;111(111):934-46. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.12.119 PMID: 30841473



5. Sleire L, Førde HE, Netland IA, Leiss L, Skeie BS, Enger PØ. Drug repurposing in cancer. *Pharmacol Res.* 2017;124:74-91. DOI: [10.1016/j.phrs.2017.07.013](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.07.013) PMID: [28712971](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28712971/)
6. Hernandez JJ, Pryszyk M, Smith L, Yanchus C, Kurji N, Shahani VM, et al. Giving drugs a second chance: overcoming regulatory and financial hurdles in repurposing approved drugs as cancer therapeutics. *Front Oncol.* 2017;7(NOV):273. DOI: [10.3389/fonc.2017.00273](https://doi.org/10.3389/fonc.2017.00273) PMID: [29184849](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29184849/)
7. Nowak-Sliwinska P, Scapozza L, Ruiz i Altaba A. Drug repurposing in oncology: Compounds, pathways, phenotypes and computational approaches for colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2019;1871(2):434-54. DOI: [10.1016/j.bbcan.2019.04.005](https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.04.005) PMID: [31034926](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31034926/)
8. Antoszczak M, Markowska A, Markowska J, Huczynski A. Old wine in new bottles: drug repurposing in oncology. *Eur J Pharmacol.* 2019;2020:866. PMID: [31730760](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31730760/)
9. van den Bogert C, Dontje BH, Kroon AM. The antitumour effect of doxycycline on a T-cell leukaemia in the rat. *Leuk Res.* 1985;9(5):617-23. DOI: [10.1016/0145-2126\(85\)90142-0](https://doi.org/10.1016/0145-2126(85)90142-0) PMID: [3874329](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3874329/)
10. Wang SQ, Zhao BX, Liu Y, Wang YT, Liang QY, Cai Y, et al. New application of an old drug: antitumor activity and mechanisms of doxycycline in small cell lung cancer. *Int J Oncol.* 2016;48(4):1353-60. DOI: [10.3892/ijo.2016.3375](https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3375) PMID: [26846275](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26846275/)
11. Wang C, Xiang R, Zhang X, Chen Y. Doxycycline inhibits leukemic cell migration via inhibition of matrix metalloproteinases and phosphorylation of focal adhesion kinase. *Mol Med Rep.* 2015;12(3):3374-80. DOI: [10.3892/mmr.2015.3833](https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3833) PMID: [26004127](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26004127/)
12. Sun T, Zhao N, Ni CS, Zhao XL, Zhang WZ, Su X, et al. Doxycycline inhibits the adhesion and migration of melanoma cells by inhibiting the expression and phosphorylation of focal adhesion kinase (FAK). *Cancer Lett.* 2009;285(2):141-50. DOI: [10.1016/j.canlet.2009.05.004](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.05.004) PMID: [19482420](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19482420/)
13. Shen LC, Chen YK, Lin LM, Shaw SY. Anti-invasion and anti-tumor growth effect of doxycycline treatment for human oral squamous-cell carcinoma—in vitro and in vivo studies. *Oral Oncol.* 2010;46(3):178-84. DOI: [10.1016/j.oraloncology.2009.11.013](https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2009.11.013) PMID: [20036604](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20036604/)
14. Qin Y, Zhang Q, Lee S, Zhong WL, Liu YR, Liu HJ, et al. Doxycycline reverses epithelial-to-mesenchymal transition and suppresses the proliferation and metastasis of lung cancer cells. *Oncotarget.* 2015;6(38):40667-79. DOI: [10.18632/oncotarget.5842](https://doi.org/10.18632/oncotarget.5842) PMID: [26512779](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26512779/)
15. Zhong W, Chen S, Zhang Q, Xiao T, Qin Y, Gu J, et al. Doxycycline directly targets PAR1 to suppress tumor progression. *Oncotarget.* 2017;8(10):16829-42. DOI: [10.18632/oncotarget.15166](https://doi.org/10.18632/oncotarget.15166) PMID: [28187433](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28187433/)
16. Zhong W, Chen S, Qin Y, Zhang H, Wang H, Meng J, et al. Doxycycline inhibits breast cancer EMT and metastasis through PAR-1/NF-κB/miR-17/E-cadherin pathway. *Oncotarget.* 2017;8(62):104855-66. DOI: [10.18632/oncotarget.20418](https://doi.org/10.18632/oncotarget.20418) PMID: [29285218](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29285218/)
17. Son K, Fujioka S, Iida T, Furukawa K, Fujita T, Yamada H, et al. Doxycycline induces apoptosis in PANC-1 pancreatic cancer cells. *Anticancer Res.* 2009;29(10):3995-4003. PMID: [19846942](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19846942/)
18. Song H, Fares M, Maguire KR, Sidén Å, Potáčová Z. Cytotoxic effects of tetracycline analogues (doxycycline, minocycline and COL-3) in acute myeloid leukemia HL-60 cells. *PLoS One.* 2014;9(12):e114457. DOI: [10.1371/journal.pone.0114457](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114457) PMID: [25502932](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25502932/)
19. Zhu C, Yan X, Yu A, Wang Y. Doxycycline synergizes with doxorubicin to inhibit the proliferation of castration-resistant prostate cancer cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2017;49(11):999-1007. DOI: [10.1093/abbs/gmx097](https://doi.org/10.1093/abbs/gmx097) PMID: [28985240](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28985240/)
20. Yang B, Lu Y, Zhang A, Zhou A, Zhang L, Zhang L, et al. Doxycycline Induces Apoptosis and Inhibits Proliferation and Invasion of Human Cervical Carcinoma Stem Cells. *PLoS One.* 2015. ;10(6)DOI: [10.1371/journal.pone.0129138](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129138) PMID: [226111245](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/226111245/)
21. Addison CL, Simos D, Wang Z, Pond G, Smith S, Robertson S, et al. A phase 2 trial exploring the clinical and correlative effects of combining doxycycline with bone-targeted therapy in patients with metastatic breast cancer. *J Bone Oncol.* 2016;5(4):173-9. DOI: [10.1016/j.jbo.2016.06.003](https://doi.org/10.1016/j.jbo.2016.06.003) PMID: [28008379](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28008379/)
22. Scatena C, Roncella M, Di Paolo A, Aretini P, Menicagli M, Fanelli G, et al. Doxycycline, an Inhibitor of Mitochondrial Biogenesis, Effectively Reduces Cancer Stem Cells (CSCs) in Early Breast Cancer Patients: A Clinical Pilot Study. *Front Oncol.* 2018;8:452. DOI: [10.3389/fonc.2018.00452](https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00452) PMID: [30364293](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30364293/)
23. Varisli L, Cen O, Vlahopoulos S. Dissecting pharmacological effects of chloroquine in cancer treatment: interference with inflammatory signaling pathways. *Immunology.* 2020;159(3):257-78. DOI: [10.1111/imm.13160](https://doi.org/10.1111/imm.13160) PMID: [31782148](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31782148/)
24. Weyerhäuser P, Kantehardt SR, Kim EL. Re-purposing chloroquine for glioblastoma: potential merits and confounding variables. *Front Oncol.* 2018;8(AUG):335. DOI: [10.3389/fonc.2018.00335](https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00335) PMID: [30211116](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30211116/)
25. Verbaander C, Maes H, Schaaf MB, Sukhatme VP, Pantziarka P, Sukhatme V, et al. Repurposing Drugs in Oncology (ReDO)-chloroquine and hydroxychloroquine as anti-cancer agents. *Ecancermedalscience.* 2017;11:781. DOI: [10.3332/ecancer.2017.781](https://doi.org/10.3332/ecancer.2017.781) PMID: [29225688](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29225688/)
26. Geser A, Brubaker G, Draper CC. Effect of a malaria suppression program on the incidence of African Burkitt's lymphoma. *Am J Epidemiol.* 1989;129(4):740-52. DOI: [10.1093/oxfordjournals.aje.a115189](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a115189) PMID: [2923122](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2923122/)
27. Jiang PD, Zhao YL, Deng XQ, Mao YQ, Shi W, Tang QQ, et al. Antitumor and antimetastatic activities of chloroquine diphosphate in a murine model of breast cancer. *Biomed Pharmacother.* 2010;64(9):609-14. DOI: [10.1016/j.biopha.2010.06.004](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2010.06.004) PMID: [20888174](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20888174/)
28. National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov. Bethesda: US NLM; 2021 [cited 2021 Feb 13]. Available from: <https://clinicaltrials.gov>.
29. Xu R, Ji Z, Xu C, Zhu J. The clinical value of using chloroquine or hydroxychloroquine as autophagy inhibitors in the treatment of cancers: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore).* 2018;97(46):e12912. DOI: [10.1097/MD.00000000000012912](https://doi.org/10.1097/MD.00000000000012912) PMID: [30431566](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30431566/)
30. Briceño E, Reyes S, Sotelo J. Therapy of glioblastoma multiforme improved by the antimutagenic chloroquine. *Neurosurg Focus.* 2003;14(2):e3. DOI: [10.3171/foc.2003.14.2.4](https://doi.org/10.3171/foc.2003.14.2.4) PMID: [15727424](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15727424/)
31. Sotelo J, Briceño E, López-González MA. Adding chloroquine to conventional treatment for glioblastoma multiforme: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med.* 2006;144(5):337-43. DOI: [10.7326/0003-4819-144-5-200603070-00008](https://doi.org/10.7326/0003-4819-144-5-200603070-00008) PMID: [16520474](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16520474/)
32. Rojas-Puentes LL, Gonzalez-Pinedo M, Crismatt A, Ortega-Gomez A, Gamboa-Vignolle C, Nuñez-Gomez R, et al. Phase II randomized, double-blind, placebo-controlled study of whole-brain irradiation with concomitant chloroquine for brain metastases. *Radiat Oncol.* 2013;8(1):209. DOI: [10.1186/1748-717X-8-209](https://doi.org/10.1186/1748-717X-8-209) PMID: [24010771](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24010771/)
33. Eldredge HB, Denittis A, Duhadaway JB, Chernick M, Metz R, Prendergast GC. Concurrent whole brain radiotherapy and short-course chloroquine in patients with brain metastases: a pilot trial. *J Radiat Oncol.* 2013;2(3):315-21. DOI: [10.1007/s13566-013-0111-x](https://doi.org/10.1007/s13566-013-0111-x) PMID: [24187608](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24187608/)
34. Kimura T, Takabatake Y, Takahashi A, Isaka Y. Chloroquine in cancer therapy: a double-edged sword of autophagy. *Cancer Res.* 2013;73(1):3-7. DOI: [10.1158/0008-5472.CAN-12-2464](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2464) PMID: [23288916](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23288916/)
35. Ben-Zvi I, Kivity S, Langevitz P, Shoenfeld Y. Hydroxychloroquine: from malaria to autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2012;42(2):145-53. DOI: [10.1007/s12016-010-8243-x](https://doi.org/10.1007/s12016-010-8243-x) PMID: [21221847](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21221847/)
36. Townsend KN, Hughson LR, Schlie K, Poon VI, Westerback A, Lum JJ. Autophagy inhibition in cancer therapy: metabolic considerations for antitumor immunity. 2012;249(1):176-94. DOI: [10.1111/j.1600-065X.2012.01141.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01141.x) PMID: [22889222](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22889222/)
37. Loehberg CR, Strissel PL, Dittrich R, Strick R, Dittmer J, Dittmer A, et al. Akt and p53 are potential mediators of reduced mammary tumor growth by chloroquine and the mTOR inhibitor RAD001. *Biochem Pharmacol.* 2012;83(4):480-8. DOI: [10.1016/j.bcp.2011.11.022](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2011.11.022) PMID: [22142888](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22142888/)
38. Maes H, Kuchnio A, Peric A, Moens S, Nys K, De Bock K, et al. Tumor vessel normalization by chloroquine independent of autophagy. *Cancer Cell.* 2014;26(2):190-206. DOI: [10.1016/j.ccr.2014.06.025](https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.06.025) PMID: [25117709](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25117709/)

39. Antonelli M, Strappazon F, Arisi I, Brandi R, D'Onofrio M, Sambucci M, et al. ATM kinase sustains breast cancer stem-like cells by promoting ATG4C expression and autophagy. *Oncotarget*. 2017;8(13):21692-709. DOI: [10.18632/oncotarget.15537](https://doi.org/10.18632/oncotarget.15537) PMID: 28423511
40. Choi DS, Blanco E, Kim YS, Rodriguez AA, Zhao H, Huang TH, et al. Chloroquine eliminates cancer stem cells through deregulation of Jak2 and DNMT1. *Stem Cells*. 2014;32(9):2309-23. DOI: [10.1002/stem.1746](https://doi.org/10.1002/stem.1746) PMID: 24809620
41. Sakamaki J, Wilkinson S, Hahn M, Tasdemir N, O'Prey J, Clark W, et al. Brodmain protein BRD4 is a transcriptional repressor of autophagy and lysosomal function. *Mol Cell*. 2017;66(4):P517-32. DOI: [10.1016/j.molcel.2017.04.027](https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.04.027) PMID: 28525743
42. Jang JE, Eom JI, Jeung HK, Cheong JW, Lee JY, Kim JS, et al. AMPK-ULK1-Mediated Autophagy Confers Resistance to BET Inhibitor JQ1 in Acute Myeloid Leukemia Stem Cells. *Clin Cancer Res*. 2017;23(11):2781-94. DOI: [10.1158/1078-0432.CCR-16-1903](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1903) PMID: 27864418
43. Hui B, Shi YH, Ding ZB, Zhou J, Gu CY, Peng YF, et al. Proteasome inhibitor interacts synergistically with autophagy inhibitor to suppress proliferation and induce apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 2012;118(22):5560-71. DOI: [10.1002/cncr.27586](https://doi.org/10.1002/cncr.27586) PMID: 22517429
44. Liang DH, Choi DS, Ensor JE, Kaiparettu BA, Bass BL, Chang JC. The autophagy inhibitor chloroquine targets cancer stem cells in triple negative breast cancer by inducing mitochondrial damage and impairing DNA break repair. *Cancer Lett*. 2016;376(2):249-58. DOI: [10.1016/j.canlet.2016.04.002](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.04.002) PMID: 27060208
45. Naber KG, Niggemann H, Stein G, Stein G. Review of the literature and individual patients' data meta-analysis on efficacy and tolerance of nitroxoline in the treatment of uncomplicated urinary tract infections. *BMC Infect Dis*. 2014;14(1):628. DOI: [10.1186/s12879-014-0628-7](https://doi.org/10.1186/s12879-014-0628-7) PMID: 25427651
46. Kresken M, Körber-Irrgang B. In vitro activity of nitroxoline against *Escherichia coli* urine isolates from outpatient departments in Germany. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(11):7019-20. DOI: [10.1128/AAC.03946-14](https://doi.org/10.1128/AAC.03946-14) PMID: 25182654
47. Cherdtrakulkiat R, Boonpangrak S, Sinthupoom N, Prachayasittikul S, Ruchirawat S, Prachayasittikul V. Derivatives (halogen, nitro and amino) of 8-hydroxyquinoline with highly potent antimicrobial and antioxidant activities. *Biochem Biophys Rep*. 2016;6:135-41. DOI: [10.1016/j.bbrep.2016.03.014](https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.03.014) PMID: 29214226
48. Pelletier C, Prognon P, Bourlioux P. Roles of divalent cations and pH in mechanism of action of nitroxoline against *Escherichia coli* strains. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39(3):707-13. DOI: [10.1128/AAC.39.3.707](https://doi.org/10.1128/AAC.39.3.707) PMID: 7793877
49. Oviedo P, Quiroga M, Pegels E, Husulak E, Vergara M. Effects of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin on enterotoxigenic *Escherichia coli* virulence factors. *J Chemother*. 2000;12(6):487-90. DOI: [10.1179/joc.2000.12.6.487](https://doi.org/10.1179/joc.2000.12.6.487) PMID: 11154030
50. Fraser RS, Creanor J. Rapid and selective inhibition of RNA synthesis in yeast by 8-hydroxyquinoline. *Eur J Biochem*. 1974;46(1):67-73. DOI: [10.1111/j.1432-1033.1974.tb03597.x](https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03597.x) PMID: 4854024
51. Sobke A, Klinger M, Hermann B, Sachse S, Nietzsche S, Makarewicz O, et al. The urinary antibiotic 5-nitro-8-hydroxyquinoline (Nitroxoline) reduces the formation and induces the dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by chelation of iron and zinc. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(11):6021-5. DOI: [10.1128/AAC.01484-12](https://doi.org/10.1128/AAC.01484-12) PMID: 22926564
52. Mrhar A, Kopitar Z, Kozjek F, Presl V, Karba R. Clinical pharmacokinetics of nitroxoline. *Int J Clin Pharmacol Biopharm*. 1979;17(12):476-81. PMID: 118941
53. Wagenlehner FM, Münch F, Pilatz A, Bärnmann B, Weidner W, Wagenlehner CM, et al. Urinary concentrations and antibacterial activities of nitroxoline at 250 milligrams versus trimethoprim at 200 milligrams against uropathogens in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(2):713-21. DOI: [10.1128/AAC.02147-13](https://doi.org/10.1128/AAC.02147-13) PMID: 24217699
54. Wijma RA, Huttner A, Koch BC, Mouton JW, Muller AE. Review of the pharmacokinetic properties of nitrofurantoin and nitroxoline. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(11):2916-26. DOI: [10.1093/jac/dky255](https://doi.org/10.1093/jac/dky255) PMID: 30184207
55. Shim JS, Matsui Y, Bhat S, Nacev BA, Xu J, Bhang HE, et al. Effect of nitroxoline on angiogenesis and growth of human bladder cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2010;102(24):1855-73. [cited 2013 Nov 18]. DOI: [10.1093/jnci/djq457](https://doi.org/10.1093/jnci/djq457) PMID: 21088277
56. Xu N, Lin W, Sun J, Sadahira T, Xu A, Watanabe M, et al. Nitroxoline inhibits bladder cancer progression by reversing EMT process and enhancing anti-tumor immunity. *J Cancer*. 2020;11(22):6633-41. DOI: [10.7150/jca.47025](https://doi.org/10.7150/jca.47025) PMID: 33046984
57. Mirković B, Renko M, Turk S, Sosić I, Jevnikar Z, Obermajer N, et al. Novel mechanism of cathepsin B inhibition by antibiotic nitroxoline and related compounds. *ChemMedChem*. 2011;6(8):1351-6. DOI: [10.1002/cmdc.201100098](https://doi.org/10.1002/cmdc.201100098) PMID: 21598397
58. Mirković B, Markelc B, Butinar M, Mitrović A, Sosić I, Gobec S, et al. Nitroxoline impairs tumor progression in vitro and in vivo by regulating cathepsin B activity. *Oncotarget*. 2015;6(22):19027-42.
59. Vasiljeva O, Turk B. Dual contrasting roles of cysteine cathepsins in cancer progression: apoptosis versus tumour invasion. *Biochimie*. 2008;90(2):380-6. DOI: [10.1016/j.biochi.2007.10.004](https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.10.004) PMID: 17991442
60. Gocheva V, Zeng W, Ke D, Klimstra D, Reinheckel T, Peters C, et al. Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes Dev*. 2006;20(5):543-56. DOI: [10.1101/gad.1407406](https://doi.org/10.1101/gad.1407406) PMID: 16481467
61. Chan-On W, Huyen NT, Songtawee N, Suwanjang W, Prachayasittikul S, Prachayasittikul V. Quinoline-based cloquinol and nitroxoline exhibit anticancer activity inducing FoxM1 inhibition in cholangiocarcinoma cells. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:2033. PMID: 25897210
62. Mitrović A, Kos J. Nitroxoline: repurposing its antimicrobial to antitumor application. *Acta Biochim Pol*. 2019;66(4):521-31. PMID: 31834689
63. Veschi S, De Lellis L, Florio R, Lanuti P, Massucci A, Tinari N, et al. Effects of repurposed drug candidates nitroxoline and nelfinavir as single agents or in combination with erlotinib in pancreatic cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37(1):236. DOI: [10.1186/s13046-018-0904-2](https://doi.org/10.1186/s13046-018-0904-2) PMID: 30241558
64. Sosić I, Mirković B, Arenz K, Štefane B, Kos J, Gobec S. Development of new cathepsin B inhibitors: combining bioisosteric replacements and structure-based design to explore the structure-activity relationships of nitroxoline derivatives. *J Med Chem*. 2013;56(2):521-33. DOI: [10.1021/jm301544x](https://doi.org/10.1021/jm301544x) PMID: 23252745
65. Sosić I, Mitrović A, Čurić H, Knez D, Brodnik Žugelj H, Štefane B, et al. Cathepsin B inhibitors: further exploration of the nitroxoline core. *Bioorg Med Chem Lett*. 2018;28(7):1239-47. DOI: [10.1016/j.bmcl.2018.02.042](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.02.042) PMID: 29503024
66. Mitrović A, Sosić I, Kos Š, Tratar UL, Breznik B, Kranjc S, et al. Addition of 2-(ethylamino)acetonitrile group to nitroxoline results in significantly improved anti-tumor activity in vitro and in vivo. *Oncotarget*. 2017;8(35):59136-47. DOI: [10.18632/oncotarget.19296](https://doi.org/10.18632/oncotarget.19296) PMID: 28938624
67. Bhat S, Shim JS, Zhang F, Chong CR, Liu JO. Substituted oxines inhibit endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Org Biomol Chem*. 2012;10(15):2979-92. DOI: [10.1039/c2ob06978d](https://doi.org/10.1039/c2ob06978d) PMID: 22391578
68. Chen W, Zhang H, Chen Z, Jiang H, Liao L, Fan S, et al. Development and evaluation of a novel series of Nitroxoline-derived BET inhibitors with antitumor activity in renal cell carcinoma. *Oncogenesis*. 2018;7(11):83. DOI: [10.1038/s41389-018-0093-z](https://doi.org/10.1038/s41389-018-0093-z) PMID: 30385738
69. Xing J, Zhang R, Jiang X, Hu T, Wang X, Qiao G, et al. Rational design of 5-((1H-imidazol-1-yl)methyl)quinolin-8-ol derivatives as novel bromodomain-containing protein 4 inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2019;163:281-94. DOI: [10.1016/j.ejmech.2018.11.018](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.11.018) PMID: 30529546
70. Mitrović A, Kljun J, Sosić I, Uršič M, Meden A, Gobec S, et al. Organoruthenated Nitroxoline Derivatives Impair Tumor Cell Invasion through Inhibition of Cathepsin B Activity. *Inorg Chem*. 2019;58(18):12334-47. DOI: [10.1021/acs.inorgchem.9b01882](https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b01882) PMID: 31464130

71. Hu D, Xu H, Xiao B, Li D, Zhou Z, Liu X, et al. Albumin-Stabilized Metal-Organic Nanoparticles for Effective Delivery of Metal Complex Anticancer Drugs. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2018;10(41):34974-82. DOI: [10.1021/acssami.8b12812](https://doi.org/10.1021/acssami.8b12812) PMID: [30238746](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30238746/)
72. Oliphant CM, Green GM. Quinolones: a comprehensive review. *Am Fam Physician*. 2002;65(3):455-64. PMID: [11858629](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11858629/)
73. Dalhoff A. Immunomodulatory activities of fluoroquinolones. *Infection*. 2005;33(S2):55-70. DOI: [10.1007/s15010-005-8209-8](https://doi.org/10.1007/s15010-005-8209-8) PMID: [16518713](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16518713/)
74. Herold C, Ocker M, Ganslmayer M, Gerauer H, Hahn EG, Schuppan D. Ciprofloxacin induces apoptosis and inhibits proliferation of human colorectal carcinoma cells. *Br J Cancer*. 2002;86(3):443-8. DOI: [10.1038/sj.bjc.6600079](https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600079) PMID: [11875713](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11875713/)
75. Aranha O, Grignon R, Fernandes N, McDonnell TJ, Wood DP, Sarkar FH. Suppression of human prostate cancer cell growth by ciprofloxacin is associated with cell cycle arrest and apoptosis. *Int J Oncol*. 2003;22(4):787-94. DOI: [10.3892/ijo.22.4.787](https://doi.org/10.3892/ijo.22.4.787) PMID: [12632069](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12632069/)
76. Phiboonchaiyanan PP, Kiratipaiboon C, Chanvorachote P. Ciprofloxacin mediates cancer stem cell phenotypes in lung cancer cells through caveolin-1-dependent mechanism. *Chem Biol Interact*. 2016;250:1-11. DOI: [10.1016/j.cbi.2016.03.005](https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.03.005) PMID: [26947806](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26947806/)
77. Chen TC, Hsu YL, Tsai YC, Chang YW, Kuo PL, Chen YH. Gemifloxacin inhibits migration and invasion and induces mesenchymal-epithelial transition in human breast adenocarcinoma cells. *J Mol Med (Berl)*. 2014;92(1):53-64. DOI: [10.1007/s00109-013-1083-4](https://doi.org/10.1007/s00109-013-1083-4) PMID: [24005829](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24005829/)
78. Kan JY, Hsu YL, Chen YH, Chen TC, Wang JY, Kuo PL. Gemifloxacin, a fluoroquinolone antimicrobial drug, inhibits migration and invasion of human colon cancer cells. *BioMed Res Int*. 2013;2013:159786. DOI: [10.1155/2013/159786](https://doi.org/10.1155/2013/159786) PMID: [24386633](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24386633/)
79. Gong JH, Liu XJ, Shang BY, Chen SZ, Zhen YS. HERG K<sup>+</sup> channel related chemosensitivity to sparfloxacin in colon cancer cells. *Oncol Rep*. 2010;23(6):1747-56. PMID: [20428834](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20428834/)
80. Shan G, Li Y, Zhang J, Li W, Szulwach KE, Duan R, et al. A small molecule enhances RNA interference and promotes microRNA processing. *Nat Biotechnol*. 2008;26(8):933-40. DOI: [10.1038/nbt.1481](https://doi.org/10.1038/nbt.1481) PMID: [18641635](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18641635/)
81. Valianatos G, Valcikova B, Growkova K, Verlande A, Mlcochova J, Radova L, et al. A small molecule drug promoting miRNA processing induces alternative splicing of MdmX transcript and rescues p53 activity in human cancer cells overexpressing MdmX protein. *PLoS One*. 2017. ;12(10)DOI: [10.1371/journal.pone.0185801](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185801) PMID: [28973015](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28973015/)
82. Katsarou ME, Efthimiadou EK, Psomas G, Karaliota A, Vourloumis D. Novel copper(II) complex of N-propyl-norflloxacin and 1,10-phenanthroline with enhanced antileukemic and DNA nuclease activities. *J Med Chem*. 2008;51(3):470-8. DOI: [10.1021/jm7013259](https://doi.org/10.1021/jm7013259) PMID: [18205294](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18205294/)
83. Hu G, Yang Y, Yi L, Wang G, Duan N, Wen X, et al. Design, synthesis and antitumor activity of C3/C3 bis-fluoroquinolones cross-linked with [1,2,4]triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazole. *Acta Pharm Sin B*. 2011;1(3):172-7. DOI: [10.1016/j.apsb.2011.07.001](https://doi.org/10.1016/j.apsb.2011.07.001)