



EESTI VABARIIK

PATENDIAMET

(11) **EE-EP 1 615 638 B1**

(51) Int. Cl.  
*A61K 31/4245 (2006.01)*  
*A61P 35/00 (2006.01)*

(12) **EESTIS KEHTIVA EUROOPA PATENDI  
 PATENDIKIRJELDUSE TÕLGE**

(10) Registreeringu number: <b>E000739</b>	(73) Patendiomanik:
(11) Patendikirjelduse tõlke number: <b>EE-EP 1 615 638</b>	<b>Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"</b>
(30) Prioriteediandmed: <b>24.04.2003</b> <b>IT RM20030194</b>	<b>Via Orazio Raimondo 18</b> <b>00173 Roma, IT</b>
(96) Euroopa patenditaotluse esitamise kuupäev: <b>19.04.2004</b>	(72) Leiutise autorid:
(96) Euroopa patendi-taotluse number: <b>04728231.4</b>	<b>CACCURI, Anna Maria</b>
(97) Euroopa patendi väljaandmisest teatamise kuupäev: <b>27.09.2006</b>	<b>Univesità degli Studi di Roma "Tor Vergata",</b> <b>Via Orazio Raimondo, 18, 00173 Roma, IT</b>
(97) Euroopa patendi number: <b>EP 1 615 638</b>	<b>RICCI, Giorgio</b>
Patendikirjelduse tõlke esitamise kuupäev: <b>18.12.2006</b>	<b>Università degli Studi di Roma</b> <b>"Tor Vergata",</b> <b>Via Orazio Raimondo, 18, 00173 Roma, IT</b>
	(74) Patendivolnik:
	<b>Tõnu Nelsas</b> <b>AAA Patendibüroo OÜ</b> <b>Tartu mnt 16, 10117 Tallinn, EE</b>

(54) 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli derivaatide kasutamine vähivastaseks raviks

## Kirjeldus

Käesolev leiutus käsitleb 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooliderivaatide kasutamist vähivastaseks raviks. Täpsemalt käsitleb leiutus 7-nitrobensofuraani ehk 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasoolina tuntud heterotsükklilise ühendi derivaatide kasutamist vahenditena, millel on tugev inhibeeriv toime glutatioon-S-transferaaside (GST) suure perekonna suhtes, mis on vähirakkudes kõrgelt ekspresseeritud ja muudavad need rakud paljude stressifaktorite suhtes eriti resistentseks. Need ühendid on seega kasulikud vähivastaseks raviks mõeldud ravimite tootmiseks ning neid võib kasutada kas üksi või kombinatsioonis teiste kemoterapeutiliste vahenditega.

Nagu teada, koosneb enamik kahekümnendal sajandil onkoloogilises ravis kasutatud vähivastaseid vahendeid molekulidest, mis ei ole vähirakkude suhtes selektiivsed ning on seega organismile väga toksilised. Tüüpiliste vähivastaste ravimite hulka kuuluvad alküleerivate vahendite laialtlevinud liikmed, mis on võimelised mitteselektiivselt modifitseerima DNA-d ja RNA-d, ning antimetaboliidid, mis sekkuvad DNA aluste ja teiste looduslike molekulide järeleaimamise abil nukleiinhapete ja valkude sünteesi ning teistesse elutähtsatesse metaboolsetesse protsessidesse, toimides antagonistide ja inhibiitoritena.

Onkoloogilises uurimistöös on alati püütud leida ravimeid, mis suudaksid nii selektiivselt kui võimalik inhibeerida vähirakkude kasvu, mõjutamata seejuures normaalseid rakke. Sel põhjusel on onkoloogiline uurimistöö olnud suunatud näiteks molekulidele, mis inhibeerivad transformeerunud rakkude eluspüsümise võtmeensüüme. Nende molekulide hulka kuuluvad telomeraasi – ensüümi, mille aktiivsus võimaldab vähirakkudel jätkata jagunemist pikema aja jooksul, võrreldes normaalsete rakkude eluspüsümise ajaga, ning mis muudab nad seega “surematuteks” – inhibiitorid. Teine tähtis sihtensüüm on türosiinkinaas, mis osaleb vähi ja teiste proliferatiivsete haiguste, nagu psoriaasi ja ateroskleroosi tekkes. Järgmine tähtis uurimissuund keskendub farnesüültransferaasi – rakkude proliferatsioonis ja kasvajateks transformeerumises osaleva proteiini p21 käivitamiseks olulise ensüümi - spetsiifiliste inhibiitorite väljatöötamisele.

Järgmine signaaliülekanne võtmeensüüm on proteiinkinaas C (PKC), mis osaleb otseselt proliferatsiooni ja diferentseerumise protsessides ja MDR fenotüübi reguleerimises. On teada mitmesuguseid looduslikke PKC inhibiitoreid ning need on alusprintsipiideks uute ravimite väljatöötamisel.

Järgmine sihtensüümide klass puudutab ensüüme, mis reguleerivad rakutsükli, eelkõige tsükliin-sõltuvaid kinaase (CDK), mille inhibiitorid põhjustavad paljudes vähirakuliinides rakutsükli blokeerimist ning võivad seetõttu olla kasutatavad tsütostaatikumide ja tsütotoksiliste vahenditena.

5 Üks ensüüm, mis on viimasel paaril aastal onkoloogia valdkonnas suurt huvi tekitanud, on glutatioon-S-transferaas (GST, EC 2.5.1.18). See on tegelikult isoensüümide perekond, mis on looduses laialt levinud ja mis katalüüsib glutatiooni (GSH) väävliaatomi nukleofiilset atakki substraadimolekulide elektrofiilsetele rühmadele. Nagu teada, on glutatioon tripeptiid, mis koosneb glutamiinhapest, tsüsteiinist ja glütsiinist, ning mis on  
10 kõige tähtsam madalmolekulaarne ühend looma- või taimerakkudes, mis sisaldab tioolrühma. Glutatioon-S-transferaasid katalüüsivad glutatiooni konjugeerimist paljude erinevat tüüpi ksenobiootikumidega, alandades sellega drastiliselt nende reaktiivsust ja muutes need ühendid vees vähem lahustuvaks, selleks et soodustada nende kõrvaldamist.

Selle mehhanismi alusel on GST aktiivsust peetud üheks teguriks, mis vastutab  
15 vähirakkudes nähtava ravimiresistentsuse ilmnemise eest, kuna paljud vähivastased ravimid tuntakse nende ensüümide poolt substraatidena ära (*Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 25, (1990), 47-70; *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, (1995), 445-600; *Cancer Cells Mon. Rev.* 2, (1990), 15-22; *Cancer Res.* 54, 4313-4320; *Eur. J. Cancer* 32A, (1996), 967-978). GST on paljudes inimese vähiliikides kõrgelt ekspresseeritud ning omab võtmerolli  
20 onkoloogilises ravis kasutatavate erinevate vähivastaste ravimite või nende metaboliitide detoksifitseerimises. Ensüüm teostab glutatiooni konjugeerimist vähivastaste ravimitega, nagu lämmastikipriitide, klorambutsiili, tsüklofosfamidi, mitoksantroni ja antrakinooniga, ning suudab detoksifitseerida ka teisi ravimeid, toimides aga mitte otseselt neile molekulidele, vaid nende metaboliitidele.

25 GSTd moodustavad isoensüümide multigeense perekonna, mis on jagatud nende immunogeensuse ja primaarstruktuuri alusel vähemalt kümnesse klassi, kaasa arvatud Alfa, Pi ja Mu. Suuremas hulgas vähivormides on hüperekspresseeritud Pi (GST-Pi), nagu on täheldatud erinevates inimese vähi- ja vähieelsetes kudedes (*Mol. Pharmacol.* 50, (1996), 149-159). Ensüümi ekspressioon tõusu on leitud nii alküleerivatele vahenditele  
30 resistentsetes rakuliinides (*Cancer Res.* 49, (1989), 6185-6192; *Br. J. Cancer* 74, (1996), S93-S98) kui doksorubitsiini ja tsisplatiini suhtes resistentsetes vähirakuliinides (*Cancer Res.* 49, (1989), 7020-7025; *Cancer* 78, (1996), 416-421; *J. Biol. Chem.* 261, (1986),

15544-15549) ning GST ensüümi Pi klassi on soovitatud ka kasutamiseks vähimarkerina vähi varase diagnoosi jaoks.

5 Veelgi enam – paljud uuringud näitavad selgesti, et GST hüperekspressioon tuumorites muudab vähivastased ravimid resistentseteks mitte ainult glutatiooniga konjugeerimise teel, vaid ka teiste mehhanismide abil, mis seni ei ole veel täielikult välja selgitatud. Hiljuti leiti korrelatsioon vähirakkude tuumadesse üle kantud Pi klassi GST ja nende rakkude poolt omandatud resistentsuse vahel selliste ravimite nagu doksorubitsiin ja tsisplatiin suhtes ning on püstitatud hüpotees, et tuumas olev Pi klassi GST kaitseb DNA-d kemoteraapia poolt põhjustatud kahjustuste eest (*Faseb J.* 15, (2001), 2702-2714).

10 Suur hulk tõendeid näitab, et GSTd võivad mängida aktiivset rolli ka programmeeritud rakusurma (apoptoosi) protsessi kontrollimises. Rakustressi tingimustes, nagu näiteks pärast töötlemist UV-kiirgusega või oksüdeerivate vahenditega, aktiveeritakse N-terminaalne proteiinkinaas c-Jun (JNK), mis osaleb imetajarakkude stressivastuses rakutsükli reguleerimise, DNA parandamise või apoptoosi indutseerimise kaudu. Hiljuti puhastati JNK proteiininhibiitor ja identifitseeriti see kui Pi klassi GST (*J. Biol. Chem.* 276, (2001), 20999-21003). See valk seostub proteiinkinaasi JNK C-terminaalse osa piirkonnaga, mis sisaldab jääke 194-201, ning on teada, et rakustressi põhjustavad tegurid osalevad GST Pi / JNK kompleksi dissotsieerimises ja seega ka kinaasi aktiveerimises.

20 Sarnaselt neile tulemustele on leitud ka, et GST Pi spetsiifilised inhibiitorid, nagu glutatiooni peptidomimeetikum TER-117 [Terrapin 117:  $\gamma$ -L-glutamüül-S-(bensüül)-L-tsüsteinüül-R(-)-fenüülglütsiin] ja TER-293, käivitavad proteiinkinaasi JNK, kuna nad soodustavad GST Pi dissotsieerumist GST Pi/JNK kompleksist (*EMBO J.* 18, (1999), 1321-1334; *J. Biol. Chem.* 276, (2001), 20999-21003).

25 Samuti on märgitud, et GSTM1-1 – Mu klassi kuuluv glutatioon-S-transferaas – seostub N-terminaalse osaga teisest kinaasist, mis reguleerib apoptootilist signaali ja mida nimetatakse ASK1 (apoptoosisignaali reguleeriv kinaas), inhibeerides selle aktiivsust. On näidatud, et termiline šokk, mis põhjustab GSTM1-1/ASK1 kompleksi dissotsieerumist, teeb võimalikuks ASK1 käivitumise. See kinaas osaleb omakorda teiste valkude 30 aktivatsioonireaktsioonide kaskaadis ning fosforüleerib JNK ja kinaasi p38, mis on tuntud vahendajad stressifaktorite ja rakuvastuse vahel (*J. Biol. Chem.* 276, (2001), 12749-12755; *J. Biol. Chem.* 277, (2002), 30792-30797).

Kokkuvõttes näib GST üks põhilisi rolle olevat JNK-ga paljude mehhanismide kaudu seotud signaalikaskaadide allareguleerimine: GST Mu ensüüm toimib ASK1 kinaasile ja seega kaudselt ka JNK-le, samas kui GST Pi ensüüm toimib otse JNK-le.

5 Eeltoodud tähelepanekud näitavad, et GST hüperekspressioon vähirakkudes kujutab endast viimaste kaitsemehhanismi endogeenset liiki stressifaktorite ja vähivastastest ravimitest põhjustatud stressi vastu. Seetõttu suudavad vähirakud omandada resistentsuse nende ravimite suhtes ning võivad edaspidi apoptootilistele stiimulitele mitte vastata.

Arvestades eespool öeldut, on tõhusate GST inhibiitorite otsing muutunud üheks 10 esmaseks eesmärgiks, et moduleerida vähirakkude resistentsust vähivastaste ravimite suhtes.

Üks esimesi kasutatud GST-de inhibiitoreid oli etakrüünhape, aktiivne toimeaine, mida oli kaua kasutatud diureetikumina (ja mis on selle näidustuse jaoks hiljuti asendatud furosemiidiga), ja mis sensibiliseerib vähirakud alküleerivate vahendite tsütotoksilise 15 toime suhtes. Ehkki tuntud ka kui substraat mõnede GST isoensüümide jaoks, käitub etakrüünhape ka nende ensüümide inhibiitorina. Selles kontekstis võib hinnatavaid tulemusi saada etakrüünhappe kasutamisel vähirakkude resistentsuse vähendamisel melfalaani, karmustiini, mitomütsiin C, doksorubitsiini ja - vähemal määral – klorambutsiili suhtes kroonilise lümfoidleukeemia patsientidel (*Advanced Drug Delivery* 20 *Reviews* 26, (1997), 91-104).

Nii spetsiifilisuse puudumine pahaloomulistes rakkudes hüperekspresseritud GST isovormide suhtes kui teatav arv märgatavaid kõrvaltoimeid, nagu märgatav diurees, on mitte soodustanud etakrüünhappe kasutamist kliinilises praktikas ning seetõttu on alternatiivina kasutusele võetud mõned spetsiifiliste ensüümi GST klasside suhtes 25 selektiivsed inhibiitorid (*Advanced Drug Delivery Reviews*, samas tsit).

Need on eespool nimetatud glutatiooni peptidomimeetikumid, kaasa arvatud näiteks TER 199 [ $\gamma$ -glutamüül-S-(bensüül)-tsüsteinüül-R(-)-fenüülglütsiini dietüülester], mis siseneb kiiresti rakkudesse ning aktiveeritakse kui eellasravim rakusiseste esteraaside poolt. Aktiivses vormis inhibeerib eespool nimetatud ravim TER-117 selektiivselt Pi 30 klassi GSTd, võimendades lämmastikipriitide ja üldiselt alküleerivate vahendite toimet erinevates vähirakuliinides, nagu käärsoole vähirakuliinis HT29 ja munasarja kartsinoomi rakuliinis SKOV-3, mis hüperekspresserivad isoensüümi GST Pi (*Cancer Chemother. Pharmacol.* 37, (1996), 363-370).

Nii etakrüünhappe kui TER 199 puhul seisneb nende hinnatud toime teiste tsütotoksiliste vahendite (alküleerivate vahendite) poolt resistentsetele vähirakkudele avaldatava toime võimendamises. Teistsugune tsütotoksiliste vahendite klass, mis põhineb glutatiooniga analoogsetel ainetel (*Advanced Drug Delivery Reviews*, juba tsiteeritud),  
5 koosneb molekulidest, mis ei inhibeeri GST, vaid kasutavad selle katalüütilist võimet aktiveerumiseks. Need eellasravimid erinevad oma selektiivsuse poolest erinevate isoensüümide suhtes ja erinevate nendest tuletatud aktiveeritud vahendite poolest. Näiteks on TER 286, mille struktuur omab GSH-peptidomimeetilise aine GST-siduvat võimet ja alküleeriva lämastikipriidi tsütotoksilisust. Pi ja Alfa klassi isoensüümide poolt  
10 aktiveerituna vabastab latetne tsütotoksiin TER 286 loomupärast tsütotoksilist toimet omava tsüklofosfamiidi analoogi.

Seega puudutab käesolev leiutis uute selektiivsete inhibiitorite uurimisvaldkonda vähirakkudes hüperekspressioneeritud glutatioon-S-transferaasi ensüümiklasside jaoks, et pakkuda derivaate, mis toimivad vähivastaste vahenditena nii neile omase tsütotoksilise  
15 jõu kui nende võime tõttu inhibeerida GST-de detoksifitseerivat toimet teiste kemoterapeutiliste vahendite suhtes.

Nagu eespool märgitud, hüperekspressioneeruvad mõned GST klassid paljudes vähirakkudes nii suurel määral, et mõningaid isovorme, nagu GSTP1-1, mis kuulub GST Pi klassi, saab kasutada vähimarkeritena. See ensüümi hüperekspressioon, mis on  
20 dokumenteeritud enamiku vähivormide jaoks, muudab vähirakud ravimiresistentseks mitte ainult detoksifitseeriva toime suhtes, mida need ensüümid katalüüsivad, vaid ka oma apoptoosivastase toime tõttu, mida nad omavad, sekkudes apoptoosi reguleerivatesse signaaliülekanemehhanismidesse.

Uuringutes, mis viisid käesoleva leiutiseni, leiti, et mõned 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli spetsiifilised derivaadid omavad – erinevates vähirakuliinides – tugevat selektiivset inhibeerivat toimet vaadeldavate GST isovormide suhtes, samuti tugevat tsütotoksilist jõudu. Need molekulid seostuvad selektiivselt GST-de hüdrofoobsesse saiti (kuhu seostub glutatiooniga konjugeeritav kaas-substraat) ja inhibeerivad tugevasti neid isoensüüme.  
25

Käesolevas leiutises vaadeldavaid 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli derivaate saab kergesti valmistada, alustades 4-kloro-7-nitro-2,1,3-bensoksadiasoolist – biokeemias hästi tuntud fluorogeensest molekulist, mida kasutatakse tiool- ja amino-ühendite märgistamiseks (*FEBS Lett.* 6, (1970), 346-348; *Eur. J. Biochem.* 54, (1975), 117-126;  
30

*Eur. J. Biochem.* 54, (1975), 127-133). 4-kloro-7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool on hästi tuntud kui Alfa klassi GST-de kaas-substraat, kuid seda kasutatakse ka Pi ja Mu GST-de substraadina, saades produkti, s.o (7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üültio)glutatiooni (*Anal. Biochem.* 218, (1994), 463-465; *J. Biol. Chem.* 271, (1996), 16193-16198).  
5 Viimane molekul on hea GST inhibiitor, kuid see siseneb rakkudesse raskesti ja visatakse neist kiiresti välja.

7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli (nimetatud ka kui 4-nitrobensofurasaan) derivaatidele oli pööratud tähelepanu juba minevikus nende kui vähivastaste vahendite võimaliku kliinilise rakenduse tõttu. Selle perekonna ühendite esmased uuringud ulatuvad tagasi hilistesse 1960-ndatesse koos mõnede publikatsioonidega, kus tõsteti esile nende võimalikku leukeemiavastast toimet (*Biochemical Pharmacology* 17, (1968), 158-161; *J. Med. Chem.* 11, (1968), 305-311). Need publikatsioonid käsitlesid piiratud arvu 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli derivaate ning nendes avaldati nende inhibeeriv toime uridiin-5-<sup>3</sup>H lülitumisele lamba lümfotsüütide RNA-sse *in vitro*, s.t. lümfotsüütide metabolismi  
15 inhibeeriv toime. Hilisemates uuringutes leiti, et 7-fenüültio- ja 7-puriin-6-tio-4-nitrobensofurasaan on mõnedes imetajate normaalses ja vähirakuliinides nukleiinhapete ja valkude sünteesi tugevad inhibiitorid (*Chem. Biol. Interactions* 42, (1982), 195-207). Nendes töödes saadud kogutulemused on vasturääkivad ning paistab, et seda uurimissuunda edaspidi ei jätkatud.

20 Teiselt poolt esitab käesolev leiutis selliste 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli spetsiifiliste derivaatide kasutamise GST-de inhibiitoritena ja vähivastaste vahenditena, mida eelnevates uuringutes ei ole võimalike vähivastaste vahenditena märgitud.

Käesoleva leiutise objektiks olevaid 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli derivaate iseloomustab tioeeter-silla olemasolu asendis -4 ja sellega ühendatud halva lahkuva rühma  
25 omadustega alifaatse rühma olemasolu. Eelistatult sisaldab viimane ka vähemalt ühte -OH rühma. Nimetatud derivaadid omavad võimet siseneda kiiresti vähirakkudesse, kus nad avaldavad olulist tsütotoksilist toimet. See toime on nähtavasti tingitud GST-de detoksifitseeriva toime inhibeerimisest (nagu näidatud spetsiifiliste eksperimentaalsete tõendite abil, mis on saadud puhastatud ensüümide puhul *in vitro*) ja GST-de  
30 apoptoosivastase toime inhibeerimisest, eelkõige vähirakuliinides hüperekspresseeritud GSTP1-1 toimete inhibeerimisest. Seega muudab käesolevale leiutisele vastavate derivaatide kasutamine võimalikuks vähirakkudele – nende kõrgelt selektiivsete ühendite

esemastele märklaudadele - tsütotoksilise toime saamiseks suunatud ravi, sekkudes normaalsete rakkude füsioloogiasse vähem efektiivselt.

Mis puutub käesolevale leiutisele vastavate ühendite keemilisse struktuuri, siis tuleb märkida, et nende skeletis olevate lahkvate rühmade loomus annab tulemuseks aeglased või null-vahetusreaktsioonid endogeensete tiolidega, nagu glutatiooniga, ja stabiilse  $\sigma$ -adukti moodustumise GSH.ga, nagu näidatud siin järgnevas eksperimentaalses osas. Vahetusreaktsioonid endogeensete tiolidega on eespool nimetatud eelnevad uurimissuuna puhul uuritud 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli teiste derivaatide puhul dokumenteeritud fenomen. Eespool nimetatud eelnevate eksperimentide käigus testiti mõningaid 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli -O-, -NR- ja -S-derivaate ning – eelkõige -S-derivaatide hulgas – neid ühendeid, kus väävliga asendis -4 seostuv rühm oli alternatiivselt kas fenüül-, bensüül-, atsetüül- või tsüanorühm. Kirjeldatud tagasihoidlikud ja vasturääkivad tulemused tuleb kirjutada nendes ühendites esinevate heade lahkvate rühmade, nagu kloro-, tiotsüanaat-, fenoksü-, fenüültio- ja bensüültiorühma arvele. Need rühmad eelistavad vahetusreaktsioone glutatiooniga, mis viib viimastega aduktide moodustumisele. Need aduktid visatakse rakkudest eelistatult välja spetsiifiliste membraani glükoproteiinide abil, mis kuuluvad valkude perekonda, mis osalevad mitmete vahendite (mitme ravimi suhtes resistentne valk, *multidrug resistance protein*, MRP) suhtes ravimiresistentsuse protsessis (*Free Rad. Biol. Med.* 27, (1999), 985-991).

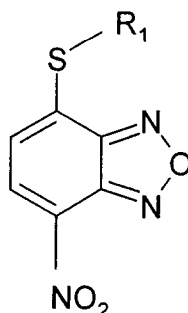
Peale selle – nagu juba märgitud – omavad mõned viidatud kirjanduses kirjeldatud ühendid olulisi lahustumisprobleeme, mis kompromiteerivad nende *in vivo* manustamise võimalikkust. Teiselt poolt aitab käesolevale leiutisele vastavates 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli derivaatides vähemalt ühe –OH rühma olemasolu kaasa nende ühendite heale lahustuvusele vesikeskkonnas, säilitades samal ajal polaarsuse astme sellisena, mis võimaldab vastastikust toimet GST substraadi hüdrofoobse sidumissaidiga, ja nende tugevale ensüümi aktiivsust inhibeerivale toimele.

Väljaspool onkoloogia valdkonda on juba teada mõned -4 asendis tioeeter-silla kaudu funktsionaliseeritud 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli derivaatide rakendused, näiteks kasutamine fluorestseeruvate reaktiividena mõnede tiol-inhibiitorite metabolismi uurimisel angiotensiin I konverteerimisel angiotensiin II-ks (US 4 395 556 ja 4 469 870) ja üldiselt fluorestseeruvate proovidena nukleiinhapete või valkude märgistamiseks. Teisi 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli 4-S-derivaate on kirjeldatud US 2002/0189032-s ja EP-A-



1261591-s, kus need on esitatud kasutamiseks keratiinkiude värviva ainena, eelkõige juuksevärvina.

Seetõttu esitab käesolev leiutis spetsiifiliselt 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli derivaatide üldvalemiga (I)



5

kasutamise, kus:

$R_1$  valitakse rühmast, millesse kuuluvad kuni 12 süsinikuaatomist koosnevad sirge ahelaga, hargnenud ahelaga või tsüklilised alküülrühmad, kuni 12 süsinikuaatomist koosnevad sirge ahelaga, hargnenud ahelaga või tsüklilised alkenüülrühmad ja kuni 12 süsinikuaatomist koosnevad sirge ahelaga, hargnenud ahelaga või tsüklilised alkünüülrühmad, kus üks  $R_1$  rühma vesinikuaatom on valikuliselt asendatud ühe rühmaga, mis valitakse rühmast, kuhu kuuluvad  $OR_2$ ,  $NO_2$  ja  $NR_2R_3$ ,

10 kus  $R_2$  ja  $R_3$  valitakse sõltumatult rühmast, kuhu kuuluvad H ja kuni 12 süsinikuaatomist koosnevad sirge ahelaga, hargnenud ahelaga või tsüklilised alküül-, alkenüül- või alkünüülrühmad,

15 ja kus nimetatud S- $R_1$  rühm ei ole hea lahkuv rühm, vähivormide raviks mõeldud GST-inhibeeriva ravimi valmistamiseks. Vastavalt käesolevale leiutisele saab eelnimetatud, GST suhtes selektiivseid inhibiitoreid kasulikult kasutada kasvajakasvatades ravis, manustades neid kas üksi kui tsütotoksilisi vahendeid või 20 kombinatsioonis teiste kemoterapeutiliste vahenditega, et võimendada nende terapeutilist toimet ravimiresistentsuse toime vähendamise teel.

Vastavalt mõnele oma spetsiifilistele teostustele käsitleb käesolev leiutis 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli derivaatide üldvalemiga (I) kasutamist, kus  $R_1$  on kuni 12 süsinikuaatomist koosnev sirge või hargnenud ahelaga hüdroksüalküülrühm ja see 25 valitakse eelistatult 4-hüdroksübutüül- ja 6-hüdroksüheksüülrühma hulgast.

Eelistatud toimeained esitatud kasutamise jaoks vastavalt käesolevale leiutisele vastavad ühele järgmistest:

4-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üültio)butanool

6-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üültio)heksanool

Vastavalt oma järgmisele eripärale esitab käesolev leiutis spetsiifilisemalt 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli üldvalemiga (I) kasutamise erinevate vähivormide ravimiseks, eriti nende vormide ravimiseks, millele on iseloomulik GST hüperekspressioon. Eelnimetatud ensüümi isovormid, mis hüperekspressseeruvad tahketes tuumorites, lümfoomides ja leukeemiates, võivad kuuluda glutatioon-S-transferaasi GST Pi, GST Mu ja GST Alfa klassidesse ning täpsemalt võivad need olla isovormid GSTP1-1, GSTM2-2 ja GSTA1-1. 35Käesoleva leiutise järgmine spetsiifiline objekt on farmatseutiline kompositsioon vähi ravimiseks, mis sisaldab – toimeainena – vähemalt ühte 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli üldvalemiga (I) derivaati koos ühe või mitme farmatseutiliselt vastuvõetava adjuvandi ja/või kandekeskkonnaga.

Käesolevale leiutisele vastavaid terapeutiliseks manustamiseks mõeldud sobivaid GST inhibiitorite farmatseutilisi preparaate saab formuleerida spetsialistile tuntud tavapäraste tehnikate alusel, kasutades farmatseutiliselt vastuvõetavaid abiaineid ja kandekeskkondi preparaatide saamiseks, mis on sobivad parenteraalseks süstimiseks (veenisiseseks, lihasesiseseks või nahaaluseks süstimiseks), suukaudseks manustamiseks tahkes või vedelas vormis, transdermaalseks, rektaalseks, intravaginaalseks või paikseks manustamiseks näiteks suu- ja ninaõõne limaskestade kaudu jne.

Toimeaine protsendiline sisaldus kompositsioonis ja vähivastase ravi meetod võivad optimaalse annustamise saamiseks varieeruda. Manustatava annuse puhul võetakse arvesse järgmisi tegureid: manustamistee, ravi kestus, patsiendi kehakaal ja seisund, toimeaine aktiivsus ja patsiendi reageerimine sellele.

Kui toimeaine õige annus on määratud, võib sobivate abiainetega ja adjuvantide valiku igaks vajaduseks teha vastava ala üldiste teadmiste alusel.

Mõned käesoleva leiutise raames saadud eksperimentaalsed tulemused, kaasa arvatud mõnede 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli derivaatide – kui GST inhibiitorite – bioloogilist aktiivsust ja tunnusjooni puudutavad andmed, on avaldatud allpool näidetena. Mõned nimetatud eksperimentaalsetest tulemustest on näidatud ka kaasnevate jooniste graafikutel, kus:

Joonisel fig 1 on näidatud Scatchardi graafik 7-nitrobensofurasaani derivaadi sidumise kohta, mis on esitatud järgnevas näites nr 2 kui (6-(7-nitro-1,3-bensoksadiasool-4-üültio)heksanooli sidumine GSTP1-1-ga; graafikul olev  $v$  on suhe antud ligandi kontsentratsioonil täheldatud fluorestsentsi muutuse ja ligandi küllastaval

konsentratsioonil täheldatud fluorestsentsi muutuse vahel; L on vaba ligandi konsentratsioon;

Joonisel fig 2 on näidatud 15  $\mu\text{M}$  7-nitrobensofuraani derivaadi nr 2 spekter 0,1 M K-fosfaatpuhvril, pH 6,5 (Paneelid A ja B, pidevad jooned) ja stöhhiomeetrilise koguse GSTP1-1-ga seostunud 15  $\mu\text{M}$  7-nitrobensofuraani derivaadi nr 2 spekter kas 1 mM GSH (Paneel A, katkendlik joon) või 1 mM S-metüülglutatiooni (Paneel B, katkendlik joon) juuresolekul;

Joonisel fig 3 on näidatud kaspas-3 aktiivsus CEM1.3 ja K562 rakuliinides pärast töötlemist 7-nitrobensofuraani derivaadiga nr 2 (■) ja kaspas-3 aktiivsus kontrollrakkudes (●); apoptoosi protsent pärast töötlemist 7-nitrobensofuraani derivaadiga nr 2 CEM1.3 ja K562 rakuliinides (□) ja kontrollrakkudes (○); aktiivsus on väljendatud fluorestsentsi muutusena rakkude arvu kohta minutis; apoptoosi mõõdeti tuumade fragmenteerumise analüüsi abil pärast rakkude värvimist Hoechst 33342 värviga; Joonisel fig 4 on näidatud vastavalt 10  $\mu\text{M}$  ja 2  $\mu\text{M}$  derivaadiga nr 2 töödeldud K562 ja CEM3.1 rakuliinide tsütofluorimeetrilise analüüsi tulemused; pärast 12 tundi ja 24 tundi kestnud töötlust pesti rakud ja värviti need nii Annexin V-FITS kui PI värvidega, mis võimaldab eristada terveid rakke, varases apoptoosis olevaid ja hilises apoptoosis olevaid või nekrootilisi rakke;

Joonisel fig 5 (A, B ja C) on näidatud vastavalt 10  $\mu\text{M}$  ja 2  $\mu\text{M}$  derivaadiga nr 2 töödeldud K562 ja CEM3.1 rakuliinide *Western blot* analüüs; GSTP1-1, c-Jun, JNK ning fosfoaktiveeritud c-Jun ja JNK isovormid detekteeriti spetsiifiliste antikehade abil; pealekandmise kontrolliks kasutati  $\beta$ -aktiini (Paneelid A ja B); GST/JNK kompleksi dissotsiatsiooni hinnati immunosadestamisanalüüsi abil; lüsaadid immunosadestati JNK vastaste polükloonaalsete antikehadega ja seejärel viidi läbi *Western blot* analüüs; GST ja JNK detekteeriti spetsiifiliste antikehade abil (Paneel B); ja

Joonisel fig 6 on näidatud hiirte kaalu varieerumine *in vivo* ägeda toksilisuse testis, võrreldes erinevate annuste leiutise testitava ühendi nr 2 suukaudse manustamise toimet kontrollidega, kes said ainult füsioloogilist lahust või kandekeskkonda.

Mis puutub sünteesi, siis, nagu juba öeldud, võib käesoleva leiutise objektiks olevaid derivaate, samuti võrdluseks kasutatavaid ühendeid valmistada, alustades kergesti kättesaadavast lähteühendist – 4-kloro-7-nitro-2,1,3-bensoksadiasoolist (Sigma-Aldrich, Fine Chemicals), välistamata seejuures alternatiivseid meetodeid.

## NÄIDE 1

4-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üültio)butanool

Valmistati 4-kloro-7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli (1 mmool) ja 4-merkpto-1-butanooli (Sigma-Aldrich, Fine Chemicals) (2 mmooli) segatud lahus ja lasti sel 6 tundi reageerida keeduklaasis olevas 20 ml-s 1:1 etanooli:kaaliumfosfaatpuhvri, pH 7,0, segus 25 °C juures. pH-d järgiti pidevalt, hoides selle neutraalsena väikeste koguste KOH lisamise abil. Reaktsiooni lõpul lasti 4-merkpto-1-butanooli liial reageerida 1,5 mmooli 3-bromopüruvaadiga.

Reaktsiooniprodukt 4-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üültio)butanool on tumekollane lahustumatu ühend, mis koguti filtrimise abil ja pesti kaks korda 15 ml külma destilleeritud veega. Lõpp-produkti puhtus oli HPLC analüüsi järgi 98%.

Ühendi molekulmass on massispektromeetria meetodil määratuna 269 Da.

UV-s nähtavale spektrile vees on iseloomulik maksimaalse neeldumise piik 431 nm juures ( $\epsilon=15 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) ja fluorestsentsispekter vees omab maksimaalset kiirguse piiki 525 nm juures.

## NÄIDE 2

6-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üültio)heksanool

Valmistati 4-kloro-7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli (1 mmool) ja 6-merkpto-1-heksanooli (Sigma-Aldrich, Fine Chemicals) (2 mmooli) segatud lahus ja lasti sel 6 tundi reageerida keeduklaasis olevas 20 ml-s 1:1 etanooli:kaaliumfosfaatpuhvri, pH 7,0, segus 25 °C juures. pH-d jälgiti pidevalt, hoides selle neutraalsena väikeste koguste KOH lisamise abil. Reaktsiooni lõpul lasti 6-merkpto-1-heksanooli liial reageerida 1,5 mmooli 3-bromopüruvaadiga.

Reaktsiooniprodukt 6-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üültio)heksanool on tumekollane lahustumatu ühend, mis koguti filtrimise abil ja pesti kaks korda 15 ml külma destilleeritud veega.

Lõpp-produkti puhtus HPLC analüüsi andmetel on 98%. Ühendi molekulmass on massispektromeetria meetodil määratuna 298 Da.

UV-s nähtavale spektrile vees on iseloomulik maksimaalse neeldumise piik 432 nm juures ( $\epsilon=15 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) ja fluorestsentsispekter vees omab maksimaalset kiirguse piiki 525 nm juures.

## VÕRDLUSNÄIDE 3

2-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üültio)imidasool

Valmistati 4-kloro-7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli (1 mmool) ja 2-merkaptoidiasooli (Sigma-Aldrich, Fine Chemicals) (1 mmool) lahus ja lasti sel reageerida 6 ml-s 0,3:1 etanooli:vee segus, mis sisaldas 2,5 mmooli püridiini (Sigma-Aldrich, Fine Chemicals). Pärast 6-tunnilist inkubeerimist 25 °C juures lahus filtriti, pesti  
5 kaks korda 10 ml külma destilleeritud veega ja kuivatati vaakumis.

Lahustumatu produkt 2-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üültio)imidiasool on oranži värvi ja HPLC analüüsi andmetel 98% puhtusega. Ühendi molekulmass on massispektromeetria meetodil määratuna 264 Da.

Ühendi UV-s nähtavale spektrile vees on iseloomulik maksimaalse neeldumise piik 401 nm juures ( $\epsilon=11,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) ja sellel ei ole fluorestsentskiirguse spektrit.

#### VÖRDLUSNÄIDE 4

##### 4-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üültio)fenool

Valmistati 4-kloro-7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli (1 mmool) ja 4-merkaptofenooli (Sigma-Aldrich, Fine Chemicals) (2 mmooli) segatud lahus ja lasti sel 6 tundi reageerida  
15 keeduklaasis olevas 20 ml-s 1:1 etanooli : kaaliumfosfaatpuhvri, pH 7,0, segus 25 °C juures. pH-d jälgiti pidevalt, hoides selle neutraalsena väikeste koguste KOH lisamise abil. Reaktsiooni lõpul lasti 4-merkaptofenooli liial reageerida 1,5 mmooli 3-bromopüruvaadiga.

Reaktsiooniprodukt 4-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üültio)fenool koguti  
20 filtrimise abil, pesti kaks korda 15 ml külma destilleeritud veega ja kuivatati vaakumis. Lõpp-produkt on pruun lahustumatu ühend ja selle puhtus HPLC analüüsi andmetel on 98%. Ühendi molekulmass on massispektromeetria meetodil määratuna 289 Da.

Ühendi UV-s nähtavale spektrile vees on iseloomulik maksimaalse neeldumise piik 428 nm juures ( $\epsilon=11,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) ja sellel puudub fluorestsentskiirguse spekter.

#### 25 VÖRDLUSNÄIDE 5

##### 3-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üültio)propioonhape

Valmistati 4-kloro-7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli (1 mmool) ja 3-merkaptopropioonhappe (Sigma-Aldrich, Fine Chemicals) (1 mmool) lahus ja lasti sel reageerida 6 ml-s 0,3:1 etanooli : vee segus, mis sisaldas 2,5 mmooli püridiini.

30 Pärast 6-tunnilist inkubeerimist 25 °C juures lahus filtriti, pesti kaks korda 10 ml külma destilleeritud veega ja kuivatati vaakumis. Lahustumatu reaktsiooniprodukt 3-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üültio)propioonhape on tumekollast värvi ja HPLC analüüsi andmetel 98% puhtusega. Ühendi molekulmass on 270 Da.

Ühendi UV-s nähtavale spektrile vees on iseloomulik maksimaalse neeldumise piik 428 nm juures ( $\epsilon=12 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) ja selle fluorestsentsispektri maksimaalne kiirguse piik on 525 nm juures.

**7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli derivaatide glutatioon-S-transferaasi inhibeeriva bioloogilise aktiivsuse uurimine**

Eksperimentaalne protseduur. Kasutati näidete 1 ja 2 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli derivaate, mis olid valmistatud nimetatud näidetes kirjeldatud protseduuride abil. Võrdluseks hinnati ka järgmiste ühendite käitumist:

- Näidete 3 ja 4 ühendid, mida iseloomustab mõõdukas lahkuv rühm;
- 10 - Näite 5 ühend, mida iseloomustab põhiliselt halb lahkuv rühm, mida on modifitseeritud ühe vesinikuaatomi asendamisel COOH rühmaga;
- 6-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üülamino)heksanooli derivaat, kus valemis on S asendatud NH-ga ja  $\text{NHR}_1$  rühm ei ole lahkuv rühm:

Viimane ühend toimis kontrollina kindlustamaks, et tsütotoksilisus on seotud GST  
15 inhibeerimisega. 6-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üülamino)heksanool saadi 1 mmooli 4-kloro-7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli reageerimisel 1 mmooli 6-amino-1-heksanooliga (Sigma-Aldrich, Fine Chemicals) 6 ml 0,3:1 etüülalkoholis:vees, mis sisaldas 2,5 mmoolipüridiini.

Neid ühendeid testiti kui isoensüümide GSTP1-1, GSTA1-1 ja GSTM2-2, mis  
20 kuuluvad kõige enam esindatud GST klassidesse – Pi, Mu ja Alfa klassidesse -, aktiivsuse inhibiitoreid.

*Escherichia coli*'s ekspresseeritud GSTA1-1, M2-2 ja P1-1 puhastati kromatograafiliselt afiinsuskandjal, mis selektiivselt seob GST (*J. Biol. Chem.* 270, (1995), 12549-1253).

25 GST aktiivsust testiti 25 °C juures 0,1 M kaaliumfosfaatpuhveris pH 6,5 juures substraatide, s.t. 1 mM glutatiooni (Sigma-Aldrich, Fine Chemicals) ja 1 mM 1-kloro-2,4-dinitrobenseeni (CDNB) (Sigma-Aldrich, Fine Chemicals) juuresolekul (*Methods Enzymol.* 77, 1981, 398-405).

30  $\text{IC}_{50}$  (inhibiitori kontsentratsioon, mille juures täheldatakse ensümaatilise aktiivsuse 50%-list inhibeerimist) määramiseks korraldatud testimise ajal lisati aktiivsuse segu koos erinevate koguste testitavate 4-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli derivaatidega.

Ensümaatilist aktiivsust hinnati spektrofotomeetriliselt 340 nm juures – lainepikkusel, mille juures reaktsiooniprodukt S-(2,4-dinitrobenseen)glutatioon (GS-DNB) neelab ( $\epsilon = 9,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

5 Tulemused. 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli derivaatide  $IC_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) väärtused on avaldatud allolevas tabelis 1. Tabelis on näidatud  $IC_{50}$  väärtused erinevate inhibiitorite jaoks, mida testiti iga GST klassi kolme tüüpiliseks näiteks oleva isoensüümi suhtes. 66Iga ühend on tabelis antud koos numbriga, mis vastab vastavale sünteesinäitele, samas kui võrdlemiseks kasutatav aminoderivaat on antud numbriga 6.

Tabel 1

GST aktiivsuse inhibeerimine – $IC_{50}$ väärtused ( $\mu\text{M}$ )			
Ensüüm	GSTA1-1	GSTP1-1	GSTM2-2
Ühend nr.			
(1)	56,00	2,00	0,03
(2)	25,00	0,80	0,01
(3)	11,00	6,30	0,01
(4)	6,50	0,70	0,03
(5)	66,00	5,74	0,31
(6)	suurem kui 100	suurem või võrdne kui 100	1,80
(1) 4-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üültio)butanool (2) 6-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üültio)heksanool (3) 2-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üültio)imidasool (4) 4-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üültio)fenool (5) 3-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üültio)propioonhape (6) 6-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üülamino)heksanool			

10

Nagu juba öeldud, testiti ka 6-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üülamino)heksanool-derivaadi inhibeerivat võimet erinevate GST isoensüümide suhtes. Viimase valemis olev väävliaatom on asendatud aminorühmaga, et hinnata, kas tsütotoksilisus on seotud GST inhibeerimisega.

15

Nende esmaste andmete analüüs näitab, et ühend on praktiliselt kaotanud oma võime inhibeerida GSTP1-1 ( $IC_{50} \geq 100 \mu\text{M}$ ), kuid säilitab tugevama inhibeeriva võime GSTM2-2 suhtes  $IC_{50}$ -ga  $1,8 \mu\text{M}$ .

Analoogse inhibiitori jaoks, mille struktuuri kuulub väävel, on  $IC_{50}$  palju madalam (tugevam inhibeeriv võime), võrreldes kontrolliga, nimelt  $0,80 \mu\text{M}$  GSTP1-1 suhtes ja  $0,01 \mu\text{M}$  GSTM2-2 suhtes.

### **7-nitrobensofurasaani derivaatide ja GST-de vahelise toime mehhanism**

#### **7-nitrobensofurasaani derivaatide sidumine GST-dega**

Eksperimentaalne protseduur. 7-nitrobensofurasaani derivaatide afiinsus inimese GST-de suhtes saadi inhibiitori sidumise järel toimuva valgu loomupärase fluorestsentsi kustutamise mõõtmisel (ergastamine toimus  $295 \text{ nm}$  juures ja kiirgus registreeriti  $340 \text{ nm}$  juures). Loomupärast fluorestsentsi mõõdeti footonite ühekaupa loendamise spektrofluoromeetris (Fluoro-max, S.A. Instruments, Paris, Prantsusmaa). Tüüpilises eksperimendis registreeriti fluorestsents  $340 \text{ nm}$  juures enne ja pärast erinevate koguste valitud inhibiitori lisamist  $4 \mu\text{M}$  GST-le  $0,1 \text{ M}$  K-fosfaatpuhvrts, pH  $6,5$ , mis sisaldas  $1 \text{ mM}$  GSH.

Tulemused. Tüüpiliseks näiteks olevad andmed, mis saadi GSTP1-1 ja 7-nitrobensofurasaani derivaadiga nr 2 (sünteesinäide 2) on esitatud Scatchardi graafikuna Joonisel fig 1. Inhibiitor-GSTP1-1 kompleksi jaoks saadud dissotsiatsioonikonstant on  $K_D=0,8 \mu\text{M}$ , mis paigutub  $IC_{50}$  väärtuse peale, mis oli saadud kineetiliselt ja mis on esitatud Tabelis 1. On tähelepanuväärne, et GSH on olulise tähtsusega 7-nitrobensofurasaani derivaadi ja GST vahelise hea afiinsuse jaoks: GSH puudumisel langeb afiinsus tõepoolest umbes kahe suurusjärgu võrra.

#### **Spektroskoopilised tõendid $\sigma$ -adukti moodustumise kohta aktiivsaisid**

Eksperimentaalne protseduur.  $15 \mu\text{M}$  7-nitrobensofurasaani derivaadi nr 2 UV-s nähtav spekter stöhhiomeetriliste koguste GSTP1-1 ja  $1 \text{ mM}$  GSH juuresolekul saadi  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  juures  $0,1 \text{ M}$  K-fosfaatpuhvrts, pH  $6,5$  juures.

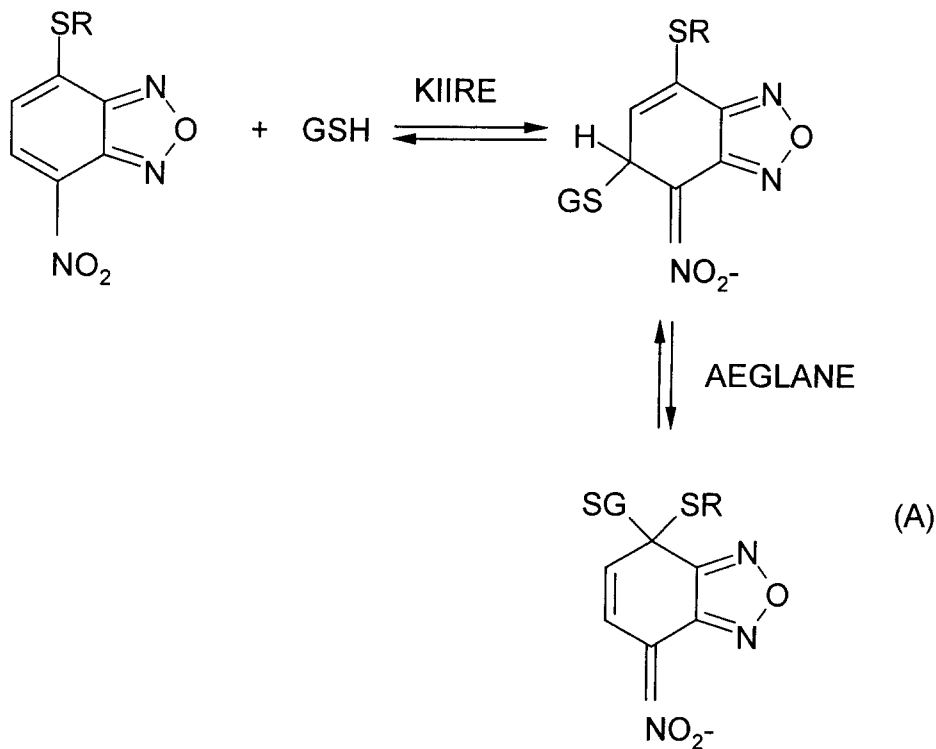
Tulemused. GSTP1-1 ja GSH juuresolekul täheldati kohe 7-nitrobensofurasaani derivaadile iseloomuliku riba ilmumist  $432 \text{ nm}$  juures ja paralleelselt  $348 \text{ nm}$  juurde keskjoondatud riba suurenemist (Joonis fig 2, Paneel A). GSH tiolrühm on selle spektrimuutuse saamiseks oluliselt vajalik. UV-nähtavas spektris ei täheldatud tõepoolest muutust juhul, kui 7-nitrobensofurasaani derivaati ( $50 \mu\text{M}$ ) inkubeeriti koos stöhhiomeetriliste koguste GSTP1-1 ja  $1 \text{ mM}$  S-metüülglutatiooniga (Joonis fig 2, Paneel B).

Seda käitumist saab selgitada eelnevate publikatsioonide abil, mis näitavad, et 7-nitrobensofurasaanid on suurepärased elektrofiilid, mis moodustavad kergesti  $\sigma$ -adukte



paljude nukleofiilidega (*J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, (2002), 257-261). Tavaline täheldatav käitumine on kineetiliselt eelistatud atakk 7-nitrobensofuraani tsükli 6. asendi juures olevale nukleofiilile, millele järgneb aeglane isomerisatsioon stabiilsema 4-adikti suunas, mis neelab 300 ja 400 nm vahel. Ülaltoodud eksperimentaalsetes tingimustes saab

5  $\sigma$ -adukt moodustuda kovalentse vastastikuse toime kaudu 7-nitrobensofuraani derivaadi ja GSTP1-1 aktiivsaii seotud GSH tiolrühma vahel, nagu avaldatud Skeemil A.



See hüpotees on kooskõlas sidumis-lähenedisega, mis viiakse läbi GST sidumissaidis oleva ligandi orientatsiooni ennustamiseks. 6. asendis ja 4. asendis oleva  $\sigma$ -adikti sidumisenergiate võrdlemine annab tulemuseks kaks suurusjärku parema stabilisatsiooni 4-asendatud ühendi jaoks.

10

Ülaltoodud andmetest nähtub, et tegelik inhibiitori molekul, mis inhibeerib GSTP1-1, on 7-nitrobensofuraani derivaadi ja GSH vahel moodustunud  $\sigma$ -adukt. GSTd katalüüsivad väga efektiivselt  $\sigma$ -adikti moodustumist 7-nitrobensofuraani derivaadi ja

15 GSH vahel. Halvad lahkuvad rühmad, nagu alküültiorühmad, võivad  $\sigma$ -adikti stabiliseerida, takistades monoasendatud 4-glutationüül-7-nitroderivaadi moodustumist. Veelgi enam, nendele  $\sigma$ -aduktidele on iseloomulik 7-nitrorühmal lokaliseeruv negatiivne laeng, mida ensüüm saab spetsiifiliselt stabiliseerida. Tõepoolest saadakse GSTP1-1 puudumisel märgatavad kogused  $\sigma$ -adikti ainult neis lahustes, kus GSH kontsentratsioon

20 on kõrgem kui 5 mM, ning selle reaktsiooni jaoks arvatud tasakaalukonstant on  $K = 20$

mM. Selle tasakaalukonstandi alusel on 1 mM GSH-ga (meie eksperimentides kasutatud GSH kontsentratsioon) GSTP1-1 puudumisel moodustunud  $\sigma$ -adukti kogus umbes 5% 7-nitrobensofurasaani kontsentratsioonist. Seetõttu tuleb GSTP1-1 afiinsuseks tõeliste inhibiitor-molekulide suhtes  $4 \times 10^{-8}$  M. See tugev afiinsus näitab, et GSTP1-1 on selle molekuli jaoks väga valitud sihtmärk rakus.

#### 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli derivaatide vähivastase toime testimine rakuliinides

Eksperimentaalne protseduur. 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli derivaatide vähivastase toime testimiseks kasutati nelja vähirakuliini: K562 (inimese müeloidleukeemia), HepG2 (inimese maksakartsinoom), CEM1.3 (inimese T-lümfotsüüt-leukeemia) ja GLC-4 (inimese väikserakuline kopsukartsinoom).

Inimese vähirakuliine hoiti RPMI 1640 söötmes (mis sisaldas 2 mM L-glutamiini ja 0,1 g/l penitsilliin-G/streptomütsiinsulfaati), mis oli rikastatud 5% veise fetaalseerumiga (*fetal bovine serum*, FBS), 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> ja 98% niiskuse juures.

Rakud paigutati 96-süvikulistesse plaatidesse tihedusega 15 000 rakku süviku kohta rakusöötme rumalas 100 µl. 24 tunni pärast lisati söötmesse iga testitavat 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli derivaati vajalikus kontsentratsioonis. Samal ajal korraldati mõned kontrollkatsed, lisades süvikutesse lahustit, milles ühend oli lahustatud (ruumalaprotsenti DMSO-d PBS-s). Kõik mõõtmised teostati neljas korduses.

Rakke inkubeeriti 48 tundi 37 °C juures 5% CO<sub>2</sub> manulusel.

Iga uuritava 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli annuse ja vastuse vahelise profiili saamiseks kasutati hindamisprotsessi, mis põhines Shekan'i *et al.* poolt kirjeldatud meetodil (*J. Natl. Cancer Inst.* 82, (1990), 1107-1112).

Pärast inkubeerimist hinnati rakkude kasvuprotsenti *in situ* rakkude fikseerimisprotsessi abil, millele järgnes SRB test, milles kasutati värvimisprotseduuri sulforodamiin B-ga, mis on võimeline valkudega spetsiifiliselt seonduma. Seejärel solubiliseeriti värvunud produkt ja kvantiseeriti spektrofotomeetriliselt, et määrata uuritava ühendiga töödeldud rakkude kasvu nende suhtes, mida oli töödeldud ainult lahustiga.

Et mõõta ka kasutatud rakkudes oleva endogeensete GST-de aktiivsust, kasutati samu vähirakuliine: K562, HepG2, CEM1.3 ja GLC-4. Sel juhul töödeldi rakke vajadusel trüpsiiniga, koguti tsentrifuugimise abil ja pesti kaks korda PBS-ga. Seejärel suspendeeriti rakud uuesti kahes rumalas PBS-s ja lüüsi sonikeerimise teel. Rakulüsaati tsentrifuugiti

15 000 g juures 15 minutit. Supernatant koguti ja kasutati GST-de ensümaatilise aktiivsuse testimiseks, nagu on kirjeldatud eelmises näites.

Üks GST ühik defineeritakse ensüümi kogusena, mis katalüüsib 1 µmooli produkti (GS-DNB) moodustumist minutis 25 °C juures.

5 Valgu kontsentratsioon määrati bitsinkoniinhappe meetodi abil (Pierce).

Tulemused. 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli derivaatide IC<sub>50</sub> väärtused (ühendi kontsentratsioon, mille juures täheldatakse rakkude kasvu 50%-list inhibeerimist, võrreldes töötlemata rakkudega), väljendatuna µM ühikutes, on avaldatud tabelis 2.

Tabelis 2 loetletud ühendid on antud samas numbrilises järjestuses nagu need, 10 mida kasutati eespool avaldatud eksperimentides. Nagu eelnevates eksperimentides, on ühendid (3)-(6) esitatud võrdluses nõudluspunktides esitatavate ühenditega (1) ja (2).

Tabel 2

Aktiivsuse katsed rakuliinides – IC <sub>50</sub> väärtused (µM)				
Rakuliin	CEM1.3	GLC-4	K562	HepG2
Ühend nr.				
(1)	0,2	3,2	2,2	3,2
(2)	0,1	1,4	0,8	2,9
(3)	3,9	10	8,8	16
(4)	2,4	7,5	6,4	16,3
(5)	6,5	16,5	38	25
(6)	suurem kui 50	suurem kui 50	suurem kui 50	suurem kui 50
(1) 4-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üültio)butanool				
(2) 6-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üültio)heksanool				
(3) 2-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üültio)imidasool				
(4) 4-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üültio)fenool				
(5) 3-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üültio)propioonhape				
(6) 6-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üülamino)heksanool				

15 SRB testi järgi omavad 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli derivaadid vastavalt valemile (I) suurepärasest tsütotoksilisest aktiivsust. Rakuliinidel saadud IC<sub>50</sub> väärtused on samas suurusjärgus kui puhastatud ensüümi isovormi GSTP1-1 jaoks saadud IC<sub>50</sub> väärtused.

Selle vastavuse toetamiseks testiti ühendit 6-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üülamino)heksanool erinevates rakuliinides ning oli näha, et see ei oma ensüümi isovormi GSTP1-1 suhtes inhibeerivat toimet, aga omab IC<sub>50</sub> umbes 2 µM ensüümi isovormi GSTM2-2 suhtes. Sellel ühendil õnnestub kergesti rakkudesse tungida, nagu võib  
 5 järeldada fluorestsentsi intensiivsusest, mis registreeritakse pärast 6-tunnilist inkubeerimist 6-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üülamino)heksanooli erinevate kontsentratsioonidega. Kõik testitud vähirakuliinid olid pärast 48-tunnilist inkubeerimist 50 µM 6-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üülamino)heksanooliga ikka veel elus.

Tabelis 3 on avaldatud GST eriaktiivsuse väärtused (**ensüümiühikut/mg**),  
 10 arvatatutena tsütoksilisuse katses kasutatud rakuliinides.

Tabel 3

GST eriaktiivsus ( <b>ensüümiühikut/mg</b> )				
Rakuliin	CEM1.3	GLC-4	K562	HepG2
Eriaktiivsus	0,21	0,35	0,52	0,02

Vähirakuliin, mis omas suuremat resistentsust 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli derivaatidega töötlemise suhtes, on maksakartsinoomi liin HepG2. See vähirakuliin omab  
 15 ka kõige madalamat GST eriaktiivsust, nagu võib näha Tabelist 3, samuti erineb see rakuliin GST isoensüümide koostise poolest teiste vähirakuliinide omast.

Paljude rakuliinidega läbi viidud iseloomustavad uuringud kinnitavad tõepoolest, et enamikus vähirakuliinides on GSTP1-1 domineeriv ensüümi isovorm (1-30 µg/mg valku) ja et selle isoensüümi kõrgeid ekspressioonitasemed näivad olevat korrelatsioonis  
 20 nende vähirakuliinide proliferatsioonivõime ja immortaliseerumisvõimega (*Mol. Pharmacol.* 50, (1996), 149-159).

HepG2 vähirakuliinis on GSTP1-1 kontsentratsioon – vastupidi – väga madal ja domineeriv ensüümi isovorm on GSTA1-1, mille kontsentratsioon absoluutses väljenduses on siiski ainult umbes 1% GSTP1-1 kontsentratsioonist, mida leitakse enamikus  
 25 vähirakuliinides (*Biochim. Biophys. Acta* 1225,(1994), 223-230).

Lõpuks on huvitav märkida, et testitud vähivastaste ühendite tsütotoksilisus oli kõige kõrgem CEM1.3 ja K562 leukeemia rakuliinides, mis on ilmselt seda tüüpi sekkumise suhtes tundlikumad kui tahke vähivormi rakuliinid.

**7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli derivaatide võime suurendada vähivastaste ravimite tsütotoksilisust resistentsete rakkude suhtes**  
 30

Vähirakkudes on resistentsus paljude vähivastaste ravimite suhtes sageli seotud P-glükoproteiini kõrge ekspressiooniga, mis on ABC transporterite üldperekonda (ATP-siduv kassett) kuuluv membraanivalk. Selles eksperimendis oli ette nähtud testida 6-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üültio)heksanooli toimet vinblastiin-ravimi toksilisusele CEMBL 100 rakuliini suhtes, mis on vinblastiini suhtes resistentne leukeemiarakuliin (hüperekspressioon P-glükoproteiini).

Eksperimentaalne protseduur. Rakud paigutati 96-süvikulistesse ribadesse tihedusega 15 000 rakku süviku kohta rakusöötme ruumalas 100 µl. 24 tunni pärast lisati söötmesse vinblastiini sobiv kontsentratsioon vahemikus 25 nM kuni 1000 nM. Test viidi läbi nii 6-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üültio)heksanooli erinevate kontsentratsioonide juuresolekul vahemikus 0,1 µM kuni 1 µM kui selle puudumisel. Samal ajal korraldati mõned kontrollkatsed, lisades süvikutesse ainult lahustit, milles ühend oli lahustatud (ruumalaprotsenti DMSO-d PBS-s). Kõik mõõtmised viidi läbi neljas korduses. 48-tunnilise inkubatsiooni järel saadi annuse-vastuse sõltuvuskõver, kasutades SRB testi (*J. Natl. Cancer Inst.* 82, (1990), 1107-1112, siin tsiteeritud). 6-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üültio)heksanooli üksinda hinnati ka resistentse leukeemialiini CEMVBL 100 suhtes.

Tulemused. Nagu näidatud Tabelis 4, põhjustab 6-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üültio)heksanool (0,5 µM) leukeemiarakkude märgatavat tundlikkuse tõusu vinblastiini suhtes.

Tabel 4

6-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üültio)heksanooli toime vinblastiini tsütotoksilisusele (IC <sub>50</sub> nM)		
6-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli derivaat	Puudub	0,5 µM
CEMVBL 100	340	50

Samuti tuleb märkida, et CEMVBL 100 rakuliinis ei toimu märgatavat resistentsuse tõusu, väljendatuna IC<sub>50</sub> -na, võrreldes teistesrakuliinidega, mis ei ekspresseeri kõrgelt P-glükoproteiini. See tulemus näitab, et P-glükoproteiini hüperekspressioon ei häiri 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli derivaatide tsütotoksilist toimet.

### Apoptoosi analüüs K562 ja CEM1.3 rakuliinides

Apoptoosi induktsioon rakkudes 7-nitrobensofurasaaani derivaadi nr 2 poolt määrati kaspas-3 aktivatsiooni mõõtmise abil ja nii morfoloogilise kui vooltsütomeetria analüüsi abil.

#### 5 **Kaspas-3 aktivatsioon**

Eksperimentaalne protseduur. Kaspas-3 aktivatsioon märgib kriitilist rolli apoptoosi aktiivse faasi käivitamisel, mille tulemuseks on rakusurm. Seega saab kaspas-3 proteaasid aktiivsust kasutada apoptoosi jälgimiseks.

Erinevate ajavahemike jooksul koos 7-nitrobensofurasaaani derivaadiga nr 2 (10  $\mu$ M ja 2  $\mu$ M) inkubeeritud rakkude sademed (vastavalt K562 ja CEM1.3) suspendeeriti uuesti lüüsipuhvris (100 mM Hepes, pH 7,6, 0,1% Chaps, 1 mM EDTA, 1 mM fenüülmetüülsulfonüülfluoriid ja 10 mM DTT) 20 minuti jooksul jääl ning rakud lõhuti 10-sekundilisel sonikeerimisega. Lüsaate kasutati pärast tsentrifuugimist kaspas-3 aktiivsuse mõõtmiseks. Kasutatud substraadiks oli fluorestseeruv mudelpeptiid Ac-DEVD-AFC (atsetüül-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-trifluorometüülkumariin), mis proteolüüstiti kaspas-3 abil, saades tulemuseks fluorestsentskiirguse 505 nm juures (ergastus 400 nm juures). Kontroll-lüsaate inkubeeriti enne ensüümi aktiivsuse määramist 30 minutit 30 °C juures koos kaspas-3 inhibiitori DEVD-CHO-ga. Kaspas-3 aktiivsus väljendati fluorestsentsi muutusena minutis rakkude arvu kohta.

20 Tulemused. Inkubatsioon koos 7-nitrobensofurasaaani derivaadiga nr 2 käivitab kaspas-3 aktivatsiooni nii CEM1.3 kui K562 rakuliinides. Nagu näidatud joonisel fig 3, täheldati kaspas-3 tugevat tõusu K562 rakkudes 24 tundi pärast töötlemist derivaadiga nr 2. Samasugune tulemus saadi CEM1.3 rakkudega.

#### **Morfoloogiline analüüs**

25 Eksperimentaalne protseduur. K562 ja CEM1.3 rakuliine töödeldi 24 tundi vastavalt 10  $\mu$ M ja 2  $\mu$ M derivaadiga nr 2. Apoptoosilised rakud detekteeriti fluorestsentsmikroskoobi abil, analüüsides tuumade fragmenteerumist pärast värvimist Hoechst 33342 värviga (Calbiochem-Novabiochem).

30 Tulemused. Tüüpilised näiteks olevad K562 rakkude andmed näitavad kromatiini kondenseerumist ja tuumade fragmenteerumist, mis vastavad apoptoosi lõppetappidele.

#### **Vooltsütomeetriline analüüs**

Eksperimentaalne protseduur. Rakke pesti PBS-ga ning värviti propiidiumjodiidi ja mitteläbiva värviga Annexin V-FITC (Bender MedSystems, Viin, Austria). Värvitud rakke

analüüsiti FAC-Scan vooltsütomeetri abil (Becton-Dickinson, CA). Andmed registreeriti ja analüüsiti statistiliselt WinMDI versioon 2.8 tarkvara abil. Rakkude samaaegne värvimine Annexin V FITC ja PI-ga võimaldab eristada terveid rakke, varases apoptoosis ja hilises apoptoosis või nekroosis olevaid rakke.

5 Tulemused. Joonisel fig 4 on näidatud vooltsütomeetrilise analüüsi tulemused nii K562 kui CEM1.3 rakuliinide puhul. Apoptootiliste rakkude arvu pidevat kasvu täheldati kuni 24-tunnise inkubeerimise kestel. 12-tunnine töötlus derivaadiga nr 2 indutseerib K562 ja CEM1.3 rakuliinides vastavalt 30% ja 34% apoptoosi, samas kui 24 tunni pärast tõusis apoptoos K562 ja CEM1.3 rakuliinides vastavalt 41% ja 47%-ni.

10 Kokkuvõttes näitavad kolme erineva eksperimentaalse lähenemise abil saadud tulemused 7-nitrobensofurasaani derivaadi proapoptootilist võimet CEM ja K562 leukeemia rakuliinides.

#### **Rakusisese mehhanismi määratlemine**

Mehhanism, mille abil GST inhibiitor indutseerib apoptoosi, on osaliselt visandatud allpool, kus kirjeldatakse derivaadi nr 2 vastastikust toimet rakusisese JNK-vahendatud rajaga CEM lümfoidleukeemia ja K562 müelotsüüt leukeemia rakuliinides.

#### **Westrn blot ja immunosadestamise eksperiment**

Eksperimentaalne protseduur. Rakud pesti PBS-ga ja koguti tsentrifuugimise abil. Rakusademed suspendeeriti uuesti lüüsi puhvris, mis sisaldas 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 5  
20 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,5% IGEPAL CA-630 ja proteaasi inhibiitoreid (Sigma Co.). Pärast 30-minutilist inkubeerimist jääl lõhuti rakud 10-sekundilise sonikeerimise abil. Seejärel lüsaadid tsentrifuugiti ja supernatandid kanti 12%-lisele polüakrüülamiidgeelile ning pärast foreesi üle nitrotselluloosmembraanile. Primaarsete antikehadena kasutati polükloonaalseid GSTP1-1 vastaseid (1:1000), c-Jun vastaseid ja JNK vastaseid (1:200)  
25 antikehi või monokloonaalseid fosfo-aktiveeritud c-Jun ja JNK isovormide vastaseid antikehi (1:200; Sata Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) ning  $\beta$ -aktiini vastaseid monokloonaalseid antikehi (1:5000; Sigma Co.).  $\beta$ -aktiini kasutati pealekandmise kontrollina.

30 Immunosadestamisanalüüsi jaoks suspendeeriti rakusademed uuesti lüüsi puhvris ja rakud lõhuti 10-sekundilise sonikeerimise abil. Seejärel tsentrifuugiti lüsaate 14 000 g juures 15 minutit 4 °C juures. Valke inkubeeriti lüüsi puhvris koos JNK vastase antikehaga 2 tundi 4 °C juures. Immunokompleksid absorbeeriti proteiin A-Sepharose külge 30 minuti jooksul 4 °C juures. Pärast kolme pesu lüüsi puhvriga keedeti immuunsademeid

SDS-proovipuhvris. Valgud kanti SDS-poliüakrüülamiidgeelile ja pärast foreesi nitrotselluloosile. GST, JNK ja fosfo-aktiveeritud JNK detekteeriti spetsiifilise antikeha abil.

Tulemused. Joonisel fig 5 (A ja B) on näidatud vastavalt 10  $\mu\text{M}$  ja 2  $\mu\text{M}$  derivaadiga nr 2 töödeldud K562 ja CEM1.3 rakuliinide *Western blot* analüüsid.

*Western blot* analüüs näitab nii JNK kui c-Jun põhi- ja fosforüleeritud vorme. Mõlemas rakuliinis suureneb fosfo-JNK selgesti pärast pooletunnilist inkubatsiooni koos derivaadiga nr 2 ja see jääb kõrgele tasemele kuni 24 tunniks. c-Jun fosfoaktiveerimise suundumus K562 rakuliinis on sarnane JNK aktiveerumisele; see on kiiresti detekteeritav pärast pooletunnilist inkubeerimist koos derivaadiga nr 2 ja see jääb kõrgele tasemele kuni 12 tunniks (Paneel A). c-Jun fosfoaktiveerumine CEM1.3 rakkudes on teistsuguse suundumusega; fosfo-c-Jun kiiret kasvu täheldatakse pool tundi pärast derivaadi nr 2 lisamist, aga see alaneb kiiresti ja jõuab 12 tundi pärast töötlust põhitasemele (Paneel C).

Need andmed tähendavad, et apoptoosi induktsioon sõltub JNK/c-Jun rajast isegi siis, kui rakuvastuse modaalsus ilmneb erinevana. Eelkõige võiks oletada histoloogilisest tüübist sõltuvat mitogeen-aktiveeritava valguga (*mitogen-activated protein, MAP*) kinaasiraja osalust.

Et hinnata, kas töötlemine derivaadiga nr 2 mõjutab GST-JNK kompleksi kogust, immunosadestati K562 rakulüsaadid JNK vastase antikehaga ja kasutati *Western blot* analüüsiks. Joonisel fig 5 paneelil B on näha, et GSTP1-1 kogus, mis sadeneb koos JNK-ga, alaneb kiiresti derivaat nr 2-ga töödeldud rakkudes ja kasvab veidi alles pärast 3 tundi.

Seega toimub JNK/c-Jun raja aktiveerimine GSTP1-1 dissotsieerumise kaudu GST-JNK kompleksist, mis käivitatakse derivaat nr 2 poolt.

Eespool toodu võimaldab teha järgmised järeldused. Vastuseks paljudele stiimulitele, mis indutseerivad oksüdatiivset stressi, kaasa arvatud UV kiirgus ja vähivastased ravimid, on vajalik MAP kinaaside perekonna aktivatsioon, et aktiveerida apoptoosi indutseerimiseks vajalikud geenid ja valkude translatsioonijärgsed modifikatsioonid. Selle signaaliülekaneraja redoks-aktivatsiooni kõrval põhjustab GSH peptidomimeetilise ühendi (TER117) ja selle dietüülestri (TER199) - GSTP1-1 isoensüümi spetsiifilise inhibiitori - lisamine GSTP1-1-JNK kompleksi dissotsiatsiooni, mille tulemuseks on JNK aktivatsioon. JNK aktivatsioon indutseerib substraadi c-Jun fosforüleerimise, mis reguleerib rakuapoptoosis osalevate geenide transkriptsiooni (*J. Pharmacol. Exp. Ther.* 296, (2001), 1-6).



Samamoodi on käesoleva leiutise 7-nitrobensofurasani derivaadid väga tõhusad GST inhibiitorid, mis võiksid praimeerida rakud apoptoosi jaoks, indutseerides GSTP1-1 dissotsiatsiooni JNK-st. On näidatud, et 7-nitrobensofurasani derivaat nr 2 käitub GST-de jaoks suitsiidisubstraadina: ta on konjugeeritud GSH-ga GST aktiivsaidis, mis viib  $\sigma$ -adukt-vaheühendini, mis inhibeerib ensüümi tugevasti ( $K_D=4 \times 10^{-8}$  koos GSTP1-1-ga). See iseäralik vastastikune toime tähendab, et GSTP1-1 on selle molekuli jaoks väga valitud sihtmärk. Raku sees indutseerib 7-nitrobensofurasani derivaat nr 2 GSTP1-1 dissotsiatsiooni JNK-st, mille tulemuseks on nii JNK kui c-Jun fosfoaktivatsioon. 7-nitrobensofurasani derivaat nr 2 käivitab K562 ja CEM1.3 rakkudes tüüpilise apoptoosiprotsessi, mis hõlmab rakkude kokkutõmbumist, fosfolipiidide fosfatidüülseriini translokatsiooni raku pinnale, kaspaaside aktivatsiooni ja kromatiini kondensatsiooni.

#### Ägeda toksilisuse in vivo test

Testis kasutati 25 emast BDF1 liini hiirt (18-20 g, Charles River Lab, Lecco, Itaalia), mis jaotati 5 rühma, igas rühmas 5 hiirt. Kolme rühma raviti ühekordse manustamisega intraperitoneaalse (*i.p.*) süstimise teel 6-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üültio)heksanooliga järgmistes kontsentratsioonides: a) 125 mg/kg, b) 25 mg/kg, c) 5 mg/kg. Ülejäänud kahte rühma kasutati kontrollidena ja neile nähti ette järgmine manustamine: d) oliivõli-kandekeskkond, mis sisaldas 2,5% DMSO-d, ja e) füsioloogiline lahus.

Hiiri jälgiti 15 päeva, kindlustades neile piisava koguse toitu ja vett ning registreerides iga hiire kehakaalu muutused. Registreeritud kaalumuutuse suund on avaldatud Joonisele fig 6 lisatud diagrammil, mis näitab, et isegi 15 päeva pärast ravimist oli hiirte kehakaalus toimunud ainult väikesi muutusi. Veelgi enam – hinnati ka iga hiire maksa ja põrna kaalu, et näha, kas need jäid normi piiresse, tähendades seega 6-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üültio)heksanooli toksilisuse puudumist isegi maksimaalse kasutatud kontsentratsiooni korral (125 mg/kg).

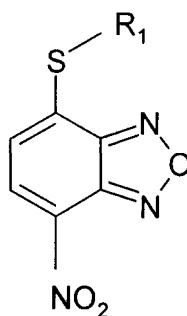
Kõik saadud andmed toetavad kinnitust, et 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli derivaatide arvestatav tsütotoksiline toime vähirakkudele on põhjustatud GSTP1-1 detoksifitseeriva ja apoptoosivastase aktiivsuse inhibeerimisest ning vähirakud on nende ühendite esmaseks märklauaks, kuna nad hüperekspressseerivad GSTP1-1.

Käesolevale leiutisele vastavad 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli derivaadid leiavad seega lootustäratavat võimalikku kasutamist vähivastaste vahenditena. Veelgi enam – neid

saab kasutada kombinatsioonis teise kemoterapeutilise vahendiga, et ära hoida, vähendada või kõrvaldada ravimiresistentsuse efekti, mida nähakse vähivastase kemoteraapia patsientidel.

**Patendinõudlus**

## 1. 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli derivaatide üldvalemiga (I)



kus:

- 5 R<sub>1</sub> valitakse rühmast, millesse kuuluvad kuni 12 süsinikuaatomist koosnevad sirge ahelaga, hargnenud ahelaga või tsüklilised alküülrühmad, kuni 12 süsinikuaatomist koosnevad sirge ahelaga, hargnenud ahelaga või tsüklilised alkenüülrühmad ja kuni 12 süsinikuaatomist koosnevad sirge ahelaga, hargnenud ahelaga või tsüklilised alkünüülrühmad,
- 10 üks R<sub>1</sub> rühma vesinikuaatom on valikuliselt asendatud ühe rühmaga, mis valitakse rühmast, kuhu kuuluvad OR<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub> ja NR<sub>2</sub>R<sub>3</sub>, kus R<sub>2</sub> ja R<sub>3</sub> valitakse sõltumatult rühmast, kuhu kuuluvad H ja kuni 12 süsinikuaatomist koosnevad sirge ahelaga, hargnenud ahelaga või tsüklilised alküül-, alkenüül- või alkünüülrühmad,
- 15 ja kus nimetatud S-R<sub>1</sub> rühm ei ole hea lahkuv rühm, kasutamine vähivormide raviks mõeldud GST-inhibeeriva ravimi valmistamiseks.
2. Kasutamine vastavalt nõudluspunktile 1, mis **erineb selle poolest**, et R<sub>1</sub> on kuni 12 süsinikuaatomist koosnev lineaarne või hargnenud hüdroksüalküülrühm.
3. Kasutamine vastavalt nõudluspunktile 2, mis **erineb selle poolest**, et R<sub>1</sub> valitakse 4-  
20 hüdroksübutüül- ja 6-hüdroksüheksüülrühma hulgast.
4. Kasutamine vastavalt nõudluspunktile 3, mis **erineb selle poolest**, et 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli derivaat vastab ühele järgnevatest:
- 4-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üültio)butanool  
6-(7-nitro-2,1,3-bensoksadiasool-4-üültio)heksanool
- 25 5. Farmatseutiline kompositsioon vähi ravimiseks, mis **sisaldab** toimeainena vähemalt ühte 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli derivaatidest valemiga (I) koos ühe või mitme farmakoloogiliselt vastuvõetava adjuvandi ja/või kandekeskkonnaga.

6. Farmatseutiline kompostisioon vastavalt nõudluspunktile 5, mis **sisaldab** kombinatsioonis vähemalt ühe 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli derivaadiga üldvalemiga (I) ühte või mitut teist kemoterapeutilist vahendit.
7. Farmatseutiline kompositsioon vähi ravimiseks, mis on suuteline ära hoidma, vähendada või kõrvaldama ravimiresistentsust, mis **sisaldab** toimeainena vähemalt ühte 7-nitro-2,1,3-bensoksadiasooli derivaati üldvalemiga (I) kombinatsioonis ühe või mitme teise kemoterapeutilise vahendiga.

Tõlme sügavust kinnitan: *Mark T. NELSON*

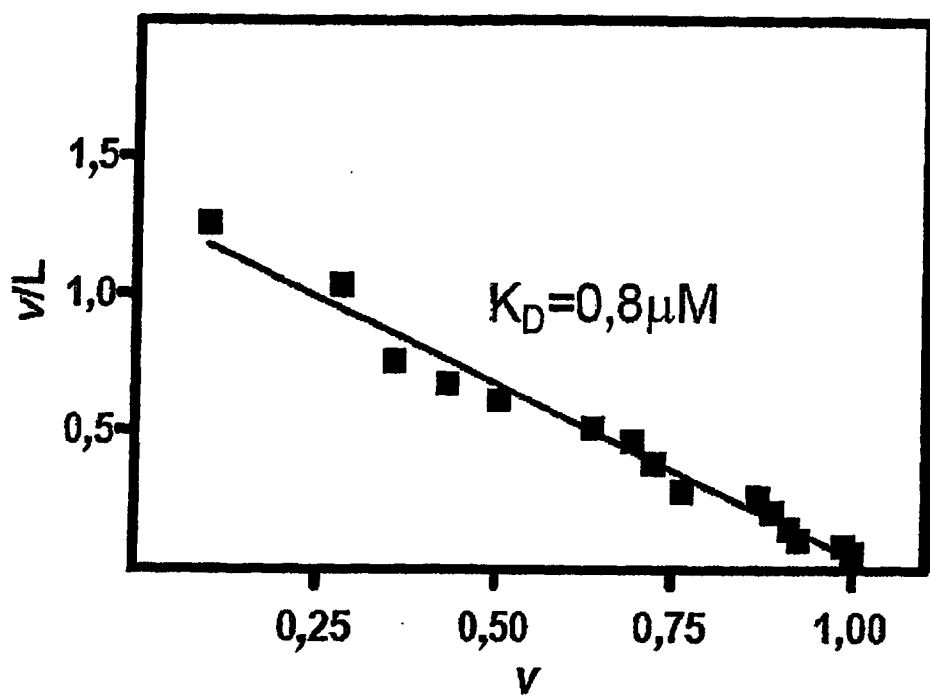


FIG 1

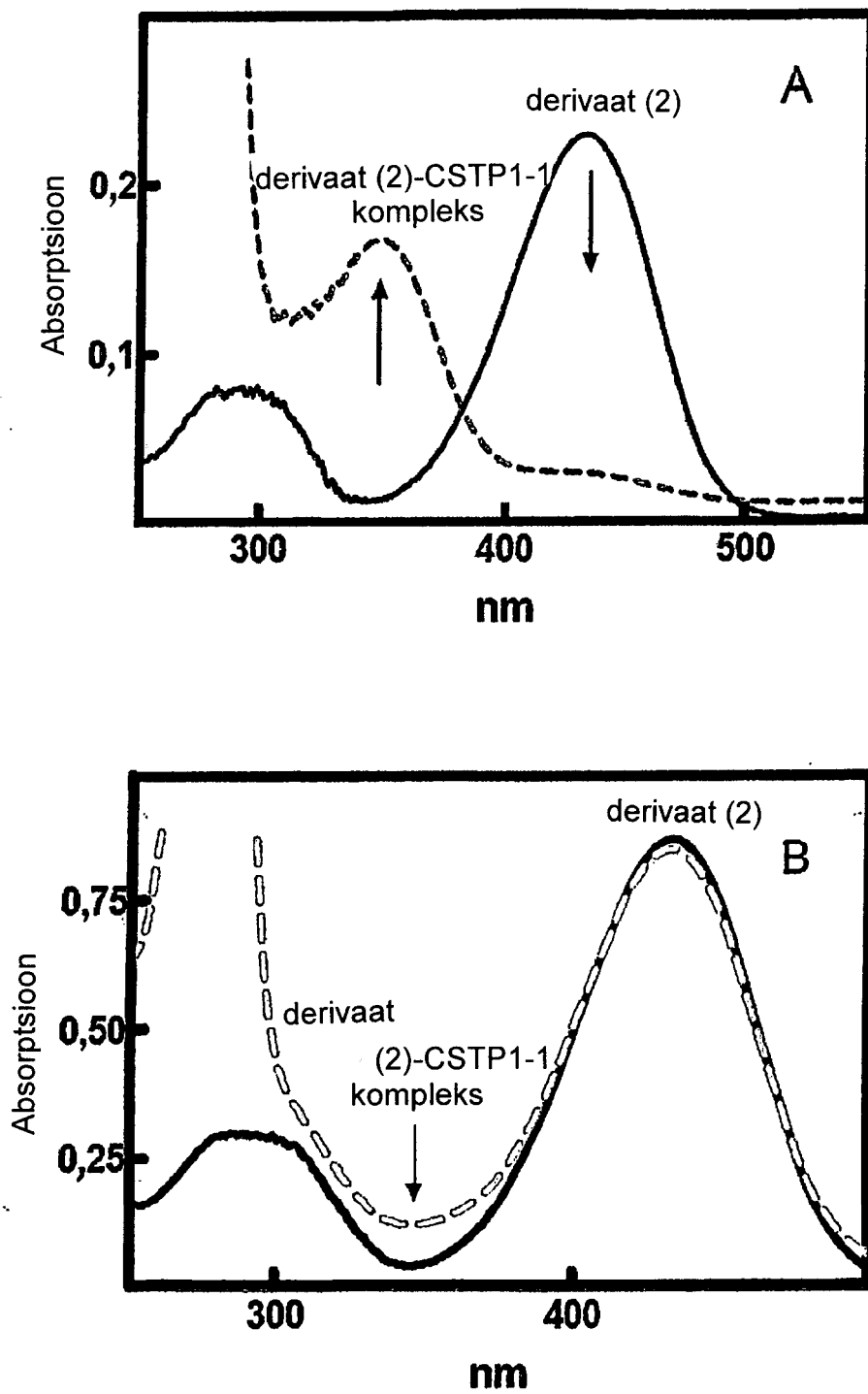
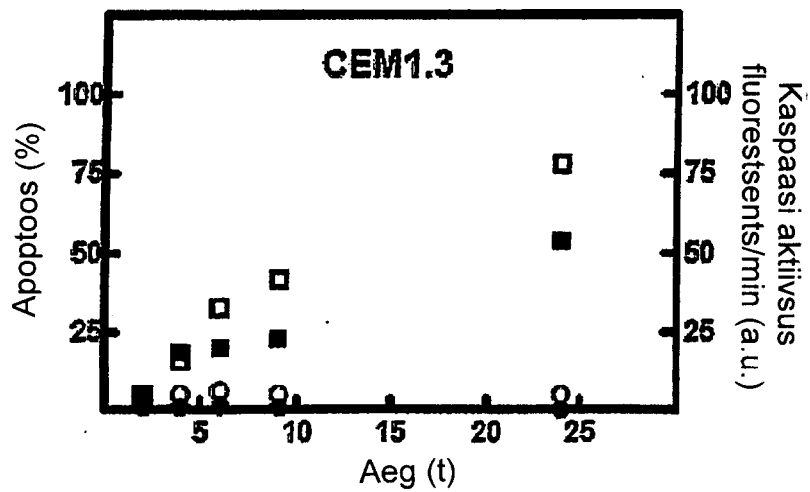
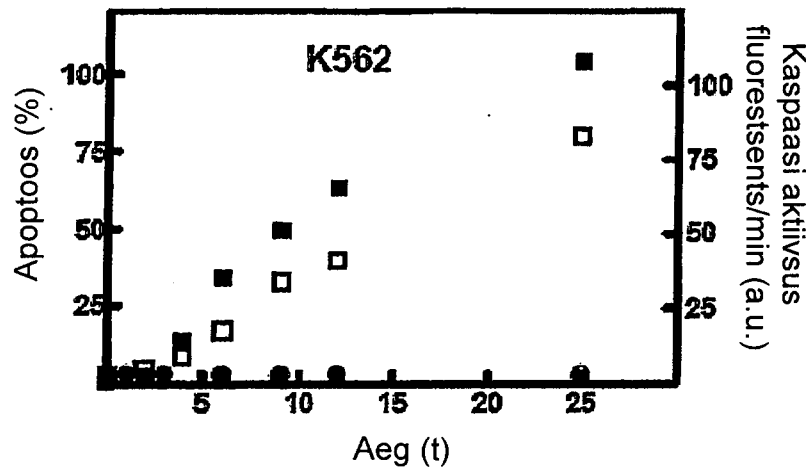


FIG 2

- Kaspaasi aktiivsus derivaadiga nr 2 töödeldud rakkudes: ■  
- Apoptoos derivaadiga nr 2 töödeldud rakkudes: □  
- Kaspaasi aktiivsus kontrollrakkudes: ●  
- Apoptoos kontrollrakkudes: ○

**FIG 3**

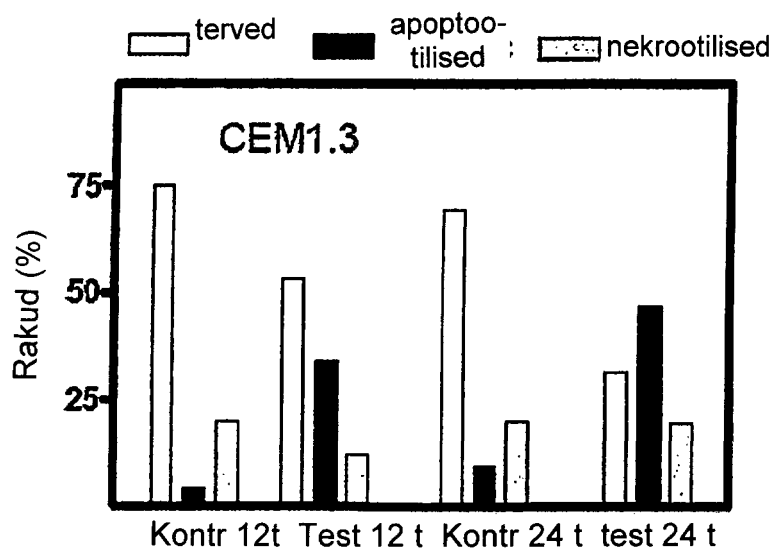
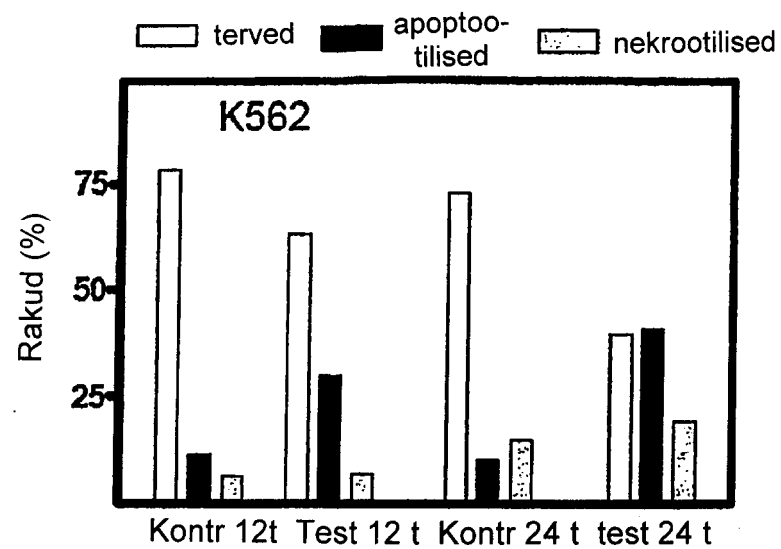
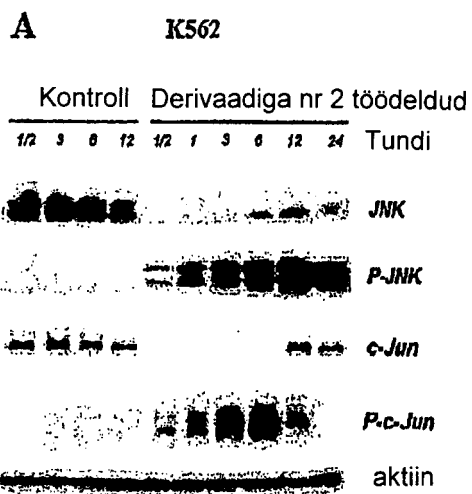
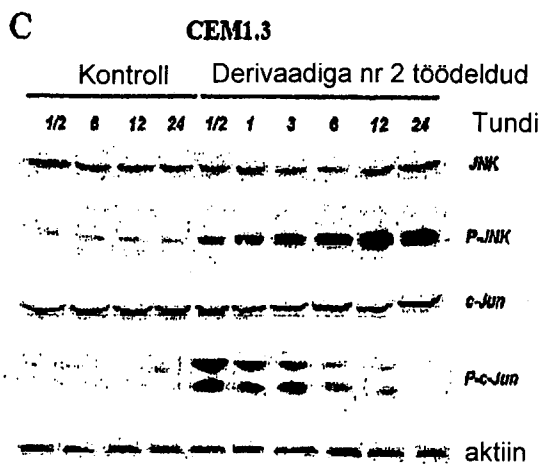
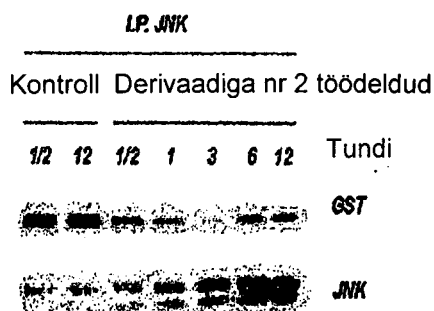


FIG 4





**B** Immunosadestamine



**FIG 5**

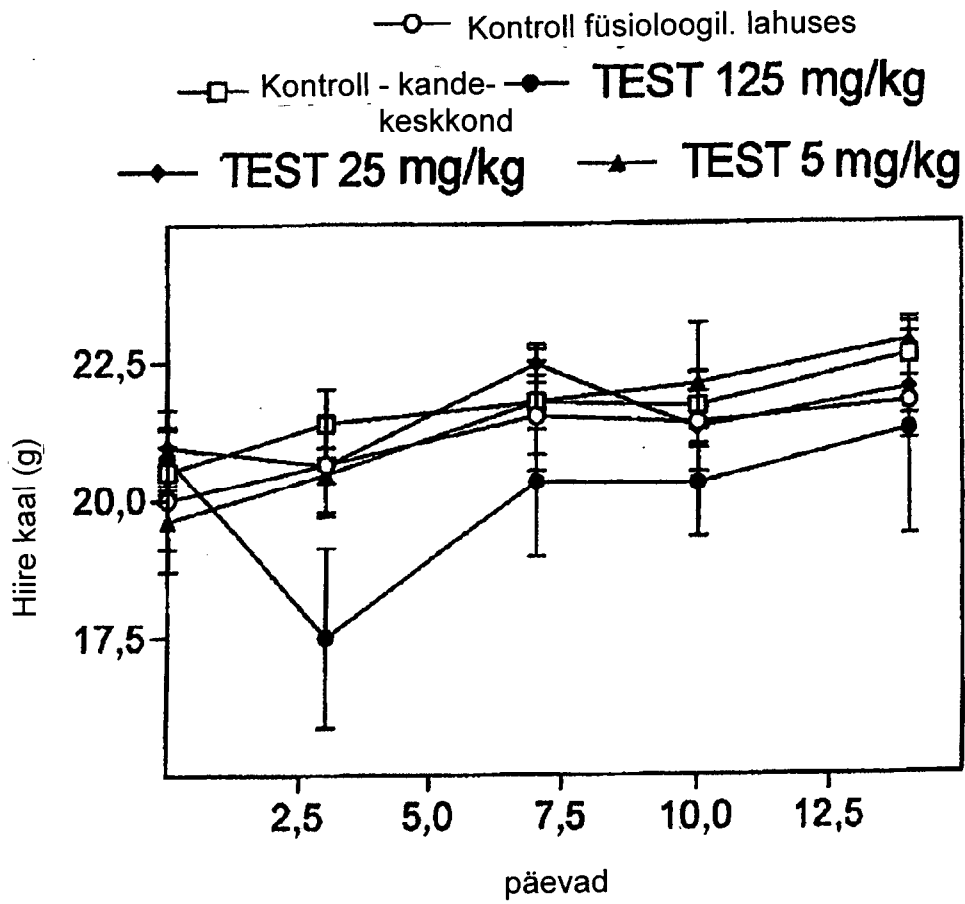


FIG 6