

(19)



URZĄD  
PATENTOWY  
RZECZYPOSPOLITEJ  
POLSKIEJ

(10)

**PL 440802 A1**

(12)

## Opis zgłoszeniowy wynalazku (z daty zgłoszenia)

(21) Numer zgłoszenia: **440802**

(22) Data zgłoszenia: **2022.03.30**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.10.02 BUP 40/2023**

(51) MKP:

**C07D 491/02** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

(71) Zgłaszający:

**UNIwersytet Gdański, Gdańsk, PL**

(72) Twórca(-y):

**ANNA HERMAN-ANTOSIEWICZ, Gdańsk, PL**

**TRISTAN REEKIE, Dickson, AU**

**MARIOLA GIMŁA, Kolonia Rybacka, PL**

**KLAUDIA ŻUCZEK, Suchy Dwór, PL**

(74) Pełnomocnik:

**Justyna Pawłowska-Bajerska, Gdynia, PL**

(54) Tytuł:

**Pochodna kwasu usninowego, sposób otrzymywania tej pochodnej, medyczne zastosowanie w terapii nowotworów, zastosowanie in vitro odczynnika**

(57) Skrót opisu:

Zgłoszenie dotyczy pochodnej kwasu usninowego stanowiącej związek (S)-7-acetylo-8,10-dihydroksy-2,3,9,10b-tetrametylo-2,10b-dihydro-4H-benzofuro[2,3-g]indazol-4-on, jej zastosowanie medyczne i in vitro. Zgłoszenie obejmuje również sposób otrzymywania pochodnej kwasu usninowego stanowiącego związek (S)-7-acetylo-8,10-dihydroksy-3,9,10b-trimetylo-2,10b-dihydro-4H-benzofuro[2,3-g]indazol-4-on.

**Pochodna kwasu usninowego, sposób otrzymywania tej pochodnej, medyczne zastosowanie w terapii nowotworów, zastosowanie *in vitro* odczynnika**

Przedmiotem wynalazku jest nowy związek, pochodna kwasu usninowego otrzymana na drodze syntezy chemicznej. Wynalazek dotyczy również sposobu otrzymywania i zastosowanie medyczne tego związku wobec nowotworów pochodzących z różnych tkanek, zwłaszcza z gruczołu sutkowego, szyjki macicy i trzustki. Związek stanowi również środek do zastosowania jako środek *in vitro* do badań laboratoryjnych do indukcji śmierci lub wakuolizacji komórek i zależności między tym procesami w odpowiedzi komórek nowotworowych na potencjalny lek.

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 koncentruje się na badaniu kwasu usninowego UA, który występuje w postaci dwóch enancjomerów: kwas (+) usninowy oraz kwas (-) usninowy (różnica w położeniu grupy metylowej w pozycji 9b) oraz jego syntetycznych pochodnych. UA wykazuje 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 SKBR3), okrężnicy (HT29), białaczki (HL60 i Jurkat) wynosiły od 49  $\mu\text{M}$  (HL60) do 199  $\mu\text{M}$  (SKBR3). Aby nieodwracalnie zahamować zdolność do podziałów tych komórek (tzw. klonogeniczność) traktowano je 200  $\mu\text{M}$  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.

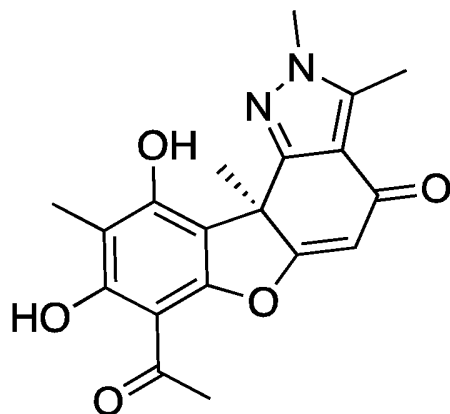
Niekorzystne jest również to, że związek ten nie jest selektywny w stosunku do komórek nowotworowych i tak dla przykładu  $IC_{50}$  dla komórek nowotworowych (MM98 i A431) wynosiło 23-72  $\mu\text{M}$ , a dla prawidłowych keratynocytów (HaCaT) - bardzo podobnie, tj. 35-76  $\mu\text{M}$  - Burlando 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  $\mu\text{M}$ , a dla prawidłowych embrionalnych fibroblastów myszy - powyżej 100  $\mu\text{M}$ . 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  $\mu\text{M}$  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 (rejon 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.

Z opisu P.436476 znany jest (S)-7-acetylo-8,10-dihydroksy-3,9,10b-trimetylo-2,10b-dihydro-4H-benzofuro[2,3-g]indazol-4-on) - 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, ale jest to jednak inna pochodna niż wskazana w obecnym wynalazku.

Wynalazek obejmuje nowy związek – pochodna kwasu usninowego UA, nazywa dalej jako **9** i tak pokazana tak na schemacie jak i pokazana osobno jako wzór 1, zastosowanie medyczne i jako odczynnik *in vitro* oraz sposób otrzymania - synteza gdzie co istotne zamiast hydratu hydrazyny dodaje się metylohydrazynę Na wzorze na schemacie 1 pokazano sposób otrzymania - pokazano również kwas usninowy. Pochodna **9** to syntetyczny związek [(S)-7-acetylo-8,10-dihydroksy-2,3,9,10b-tetrametylo-2,10b-dihydro-4H-benzofuro[2,3-g]indazol-4-on], który wykazuje antyproliferacyjne działanie wobec komórek nowotworowych różnego pochodzenia, zwłaszcza komórek nowotworu piersi, szyjki macicy i trzustki. Pochodna według wynalazku ma działanie antyproliferacyjne oraz hamuje migrację komórek nowotworowych (ma potencjalne działanie antymetastatyczne).

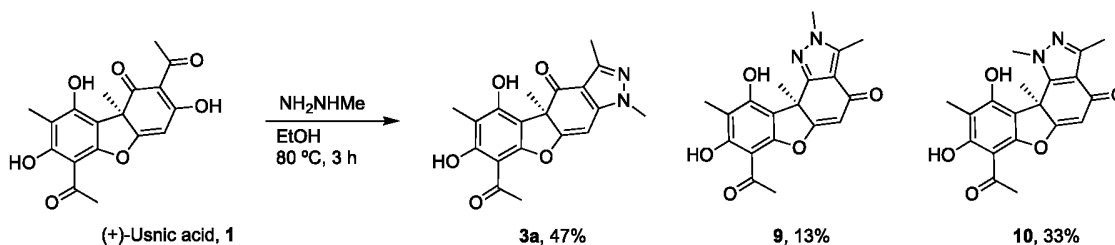
Co do zastosowania tej pochodnej do celów badawczych, laboratoryjnych – jako odczynnik podawany *in vitro* pochodna ta ze względu na to, że indukuje *in vitro* śmierć komórek, czemu może towarzyszyć wakuolizacja cytoplazmy – umożliwia zastosowanie tego odczynnika do badania związku między tymi procesami – śmierci/wokalizacji i ich roli w działaniu antynowotworowym potencjalnych leków.



Wzór 1

Wynalazek pokazano na wzorze, schemacie, jak i w przykładzie. Na fig. 1-2 pokazano potwierdzenie otrzymania związku, zaś na fig. 3 pokazano wykresy potwierdzające aktywności związku według wynalazku, na fig. 4-7 pokazano wyniki badań biologicznych opisanych badań potwierdzających aktywności związku według wynalazku.

## Przykład



Schemat 1

Sposób otrzymywania nowego związku **9** – schemat 1 :

- zawiesinę (+)-kwasu usninowego (**1**, 1.00 g, 2,90 mmol) w bezwodnym etanolu (20 mL) ogrzano do 80 °C do rozpuszczenia związku.
- do roztworu dodano metylohydrazynę (169  $\mu$ L, 3.20 mmol, 1,1 równoważnik) i ogrzewano do 80 °C przez 3 godziny
- po ochłodzeniu usunięto rozpuszczalnik z wykorzystaniem wyparki

- uzyskany osad był oczyszczony za pomocą chromatografii kolumnowej typu flash, gdzie fazę ruchomą stanowił gradient octanu etylu w heksanie (3:1 - 1:1), uzyskując 3 frakcje. Podczas tej chromatografii uzyskano (rozdzielono) 3 frakcje i w każdej był inny związek (ze schematu 1), zidentyfikowany za pomocą spektroskopii NMR.

Koncentracja frakcji 1 ( $R_f = 0.16$  (1:1 EtOAc/heksan)) wyłoniła związek **3a**: (*R*)-8-acetylo-5,7-dihydroksy-1,3,4a,6-tetrametylo-1,4a-dihydro-4*H*-benzofuro[3,2-*f*]indazol-4-on, jako żółte ciało stałe (474 mg, 46%).  $R_f = 0.16$  (1:1 EtOAc/heksan).  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  13.28 (s, 1H), 11.16 (s, 1H), 6.11 (1H, s), 3.82 (s, 3H), 2.64 (s, 3H), 2.46 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 1.69 (s, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  200.5, 195.6, 172.6, 163.6, 157.8, 156.4, 150.5, 149.0, 110.0, 108.3, 104.2, 101.6, 87.8, 60.2, 36.1, 31.3, 30.6, 13.2, 7.6. **LRMS** (–ESI):  $m/z$  353 (100%,  $[\text{M} - \text{H}]^-$ ). **HRMS** (TOF ESI, +ve) 364.0792  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (obliczono dla  $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{NaNO}_6$ , 364.0797). **HPLC**: 98.85%, RT: 28.60 min.

Koncentracja frakcji 2 ( $R_f = 0.33$  (1:1 EtOAc/heksan)) wyłoniła związek **9**: (*S*)-7-acetylo-8,10-dihydroksy-2,3,9,10b-tetrametylo-2,10b-dihydro-4*H*-benzofuro[2,3-*g*]indazol-4-on, jako żółte ciało stałe (138 mg, 13%).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  13.31 (s, 1H), 9.78 (s, 1H), 5.93 (s, 1H), 3.85 (s, 3H), 2.71 (s, 3H), 2.61 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 1.69 (s, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  201.0, 182.9, 180.7, 163.4, 156.6, 156.4, 155.5, 142.1, 112.6, 108.6, 105.9, 105.5, 102.2, 45.5, 36.2, 33.6, 31.5, 10.6, 7.6. **LRMS** (+ESI):  $m/z$  731 (100%,  $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ ), 393 (30%,  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ). **HRMS** (TOF ESI, +ve) 355.1297  $[\text{M} + \text{H}]^+$  (obliczono dla  $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_5$ , 355.1294). **HPLC**: 99.07%, RT: 28.93 min.

Koncentracja frakcji 3 ( $R_f = 0.10$  (1:1 EtOAc/heksan)) wyłoniła związek **10** (*S*)-7-acetylo-8,10-dihydroksy-1,3,9,10b-tetrametylo-1,10b-dihydro-4*H*-benzofuro[2,3-*g*]indazol-4-on jako żółte ciało stałe (338 mg, 33%).  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  13.52 (s, 1H), 6.00 (s, 1H), 4.21 (s, 3H), 2.75 (s, 3H), 2.52 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 1.82 (s, 3H), nie obserwowano jednego sygnału OH.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  13.47 (s, 1H), 10.79 (br. s, 1H), 6.05 (s, 1H), 4.17 (s, 3H), 2.69 (s, 3H), 2.36 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.77 (s, 3H).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 101 MHz)  $\delta$  201.6, 182.2, 178.0, 162.9, 158.4, 155.2, 148.7, 146.9, 115.7, 106.5, 106.1, 104.8, 102.6, 47.4, 40.3, 31.9, 30.8, 13.4, 7.3. **LRMS** (+ESI):  $m/z$  731 (100%,  $[2\text{M} + \text{Na}]^+$ ), 393 (25%,  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ ). **HRMS**

(TOF ESI, +ve) 355.1295 [M+H]<sup>+</sup> (obliczono dla C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 355.1294). HPLC: 98.98%, RT: 22.41 min.

Widma <sup>1</sup>H NMR oraz <sup>13</sup>C NMR zarejestrowano za pomocą spektrometru Bruker 300. Widma związku **9** 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).

Identyfikacja otrzymanego związku:

**9** [(*S*)-7-acetylo-8,10-dihydroksy-2,3,9,10b-tetrametylo-2,10b-dihydro-4*H*-benzofuro[2,3-*g*]indazol-4-on],

Właściwości: żółte ciało stałe, o widmie:

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 13.31 (s, 1H), 9.78 (s, 1H), 5.93 (s, 1H), 3.85 (s, 3H), 2.71 (s, 3H), 2.61 (s, 3H), 2.11 (s, 3H), 1.69 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (101 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 201.0, 182.9, 180.7, 163.4, 156.6, 156.4, 155.5, 142.1, 112.6, 108.6, 105.9, 105.5, 102.2, 45.5, 36.2, 33.6, 31.5, 10.6, 7.6. **LRMS** (+ESI): *m/z* 731 (100%, [2M+Na]<sup>+</sup>), 393 (30%, [M+Na]<sup>+</sup>). **HRMS** (TOF ESI, +ve) 355.1297 [M+H]<sup>+</sup> (obliczono dla C<sub>19</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 355.1294)

Badania aktywności biologicznej związku będącego przedmiotem wynalazku.

Przetestowano działanie antyproliferacyjne substancji **9** na liniach nowotworowych pochodzących z nowotworów gruczołu sutkowego (linie MCF-7, MDA MB 231 różniące się statusem receptorów dla estrogenu i czynników wzrostu), szyjki macicy (linia HeLa) i trzustki (linia MIA PaCa-2) oraz prawidłowych fibroblastów skóry (HDFa).

Testy cytotoksyczności MTT komórek traktowanych związkiem **9** 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 **9** i czasu ekspozycji. Komórki nowotworowe były traktowane pochodną **9** w stężeniu 100,

250, 500, 1000, 2500 i 5000 ng/ml przez 24 lub 48 godzin. Komórki HeLa traktowano też kwasem usninowym (UA) w podobnych stężeniach, aby porównać jego efektywność w stosunku do nowej pochodnej **9**. 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  $IC_{50}$  (absolutnego) 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 usninowego, co wskazuje na dużo silniejsze działanie cytotoksyczne związku **9**.

Tabela 1. Wartości  $IC_{50}$  [ $\mu$ g/ml] dla związku **9** po 24 i 48 godzinach ekspozycji względem linii komórek nowotworowych różnego pochodzenia oraz zdrowych komórek ludzkich. 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	1,25	0,35
	MDA MB 231	1,06	0,28
Szyjka macicy	HeLa	0,32	0,04
Trzustka	Mia PaCa-2	1,14	0,55
Komórki prawidłowe			
Skóra	HDFa	2,45	0,75

Analiza morfologii komórek traktowanych pochodną **9** wskazuje, że powoduje on ich śmierć, najprawdopodobniej na drodze apoptozy (komórki się kurczą, zawartość mocno kondensuje, ubywa ich z czasem, szczególnie przy wyższych stężeniach testowanego związku). Widoczna jest też w niektórych warunkach wakuolizacja cytoplazmy, co wskazuje, że mechanizm działania badanego związku może być związany z indukcją stresu retikulum endoplazmatyczne (ER). Zmiany w morfologii komórek nowotworowych pod wpływem związku **9** są pokazane na fig. 4 (komórki HeLa) i fig. 5 (komórki Mia PaCa-2).

Na fig. 4 pokazano morfologię komórek nowotworu szyjki macicy linii HeLa zarejestrowaną w mikroskopie świetlnym (powiększenie x 100). Komórki były traktowane DMSO (kontrola) lub związkiem **9** w stężeniu 0,1; 0,25 lub 0,5  $\mu\text{g/ml}$  przez 24, 48 lub 72 godziny.

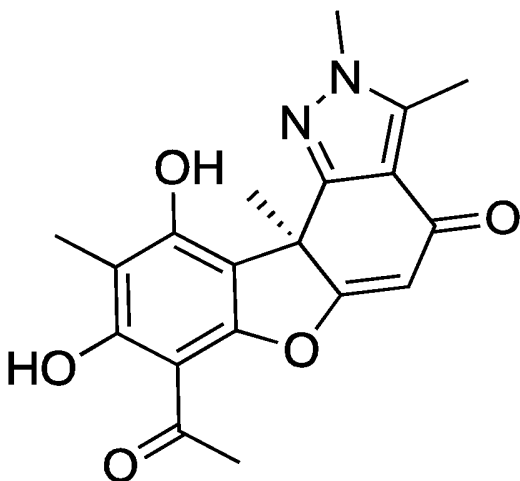
Na fig. 5 pokazano morfologię komórek nowotworu trzustki linii MIA PaCa-2 zarejestrowaną w mikroskopie świetlnym (powiększenie x 100). Komórki były traktowane DMSO (kontrola) lub związkiem **9** w stężeniu 0,1; 1 lub 2,5  $\mu\text{g/ml}$  przez 24 lub 48 godzin.

Związek **9**, oprócz antyproliferacyjnej aktywności znacznie hamuje potencjał migracyjny komórek nowotworu szyjki macicy i nowotworu trzustki. Na fig. 6 pokazane są zdjęcia komórek w momencie rozpoczynania eksperymentu (0 godz.) - z lewej strony oraz stan po 24 lub/i 48 godzinach eksperymentu - zdjęcia z prawej strony. Kontrolę stanowiły komórki traktowane DMSO. Przedstawiono reprezentatywne wyniki z trzech niezależnych powtórzeń.

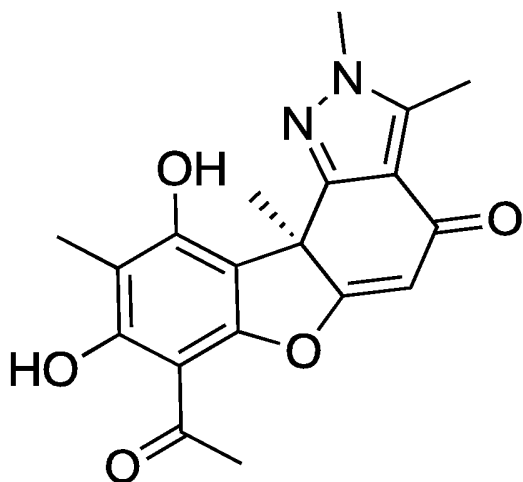
Potencjał migracyjny badano za pomocą techniki „zarastania rany”. Na płytce pokrytej komórkami HeLa lub MIA PaCa-2 (95% konfluencji) wykonano rysę tipsem i po odplukaniu usuniętych komórek, przyklejone do płytki komórki traktowano DMSO (kontrola) lub związkiem **9** w stężeniu 0,25 i 0,5  $\mu\text{g/ml}$  przez 48 godzin (HeLa) lub 0,5; 1 i 1,5  $\mu\text{g/ml}$  przez 24 lub 48 godzin (MIA PaCa-2). Zdjęcia wykonano na początku eksperymentu oraz po ekspozycji na badany związek. Liniami zaznaczono granice występowania komórek. Widoczne jest, że pochodna **9**, w przeciwieństwie do DMSO, hamuje migrację komórek nowotworowych.

## Zastrzeżenia patentowe

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

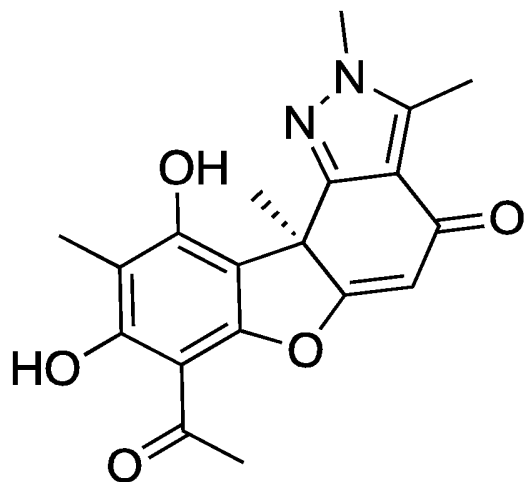


2. Sposób otrzymywania pochodnej kwasu usninowego stanowiącego związek [(*S*)-7-acetylo-8,10-dihydroksy-2,3,9,10b-tetrametylo-2,10b-dihydro-4*H*-benzofuro[2,3-*g*]indazol-4-on]pokazanej we wzorze 1:



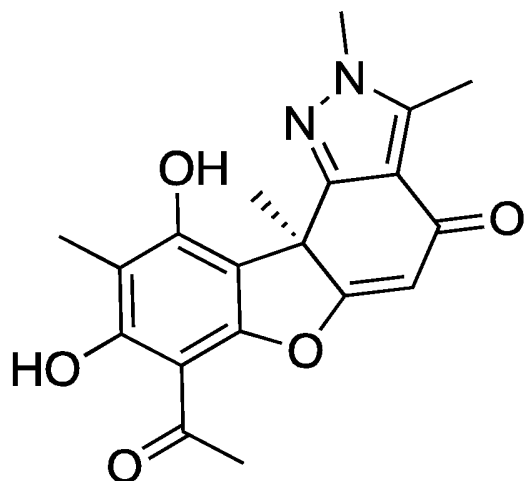
polegający na tym, że do zawiesiny (+)-kwasu usninowego w rozpuszczalniku ogrzanej do 80 °C dodaje się metylohydrazynę mieszając, następnie usuwa się rozpuszczalnik, a osad produkt oczyszcza się zwłaszcza za pomocą chromatografii kolumnowej

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



do zastosowania jako lek w terapii nowotworowej.

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



do zastosowania jako odczynnik *in vitro*.

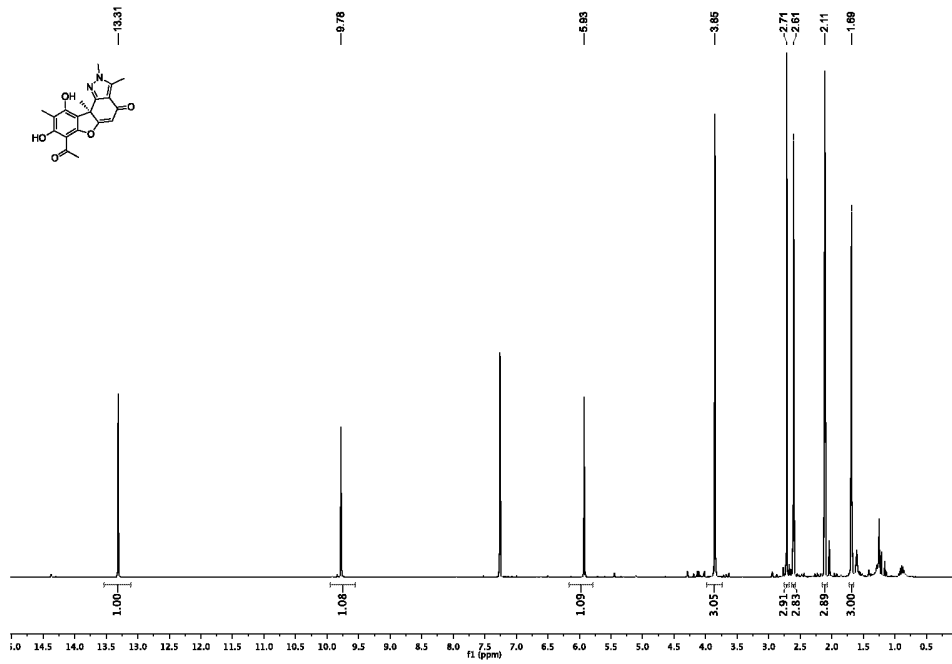
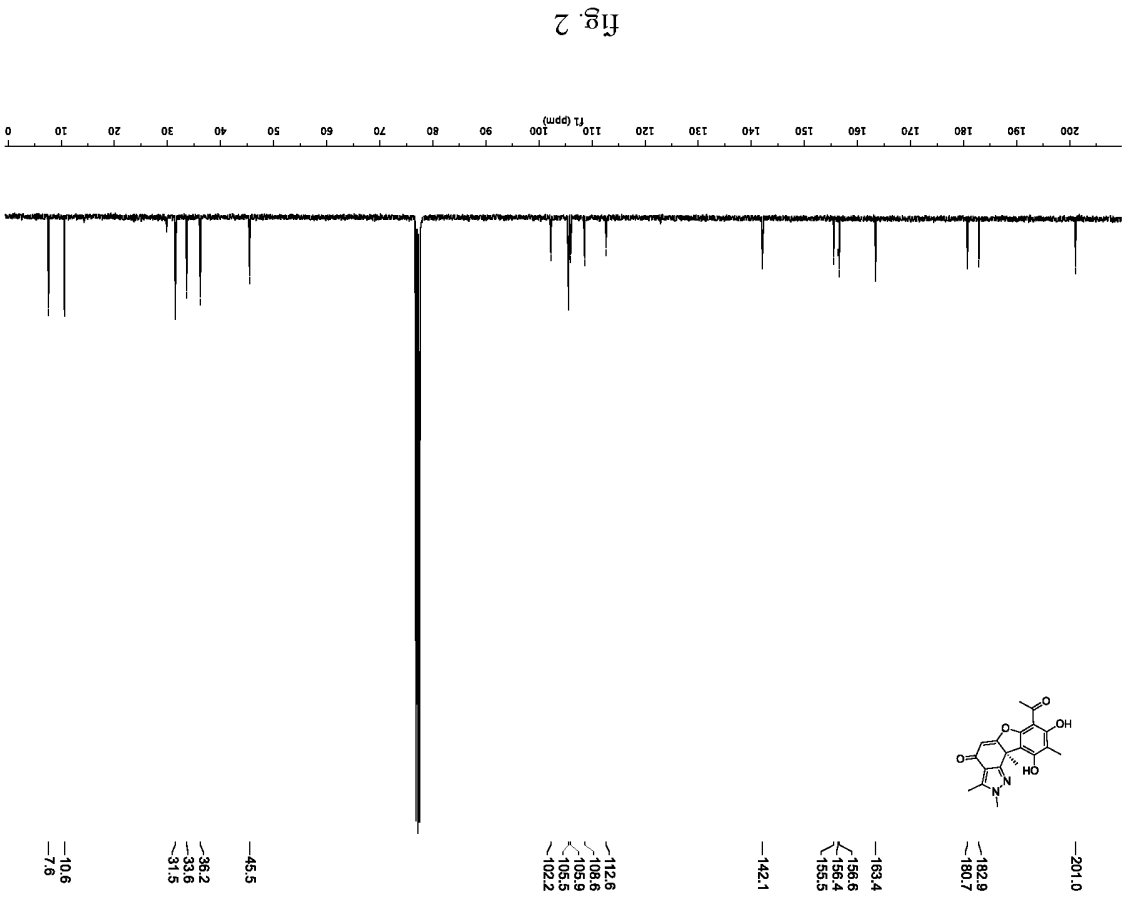


fig. 1



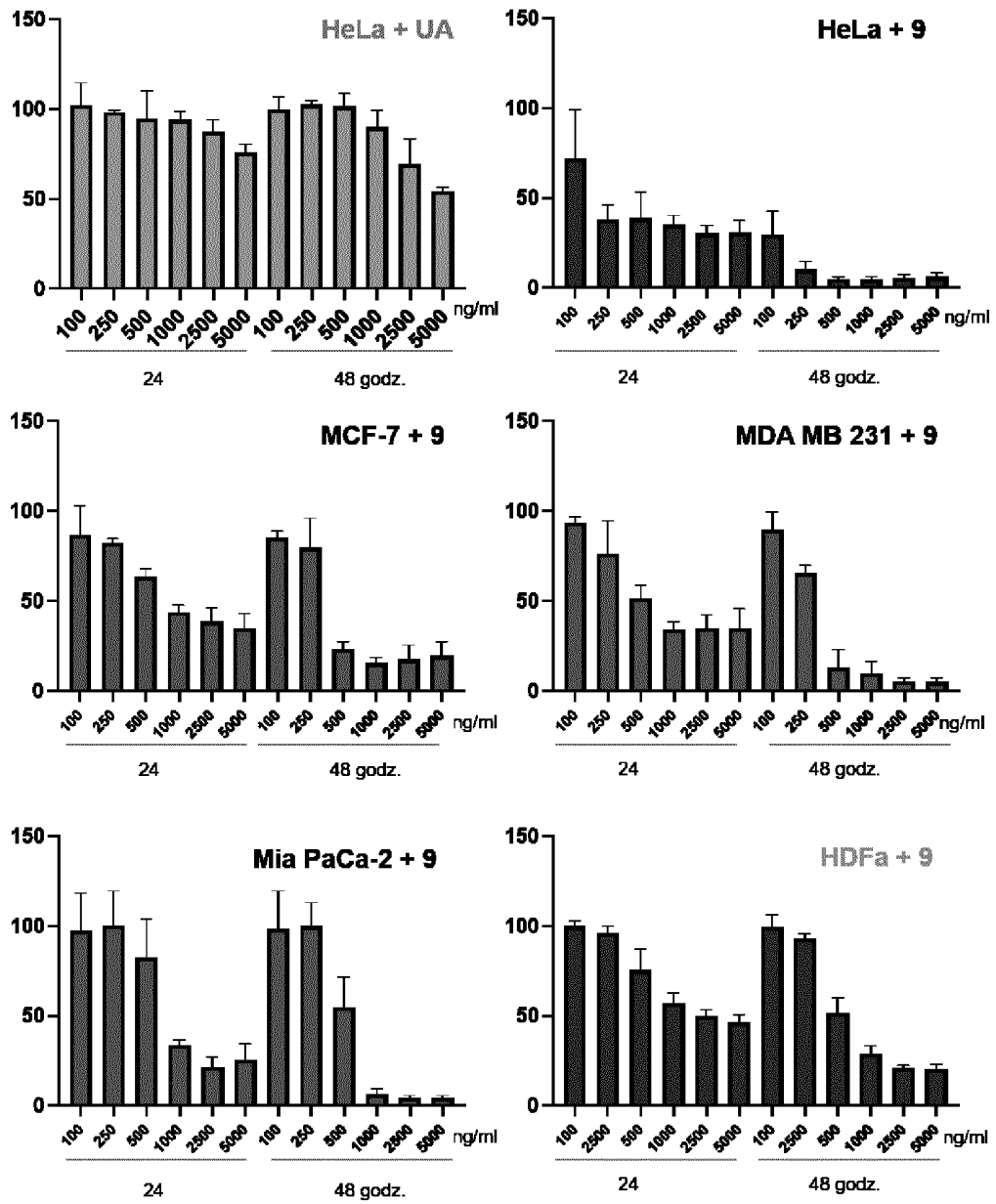


fig. 3

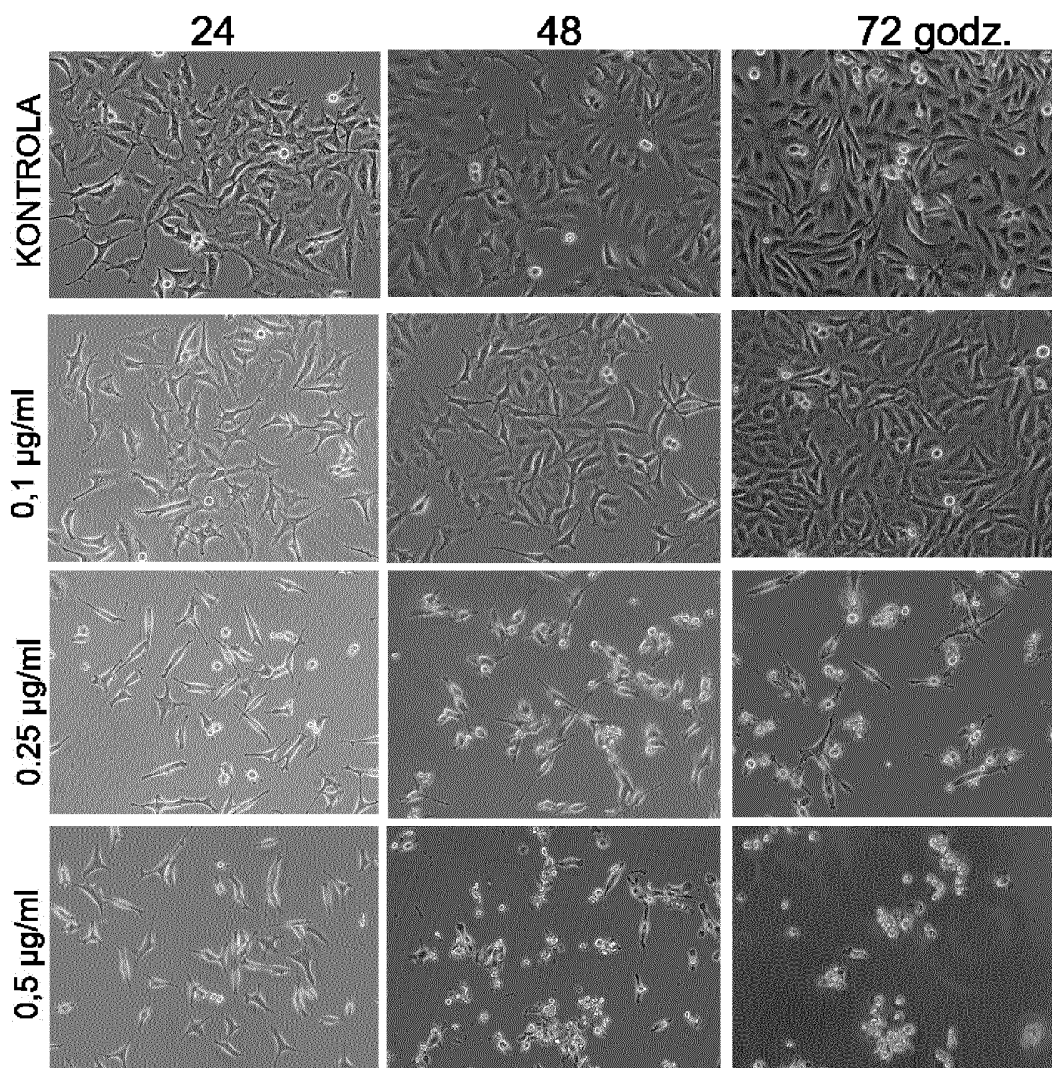


fig. 4

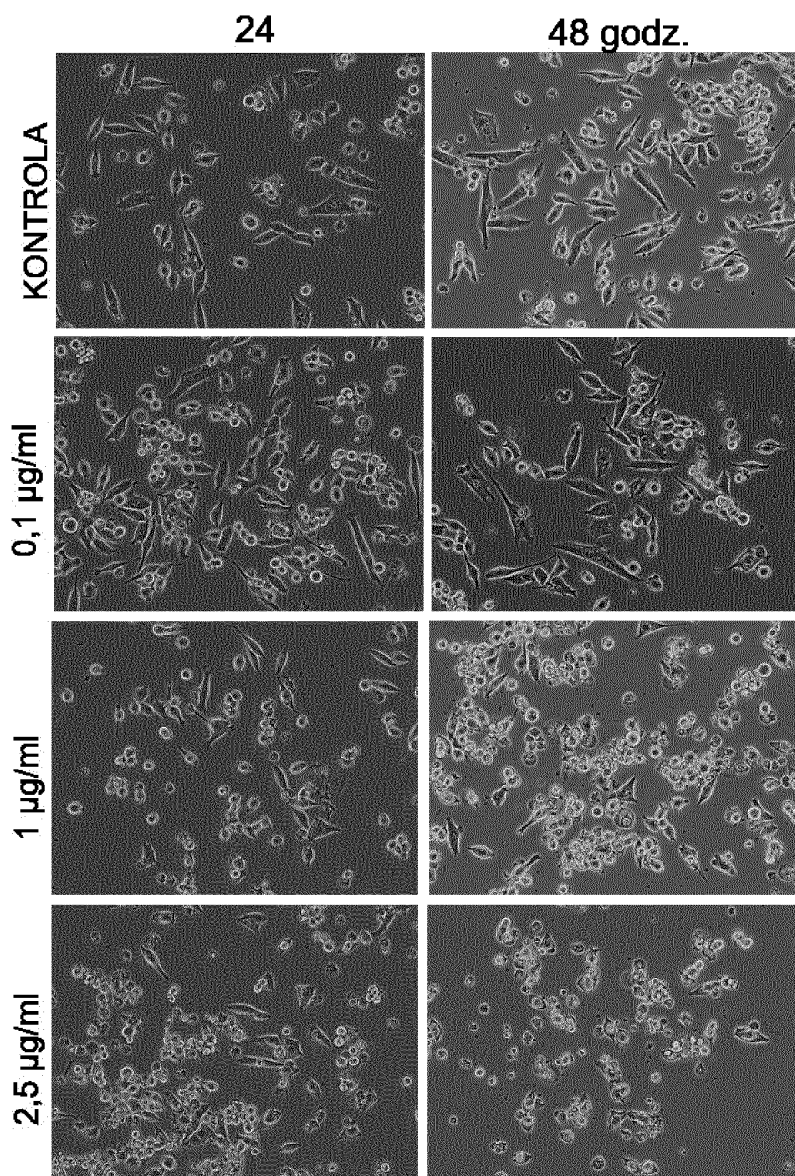


fig. 5

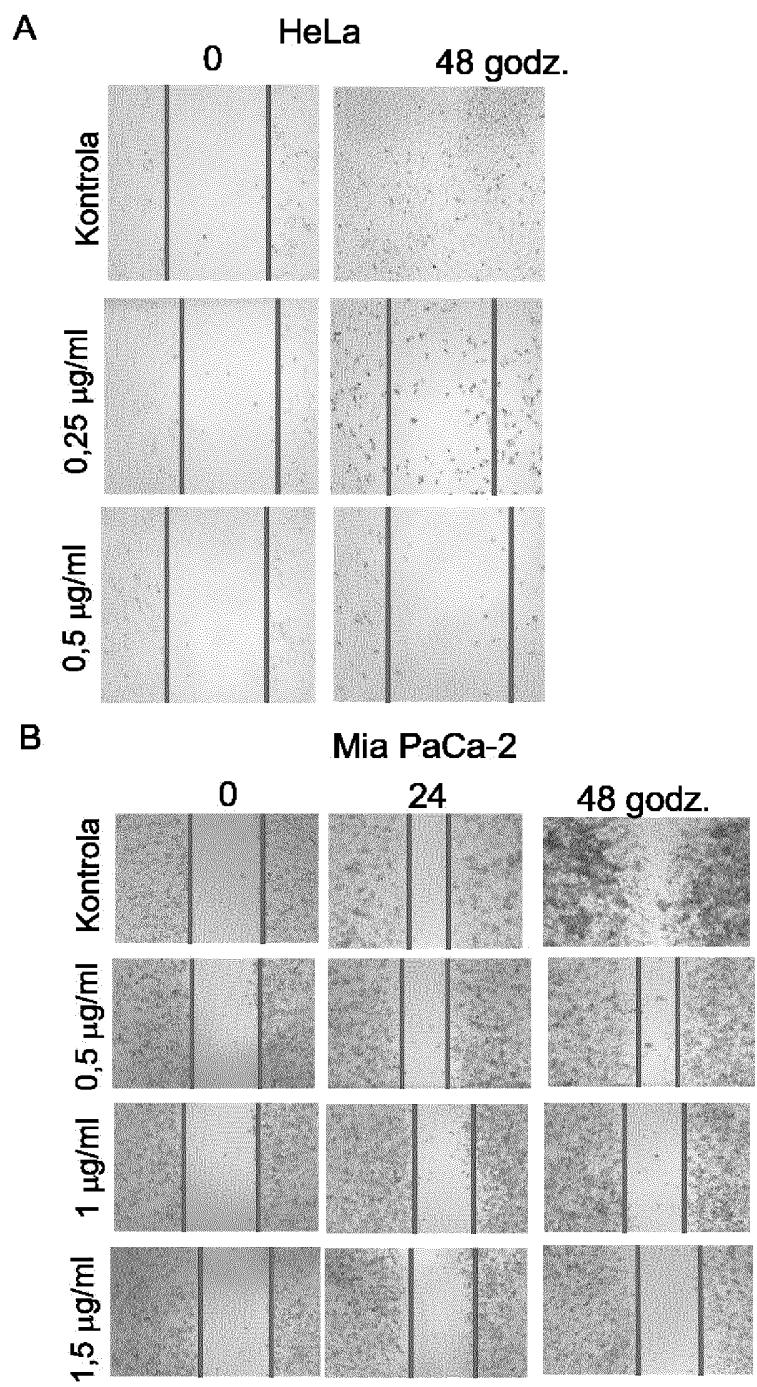


fig. 6



## SPRAWOZDANIE O STANIE TECHNIKI ZGŁOSZENIA NR P.440802

Klasyfikacja zgłoszenia: C07D 491/02 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)		
Poszukiwania prowadzone w klasach: C07D491, A61P35		
Bazy komputerowe, w których prowadzono poszukiwania: bazy UPRP, espacenet, WPI, PubChem, EPODOC, Google Patents, Google Scholar, STNext		
Kategoria dokumentu	Dokumenty – z podaną identyfikacją	Odniesienie do zastrz.
A	Guzow-Krzemińska B. et al. „Usnic Acid Derivatives as Cytotoxic Agents Against Cancer Cells and the Mechanisms of Their Activity” Current Pharmacology Reports (2019) 5:429–439; <a href="https://doi.org/10.1007/s40495-019-00202-8">https://doi.org/10.1007/s40495-019-00202-8</a>	1-4 1-4
A	PL436476A1, Uniwersytet Gdański, Gdańsk, Polska, The Australian National University, Canberra, Australia, Gdański Uniwersytet Medyczny, Gdańsk, Polska; 2021-08-09	
A	CN110845457 A, CHINA PHARMACEUTICAL UNIVERSITY [CN], 2020-02-28	1-4
A	PYRCZAK-FELCZYKOWSKA A. ET AL. "SYNTHESIS OF USNIC ACID DERIVATIVES AND EVALUATION OF THEIR ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY AGAINST CANCER CELLS" J. NAT. PROD. 2019, 82, 1768–1778, DOI: 10.1021/ACS.JNATPROD.8B00980	1-4
<input type="checkbox"/> Dalszy ciąg wykazu dokumentów na następnej stronie		
<p>A – dokument określający ogólny stan techniki, który nie jest uważany za posiadający szczególne znaczenie,  E – dokument stanowiący wcześniejsze zgłoszenie lub patent, ale opublikowany w lub po dacie zgłoszenia,  L – dokument, który może poddawać w wątpliwość zastrzegane pierwszeństwo(-wa), lub przytoczony w celu ustalenia daty publikacji innego cytowanego dokumentu lub z innego szczególnego powodu,  O – dokument odnoszący się do ujawnienia ustnego przez zastosowanie, wystawienie lub ujawnienie w inny sposób,  P – dokument opublikowany przed datą zgłoszenia, ale później niż zastrzegana data pierwszeństwa,  T – dokument późniejszy, opublikowany po dacie zgłoszenia lub w dacie pierwszeństwa i niebędący w konflikcie ze zgłoszeniem, ale cytowany w celu zrozumienia zasad lub teorii leżących u podstaw wynalazku,  X – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za nowy lub nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument brany jest pod uwagę samodzielnie,  Y – dokument o szczególnym znaczeniu; zastrzegany wynalazek nie może być uważany za posiadający poziom wynalazczy, jeżeli ten dokument zostanie połączony z jednym lub kilkoma tego typu dokumentami, a takie połączenie będzie oczywiste dla znawcy,  &amp; – dokument należący do tej samej rodziny patentowej.</p>		

Sprawozdanie wykonał/-a: Justyna Kowalczyk

data 04.11.2022r.

ekspert

/-podpisano kwalifikowanym podpisem elektronicznym-/  
Pismo wydane w formie dokumentu elektronicznego

## Uwagi do zgłoszenia

Sprawozdanie zostało wykonane w oparciu o wersję zastrzeżeń patentowych z 2022-03-30