

(19)



URZĄD  
PATENTOWY  
RZECZYPOSPOLITEJ  
POLSKIEJ

(10) **PL 244379 B1**

(12)

## Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **437616**

(22) Data zgłoszenia: **2021.04.19**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.10.24 BUP 43/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.01.22 WUP 04/2024**

(51) MKP:

**C07D 417/04** (2006.01)

**A61K 31/4178** (2006.01)

**A61K 31/433** (2006.01)

**A61P 17/00** (2006.01)

**A61Q 19/02** (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIWERSYTET ŁÓDZKI, Łódź, PL**  
**UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE,**  
**Lublin, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**KATARZYNA DZITKO, Dobieszków, PL**  
**ADRIAN BEKIER, Warszawa, PL**  
**AGATA PANETH, Lublin, PL**  
**LIDIA WĘGLIŃSKA, Piotrków Kolonia, PL**

(74) Pełnomocnik:

**rzecz. pat. Wojciech Zajączkowski, Łódź, PL**

(54) Tytuł:

**Pochodne 1,3,4-tiadiazolu, sposób ich otrzymywania, oraz pochodne 1.3.4-tiadiazolu do zastosowania medycznego oraz kosmetycznego**

**PL 244379 B1**

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku są pochodne 1,3,4-tiadiazolu. Przedmiotem wynalazku jest także sposób ich otrzymywania, oraz pochodne 1,3,4-tiadiazolu do zastosowania medycznego do wytwarzania leku oraz jako składnik produktów kosmetycznych.

Melanogeneza to proces obejmujący syntezę melaniny, jej transport i uwalnianie z melanosomu. Melanina, składa się z feomelaniny i eumelaniny, i syntetyzowana jest w melanosomach organellach melanocytów, znajdujących się w warstwie podstawnej naskórka (Nerya et al., 2004). Do produkcji melaniny potrzebny jest enzym melanogeny, taki jak tyrozynaza. Tyrozynaza (EC 1.14.18.1), jest wielofunkcyjnym enzymem zawierającym miedź w centrum aktywnym i jest kluczowa dla biosyntezy melaniny u zwierząt i roślin. Reakcje na szlaku biosyntezy melaniny obejmują ortohydroksylację L-tyrozyny do L-3,4-dihydroksyfenyloalaniny (L-DOPA) oraz utlenianie L-DOPA do dopachinonu (Kim et al., 2018).

Niekontrolowana aktywność tyrozynazy powoduje poważne zaburzenia. Na przykład albinizm jest wadą wrodzoną, w której organizm w niewielkim stopniu syntetyzuje melaninę ze względu na brak tyrozynazy, natomiast nadmierna aktywacja tyrozynazy zwiększa syntezę melaniny, co powoduje problemy ze skórą. Nieprawidłowa synteza melaniny prowadzi do chorób skóry, takich jak bielactwo nabyte, ostuda (melanodermia), piegi, plamy soczewicowate i przebarwienia pozapalne (hiperpigmentacja). Nieprawidłowości w aktywności tyrozynazy są również związane z innymi chorobami, takimi jak rak czy choroba Parkinsona (Cavalieri et al., 2002; Asanuma et al., 2003; Sendoel et al., 2010; Pan et al., 2011). Poszukuje się niskocząsteczkowych związków, które selektywnie modulują funkcję tyrozynazy w leczeniu chorób skóry, w tym do opracowywania kosmetyków rozjaśniających skórę.

Istotą wynalazku są pochodne 1,3,4-tiadiazolu o wzorze ogólnym 1, gdzie R1 oznacza podstawnik arylowy 3-jodofenylowy (T1), 4-jodofenylowy (T2), 3 bromofenylowy (T3) lub 3-fluorofenylowy (T4), zaś R2 oznacza podstawnik 4-metyloimidazolo-5-yłowy.

Istotą wynalazku jest także sposób otrzymywania pochodnych 1,3,4-tiadiazolu charakteryzujący się tym, że odpowiednią pochodną tiosemikarbazydu poddaje się na czas 2 godzin dehydrocyklizacji w środowisku stężonego kwasu siarkowego, po czym otrzymany produkt reakcji oczyszcza się przez krystalizację z butanolu.

Istotą wynalazku są także pochodne 1,3,4-tiadiazolu do zastosowania medycznego do wytwarzania leku przeznaczonego do leczenia chorób skóry związanych z zaburzeniami barwnikowymi skóry w postaci tabletek, proszku, granulek, kapsułek, syropu, roztworu do wstrzykiwań a także pochodne 1,3,4-tiadiazolu jako składnik produktów kosmetycznych rozjaśniających skórę w postaci maści, kremu i kapsułek.

Pochodne 1,3,4-tiadiazolu stosuje się do wytwarzania leku w postaci tabletki, proszku, granulek, kapsułek, syropu, roztworu do wstrzykiwań.

Pochodne 1,3,4-tiadiazolu stosuje się jako składnik kosmetyku w postaci maści, kremu, kapsułek.

Związki według wynalazku wykazują silne hamowanie aktywności enzymatycznej tyrozynazy in vitro oraz brak znaczącej cytotoksyczności względem komórek eukariotycznych. Tak więc, otrzymane według wynalazku związki mogą znaleźć zastosowanie do wytwarzania nowych leków i produktów kosmetycznych.

Wynalazek został przedstawiony w przykładach wykonania oraz na rysunku gdzie fig. 1 ilustruje pochodne 1,3,4-tiadiazolu o wzorze 1, a fig. 2 przedstawia wyniki inhibicji tyrozynazy (% hamowania przy stężeniu 25  $\mu$ M) dla pochodnych 1,3,4-tiadiazolu z podstawnikiem arylowym (T1-T4) oraz kwasu kojowego (KA). Wartości nad słupkami przedstawiają procent inhibicji, a słupki błędów wskazują odchylenie standardowe.

Przykład 1. Sposób otrzymywania pochodnych 1,3,4-tiadiazolu.

4-(3-jodofenylo)-1-(4-metyloimidazolo-5-ylo)tiosemikarbazyd (0.01 mol) umieszcza się w kolbce stożkowej, dodaje się 5 mL stężonego kwasu siarkowego(VI) i mieszaninę reakcyjną pozostawia się na 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po tym czasie mieszaninę reakcyjną wylewa się na pokruszony lód. Otrzymany osad sączy się pod zmniejszonym ciśnieniem a następnie krystalizuje z butanolu.

Przykład 2. Wpływ na żywotność komórek linii L929 – test MTT.

Zasada testu MTT

Oznaczenie cytotoksyczności związku z wykorzystaniem komórek linii L929 wykonano przy użyciu testu MTT, zgodnie z Normą Europejską: ISO 10993-5:2009(E). Test MTT oparty jest na przekształceniu żółtej soli MTT (bromku 3-(4,5-dimetylotiazolo-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazoliowego) do fioletowego, nierozpuszczalnego formazanu. Za tę konwersję odpowiedzialne są NADPH lub NADH, produkowane

przez enzym dehydrogenazę mitochondrialną obecną w aktywnych metabolicznie komórkach. Natężenie barwy fioletowego produktu jest wprost proporcjonalne do liczby żywych komórek w próbce i może być mierzone spektrofotometrycznie.

#### Część doświadczalna

Na płytkę 96-dółkową (Nunc<sup>TC</sup>), nanoszono komórki L929 (ATTC CCL-1<sup>TM</sup>) o gęstości  $1 \times 10^5$ /ml po 100  $\mu$ l/dółek, zawieszono w pełnym podłożu hodowlanym RPMI 1640 bez czerwieni fenolowej (Biowest) z dodatkiem 10% surowicy płodów bydłych (Cytogen), 2 mM/mL L-glutaminy (Sigma), 100  $\mu$ g/mL streptomycyny (Sigma), 100 U/mL penicyliny (Sigma) i inkubowano przez 24 godziny w 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Związek rozpuszczono w DMSO (Sigma), a następnie seryjnie rozcieńczono w pełnym podłożu hodowlanym RPMI, najwyższe stężenie końcowe wynosiło 1000  $\mu$ M. Końcowe stężenie DMSO nie było wyższe niż 1%. Po inkubacji usuwano podłoże z komórek i dodawano po 100  $\mu$ L związku. Dodatkową kontrolę stanowił rozpuszczalnik DMSO, kontrolę negatywną stanowiły komórki hodowane w pełnym podłożu hodowlanym RPMI.

Po dodaniu wyżej wymienionych związków komórki inkubowano 24 godziny w 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Po obejrzeniu hodowli pod mikroskopem podłoże wraz z badanymi związkami ściągano, a następnie do dółków naniesiono po 50  $\mu$ L roztworu MTT o stężeniu 1 mg/mL w podłożu RPMI 1640 i inkubowano w standardowych warunkach (37°C i 5% CO<sub>2</sub>). Po 2 godzinach, zbierano supernatant z komórek, a kryształy formazanu rozpuszczano dodając po 150  $\mu$ L DMSO/studzienkę. Barwę produktu stabilizowano dodając po 25  $\mu$ L buforu glicynowego. Poziom absorbancji mierzono od razu za pomocą czytnika ELISA (Multiskan EX, Labsystems, VA, USA), przy długości fali  $\lambda=570$  nm.

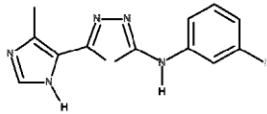
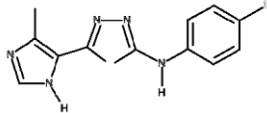
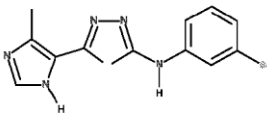
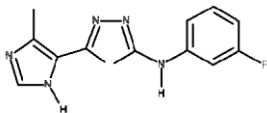
#### Wyniki

W doświadczeniu oceniano wpływ testowanych związków na żywotność komórek linii L929 przy pomocy testu MTT. Za kontrolę przyjęto hodowle komórkowe inkubowane w pełnym podłożu RPMI, bez dodatku badanych substancji i rozpuszczalnika (DMSO). Żywotność komórek obliczono według wzoru:

$$\text{Żywotność} = \frac{\text{Wartość absorbancji próby badanej}}{\text{Wartość absorbancji próby kontrolnej}} \times 100\%$$

Dla badanych związków wyznaczono stężenie CC<sub>30</sub> – stężenie cytotoksyczne związków dla 30% komórek (Tab. 1).

**Tab. 1.** Cytotoksyczność pochodnych 1,3,4-tiadiazolu z podstawnikiem arylovym (T1–T4), rozcieńczonych seryjnie w pełnym podłożu hodowlanym RPMI. Procent żywych komórek (%)  $\pm$  SD.

Związek	Stężenia [ $\mu$ M]							CC <sub>30</sub> [ $\mu$ M]
	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	
<b>T1</b> 	40,38	46,69	49,34	66,36	85,87	95,75	92,36	<b>84,53</b>
	1,95	1,90	3,00	5,41	2,40	1,26	6,24	
<b>T2</b> 	17,57	39,93	63,68	82,10	94,43	99,95	98,17	<b>211,84</b>
	4,70	6,95	3,51	3,37	4,32	3,77	0,92	
<b>T3</b> 	60,68	66,08	73,45	78,27	81,09	87,33	90,21	<b>347,62</b>
	1,27	1,70	1,66	1,42	3,26	2,66	2,82	
<b>T4</b> 	39,37	46,20	55,68	64,52	75,73	86,16	91,35	<b>43,95</b>
	2,31	0,75	1,08	0,58	3,23	2,63	2,57	

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że pochodne 1,3,4-tiadiazolu z podstawnikiem arylowym wykazują niską cytotoksyczność.

Przykład 3. Badanie wpływu pochodnych 1,3,4-tiadiazolu na aktywność enzymu tyrozynazy.

Zasada testu

W badaniach wykorzystano tyrozinazę wyizolowaną z *Agaricus bisporus* (T3824, Sigma). Tyrozinaza odpowiada za ortohydroksylację L-tyrozyny do L-3,4-dihydroksyfenyloalaniny (L-DOPA), a następnie utlenianie L-DOPA do dopachinonu i przemianę do barwnego dopachromu. Natężenie barwy produktu jest wprost proporcjonalne do aktywności enzymu w próbce i może być mierzone spektrofotometrycznie. Jako kontroli pozytywnej użyto kwas kojowy (KA), znany inhibitor tyrozynazy.

Część doświadczalna

Wszystkie rozcieńczenia związków, L-tyrozyny jako substrat tyrozynazy i enzym tyrozinazę przygotowano w 50 mM buforze fosforanowym o pH 6,5. Objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 200  $\mu$ L i zawierała: 80  $\mu$ L 2,5 mM L-tyrozyny, 50  $\mu$ L 100  $\mu$ M związku/inhibitora i 70  $\mu$ L tyrozynazy (10 U). Substrat i związek lub inhibitor dodano do 96-dółkowej płytki (Nunc MaxiSorp™, Dania), a następnie dodano tyrozinazę i zmierzono początkową absorbancję ( $A_0$ ) przy długości fali  $\lambda = 492$  nm. Następnie płytkę inkubowano w 25°C przez 30 min. Po inkubacji, ilość dopachromu wytworzonego w mieszaninie reakcyjnej określono spektrofotometrycznie przy długości fali  $\lambda = 492$  nm ( $A_{30}$ ) przy użyciu czytnika mikroplatek SpectraMax i3 (Syngen).

Wyniki

W doświadczeniu oceniano wpływ testowanych związków na aktywność enzymatyczną tyrozynazy. Za kontrolę przyjęto próbki bez dodatku związku/inhibitora. Doświadczalnie ustalono stężenie hamujące 50% aktywność enzymu dla KA ( $IC_{50KA} = 25$   $\mu$ M) dla 10 U tyrozynazy. Inhibicję tyrozynazy dla pochodnych obliczono według wzoru:

$$\text{Inhibicja tyrozynazy} = \left( \frac{A_{30} - A_0 \text{ próby badanej}}{A_{30} - A_0 \text{ próby kontrolnej}} \times 100\% \right)$$

Dla badanych związków wyznaczono zahamowanie aktywności tyrozynazy przy zastosowaniu stężenia pochodnych równego  $IC_{50KA}$  (Fig. 1).

Przykład 4. Wyznaczenie wartości  $IC_{50}$  względem enzymu tyrozynazy.

Zasada testu tak jak w przykładzie 3.

Część doświadczalna

Związki seryjnie rozcieńczono w 50 mM buforze fosforanowym o pH 6,5. Najwyższe stężenie końcowe wynosiło 100  $\mu$ M. Pozostałe warunki doświadczenia tak jak w przykładzie 3.

Wyniki

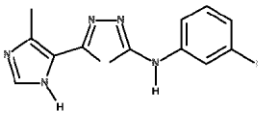
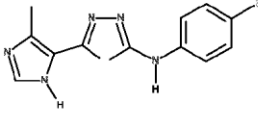
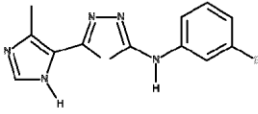
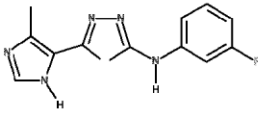
W doświadczeniu oceniano wpływ testowanych związków na aktywność enzymatyczną tyrozynazy. Za kontrolę przyjęto próbki bez dodatku związku/inhibitora. Aktywność tyrozynazy dla pochodnych obliczono według wzoru:

$$\text{Aktywność tyrozynazy} = \left( \frac{A_{30} - A_0 \text{ próby badanej}}{A_{30} - A_0 \text{ próby kontrolnej}} \times 100\% \right)$$

Dla badanych związków wyznaczono stężenie  $IC_{50Tyr}$  – stężenie hamujące aktywność tyrozynazy w 50% (Tab. 2).

**Tab. 2.** Aktywność inhibicyjna dla pochodnych 1,3,4-tiadiazolu z podstawnikiem arylowym (T1-T4), rozcieńczonych seryjnie w 50 mM buforze fosforanowym o pH 6,5. Procent aktywności tyrozynazy (%) ± SD.

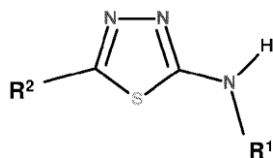
**KA** – kwas kojowy

Związek	Stężenia [μM]								IC <sub>50</sub> Tyr [μM]
	100,00	50,00	25,00	12,50	6,25	3,13	1,56	0,78	
<b>T1</b> 	30,10 0,80	40,31 0,76	44,04 0,27	46,18 0,35	61,98 0,61	63,57 0,52	73,99 0,99	75,85 1,42	<b>13,60</b>
<b>T2</b> 	19,26 0,74	24,36 0,73	31,33 4,95	42,10 5,03	53,56 2,53	59,01 2,41	66,05 4,39	70,82 2,85	<b>7,24</b>
<b>T3</b> 	38,38 6,82	56,87 4,90	58,05 5,06	63,29 4,11	73,16 4,66	78,20 2,54	87,65 2,08	91,04 1,12	<b>53,81</b>
<b>T4</b> 	48,38 1,82	55,49 1,35	59,29 0,89	62,53 0,82	69,16 1,14	72,19 0,85	79,44 1,16	81,51 0,96	<b>89,35</b>
<b>KA</b>	5,87 0,64	18,36 1,36	45,28 0,70	51,62 1,57	77,72 1,36	92,14 1,31	95,87 1,27	101,05 1,79	<b>24,87</b>

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że pochodne 1,3,4-tiadiazolu wykazują aktywność inhibicyjną względem tyrozynazy. Nieoczekiwanie istotnie niższą wartość IC<sub>50</sub>Tyr niż kwas kojowy osiągnęły pochodne z podstawnikiem R1 3-jodofenylowym (T1) i 4-jodofenylowym (T2).

### Zastrzeżenia patentowe

1. Pochodne 1,3,4-tiadiazolu o wzorze ogólnym 1 gdzie R1 oznacza podstawnik arylowy 3-jodofenylowy (T1), 4-jodofenylowy (T2), 3-bromofenylowy (T3) lub 3-fluorofenylowy (T4), zaś R2 oznacza podstawnik 4-metyloimidazolo-5-ylowy.



Wzór 1

2. Sposób otrzymywania pochodnych 1,3,4-tiadiazolu określonych w zastrz. 1, **znamienny tym**, że odpowiednią pochodną tiosemikarbazylu poddaje się na czas 2 godzin dehydrocyklizacji w środowisku stężonego kwasu siarkowego, po czym otrzymany produkt reakcji oczyszcza się przez krystalizację z butanolu.
3. Pochodne 1,3,4-tiadiazolu określone w zastrz. 1 do zastosowania do wytwarzania leku przeznaczonego do leczenia chorób skóry związanych z zaburzeniami barwnikowymi skóry w postaci tabletek, proszku, granulek, kapsulek, syropu, i roztworu do wstrzykiwań.
4. Pochodne 1,3,4-tiadiazolu określone w zastrz. 1 do zastosowania jako składnik produktów kosmetycznych rozjaśniających skórę w postaci maści, kremu i kapsulek.

## Rysunek

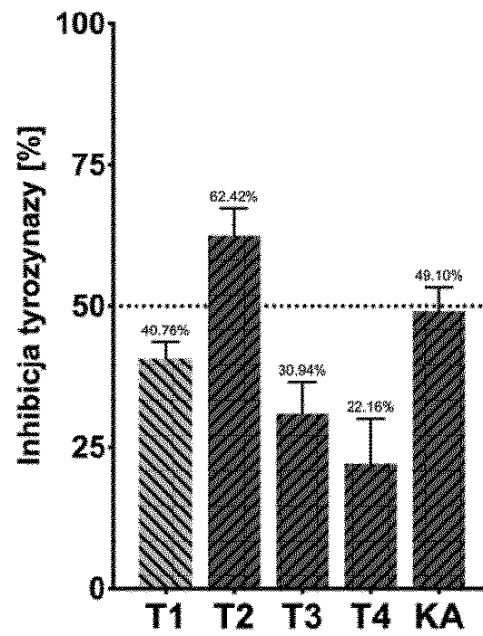


Fig. 1