



(21) Numer zgłoszenia: **436476**

(22) Data zgłoszenia: **24.12.2020**

(51) Int.Cl.
C07D 491/048 (2006.01)
C07D 405/02 (2006.01)
C07D 307/91 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **Pochodna kwasu usninowego, sposób otrzymywania pochodnej kwasu usninowego i medyczne wykorzystanie pochodnej kwasu usninowego w terapii nowotworów oraz zastosowanie do indukcji stresu związanego z retikulum endoplazmatycznym**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
09.08.2021 BUP 19/21

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
22.11.2021 WUP 34/21

(73) Uprawniony z patentu:

UNIwersytet Gdański, Gdańsk, PL
The Australian National University,
Canberra, AU
GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY, Gdańsk, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

ANNA HERMAN-ANTOSIEWICZ, Gdańsk, PL
TRISTAN REEKIE, Dickson, AU
MARIOLA GIMŁA, Kolonia Rybacka, PL
KAMIL RYŚ, Łódź, PL
AGNIESZKA PYRCZAK-FELCZKOWSKA,
Gdynia, PL
ANNA PAWLIK, Jelenia Góra, PL
MALINOWSKA MARCELINA, Gdynia, PL
ALEKSANDRA HAĆ, Wejherowo, PL
BEATA GUZOW-KRZEMIŃSKA, Gdańsk, PL

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Justyna Pawłowska

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest nowy związek, pochodna kwasu usninowego otrzymana na drodze syntezy chemicznej. Wynalazek dotyczy również zastosowania medycznego związku wobec nowotworów pochodzących z różnych tkanek. Związek stanowi również środek do zastosowania jako środek *in vitro* w badaniach biologii komórek do indukcji stresu związanego z retikulum endoplazmatycznym, jako odczynnik do zastosowania *in vitro* do badań laboratoryjnych nad molekularnym mechanizmem odpowiedzi na ten stres.

Choroby nowotworowe stanowią jedną z czołowych przyczyn zgonów ludzi na całym świecie, stąd ciągle poszukuje się skutecznych form zapobiegania im i ich leczenia. W działania te wpisuje się opracowanie nowych leków opartych na strukturze znanych związków pochodzenia naturalnego. Porosty są bogatym źródłem substancji o potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym.

Zespół naukowy wynalazku posiada długoletnie doświadczenie w dziedzinie chorób nowotworowych i poszukiwaniu związków naturalnych o oczekiwanym działaniu biologicznym. Obecnie skupił prace badawcze nad kwasem usninowym, który występuje w postaci dwóch enancjomerów: kwas (+) usninowy oraz kwas (-) usninowy, różniących się położeniem grupy metylowej w pozycji 9b. Wykazuje on szereg interesujących właściwości, m.in. aktywność przeciwbakteryjną, przeciwwirusową, przeciwgrzybiczą, a także cytostatyczną i cytotoksyczną względem komórek nowotworowych – zarówno w modelach *in vitro*, jak i *in vivo*, co opisano w Ingolfsdottir K: Usnic acid. *Phytochemistry* 2002, 61(7):729–736; Araujo AA, de Melo MG, Rabelo TK, Nunes PS, Santos SL, Serafini MR, Santos MR, Quintans-Junior LJ, Gelain DP: Review of the biological properties and toxicity of usnic acid. *Natural Product Research* 2015, 29(23):2167–2180; Galanty A, Pasko P, Podolak I: Enantioselective activity of usnic acid: a comprehensive review and future perspectives. *Phytochemistry Reviews* 2019, 18; Luzina OA, Salakhutdinov NF: Biological activity of usnic acid and its derivatives: Part 2. Effects on higher organisms. Molecular and physicochemical aspects. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 2016, 42:249–268.

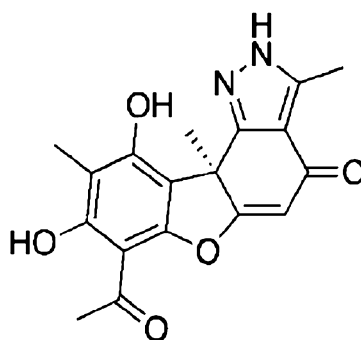
Opisane w literaturze działanie cytotoksyczne UA objawia się głównie przy stosunkowo wysokich jego stężeniach. Dla przykładu, wartości IC_{50} po 72-godzinnym traktowaniu (+)-UA komórek nowotworu jajnika (A2780), szyjki macicy (HeLa), piersi (MCF-7 i SKBR-3), okrężnicy (HT29), białaczki (HL60 i Jurkat) wynosiły od 49 μ M (HL60) do 199 μ M (SKBR-3). Aby nieodwracalnie zahamować zdolność do podziałów tych komórek (tzw. klonogeniczność) traktowano je 200 μ M kwasem (+) usninowym przez 48 godzin – Backorova M, Jendzelovsky R, Kello M, Backor M, Mikes J, Fedorocko P: Lichen secondary metabolites are responsible for induction of apoptosis in HT-29 and A2780 human cancer cell lines. *Toxicology in vitro* 2012, 26(3):462–468.

Niekorzystne jest również to, że związek ten nie jest selektywny w stosunku do komórek nowotworowych i tak dla przykładu IC_{50} dla komórek nowotworowych (MM98 i A431) wynosiło 23–72 μ M, a dla prawidłowych keratynocytów (HaCaT) – bardzo podobnie, tj. 35–76 μ M – Burlando B, Ranzato E, Volante A, Appendino G, Pollastro F, Verotta L: Antiproliferative effects on tumour cells and promotion of keratinocyte wound healing by different lichen compounds. *Planta Medica* 2009, 75(6):607–613. Jedynie odmienne wyniki opisano w Brisdelli F, Perilli M, Sellitri D, Piovano M, Garbarino JA, Nicoletti M, Bozzi A, Amicosante G, Celenza G: Cytotoxic activity and antioxidant capacity of purified lichen metabolites: an *in vitro* study. *Phytotherapy Research* 2013, 27(3):431–437, gdzie opisano komórki traktowane kwasem (+) usninowym izolowanym z *Cladonia lepidophora*. Wartości IC_{50} , jakie wyznaczono w tej pracy dla komórek nowotworu piersi (MCF-7), szyjki macicy (HeLa) i okrężnicy wynosiły odpowiednio około 76, 24 i 18 μ M, a dla prawidłowych embrionalnych fibroblastów myszy – powyżej 100 μ M. Jednak szereg prac wskazuje na silne hepatotoksyczne działanie kwasu usninowego. Dla przykładu, w: Han D, Matsumaru K, Rettori D, Kaplowitz N: Usnic acid-induced necrosis of cultured mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress. *Biochemical Pharmacology* 2004, 67(3):439–451, traktowanie hepatocytów mysich kwasem usninowym już w stężeniu 5 μ M spowodowało śmierć 98% komórek. Opisano też w: Da Silva Santos NP, Nascimento SC, Wanderley MS, Pontes-Filho NT, da Silva JF, de Castro CM, Pereira EC, da Silva NH, Honda NK, Santos-Magalhaes NS: Nanoencapsulation of usnic acid: An attempt to improve antitumour activity and reduce hepatotoxicity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2006, 64(2): 154–160, uszkodzenie wątroby (rejony nekrotyczne w tych organach, podwyższony poziom transaminaz we krwi) u myszy, którym podano dootrzewnowo kwas usninowy w dawce 15 mg/kg/dzień przez 15 dni.

Wynalazek obejmuje sposób otrzymania – syntezy chemicznej, nowego związku według wynalazku – pochodnej kwasu usninowego, nazywanego dalej jako NHPYUSNC (ang. NH pyrazole usnic acid derivative, pochodna NH-pirazolowa kwasu usninowego) i pokazanego jako wzór 1 i jego zastosowanie medyczne oraz jako środek do badań *in vitro*. Na wzorze na schemacie 1 – gdzie pokazano sposób otrzymania – pokazano również kwas usninowy. Pochodna NHPYUSNC to syntetyczny związek (S)-7-acetylo-8,10-dihydroksy-3,9,10b-trimetylo-2,10b-dihydro-4H-benzofuro[2,3-g]indazol-4-on).

Już w niskich stężeniach wykazuje on antyproliferacyjne działanie wobec komórek nowotworowych pochodzących z różnych organów, takich jak gruczoł sutkowy, płuco, wątroba, trzustka, szyjka macicy. Ponadto, związek ten wywołuje charakterystyczne zmiany w komórkach nowotworowych polegające na ich silnej wakuolizacji związanej ze stresem retikulum endoplazmatycznego. Ponieważ ten rodzaj stresu leży u podłoża wielu chorób (w tym chorób nowotworowych), a jego mechanizm nie jest do końca poznany, związek ten ma zastosowanie jako środek laboratoryjny *in vitro* do zastosowania w badaniach biologii komórek *in vitro* do indukcji tej charakterystycznej odpowiedzi fenotypowej.

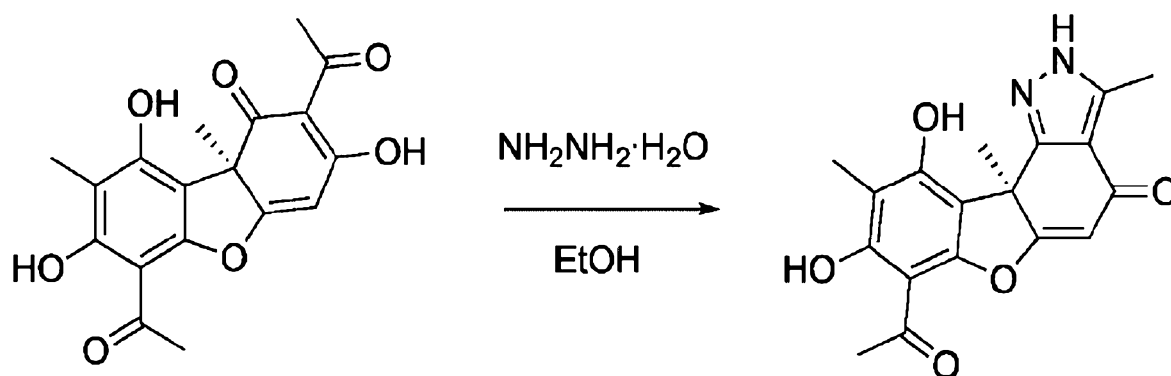
Pochodna według wynalazku ma działanie antyproliferacyjne (hamuje podziały i indukuje śmierć komórek nowotworowych), ale i hamuje ich migrację (potencjalne działanie anty metastatyczne).



Wzór 1

Wynalazek pokazano na wzorze, schemacie, jak i w przykładzie. Na fig. 1–2 pokazano potwierdzenie otrzymania związku, zaś na fig. 3–7 pokazano wyniki opisanych badań potwierdzających aktywności związku według wynalazku.

Przykład



Kwas usninowy - Wzór 1

Schemat 1

Sposób otrzymywania nowego związku NHPYUSNC – schemat 1:

- do zawiesiny (+)-kwasu usninowego (1 równoważnik) w bezwodnym etanolu (roztwór o stężeniu 0.1 M) ogrzanej do wrzenia, dodawano hydrat hydrazyny (1,1 równoważnik) i mieszano pod chłodnicą zwrotną przez 18 godz.
- po ochłodzeniu usunięto rozpuszczalnik z wykorzystaniem wyparki

- uzyskany osad był oczyszczony za pomocą chromatografii kolumnowej typu flash, gdzie fazę ruchomą stanowił octanu etylu w heksanie (3:7 – 1:1), uzyskując pożądaną produkt w postaci żółtego krystalicznego ciała stałego (stopień czystości 78%).

Widmo ^1H NMR zarejestrowano przy 300 MHz, natomiast widmo ^{13}C NMR przy 75 MHz za pomocą spektrometru Bruker 300. Widma pokazano na fig. 1 i fig. 2. Przesunięcia chemiczne (δ) podano w częściach na milion (ppm), a jako wzorca wewnętrznego przy 0 ppm użyto tetrametylosilanu (TMS). Wszystkie stałe sprzężenia (J) podano w hercach, multipletowość sygnałów określano następująco: s (singlet), d (dublet), dd (dublet dubletów), t (tryplet), dt (dublet trypletów), q (kwartet), m (multiplet). Widma mas o niskiej i wysokiej rozdzielczości zostały zarejestrowane za pomocą spektrometru Bruker (USA) Daltronics BioApex II z jonizacją przez elektrorozpylanie (ESI) i 7T nadprzewodzącym magnesem 7T.

Identyfikacja otrzymanego związku:

NHPYUSNC [(S)-7-acetylo-8,10-dihydroksy-3,9,10b-trimetylo-2,10b-dihydro-4*H*-benzofuro[2,3-*g*]indazol-4-on]], masa molowa 340,335.

Właściwości: jasno żółte ciało stałe, o widmie:

^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 13.32 (s, 1H), 10.60 (s, 1H), 9.78 (s, 1H), 5.98 (s, 1H), 2.73 (s, 3H), 2.68 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 1.73 (s, 3H); ^{13}C NMR(101 MHz, CDCl_3) δ 200.96, 183.30, 181.29, 163.30, 157.27, 156.47, 156.20, 142.68, 111.95, 108.60, 105.77, 105.36, 102.10, 45.68, 33.52, 31.34, 10.87, 7.51; (+)-HRESIMS m/z 341.1141 [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ (obliczono dla $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_5$ 341.1137).

Badania aktywności biologicznej związku będącego przedmiotem wynalazku.

Przetestowano działanie antyproliferacyjne substancji NHPYUSNC na wielu liniach nowotworowych pochodzących z nowotworów gruczołu sutkowego (linie MCF-7, T47D, SKBR-3, MDA MB 231 różniące się statusem receptorów dla estrogenu i czynników wzrostu), wątroby (HepG2), płuca (A549), szyjki macicy (linie HeLa, CaSki, ME 180, C-33A różniące się statusem receptorów dla czynników wzrostu i obecnością genomu HPV), trzustki (linie PANC-1 i MIA PaCa-2 różniące się m.in. statusem receptorów dla hormonów) oraz komórek prawidłowych z nabłonka gruczołu sutkowego (HB-2) i fibroblastów skóry (HDFa).

Testy cytotoksyczności MTT komórek traktowanych związkiem NHPYUSNC wykazały, że hamuje on żywotność badanych linii komórek nowotworowych w sposób zależny od użytego stężenia. Jednocześnie prawidłowe komórki były znacznie bardziej odporne na testowany związek, co pokazano na fig. 3 i w Tabeli 1.

Wykresy przedstawiają żywotności komórek (szacowanych względem kontroli, która stanowi 100%) wybranych linii nowotworowych w zależności od stężenia NHPYUSNC i czasu ekspozycji. Komórki nowotworowe gruczołu sutkowego HER2-dodatnie (SKBR-3), szyjki macicy (HeLa), płuca (A549), wątroby (HepG2) oraz prawidłowe komórki epitelialne gruczołu sutkowego (HB-2) i fibroblasty skóry (HFDa) były traktowane NHPYUSNC w stężeniu 50, 100, 250, 500 lub 1000 ng/ml, a trzustki (PANC-1 i MIA PaCa-2) – dodatkowo 2500 i 5000 ng/ml przez 24 lub 48 godzin. Następnie do pożywki dodano roztworu bromku 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowego (MTT) do stężenia końcowego 1 mg/ml i inkubowano przez 3 godziny. Związek ten jest metabolizowany do formazanu jedynie przez aktywne metabolicznie, żywe komórki. Po zakończeniu inkubacji pożywkę usuwano, a powstałe na dnie dołków kryształki formazanu rozpuszczano w 100% DMSO. Absorbancję powstałego roztworu mierzono spektrofotometrycznie w czytniku płytek wielodołkowych przy fali o długości 570 nm oraz fali o długości 660 nm, służącej jako referencja.

Wartości IC_{50} dla wszystkich testowanych linii zestawiono w Tabeli 1. Warto podkreślić, że w badanym zakresie stężeń nie ustalono wartości IC_{50} w przypadku strukturalnie podobnego kwasu usninoowego, co wskazuje na dużo silniejsze działanie cytotoksyczne związku NHPYUSNC.

T a b e l a 1. Wartości IC₅₀ (μg/ml) dla NHPYUSNC po 24 i 48 godzinach ekspozycji względem linii komórek nowotworowych różnego pochodzenia oraz zdrowych komórek ludzkich; n. w. – nie wyznaczono w testowanym przedziale stężeń. Wartości te były wyznaczone na podstawie wyników testów MTT w programie GraphPad Prism.

Pochodzenie	Linia komórkowa	IC ₅₀ po 24 godz.	IC ₅₀ po 48 godz.
Komórki nowotworowe			
Gruzoł piersiowy	MCF-7	0,46	0,5
	T47D	0,35	0,24
	SKBR-3	0,46	0,27
	MDA MB 231	0,32	0,19
Płuco	A549	0,34	0,41
Wątroba	HepG2	0,30	0,29
Szyjka macicy	HeLa	0,43	0,33
	Ca Ski	0,53	0,51
	ME 180	0,45	0,38
	C-33A	0,56	0,44
Trzustka	PANC-1	0,94	0,69
	Mia PaCa-2	0,97	0,71
Komórki prawidłowe			
Gruzoł piersiowy	HB-2	n.w.	1,3
Skóra	HDFa	n.w.	0,94

Testy toksykologiczne przy użyciu myszy szczepu BALB/c wykazały również, że pochodna NHPYUSNC jest mniej toksyczna dla zwierząt niż kwas (+) usninowy: MTD (maksymalna tolerowana dawka) dla NHPYUSNC została wyznaczona jako 400 mg/kg masy ciała, natomiast dla (+)- UA – 200 mg/kg masy ciała przy podaniu doustnym.

Mechanizm działania związku NHPYUSNC został dokładniej zbadany na modelu komórek raka piersi (stosunkowo wrażliwe na badany związek i istnieje dużo danych odnośnie działania kwasu usninowego) oraz komórek raka trzustki (były stosunkowo mniej wrażliwe niż komórki nowotworowe z innych narządów na badaną pochodną). Antyproliferacyjne działanie NHPYUSNC wiązało się z zahamowaniem cyklu podziałowego w fazie G₀/G₁, co pokazano w Tabeli 2 oraz śmiercią komórek nowotworu trzustki na drodze apoptozy lub nekrozy, co pokazano w Tabeli 3.

Komórki nowotworu trzustki (PANC-1 i MIA PaCa-2) traktowano związkiem NHPYUSNC lub kwasem usninowym w stężeniu 1 lub 5 μg/ml przez 24 (do badania wpływu na przebieg cyklu komórkowego) lub 48 godzin (do badania śmierci). Komórki po traktowaniu były zbierane. W celu analizy ich cyklu podziałowego, DNA barwione było odczynnikami z zestawu Muse™ Cell Cycle Kit i dalsza analiza była przeprowadzona w cytometrze typu Muse Cell Analyzer. W badaniu rodzaju śmierci zebrane komórki były barwione odczynnikami z zestawu Muse™ Annexin-V & Dead Cell Assay Kit. Ilość komórek apoptotycznych (Aneksyna V^{+/7}-AAD⁻ i Aneksyna V^{+/7}-AAD⁺) lub nekrotycznych (Aneksyna V^{+/7}-AAD⁺) była zliczana w cytometrze typu Muse™ Cell Analyzer.

T a b e l a 2. NHPYUSNC powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie G0/G1 w stopniu zależnym od jego stężenia. Komórki nowotworu trzustki traktowano DMSO (kontrola), kwasem usninowym lub związkami NHPYUSNC w stężeniu 1 lub 5 $\mu\text{g/ml}$ przez 24 godziny.

Nazwa związku	Stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	Faza cyklu [%]		
		G0/G1	S	G2/M
PANC-1				
Kontrola		43 \pm 1	19 \pm 1	36 \pm 2
Kwas (+) usninowy	1 5	44 \pm 3 43 \pm 3	21 \pm 1 19 \pm 1	34 \pm 3 34 \pm 2
NHPYUSNC	1 5	48 \pm 2 62 \pm 4	19 \pm 3 8 \pm 2	32 \pm 1 28 \pm 2
MIA PaCa-2				
Kontrola		43 \pm 2	21 \pm 3	33 \pm 2
Kwas (+) usninowy	1 5	40 \pm 1 40 \pm 3	24 \pm 4 25 \pm 3	33 \pm 2 31 \pm 2
NHPYUSNC	1 5	48 \pm 2 55 \pm 1	20 \pm 2 16 \pm 1	30 \pm 3 27 \pm 2

T a b e l a 3. NHPYUSNC powoduje śmierć komórek PANC-1 na drodze apoptozy i nekrozy, a komórek MIA PaCa-2 – na drodze apoptozy w znacznie większym stopniu niż kwas usninowy. Komórki traktowano DMSO (kontrola), kwasem usninowym lub związkami NHPYUSNC przez 48 godzin.

Nazwa związku	Stężenie [$\mu\text{g/ml}$]	komórki [%]		
		żywe	apoptotyczne	nekrotyczne
PANC-1				
Kontrola		82 \pm 5	14 \pm 3	5 \pm 3
Kwas (+) usninowy	1 5	75 \pm 5 75 \pm 4	23 \pm 5 24 \pm 4	3 \pm 0 1 \pm 1
NHPYUSNC	1 5	63 \pm 9 61 \pm 2	24 \pm 3 27 \pm 5	13 \pm 6 11 \pm 5
MIA PaCa-2				
Kontrola		78 \pm 2	20 \pm 1	2 \pm 1
Kwas (+) usninowy	1 5	82 \pm 4 73 \pm 3	18 \pm 4 26 \pm 3	1 \pm 0 1 \pm 0
NHPYUSNC	1 5	46 \pm 1 23 \pm 3	51 \pm 1 74 \pm 2	3 \pm 1 2 \pm 1

Dodatkowo, NHPYUSNC znacznie hamował potencjał migracyjny komórek nowotworu trzustki. Na fig. 4 pokazane są zdjęcia komórek w momencie rozpoczynania eksperymentu (0 godz.) – z lewej strony oraz stan po 48 godzinach eksperymentu – zdjęcia z prawej strony. Kontrolę stanowiły komórki traktowane DMSO. Przedstawiono reprezentatywne wyniki z trzech niezależnych powtórzeń. Potencjał migracyjny badano za pomocą techniki „zarastania rany”. Na płytce pokrytej komórkami PANC-1 lub MIA PaCa-2 (95% konfluencji) wykonano rysę tipsem i po odpłukaniu usuniętych komórek, przyklejone do płytki komórki traktowano NHPYUSNC w stężeniu 1 lub 5 $\mu\text{g/ml}$ przez 48 godzin lub DMSO (kontrola). Zdjęcia wykonano na początku eksperymentu oraz po ekspozycji na badany związek. Liniami zaznaczono granice występowania komórek.

Co ciekawe, komórki poddane działaniu badanego związku charakteryzowały się silną wakuolizacją cytoplazmy, zarówno komórek nowotworu trzustki, co pokazano na fig. 5, jak i nowotworu piersi, co pokazano na fig. 6. Wakuolizacja wskazuje na mechanizm działania badanego związku, może być bowiem związana z anomaliami takich organelli jak retikulum endoplazmatyczne (ER) czy mitochondria i towarzyszy różnym typom regulowanej śmierci komórki. Ponieważ komórki nowotworowe doświadczają stresu ER (z powodu m.in. nadmiernej produkcji białek czy niedotlenienia), dodatkowa aktywacja tej odpowiedzi jest dla nich często letalna. Na fig. 5 pokazano morfologię komórek nowotworu trzustki linii PANC-1 i MIA PaCa-2 zarejestrowaną w mikroskopie świetlnym (powiększenie $\times 200$). Komórki były traktowane DMSO (kontrola) lub NHPYUSNC w stężeniu 1 lub 5 $\mu\text{g/ml}$ przez 48 godzin.

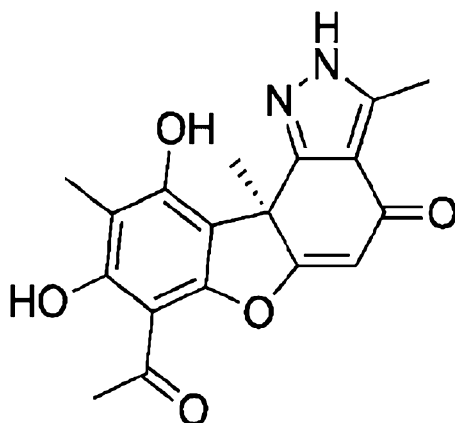
Na fig. 6 pokazano wpływ NHPYUSNC na wakuolizację cytoplazmy komórek raka piersi, linii MCF-7 i SKBR-3. Morfologia komórek nowotworowych była rejestrowana w mikroskopie świetlnym (powiększenie $\times 100$ -górny panel i $\times 200$ -dolny panel) po 48-godzinnym traktowaniu DMSO (kontrola) lub NHPYUSNC w stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$.

Stres związany z ER jest często aktywowany przez terapeutyki, które powodują uwalnianie jonów Ca^{2+} z ER. Badany związek faktycznie powodował wzrost ilości jonów Ca^{2+} w cytoplazmie, co jest pokazane na fig. 7A. Co więcej, pochodziły one z ER, o czym świadczył fakt, że hamowanie receptorów IP_3 znajdujących się na błonie ER przez 3-APB zapobiegało wzrostowi ilości Ca^{2+} w cytoplazmie oraz częściowo chroniło przed spadkiem żywotności komórek traktowanych NHPYUSNC. Takiego efektu nie wykazał BAPTA, chelator zewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} , co widać na fig. 7B–C. Związki indukujące stres ER poprzez stymulację uwalniania jonów Ca^{2+} z ER mogą być użyteczne w badaniu molekularnych mechanizmów tego procesu. Związek ten zatem może być wykorzystany jako induktor wpływu jonów wapnia z ER, a więc stresu ER.

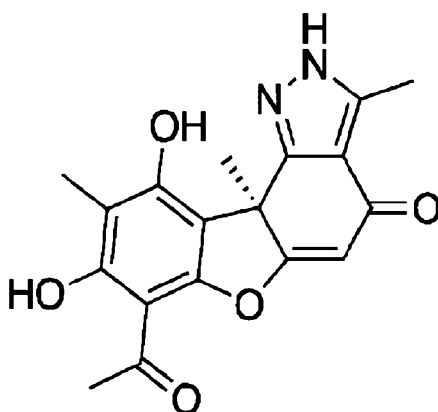
Na fig. 7A pokazano, że NHPYUSNC zwiększa poziom jonów Ca^{2+} w cytoplazmie komórek MCF-7. Komórki były traktowane badanym związkiem w stężeniu 1, 1,5 lub 2 $\mu\text{g/ml}$ przez 6 godzin, a następnie poziom wapnia oznaczono przy użyciu zestawu odczynników Fluo-4 Direct Assay Kit firmy Invitrogen według instrukcji producenta. Analiza statystyczna została przeprowadzona przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji (one-way ANO) i testu post-hoc Dunnetta, gdzie b oznacza $p < 0,001$, c - $p < 0,05$. Fig. 7B pokazuje, że wzrost stężenia jonów Ca^{2+} w cytoplazmie zachodzi poprzez aktywację receptorów IP_3R w ER. Eksperyment przeprowadzony był jak w (A), z tym że godzinę przed dodaniem do hodowli NHPYUSNC (w stężeniu 1, 1,5 lub 2 $\mu\text{g/ml}$) była ona traktowana inhibitorem IP_3R (2-APB w stężeniu 30 μM) lub chelatorem zewnątrzkomórkowych jonów Ca^{2+} (BAPTA w stężeniu 10 μM). Fig. 7C pokazuje, że 2-APB, a nie BAPTA, częściowo zapobiega spadkowi żywotności komórek traktowanych NHPYUSNC. Komórki były traktowane DMSO (K) lub NHPYUSNC w obecności lub braku 2-APB (30 μM) lub BAPTA (10 μM). Po 24 godzinach ekspozycji na NHPYUSNC wykonano test żywotności MTT (jak w opisie do fig. 3). Analiza statystyczna w (B) i (C) została przeprowadzona przy użyciu jednoczynnikowej analizy wariancji (one-way ANOVA) i testu post-hoc Bonferroni, gdzie a oznacza $p < 0,001$.

Zastrzeżenia patentowe

1. Pochodna kwasu usninowego stanowiąca związek (S)-7-acetylo-8,10-dihydroksy-3,9,10b-trimetylo-2,10b-dihydro-4/H-benzofuro[2,3-g]indazol-4-on pokazana we wzorze 1:

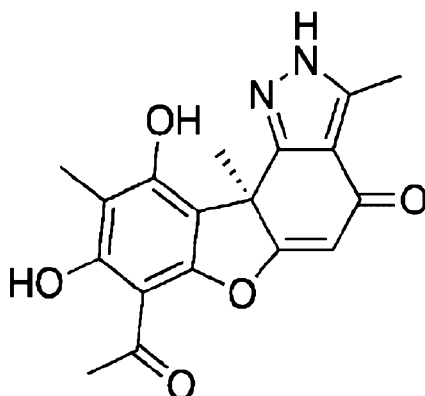


2. Sposób otrzymywania pochodnej kwasu usninowego stanowiącego związek (S)-7-acetylo-8,10-dihydrokso-3,9,10b-trimetylo-2,10b-dihydro-4H-benzofuro[2,3-g]indazol-4-on pokazanej we wzorze 1:



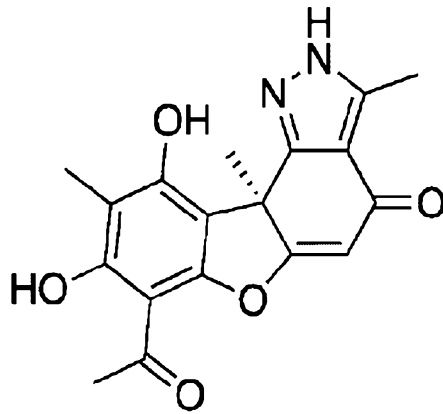
polegający na tym, że do zawiesiny (+)-kwasu usninowego w rozpuszczalniku ogrzanej do wrzenia dodaje się hydrat hydrazyny mieszając, następnie usuwa się rozpuszczalnik, a osad oczyszcza się.

3. Zastosowanie pochodnej kwasu usninowego stanowiącej związek (S)-7-acetylo-8,10-dihydrokso-3,9,10b-trimetylo-2,10b-dihydro-4H-benzofuro[2,3-g]indazol-4-on, pokazanej we wzorze 1:



jako leku w terapii nowotworowej.

4. Zastosowanie pochodnej kwasu usninowego stanowiącej związek (S)-7-acetylo-8,10-dihydrokso-3,9,10b-trimetylo-2,10b-dihydro-4H-benzofuro[2,3-g]indazol-4-on we wzorze 1:



jako środek do zastosowania *in vitro* jako induktor stresu związanego z retikulum endoplazmatycznym (ER) poprzez stymulację uwalniania jonów wapnia.

Rysunki

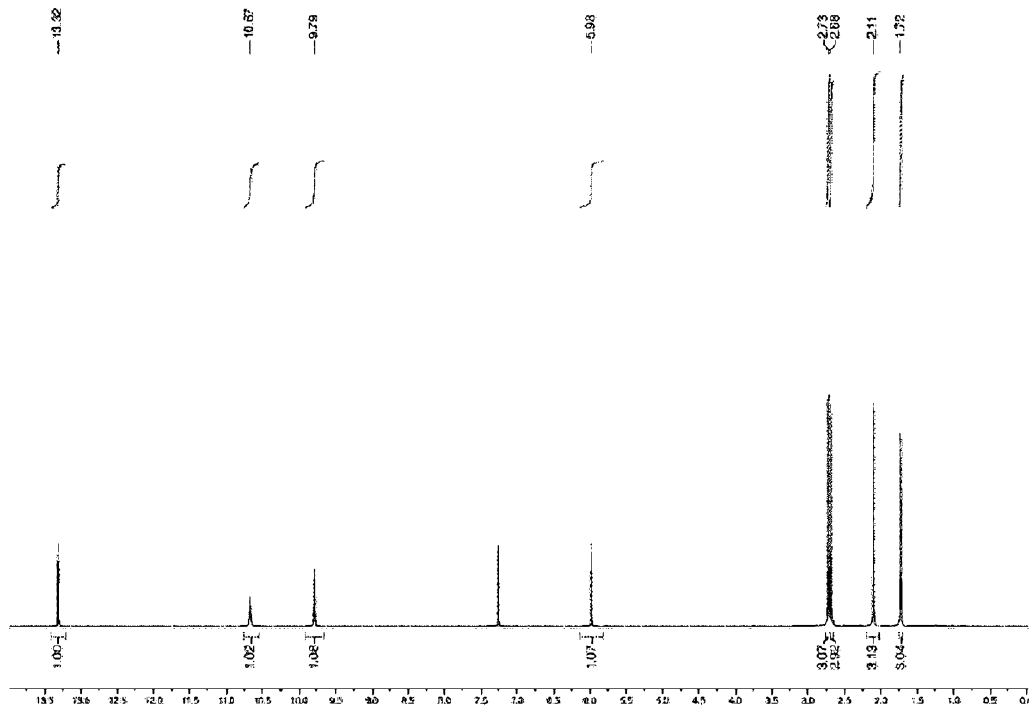


fig. 1

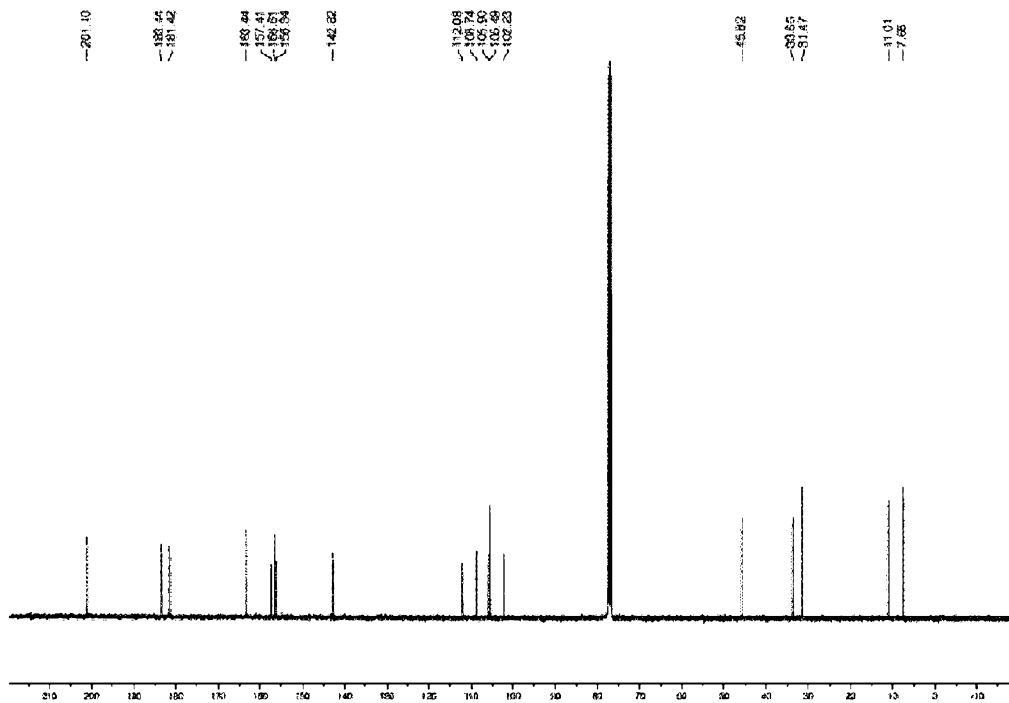


fig. 2

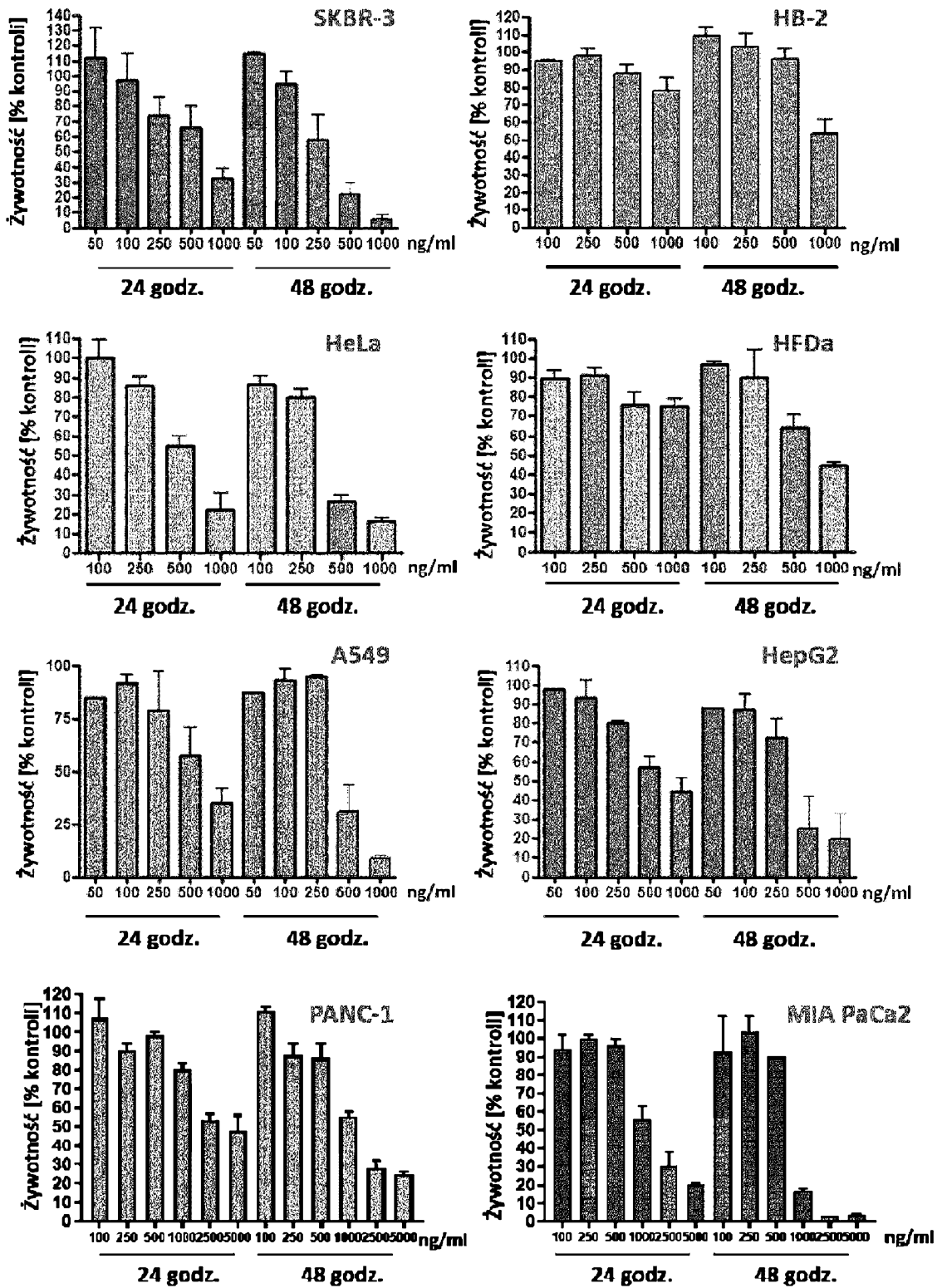


fig. 3

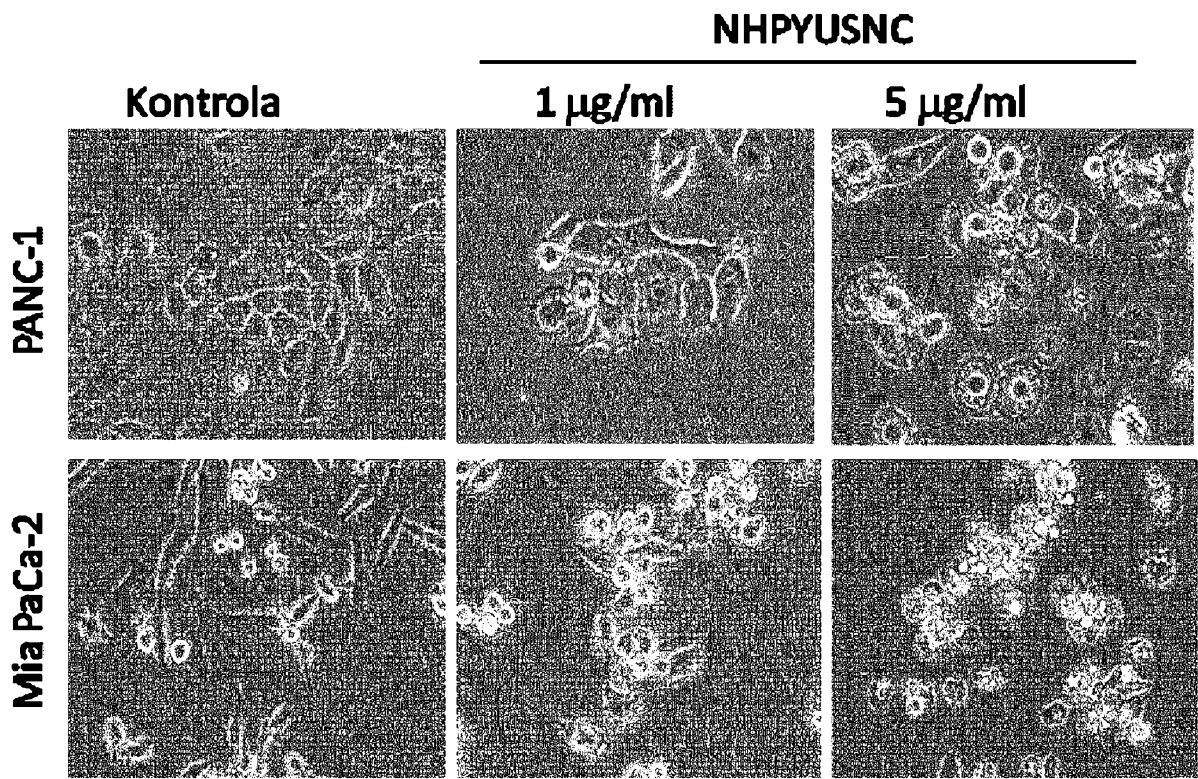


fig. 5

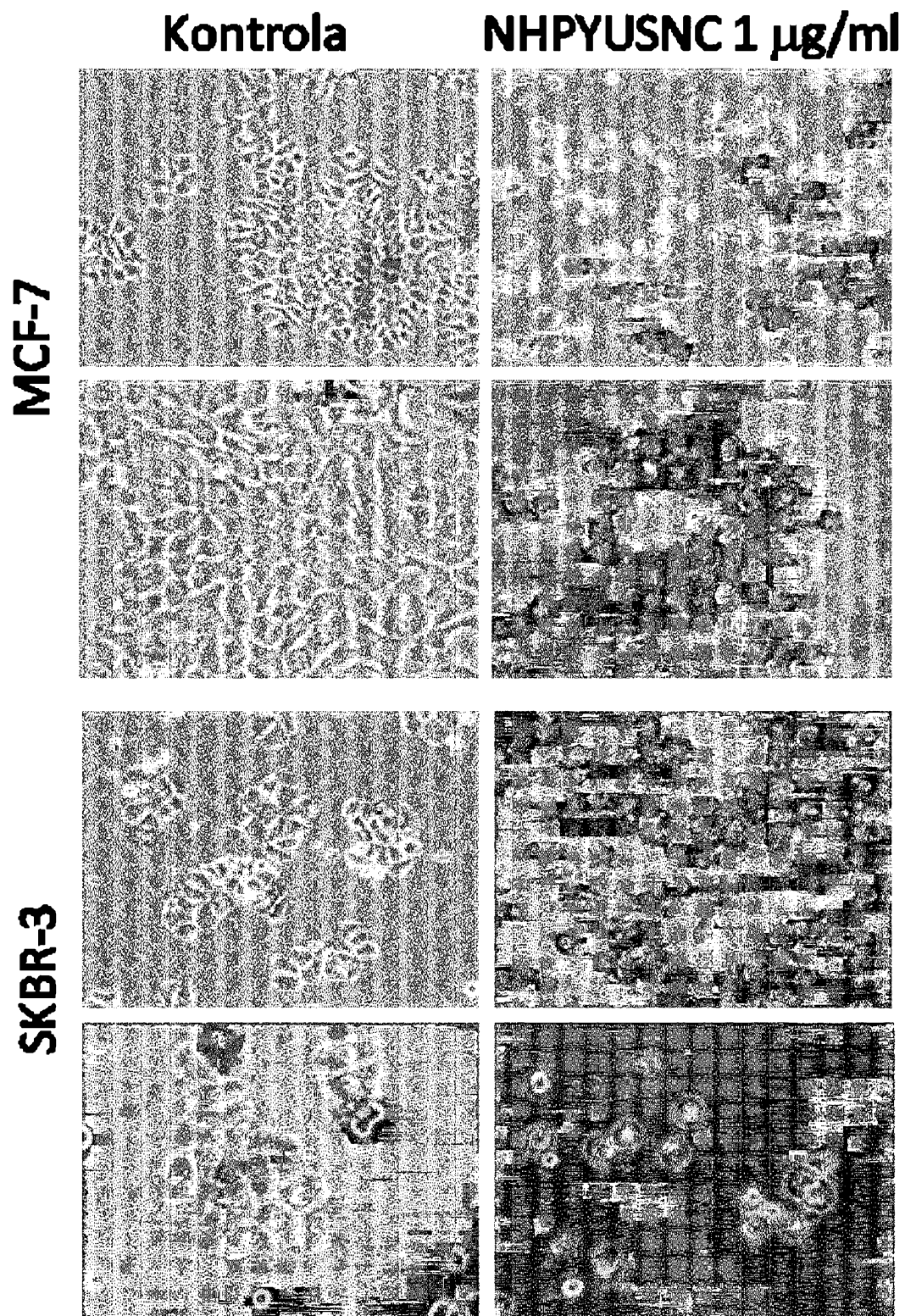


fig. 6

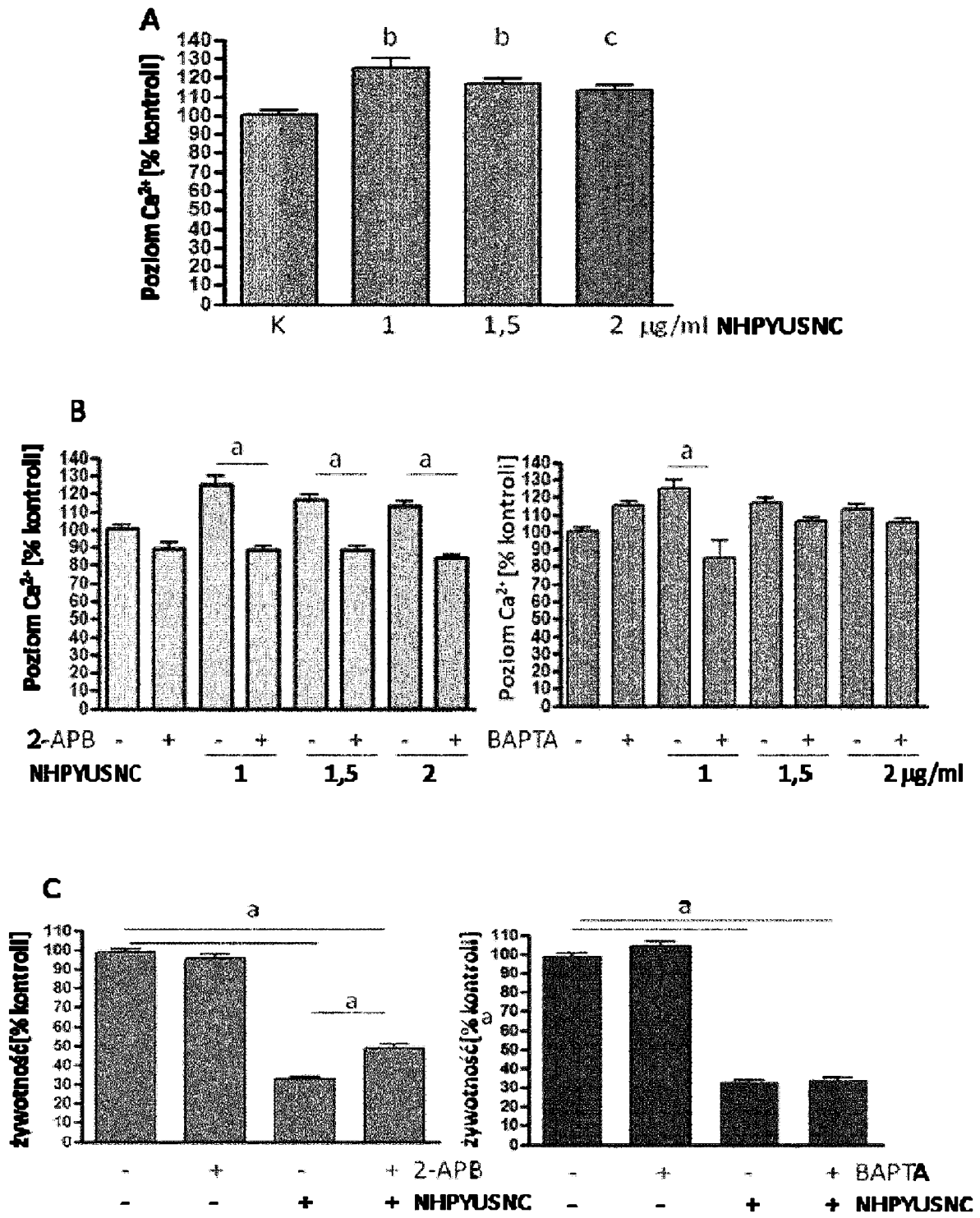


fig. 7