

Nowe pochodne 1,3,4-tiadiazolu, sposób ich otrzymywania, zastosowanie medyczne oraz kosmetyczne

Przedmiotem wynalazku są nowe pochodne 1,3,4-tiadiazolu. Przedmiotem wynalazku jest także sposób wytwarzania, zastosowanie medyczne i 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 potrzebne jest enzym melanogeny, taki jak tyrozynaza. Tyrozynaza (EC 1.14.18.1), jest wielofunkcyjnym enzymem zawierający 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 nowe pochodne 1,3,4-tiadiazolu o wzorze ogólnym 1, gdzie R1 oznacza podstawnik arylowy 3-jodofenylowy, 4-jodofenylowy, 3-bromofenylowy lub 3-fluorofenylowy, zaś R2 oznacza podstawnik 4-metyloimidazolo-5-ylowy.

Istotą wynalazku jest także sposób otrzymywania nowych pochodnych 1,3,4-tiadiazolu o wzorze ogólnym 1 polegający na 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 jest także zastosowanie pochodnych 1,3,4-tiadiazolu o wzorze ogólnym 1 do wytwarzania leku przeznaczonego do leczenia chorób skóry związanych z zaburzeniami barwnikowymi skóry oraz produktów kosmetycznych rozjaśniających skórę.

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

Nowe pochodne 1,3,4-tiadiazolu stosuje się jako składnik kosmetyku w postaci maści, kremu, kapsułek. Istotą wynalazku

Nowe związki według wynalazku wykazuje 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.

Objaśnienie figur rysunku

Fig. 1 przedstawia wzór 1, a fig. 2 przedstawia wyniki inhibicji tyrozynazy (% hamowania przy stężeniu 25 μM) dla pochodnych 1,3,4-tiadiazolu z podstawnikiem arylowym oraz kwasu kojowego (KA). Wartości nad słupkami przedstawiają procent inhibicji, a słupki błędów wskazują odchylenie standardowe.

Wynalazek został przedstawiony bliżej w przykładach.

Przykład I. 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 II. 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^{TC}), nanoszono komórki L929 (ATTC CCL-1TM) o gęstości 1×10^5 /ml po 100 μ l/dółek, zawieszono w pełnym podłożu hodowlanym RPMI 1640 bez czerwieni fenolowej (Biowest) z dodatkiem 10% surowicy płodów bydlęcych (Cytogen), 2mM/ml L-glutaminy (Sigma), 100 μ g/ml streptomycyny (Sigma), 100 U/ml penicyliny (Sigma) i inkubowano przez 24 godziny w 37°C, 5% CO₂. Związek rozpuszczono w DMSO (Sigma), a następnie seryjnie rozcieńczono w pełnym podłożu hodowlanym RPMI, najwyższe stężenie końcowe wynosiło 1000 μ M. Końcowe stężenie DMSO nie było wyższe niż 1%. Po inkubacji usuwano podłoże z komórek i dodawano po 100 μ 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% CO₂. Po obejrzeniu hodowli pod mikroskopem podłoże wraz z badanymi związkami ściągano, a następnie do dółków naniesiono po 50 μ l roztworu MTT o stężeniu 1 mg/ml w podłożu RPMI 1640 i inkubowano w standardowych warunkach (37°C i 5% CO₂). Po 2 godzinach, zbierano

supernatant z komórek, a kryształy formazanu rozpuszczano dodając po 150 µl DMSO/studzienkę. Barwę produktu stabilizowano dodając po 25 µl 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_{30} – stężenie cytotoksyczne związków dla 30% komórek (Tab. 1).

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

Związek	Stężenia [μ M]							CC_{30} [μ M]
	1000	500	250	125	62,5	31,25	15,63	
T1	40,38	46,69	49,34	66,36	85,87	95,75	92,36	84,53
	1,95	1,90	3,00	5,41	2,40	1,26	6,24	
T2	17,57	39,93	63,68	82,10	94,43	99,95	98,17	211,84
	4,70	6,95	3,51	3,37	4,32	3,77	0,92	
T3	60,68	66,08	73,45	78,27	81,09	87,33	90,21	347,62
	1,27	1,70	1,66	1,42	3,26	2,66	2,82	
T4	39,37	46,20	55,68	64,52	75,73	86,16	91,35	43,95
	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 III. Badanie wpływu pochodnych 1,3,4-tiadiazolu na aktywność enzymu tyrozynazy.

Zasada testu

W badaniach wykorzystano tyrozynazę wyizolowaną z *Agaricus bisporus* (T3824, Sigma). Tyrozynaza 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 tyrozynazę przygotowano w 50 mM buforze fosforanowym o pH 6,5. Objętość mieszaniny reakcyjnej wynosiła 200 μ l i zawierała: 80 μ l 2,5 mM L-tyrozyny, 50 μ l 100 μ M związku/inhibitora i 70 μ l tyrozynazy (10 U). Substrat i związek lub inhibitor dodano do 96-dółkowej płytki (Nunc MaxiSorp™, Dania), a następnie dodano tyrozynazę 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 mikropłytek 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:

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

Dla badanych związków wyznaczono zahamowanie aktywności tyrozynazy przy zastosowaniu stężenia pochodnych równego IC_{50KA} (Rys. 2).

Przykład IV. Wyznaczenie wartości IC_{50} względem enzymu tyrozynazy.

Zasada testu – jw.

Część doświadczalna

Związki seryjnie rozcieńczono w 50 mM buforze fosforanowym o pH 6,5. Najwyższe stężenie końcowe wynosiło 100 μM . Pozostałe warunki doświadczenia jw.

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, rozcieńczonych seryjnie w 50 mM buforze fosforanowym o pH 6,5. Procent aktywności tyrozynazy (%) \pm SD.

Związek	Stężenia [μ M]								IC_{50Tyr} [μ M]
	100,0 0	50,0 0	25,0 0	12,5 0	6,25	3,13	1,56	0,78	
T1	30,10	40,31	44,04	46,18	61,9 8	63,5 7	73,9 9	75,85	13,60
	0,80	0,76	0,27	0,35	0,61	0,52	0,99	1,42	
T2	19,26	24,36	31,33	42,10	53,5 6	59,0 1	66,0 5	70,82	7,24
	0,74	0,73	4,95	5,03	2,53	2,41	4,39	2,85	
T3	38,38	56,87	58,05	63,29	73,1 6	78,2 0	87,6 5	91,04	53,81
	6,82	4,90	5,06	4,11	4,66	2,54	2,08	1,12	
T4	48,38	55,49	59,29	62,53	69,1 6	72,1 9	79,4 4	81,51	89,35
	1,82	1,35	0,89	0,82	1,14	0,85	1,16	0,96	
KA	5,87	18,36	45,28	51,62	77,7 2	92,1 4	95,8 7	101,05	24,87
	0,64	1,36	0,70	1,57	1,36	1,31	1,27	1,79	

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że pochodne 1,3,4-tiadiazolu wykazują aktywność inhibicyjną względem tyrozynazy. Nieoczekiwanie istotnie niższą wartość IC_{50Tyr} niż kwas kojowy osiągnęły pochodne z podstawnikiem R^1 *meta*-jodofenylowym i *para*-jodofenylowym.