

(19)



URZĄD  
PATENTOWY  
RZECZYPOSPOLITEJ  
POLSKIEJ

(10) **PL 245399 B1**

(12)

## Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **427944**

(22) Data zgłoszenia: **2018.11.29**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2020.06.01 BUP 12/2020**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.07.15 WUP 29/2024**

(51) MKP:

**A61K 31/37** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

- (73) Uprawniony z patentu:  
**MICROBIOTA MED SPÓŁKA Z OGRANICZONĄ  
ODPOWIEDZIALNOŚCIĄ, Warszawa, PL**
- (72) Twórca(-y) wynalazku:  
**JAKUB PIWOWARSKI, Umer, PL**  
**SEBASTIAN GRANICA, Warszawa, PL**  
**MARIUSZ SACHARCZUK, Warszawa, PL**  
**MAREK NARUSZEWICZ, Zalesie Górne, PL**
- (74) Pełnomocnik:  
**rzecz. pat. Anna Grzelak, Warszawa, PL**

(54) Tytuł:

**Kompozycja farmaceutyczna zawierająca urolitynę A lub jej pochodną do zastosowania zewnętrznego miejscowego w leczeniu, hamowaniu i zapobieganiu chorobom skóry i błon śluzowych o podłożu zapalnym**

**PL 245399 B1**

## Opis wynalazku

### Dziedzina wynalazku

Wynalazek dotyczy kompozycji farmaceutycznej zawierającej jedną lub więcej typowych substancji pomocniczych oraz składnik aktywny, która jako składnik aktywny zawiera urolitynę A lub jej farmaceutycznie dopuszczalną pochodną, którą stanowi 3,8-dioctan urolityny A, do zastosowania w leczeniu, hamowaniu i zapobieganiu chorobom skóry i błon śluzowych o podłożu zapalnym, przy czym kompozycja jest przeznaczona do zewnętrznego podawania miejscowego.

Kompozycja farmaceutyczna w zastosowaniu a przeznaczona jest do podawania miejscowo w stanach zapalnych o różnej etiologii działając poprzez zmniejszanie poziomu S100A8/A9, kalprotektyny.

### Tło wynalazku

Stany zapalne skóry o różnej etiologii dotyczą dużej części społeczeństwa. Atopowe zapalenie skóry (AZS) występuje u około 20% dzieci i 7% dorosłych. Szczególny wzrost częstości występowania AZS obserwowany jest w krajach rozwiniętych (Odhiambo et al., 2009). Patogeneza AZS jest bardzo złożona. Biorą w niej udział zarówno komórki układu swoistej odpowiedzi zapalnej (limfocyty T, komórki tuczne) jak i nieswoistej odpowiedzi zapalnej (neutrofile, makrofagi). Obecnie uważa się, że główną rolę w przebiegu AZS odgrywiają limfocyty Th2 wytwarzające IL-4, IL-5 oraz IL-13, których wydzielanie jest związane ze zwiększonym wytwarzaniem immunoglobuliny E (Eichenfield et al., 2016).

Łuszczyca jest chorobą dotykającą 2–5% populacji na świecie. Związana jest z hiperproliferacją komórek naskórka i ich nadmiernym rogowaceniem. W konsekwencji dochodzi do zgrubienia naskórka i nacieku zapalnego w skórze właściwej z neutrofilii, makrofagów, komórek dendrytycznych i limfocytów T. Główne szlaki sygnałowe odpowiedzialne za rozwój zmian łuszcycowych w skórze to: szlak białek S100 (w tym S100A8/A9), szlak Wnt, szlak JAK-STAT oraz szlak RAR (Yadav et al., 2018).

Etiologia stanów zapalnych skóry jest bardzo złożona i zależna od interakcji pomiędzy komórkami skóry – keratynocytami i fibroblastami oraz komórkami układu odpornościowego mastocytami, limfocytami, monocytami, makrofagami, neutrofilami, komórkami dendrytycznymi. W ostatnich latach szczególną rolę w stanach zapalnych skóry o różnej etiologii w tym atopowym stanie zapalnym skóry i łuszczycy zaczęto przypisywać dimerycznemu białku – kalprotektynie (D'Amico et al., 2018; Jin et al., 2014; Schonhaler et al., 2013). Heterodimeryczne białko S100A8/A9 (kalprotektyna, kalgranulina) uważane jest obecnie za jeden z kluczowych czynników regulujących odpowiedź zapalną. Należy ono do rodziny białek wiążących jony  $Ca^{2+}$  i występuje w dużych ilościach w cytoplazmie neutrofilii (do 40% rozpuszczalnych białek cytozolowych) i monocytów (do 5%). Pasywnie lub aktywnie wydzielana przez neutrofile oraz makrofagi wykazuje swoje funkcje efektorowe poprzez wiązanie się glikozaminoglikanami oraz z receptorami rozpoznającymi wzorce: Toll like receptor 4 (TLR4) oraz Receptor of Advanced Glycation Endproducts (RAGE) na powierzchni komórek endotelialnych, fagocytów i limfocytów. Wykazano, że S100A8/A9 powoduje zwiększenie wydzielania IL-8, IL-6, MCP-1 oraz cząsteczek adhezyjnych przez komórki endotelialne oraz wpływa na zwiększoną przepuszczalność monowarstwy poprzez dezorganizację F-aktyny oraz zahamowanie ekspresji E-kadheryny, zonula occludens-1 (ZO-1) i  $\beta$ -kateniny. S100A8/A9 oddziałując na receptor TLR4 na powierzchni neutrofilii powoduje zmniejszenie ekspresji powierzchniowej selektyny L (CD62L) i zwiększenie poziomu warunkującej ścisłą adhezję i diapedezę  $\beta$ 2 integryny (CD11b/CD18). Wykazano, że efekty te mogą być związane z aktywacją kinaz MAPK/ERK oraz szlaku NF- $\kappa$ B. Dodatkowo, wykazano że S100A8/A9 powoduje również znaczące zwiększenie wytwarzania IL-17 przez CD8+ limfocyty T. Uważa się, że samo białko S100A8/A9 nie posiada właściwości chemotaktycznych, natomiast indukuje chemotaksję poprzez aktywację komórek układu odpornościowego. Poziom S100A8/A9 ściśle koreluje z progresją stanu zapalnego i dlatego często uznawany jest za ważny biomarker w rozmaitych schorzeniach o podłożu zapalnym i autoimmunologicznym (reumatyzm, nieswoiste stany zapalne jelit, stany zapalne skóry, stany zapalne naczyń, toczeń rumieniowaty układowy, zapalenie skórno-mięśniowe, sklerodermia, stwardnienie rozsiane, olbrzymiokomórkowe zapalenie tętnic, łuszczyca, mukowiscydoza, odrzucenie allografticznego przeszczepu nerki, infekcje, choroby układu sercowo-naczyniowego). Obecnie, S100A8/A9 uważane jest za kluczowy czynnik pobudzający odpowiedź zapalną, którego regulacja może zahamować funkcje komórek układu odpornościowego odpowiadające za progresję schorzeń o podłożu zapalnym i autoimmunologicznym (Pruenster et al., 2016).

Ostatnio publikowane wyniki badań wskazują, że S100A8/A9 może być interesującym celem przy opracowywaniu nowych terapii chorób o podłożu zapalnym. Dotychczas jedynie dla związków z grupy pochodnych chinolino-3-karboksyamidu wykazano zahamowanie interakcji S100A8/A9 z receptorem TLR4 (Bjork et al., 2009). Ważne jest również to, że w badaniach klinicznych związki te wykazywały aktywność przeciwko stwardnieniu rozsianemu (Comi et al., 2012), toczniowi rumieniowatemu (Bengtsson et al., 2012) oraz chorobie Leśniowskiego-Crohna (D'Haens et al., 2015).

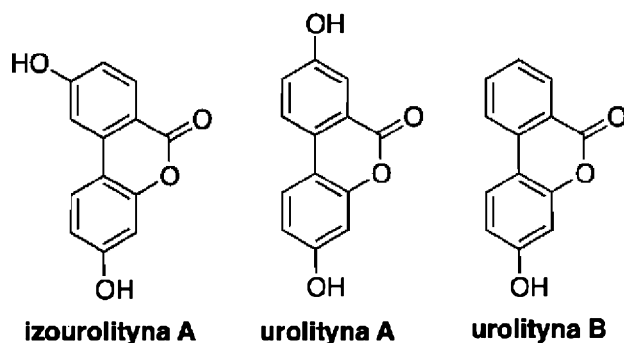
W ostatnich latach, dynamicznie zaczęła się rozwijać wiedza na temat roli mikrobioty jelitowej w utrzymaniu homeostazy organizmu człowieka. Uważa się, że aktywność mikrobioty jelitowej ma kluczowe znaczenie dla zdrowia głównie poprzez wpływ substancji odżywczych i ksenobiotyków na układ immunologiczny oraz metabolizm (Tuohy and Del Rio, 2015). Wyniki badań, odnoszące się do zmian w strukturze przyjmowanych doustnie związków pod wpływem mikrobioty jelitowej spowodowały, że obecnie, przy ocenie wpływu na organizm człowieka substancji występujących w żywności oraz lekach, niezbędne jest uwzględnianie aktywności biologicznej metabolitów powstających w jelicie (Haiser and Tumbaugh, 2013).

Jedną z grup związków podlegających istotnym zmianom strukturalnym pod wpływem mikrobioty jelitowej są elagotanoidy, będące wielkocząsteczkowymi polifenolami, które występują w takich produktach spożywczych jak orzechy włoskie, orzechy laskowe, migdały, sok z granatu, maliny, truskawki, czy dojrzewające w beczkach wino oraz w wielu roślinnych surowcach leczniczych. Biodostępność tych związków w stanie niezmienionym, ze względu na wielkocząsteczkową budowę oraz hydrofilny charakter i podatność na hydrolizę, nie jest w pełni ustalona lub nawet uznawana za wątpliwą. Wiadomo jednak, że elagotanoidy ulegają metabolizmowi pod wpływem mikrobioty jelitowej do pochodnych dibenzo[b,d]piran-6-onu-urolityn, które w przeciwieństwie do elagotanoidów są małowcząsteczkowymi, lipofilnymi związkami o dobrze udokumentowanej biodostępności, mogącymi osiągać stężenia mikromolarnie we krwi, tkankach, kale oraz moczu (Espin et al., 2013). W badaniach *in vivo* stwierdzono korzystny wpływ podawanych doustnie produktów bogatych w elagotanoidy na schorzenia związane z występowaniem przewlekłego stanu zapalnego. Szczególnie podkreśla się pozytywne efekty produktów bogatych w elagotanoidy na układ krążenia oraz nieswoiste stany zapalne jelita grubego. Ze względu na wykazany w ostatnich latach metabolizm elagotanoidów przez florę jelitową, uważa się, że za obserwowane działanie odpowiedzialne mogą być powstające w jelicie urolityny (Colombo et al., 2013; Larrosa et al., 2010a; Piwowarski et al., 2014b; Tomas-Barberan et al., 2016).

Stany zapalne skóry o różnej etiologii dotyczą dużej części społeczeństwa. Atopowe zapalenie skóry występuje u 20% dzieci i 7% dorosłych i jest powszechne zarówno w krajach rozwiniętych jak i rozwijających się. Lekami pierwszego wyboru w terapii AZS i łuszczycy są miejscowo podawane steroidy w tym hydrokortyzon. Wskazaniami do miejscowego stosowania hydrokortyzonu i innych leków steroidowych są choroby skórne takie jak: liszaj rumieniowaty, rumień wielopostaciowy, łojotokowe zapalenie skóry; ukąszenia owadów (na zredukowanie niedogodności bólowych, świądowych i obrzękowych po ukąszeniu, zwłaszcza gdy chory jest uczulony na jad kąsającego owada); trądzik (wypryski); zmiany skórne spowodowane przyjmowaniem leków; oparzenia I i II stopnia; swędzenie skóry; zarumienienie skóry. Stosowanie leków steroidowych związane jest jednak z poważnymi działaniami niepożądanymi, takimi jak infekcje bakteryjne i grzybicze, atrofia skóry, zmiany w pigmentacji skóry, teleangiektazja oraz ryzyko oddziaływania na oś podwzgórze-przysadka-nadnercza (zwłaszcza u dzieci). Ponadto, skuteczność leków steroidowych jest ograniczona występowaniem zjawiska tachyfilaksji (osłabienia działania, które jest wywołane długotrwałym stosowaniem leku) co ogranicza skuteczność w leczeniu przewlekłych stanów zapalnych skóry. Gdy terapia steroidami jest nieskuteczna lub nie może zostać zastosowana ze względu na występującą nadwrażliwość wprowadzona zostaje terapia inhibitorami kalcyneuryny (tacrolimus, pimecrolimus). Może być ona prowadzona jedynie krótkotrwale, a związana jest ze zwiększonym ryzykiem wystąpienia nowotworów (skóry – ang. *nonmelanoma skin cancer* i chłoniaków – ang. *lymphoma*) oraz wiąże się ze zwiększonym ryzykiem infekcji wirusowych np. Herpes simplex. W przypadku miejscowego leczenia AZS zarówno lekami steroidowymi jak i inhibitorami kalcyneuryny, w większości przypadków najpóźniej po pół roku dochodzi do nawrotów choroby (Berth-Jones et al., 2003; Breneman et al., 2008; Papier and Strowd, 2018).

Urolityna A należy do pochodnych dibenzo[b,d]piran-6-onu. Jest metabolitem wytwarzanym przez mikrobiotę jelitową z garbników z grupy elagotanoidów występujących w niektórych produktach spożywczych tj. owocach granatu, truskawkach, malinach, orzechach włoskich czy w winie dojrzewającym w dębowych beczkach. W przeciwieństwie do elagotanoidów, z których powstaje, urolityna A jest mało-

cząsteczkowym, lipofilnym związkiem o dobrze udokumentowanej biodostępności. Podczas wchłaniania w jelicie, urolityna A ulega sprzęgnięciu z kwasem glukuronowym i zarówno w tkankach, jak i krwioobiegu obecna jest już w formie glukuronidów. Wiadomo, że nie wszyscy ludzie wytwarzają każdy rodzaj urolityny. Z opublikowanych dotychczas badań wiadomo, że są osoby wytwarzające jako dominujący związek urolitynę A, izourolitynę A lub urolitynę B lub wcale nie wytwarzają urolityny (Piwowarski et al., 2016; Tomas-Barberan et al., 2017). Urolitynę A od izourolityny A odróżnia orientacja grup hydroksylowych, natomiast od urolityny B i urolityny C ich liczba. Przy tak małej cząsteczce niewielka zmiana w układzie oraz ilości grup hydroksylowych ma kluczowe znaczenie dla aktywności związku. Przeprowadzone dotychczas badania wskazują, że zarówno liczba jak i orientacja grup hydroksylowych determinuje zmiany w aktywności biologicznej poszczególnych związków (Piwowarski et al., 2014a; Piwowarski et al., 2015).



Urolityna A jest metabolitem powstającym w jelicie grubym ze związków występujących w żywności pod wpływem mikrobioty jelitowej. Jej stężenie w kale, tkankach, krwi oraz moczu po spożyciu produktów spożywczych bogatych w elagotanoidy może osiągać do 100  $\mu\text{M}$ . Na tej podstawie można wnioskować, że zastosowanie zewnętrzne tego związku wiąże się z bardzo niskim ryzykiem wystąpienia działania toksycznego lub ciężkich działań niepożądanych również przy przewlekłej ekspozycji organizmu na działanie tej substancji. Problemem, jaki pojawia się z wykorzystywaniem endogennej urolityny A jest fakt, iż nie każdy człowiek posiada bakterie zdolne do wytwarzania urolityny A. Ponadto, organizmy odpowiedzialne za ten proces wciąż nie zostały zidentyfikowane, co uniemożliwia manipulowanie składem mikrobioty jelitowej dla indukowania wytwarzania urolityny A w jelicie grubym. Bezpośrednie podanie doustne urolityny A nie pozwala natomiast na osiągnięcie stężeń terapeutycznych przez ten związek, gdyż podczas transportowania przez przewód pokarmowy ulega ona dalszej dehydroksylacji prowadzącej do powstania urolityny B. Natomiast, zarówno podana doustnie jak i wytworzona endogennie urolityna A i tak ulega intensywnemu metabolizmowi II fazy przy przechodzeniu przez ścianę jelita. Metabolizm II fazy polega na sprzęganiu niektórych ksenobiotyków z reaktywnymi metabolitami ustrojowymi, przez co stają się one lepiej rozpuszczalne w wodnym środowisku płynów ustrojowych i w konsekwencji łatwiej wydalane z moczem. Reakcje sprzęgania zachodzące w II fazie biotransformacji katalizują głównie enzymy klasy transferaz, a metabolitami, które biorą udział w tych reakcjach są aminokwasy, glutation, oraz aktywowane kwasy tj.: octowy, siarkowy i przede wszystkim glukuronowy. W konsekwencji tego procesu, w krwioobiegu i tkankach nie jest obecna wolna urolityna A, lecz jej formy sprzężone z kwasem glukuronowym. Jak pokazano w dotychczasowych badaniach *in vitro*, zarówno dehydroksylacja jak i glukuronidacja urolityny A może prowadzić do zmiany lub utraty aktywności (Tomas-Barberan et al., 2017; Tomas-Barberan et al., 2018).

Powyższe ograniczenia związane z metabolizmem elagotanoidów oraz urolityny A związane z ich doustnym stosowaniem doprowadziły do podjęcia prób wykorzystania właściwości przeciwzapalnych urolityny A w kompozycji do stosowania miejscowego na skórę. Podanie związku bezpośrednio na skórę prowadzi do ominięcia problemu dezaktywacji pod wpływem enzymów II fazy i powoduje osiągnięcie aktywnych stężeń związku bezpośrednio w miejscu objętym stanem zapalnym, które nie są możliwe do osiągnięcia przy normalnym spożyciu produktów spożywczych zawierających elagotanoidy ani przy podaniu doustnym urolityny A.

Dodatkowo, opublikowane w lipcu 2017 roku badania wskazują na brak toksycznego działania urolityny A na modelu zwierzęcym zarówno po podaniu doustnym, jak i dożylnym (Heilman et al. 2017

Food and Chemical Toxicology doi: 10.1016/j.fct.2017.07.050). Ponadto, urolityna A jest związkiem wykazującym zupełnie odmienny mechanizm działania w odniesieniu do stosowanych dotychczas w terapii leków steroidowych i inhibitorów kalcyneuryny, tj. hamuje uwalnianie kalprotektyny oraz hamuje translokację podjednostki NF- $\kappa$ B do jądra komórkowego (Piwowarski et al., 2015).

Korzystnym aspektem jest również fakt, że urolityna A jest skuteczną alternatywą dla stosowanych obecnie leków steroidowych i inhibitorów kalcyneuryny, które w wielu przypadkach chorób skóry/błon śluzowych o podłożu zapalnym i autoimmunologicznym wykazują niską skuteczność. Stosowanie leków steroidowych związane jest z wystąpieniem efektu tachyfilaksji, tj. spadku skuteczności leku wywołanego jego częstym stosowaniem, który ogranicza ich skuteczność w leczeniu przewlekłych stanów zapalnych. Efekt ten jest charakterystyczny dla leków, których działanie oparte jest na mechanizmie receptorowym. Urolityna A jest substancją hamującą wydzielanie kalprotektyny oraz hamującą szlak sygnalizacyjny związany z procesem translokacji podjednostki p65 NF- $\kappa$ B do jądra komórkowego i nie wykazano dla niej dotychczas działania receptorowego, dlatego efekt tachyfilaksji nie powinien w przypadku urolityny A ograniczać jej skuteczności przy przewlekłym stosowaniu.

W związku z tym, że urolityna A jest związkiem wytwarzanym w jelicie z elagotanoidów występujących w typowych produktach spożywczych, istnieje niskie ryzyko wystąpienia działania toksycznego lub poważnych działań niepożądanych *in vivo* również przy przewlekłej ekspozycji organizmu na działanie tej substancji.

Podkreślić należy również fakt, że zmniejszone ryzyko wystąpienia działań niepożądanych przy zewnętrznym stosowaniu urolityny A, znacząco wpłynie na rezultaty prowadzonej terapii, co nie będzie generowało dodatkowych kosztów związanych z dalszym leczeniem. U 16–43% pacjentów stosujących miejscowo steroidy obserwowane są infekcje bakteryjne i grzybicze w obrębie leczonych miejsc, wobec których musi zostać zastosowana terapia farmakologiczna. Opisywana jest również atrofia skóry, zmiany w pigmentacji (hipo i hiperpigmentacja) oraz kontaktowa nadwrażliwość na steroidy, która uniemożliwia dalszą terapię. Terapia inhibitorami kalcyneuryny może być prowadzona jedynie krótkotrwale, a związana jest to zwiększonym ryzykiem wystąpienia nowotworów skóry.

Dlatego też, tak ważnym stało się podjęcie próby zidentyfikowania związku oraz wytworzenia kompozycji zawierającej ten związek, który byłby skuteczny w leczeniu opornych na konwencjonalną terapię przypadków oraz jego stosowanie nie byłoby związane z ryzykiem pojawienia się poważnych działań niepożądanych.

Ze stanu techniki znane jest stosowanie doustne lub parenteralne urolityny A oraz wywoływane przez nią ogólnoustrojowe efekty terapeutyczne.

Publikacja *Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism* (Larrosa et al., 2010b) dotyczy wpływu podawanego doustnie wyciągu z owoców granatu w dawce 250 mg/kg lub urolityny A w dawce 15 mg/kg na stan zapalny jelita u szczurów wywołany dekstranem siarczanu sodu. Wyciąg i urolitynę A podawano przez 25 dni, a stan zapalny jelita wywołano przez podawanie DSS przez 5 ostatnich dni trwania eksperymentu. Na podstawie otrzymanych wyników autorzy stwierdzili, że w przypadku objętego stanem zapalnym jelita grubego aktywność terapeutyczną wykazuje głównie wyciąg z owoców granatu i występujące w nim elagotanoidy, natomiast aktywność przeciwzapalna urolityny A może mieć znaczenie jedynie w przypadku zdrowych osobników. Do takich wniosków doprowadziły autorów badania próbek kału zwierząt przyjmujących urolitynę A, w których stwierdzono niewielkie ilości tego związku. Prawdopodobnie uległ on procesowi dalszego metabolizmu pod wpływem mikrobioty jelitowej lub został wchłonięty i uległ metabolizmowi II fazy.

Publikacja *In vivo anti-inflammatory and antioxidant properties of ellagitannin metabolite urolithin A* (Ishimoto et al., 2011) dotyczy wpływu doustnego podania urolityny A na wywołany karagenem obrzęk łapy u myszy. Doustne podanie urolityny A jedną godzinę po wywołaniu obrzęku znacząco zmniejszało jego rozmiary przez kolejne 24 godziny eksperymentu. Jak podają autorzy, zastosowany model pozwala ocenić potencjał przeciwzapalny jedynie dla doustnie podawanych leków. W osoczu natomiast stwierdzono obecność metabolitów II fazy urolityny A-glukuronidów. Z tego możemy wnioskować, że doustnie podana urolityna A jest metabolizowana i w związku za obserwowane zmiany odpowiada produkt jej metabolizmu – glukuronid urolityny A.

Dokument patentowy EP2068864B1 ujawnia terapeutyczne zastosowanie urolityny, wybranej z grupy składającej się z: m.in. urolityny B, urolityny A, hydroksy-urolityny A, metylo-urolityny A, do leczenia i/lub zapobiegania chorobie nowotworowej u osobnika. Wiadomym jest, że metabolity elagotanoidów wykazują działanie antyproliferacyjne i/lub proapoptotyczne i jako takie znajdują zastosowanie

w leczeniu i zapobieganiu wielu chorobom nowotworowym. Jednakże, w odróżnieniu do powyższego, wynalazek będący przedmiotem niniejszego zgłoszenia ujawnia zastosowania urolityny A na stany zapalne skóry. Stany zapalne skóry o różnej etiologii związane są ze zwiększoną odpowiedzią zapalną komórek układu odpornościowego, jednak nie mają one podłoża nowotworowego. Wykazane przez nas zahamowanie stanu zapalnego skóry *in vivo* poprzez miejscowe podanie kompozycji urolityny A jest związane z miejscowym zahamowaniem procesów zapalnych i nie ma związku z działaniem hamującym proliferację komórek lub indukowaniem w nich apoptozy. Ponadto, w poprzednich badaniach przeprowadzonych na neutrofilach i makrofagach nie obserwowano ani działania cytotoksycznego ani antyproliferacyjnego dla urolityny A (Piwowarski et al., 2014a; Piwowarski et al., 2014b; Piwowarski et al., 2015).

Amerykańskie zgłoszenie US2010323985A ujawnia zastosowanie związku z grupy urolityn, urolityny B jako składnika preparatu farmaceutycznego lub kosmetycznego do stosowania miejscowego i/lub pozajelitowego. Jednakże, dokument ten nie odnosi się do stosowania urolityny B jako takiej, a do kombinacji kwasu hialuronowego i co najmniej jednego inhibitora degradacji kwasu hialuronowego, do stosowania w szczególności w dermatologii u ludzi, w szczególności w leczeniu przez wypełnianie zmarszczek, cienkich linii, ubytków fibroblastów i wszelkich blizn lub w chirurgii rekonstrukcyjnej. Urolityna B została wskazana jako przykład jednego spośród inhibitorów degradacji kwasu hialuronowego, samych lub w mieszaninie. W odniesieniu do powyższego, twórcy przeprowadzili doświadczenia zgodnie z metodą farmakopealną (USP), w wyniku których nie zaobserwowano wpływu urolityny A na aktywność hialuronidazy. Aktywność hamująca ten enzym była natomiast obserwowana dla elagotanoidów, spośród których urolityna A jest wytwarzana przez mikrobiotę jelitową (Piwowarski and Kiss, 2015). Ujawnione w powyższym zgłoszeniu zastosowanie związku należącego do rodziny urolityn nie odnosi się ponadto do atopowego zapalenia skóry, gdyż nie są znane dane literaturowe potwierdzające zwiększony rozkład kwasu hialuronowego w tym schorzeniu. Jak również, w przypadku łuszczycy trwają obecnie badania nad skutecznością podskórnych zastrzyków z hialuronidazy (preparat Hylenex; <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01987609>).

Japońskie zgłoszenie patentowe JP2017007951A odnosi się do nowego zastosowania urolityn w hamowaniu fotostarzenia spowodowanego wpływem promieniowania UV na skórę. W opisie zgłoszenia ujawniono wzór ogólny dla urolityn, wskazując wspólne działanie dla urolityn, np. urolityny A, urolityny B, urolityny C, urolityny D, urolityny E, urolityny M3, urolityny M4 i tym podobnych, w hamowaniu fotostarzenia. Właściwości urolityny A opisane twórców zgłoszeniu odnoszą się do bezpośredniej ochrony skóry przed promieniowaniem UV, która związana jest jedynie z właściwościami fizykochemicznymi a nie farmakologicznymi tej cząsteczki. Ekspozycja na promieniowanie UV, jako czynnik uszkadzający tkanki, przyspiesza starzenie skóry a nadmierna jednorazowa ekspozycja na promieniowanie może wywołać stan zapalny skóry (poparzenie słoneczne) i nowotwory (D'Orazio et al., 2013). Urolityna A wykorzystywana jest tu jako związek absorbujący promieniowanie UV i przez to zapobiegający działaniu uszkadzającemu skórę, którego pośrednią konsekwencją przy ostrej ekspozycji jest stan zapalny skóry wywołany np. poparzeniem słonecznym. Zgłoszenie to odnosi się w szczególności do zapobiegania stanom zapalnym skóry wywołanym nadmierną ekspozycją na promieniowanie UV, nie odnosi się natomiast do pozostałych schorzeń o podłożu zapalnym. Nie są znane żadne doniesienia literaturowe, dotyczące wywoływania atopowych stanów zapalnych skóry czy łuszczycy przez promieniowanie UV. Ponadto, znane jest szerokie zastosowanie promieniowania UV w fototerapii atopowych stanów zapalnych skóry i łuszczycy.

Międzynarodowe zgłoszenie patentowe (WO2014004902 A2) odnosi się do zastosowania związków z grupy urolityn i ich prekursorów jako substancji pobudzających autofagię i przez to hamujących procesy starzenia. Zgłoszenie oparte jest na wynikach badań *in vitro* i *in vivo*, które wskazują urolityny jako związki pobudzające autofagię i tym samym, zapobiegające procesom starzenia, zwiększające siłę mięśni zwierząt oraz ich aktywność lokomotoryczną. Badania *in vivo* przeprowadzono jedynie dla doustnie podawanej urolityny A i nie uwzględniały one zbadania metabolizmu urolityny A w przewodzie pokarmowym zwierząt oraz pod wpływem enzymów II fazy. Ze względu na stwierdzone działanie pobudzające autofagię po podaniu doustnym, twórcy niniejszego zgłoszenia domniemają, że związki należące do grupy urolityn mogą znajdować zastosowanie w leczeniu schorzeń, w których pożądane jest pobudzenie tego procesu. Pośród bardzo wielu schorzeń, wymienione zostają również choroby skóry: starzenie się skóry, fotostarzenie, stan zapalny skóry oraz łuszczycy, jako te w których pobudzenie procesu autofagii może okazać się korzystne. Nie przeprowadzono natomiast żadnych badań, które wskazywałyby na aktywność przeciwzapalną urolityny A po miejscowym podaniu na skórę oraz nie

uwzględniono w badaniach żadnych procesów, które są kluczowe dla rozwoju stanów zapalnych skóry o różnej etiologii, w tym atopowego zapalenia skóry i łuszczycy.

W odróżnieniu do powyższej opisywanego, międzynarodowego zgłoszenia, istotą zgłaszanego wynalazku jest bezpośrednie działanie przeciwzapalne na skórę opisane na modelu *in vivo* związane z przyspieszaniem procesu gojenia, zmniejszaniem częstotliwości drapania oraz zmniejszaniem populacji komórek układu odpornościowego odpowiedzialnych za progresję stanu zapalnego (leukocytów, monocytów i neutrofilii) co może wiązać się z zahamowaniem uwalniania kalprotektyny. Powyższe procesy nie mają związku z opisywanym wcześniej stymulującym wpływem urolityny A na autofagię po podaniu doustnym. Ponadto, według dostępnej literatury zahamowanie procesu autofagii nie jest kluczowe dla progresji stanów zapalnych skóry o różnej etiologii w tym łuszczycy, nie jest również znana rola procesu autofagii w etiologii atopowego stanu zapalnego skóry (Deng et al., 2016; Furue et al., 2018; Weidinger and Novak, 2016; Yadav et al., 2018).

Publikacja *Anti-aging Effects Of Urolithin A On Replicative Senescent Human Skin Fibroblasts* (Liu et al., 2018) dotyczy badań wpływu urolityny A na procesy starzenia, przeprowadzonych na modelu *in vitro* ludzkich fibroblastów. Autorzy wykazali, że urolityna A pobudzała syntezę kolagenu i hamowała ekspresję mRNA dla matrycowej metaloproteiny macierzy-1, ponadto wykazali działanie antyoksydacyjne zależne od aktywacji receptora Nrf2. Nie stwierdzono natomiast zahamowania starzenia się fibroblastów. Mimo to, autorzy na podstawie przeprowadzonych badań *in vitro* sugerują kosmetyczne zastosowanie urolityny A w preparatach o działaniu przeciwstarzejącym. Powyższe badania przeprowadzono na komórkach wchodzących w skład tkanki skóry, nie odnoszą się one jednak do zjawisk i mechanizmów bezpośrednio związanych ze stanami zapalnymi skóry.

Ponadto, miejscowe stosowanie urolityny A na skórę nie zostało dotychczas nigdzie opisane do stosowania w leczeniu stanu zapalnego skóry. Przytoczone powyżej zgłoszenia patentowe i publikacje oparte są wyłącznie na badaniach *in vitro* oraz badaniach *in vivo* po podaniu doustnym urolityny A. Droga podania urolityny A ma szczególne znaczenie wzięwszy pod uwagę metabolizm urolityny A, zachodzący po jej doustnym podaniu w przewodzie pokarmowym. Nie przeprowadzono dotychczas żadnych badań *in vivo* dotyczących miejscowego stosowania urolityny A ani żadnego z pozostałych związków należących do grupy urolityn. Doniesienia te potwierdza również fakt opublikowania 20 marca 2018 roku krytycznego komentarza pionierów badań nad urolitynami (Tomas-Barberan et al., 2018) i specjalistów w dziedzinie metabolizmu mikrobioty jelitowej oraz opublikowana rok wcześniej przez nich praca przeglądowa (Tomas-Barberan et al., 2017) jasno wskazujące, że kierunek działania przeciwzapalnego na skórę oraz miejscowy sposób aplikacji urolityny A nie był dotychczas brany pod uwagę. Dlatego też, otrzymane wyniki badań wraz z tym zgłoszeniem stanowią pierwsze doniesienie stosowania urolityny A, będącej metabolitem mikrobioty jelitowej, oraz kompozycji ją zawierającej do miejscowego hamowania stanu zapalnego.

Publikacja *“Psoriasis and Atopic Dermatitis”* (Griffiths Christopher E.M. et al, *Dermatology and Therapy*, vol. 7, no.S1, January 2017) dotyczy leczenia zapalnych chorób skóry, takich jak łuszczycy czy atopowe zapalenie skóry i prezentuje przegląd współczesnych metod leczenia łuszczycy i atopowego zapalenia skóry jako przewlekłych chorób zapalnych skóry za pomocą kortykosteroidów i inhibitorów kalcyneuryny oprócz metod związanych z nawilżaniem skóry, naprawy bariery skórnej, leków przeciwzapalnych i innych. Jednak ewentualne stosowanie urolityny A lub jej specyficznych pochodnych nie jest wskazane ani sugerowane.

## **STRESZCZENIE WYNAŁAZKU**

Mając powyższe na uwadze celem twórców niniejszego wynalazku było dostarczenie związku, który skutecznie będzie zmniejszał poziom S100A8/A9, kalprotektyny, do stosowania zewnętrznego o działaniu przeciwzapalnym na skórę i błony śluzowe. Twórcy wynalazku nieoczekiwanie stwierdzili, że cel ten może być osiągnięty dzięki wykorzystaniu urolityny A.

## **ISTOTA WYNAŁAZKU**

Wynalazek dostarcza kompozycję farmaceutyczną zawierającą jedną lub więcej typowych substancji pomocniczych oraz składnik aktywny, która jako składnik aktywny zawiera urolitynę A lub jej farmaceutycznie dopuszczalną pochodną, którą stanowi 3,8-dioctan urolityny A, do zastosowania w leczeniu, hamowaniu i zapobieganiu chorobom skóry i błon śluzowych o podłożu zapalnym, przy czym kompozycja jest przeznaczona do zewnętrznego podawania miejscowego.

Kompozycja farmaceutyczna do zastosowania korzystnie jest stosowana w leczeniu, hamowaniu i zapobieganiu chorobom skóry i błon śluzowych o zwiększonym poziomie kalprotektyny dla obniżenia poziomu kalprolektyny.

W korzystnej kompozycji farmaceutycznej do zastosowania składnik aktywny jest obecny w ilości od około 0,0001 procent wagowo do około 15 procent wagowo względem całkowitej masy kompozycji, korzystnie od około 0,01 procent wagowo do około 5 procent wagowo względem całkowitej masy kompozycji, najkorzystniej od około 0,1 procent wagowo do około 2 procent wagowo względem całkowitej masy kompozycji.

Kompozycja farmaceutyczna do zastosowania korzystnie dodatkowo zawiera co najmniej jeden lek wybrany z grupy steroidów, inhibitorów kalcyneuryny, leków o działaniu przeciwbakteryjnym, przeciwgrzybiczym lub przeciwwirusowym, korzystnie wybrany z grupy steroidów lub inhibitorów kalcyneuryny, najkorzystniej lek stanowi inhibitor kalcyneuryny.

W korzystnej kompozycji farmaceutycznej do zastosowania urolityna A jest jedynym składnikiem aktywnym obecnym w kompozycji.

W korzystnej kompozycji farmaceutycznej do zastosowania co najmniej jedna farmaceutycznie dopuszczalna substancja pomocnicza jest wybrana spośród nośnika i/albo zaróbki i/albo rozcieńczalnika oraz ich kombinacji.

W korzystnej kompozycji farmaceutycznej do zastosowania farmaceutycznie dopuszczalną substancją pomocniczą jest jeden lub więcej spośród środków ochronnych, adsorbentów, środków łagodzących, środków zmiękczających, środków konserwujących, antyoksydantów, środków nawilżających, środków buforujących i środków solubilizujących.

Kompozycja farmaceutyczna do zastosowania korzystnie jest przeznaczona do podawania miejscowego na dotknięty chorobą obszar w zakresie od około 0,0001 g/cm<sup>2</sup> obszaru powierzchni skóry do około 0,5 g/cm<sup>2</sup>, korzystnie 0,001 g/cm<sup>2</sup> do około 0,2 g/cm<sup>2</sup> obszaru powierzchni skóry.

Kompozycja farmaceutyczna do zastosowania korzystnie jest w postaci płynnej, korzystnie w postaci toniku, balsamu, lotionu, pianki, najkorzystniej w postaci toniku.

W korzystnej kompozycji farmaceutycznej do zastosowania kompozycja jest w postaci półstałej, korzystnie w postaci maści, kremu, pasty, żelu, korzystnie w postaci maści lub kremu, najkorzystniej w postaci maści.

W korzystnej kompozycji farmaceutycznej do zastosowania kompozycja jest przeznaczona do nanoszenia na dotknięty chorobą obszar manualnie, korzystnie przy użyciu zakraplacza, patyczka aplikacyjnego albo aplikatora aerozolowego.

W korzystnej kompozycji farmaceutycznej do zastosowania kompozycja jest w postaci transdermalnego systemu terapeutycznego takiego jak plaster śródskórny albo plaster przezskórny.

W korzystnej kompozycji farmaceutycznej do zastosowania choroby skóry i błon śluzowych wybiera się z grupy składającej się ze stanów zapalnych skóry, stanów zapalnych naczyń, tocznia rumieniowatego, zapalenia skórno-mięśniowego, sklerodermii, stwardnienia rozsianego, olbrzymiokomórkowego zapalenia tętnic, łuszczycy, atopowego zapalenia skóry, łojotokowego zapalenia skóry, kontaktowego zapalenia skóry, pokrzywki, trądziku różowatego, opryszczkowego zapalenia skóry, liszaja płaskiego, mnogich ropni pach, łupieżu różowego Giberta, potówek, aft, pieluszkowego zapalenia skóry, trądziku młodzieńczego, wyprysku kontaktowego niealergicznego, zapalenia tkanki tłuszczowej, zapalenia tkanki łącznej- cellulitis.

W korzystnej kompozycji farmaceutycznej do zastosowania chorobą skóry i błon śluzowych jest łuszczycza.

Kompozycja farmaceutyczna do zastosowania korzystnie jest stosowana dla obniżenia poziomu kalprolektyny.

Korzystnie kompozycja farmaceutyczna przeznaczona jest do zastosowania w którym chorobą skóry i błon śluzowych o podłożu zapalnym jest atopowe zapalenie skóry.

Kompozycja farmaceutyczna do zastosowania korzystnie jest stosowana dla obniżenia poziomu kalprolektyny.

W korzystnej kompozycji farmaceutycznej do zastosowania jedynym składnikiem aktywnym stosowanym dla obniżenia poziomu kalprolektyny w stanach i chorobach skóry i błon śluzowych o podłożu zapalnym jest urolityna A stosowana w chorobach skóry i błon śluzowych o podłożu zapalnym wybranych z grupy składającej się ze stanów zapalnych skóry, stanów zapalnych naczyń, tocznia rumieniowatego, zapalenia skórno-mięśniowego, sklerodermii, stwardnienia rozsianego, olbrzymiokomórkowego,

wego zapalenia tętnic, łuszczycy, atopowego zapalenia skóry, łojotokowego zapalenia skóry, kontaktowego zapalenia skóry, pokrzywki, trądziku różowatego, opryszczkowego zapalenia skóry, liszaja płaskiego, mnogich ropni pach, łupieżu różowego Giberta, potówek, aft, pieluszkowego zapalenia skóry, trądziku młodzieńczego, wyprysku kontaktowego niealergicznego, zapalenia tkanki tłuszczowej, zapalenia tkanki łącznej- cellulitis.

W korzystnej kompozycji farmaceutycznej do zastosowania jedynym składnikiem aktywnym stosowanym dla obniżenia poziomu kalprolektyny w stanach i chorobach skóry i błon śluzowych o podłożu zapalnym jest urolityna A stosowana w atopowym zapaleniu skóry.

W korzystnej kompozycji farmaceutycznej do zastosowania jedynym składnikiem aktywnym stosowanym dla obniżenia poziomu kalprolektyny w stanach i chorobach skóry i błon śluzowych o podłożu zapalnym jest urolityna A stosowana w łuszczycy.

### **SZCZEGÓŁOWY OPIS WYNAŁAZKU**

Jak wskazano powyżej, przedmiotem wynalazku jest kompozycja farmaceutyczna zawierająca jedną lub więcej typowych substancji pomocniczych oraz składnik aktywny, która jako składnik aktywny zawiera urolitynę A lub jej farmaceutycznie dopuszczalną pochodną, którą stanowi 3,8-dioctan urolityny A, do zastosowania w leczeniu, hamowaniu i zapobieganiu chorobom skóry i błon śluzowych o podłożu zapalnym, przy czym kompozycja jest przeznaczona do zewnętrznego podawania miejscowego.

Korzystnie, kompozycja do zastosowania do stosowania zewnętrznego, zawiera syntetyczną urolitynę A, będącą w naturze metabolitem mikrobioty jelitowej. Urolityna A ma przeciwzapalne właściwości w leczeniu stanów zapalnych skóry i błon śluzowych.

Bardziej szczegółowo, ujawniono urolitynę A do miejscowego stosowania w leczeniu, hamowaniu i zapobieganiu chorób skóry i błon śluzowych o podłożu zapalnym, w szczególności: stanów zapalnych skóry, stanów zapalnych naczyń, tocznia rumieniowatego, zapalenia skórno-mięśniowego, sklerodermy, stwardnienia rozsianego, olbrzymiokomórkowego zapalenia tętnic, łuszczycy, atopowego zapalenia skóry, łojotokowego zapalenia skóry, kontaktowego zapalenia skóry, pokrzywki, trądziku różowatego, opryszczkowego zapalenia skóry, liszaja płaskiego, mnogich ropni pach, łupieżu różowego Giberta, potówek, aft, pieluszkowego zapalenia skóry, trądziku młodzieńczego, wyprysku kontaktowego niealergicznego, zapalenia tkanki tłuszczowej, zapalenia tkanki łącznej- cellulitis.

Opisane zostały również kompozycje farmaceutyczne zawierające różne postacie urolityny A, razem z jedną lub z większą liczbą farmaceutycznie dopuszczalnych zaróbek, rozcieńczalników lub nośników.

Taka kompozycja farmaceutyczna może, bez ograniczania się do podanych w zgłoszeniu informacji, zawierać stałą postać, która jest wymieszana z co najmniej jedną farmaceutycznie dopuszczalną zaróbką i/lub rozcieńczalnikiem. Jednakże, korzystnie kompozycja farmaceutyczna do zastosowania ma ostateczną postać użytkową jaką jest postać płynna lub półstała i jest zazwyczaj podawana potrzebującemu tego osobnikowi w postaci pianki, toniku, maści, emulsji lub kremu.

Przykłady odpowiednich zaróbek obejmują skrobię, gumę arabską, krzemian wapnia, mikrokryształiczną celulozę, poliwinylpirolidon, celulozę, wodę, syrop i metylocelulozę. Kompozycja farmaceutyczna do zastosowania może zawierać dodatkowo środki smarujące, takie jak przykładowo talk, stearynian magnezu i olej mineralny; środki zwilżające; środki emulgujące i suspendujące; środki konserwujące, takie jak metylo- i propylohydroksybenzoesany; środki aromatyzujące.

Kompozycja farmaceutyczna do zastosowania może zawierać farmaceutycznie dopuszczalne substancje pomocnicze, obejmujące środki ochronne, adsorbenty, środki łagodzące, środki zmiękczające skórę, środki konserwujące, antyoksydanty, środki nawilżające, środki buforujące, środki solubilizujące, środki penetrujące skórę oraz surfaktanty.

Odpowiednie środki ochronne oraz adsorbenty obejmują, lecz nie ograniczają się nich, zasyпки, stearynian cynku, kolodium, dimetikon, silikon, węglan cynku, żel aloesowy i inne produkty aloesowe, olejek z witaminą E, alantoinę, glicerynę, wazelinę oraz tlenek cynku.

Odpowiednie środki łagodzące obejmują, lecz nie ograniczają się do benzoiny, hydroksypropylocelulozy, hydroksypropylometylocelulozy oraz alkoholu poliwinylowego.

Odpowiednie środki zmiękczające skórę obejmują, lecz nie ograniczają się do tłuszczów oraz olejów zwierzęcych oraz roślinnych, alkoholu mirystylowego, ałunu oraz octanu glinu.

Odpowiednie środki konserwujące obejmują, lecz nie ograniczają się do czwartorzędowych związków amoniowych, takich jak chlorek benzalkoniowy, chlorek benzetonowy, cetrymid, chlorek dekwalinium oraz chlorek cetylopirydyniowy; środków ręciovych, takich jak azotan fenylortęci, octan fenylortęci oraz tiomerosal; środków alkoholowych, na przykład, chlorobutanol, alkohol feniloetylowy

oraz alkohol benzylowy; estrów antybakteryjnych, na przykład, estrów kwasu parahydroksybenzoesowego; oraz innych środków przeciwdrobnoustrojowych, takich jak chlorheksydyna, chlorokrezol, kwas benzoesowy oraz polimyksyna. Dwutlenek chloru (ClO<sub>2</sub>), korzystnie, stabilizowany dwutlenek chloru, jest korzystnym środkiem konserwującym do zastosowania w kompozycji do stosowania miejscowego objętej wynalazkiem.

Odpowiednie antyoksydanty obejmują, lecz nie ograniczają się do kwasu askorbinowego oraz jego estrów, wodorosiarczynu sodu, butylohydroksytoluenu, butylohydroksyanizolu, tokoferoli oraz środków chelatujących, takich jak EDTA oraz kwas cytrynowy.

Odpowiednie środki nawilżające obejmują, lecz nie ograniczają się do gliceryny, sorbitolu, glikoli polietylenowych, mocznika oraz glikolu propylenowego.

Odpowiednie środki buforujące do zastosowania w wynalazku obejmują, lecz nie ograniczają się do buforów octanowych, buforów cytrynianowych, buforów fosforanowych, buforów kwasu mlekowego oraz buforów boranowych.

Odpowiednie środki solubilizujące obejmują, lecz nie ograniczają się do czwartorzędowych chlorków amoniowych, cyklodekstryn, benzoesanu benzylu, lecytyny oraz polisorbitatów.

Kompozycja do stosowania miejscowego objęta wynalazkiem może dodatkowo zawierać leki z grupy steroidów, inhibitorów kalcyneuryny i/lub inhibitorów fosfodiesterazy 4. Kompozycja ta może stanowić również kombinację urolityny A i leku/leków o działaniu przeciwbakteryjnym, przeciwgrzybiczym lub przeciwwirusowym. Leki z grupy steroidów obejmują, lecz nie ograniczają się do propionianu klobetazolu, betametazonu, halobetazolu, dezoksymetazonu, halometazonu, acetonidu, hydrokortyzonu, mometazonu. Leki z grupy inhibitorów kalcyneuryny obejmują, lecz nie ograniczają się do takrolimusu, pimekrolimusu. Leki z grupy inhibitorów fosfodiesterazy 4 obejmują, lecz nie ograniczają się do crisaborolu. Leki o działaniu przeciwbakteryjnym obejmują, lecz nie ograniczają się do sulfacetamidu, bacytracyny, neomycyny, polimyksyny b, erytromycyny, mupirocyny, gentamycyny, chloramfenikolu. Leki o działaniu przeciwgrzybiczym obejmują, lecz nie ograniczają się do klotrimazolu, ekonazolu, mykonazolu, terbinafiny, flukonazolu, ketokonazolu amfotercyny. Leki o działaniu przeciwwirusowym obejmują, lecz nie ograniczają się do acyklowiru, pencyklowiru, walacyklowiru, famcyklowiru.

Opisano również urolitynę A lub jej farmaceutycznie dopuszczalne sole i estry, na przykład, 3-mrówczan urolityny A, 8-octan urolityny A, 3,8-dioctan urolityny A, 8-propionian urolityny A, 8-maślan urolityny A, 3,8-diizomaślan urolityny A, 3,8-disalicylan urolityny A, 8-benzoesan urolityny A, 8-cytrynian urolityny A, 8-stearynian urolityny A, 3,8-palmitynian urolityny A, 8-oleinian urolityny A, 3,8-didodekianian urolityny A, korzystne pochodne wybrane z grupy pochodnych diacylowanych, najkorzystniejszą pochodną urolityny A stanowi 3,8-dioctan urolityny A. Dla specjalisty w dziedzinie będzie jednak oczywistym, że również inne, ekwiwalentne sole mogą być stosowane z oczekiwaniem powodzenia jakie wykazano niniejszym dla konkretnych postaci urolityny A.

Kompozycja farmaceutyczna do zastosowania według wynalazku może być wygodnie podawana w postaci jednostek dawkowania i może być wytworzona dowolnymi sposobami dobrze znanymi w dziedzinie farmacji.

Zgodnie z niniejszym opisem, określenie „kompozycja farmaceutyczna” powinno oznaczać kompozycję obejmującą co najmniej jeden składnik aktywny i co najmniej jeden składnik, który nie jest składnikiem aktywnym (na przykład nie ograniczając do, wypełniacz czy barwnik), dzięki którym kompozycja jest odpowiednia do stosowania dla określonych, skutecznych odbiorców wśród ssaków (na przykład, bez ograniczania do, ludzi).

Przez określenie „składnik aktywny” jak zdefiniowano odnośnie określenia „kompozycji farmaceutycznej” należy rozumieć składnik kompozycji farmaceutycznej, który dostarcza pierwszorzędowej korzyści farmaceutycznej, w odróżnieniu do „składnika nieaktywnego”, który mógłby zasadniczo być rozpoznawany jako niedostarczający korzyści farmaceutycznej.

Dla specjalisty w dziedzinie będzie również zrozumiałe, że niektóre z opisanych związków mogą występować w postaci wolnej lub, gdy to odpowiednie, jako farmaceutycznie dopuszczalna pochodna lub ich prolek. Zgodnie z ujawnieniem farmaceutycznie dopuszczalna pochodna lub prolek obejmuje farmaceutycznie dopuszczalne sole, estry, sole takich estrów lub jakiegokolwiek inne związki addycyjne lub pochodne, które po podaniu potrzebnemu tego pacjentowi są w stanie dostarczyć, bezpośrednio lub pośrednio, związek jak opisany tutaj lub metabolit, lub jego resztę.

Określenie „farmaceutycznie dopuszczalna sól” odnosi się do tych soli, które są odpowiednie do stosowania w kontakcie z tkankami ludzkimi i niższych zwierząt bez nadmiernej toksyczności, podrażnienia, reakcji alergicznej i tym podobnych, i są współmierne z rozsądnym stosunkiem korzyść/ryzyko.

„Farmaceutycznie dopuszczalna sól” oznacza dowolną nietoksyczną sól lub sól estru związku, która, po podaniu przyjmującemu, jest w stanie dostarczyć, bezpośrednio lub pośrednio, związek lub działający hamująco metabolit lub jego resztę.

Określenie ‘prolek’ stosowane w opisie jest zdefiniowane jako substancja farmakologiczna, którą podaje się w nieaktywnej lub mniej aktywnej postaci. Po podaniu w organizmie pacjenta jest ona przekształcana w postać aktywną i skuteczną.

Postacie dawkowane do miejscowego lub przezskórnego podawania opisanego związku obejmują maści, pasty, kremy, lotion, żele, proszki, roztwory, spreje, lub plastry.

Dodatkowo, pod uwagę wzięto też stosowanie plastrów przezskórnych, które mają dodatkową zaletę zapewniania kontrolowanego dostarczania kompozycji do organizmu. Takie postacie dawkowania wytwarza się rozpuszczając lub dozując kompozycję w odpowiednim ośrodku. Środki polepszające absorpcję można także stosować dla zwiększania przenikania związku przez skórę. Szybkość można kontrolować stosując membranę regulującą szybkość lub dyspergując kompozycję w matrycy polimerowej lub żelu.

Opisane są również kompozycje farmaceutyczne, które obejmują, ale bez ograniczania do tego, kompozycje farmaceutyczne, zawierające co najmniej jeden związek i/albo jego dopuszczalną sól lub solwat (np., farmaceutycznie dopuszczalną sól lub solwat) jako składnik aktywny w połączeniu z co najmniej jednym nośnikiem lub substancją pomocniczą (np., farmaceutycznym nośnikiem lub substancją pomocniczą) i mogą być stosowane do leczenia stanów klinicznych wskazanych w niniejszym wynalazku. Stanowiąca składnik aktywny kompozycji do zastosowania według wynalazku, urolityna A lub jej farmaceutycznie dopuszczalna pochodna 3,8-dioctan urolityny A może być łączona z nośnikiem w płynną lub półstałą postać podczas wytwarzania użytkowej jednostki dawkowania. Nośnik farmaceutyczny musi być zdolny do jednorodnego mieszania się z wszystkimi składnikami kompozycji i musi być tolerowany przez indywidualnego odbiorcę. Jednakże, do kompozycji farmaceutycznej do zastosowania mogą być włączone, jeśli to pożądane oraz gdy składniki te są zdolne do jednorodnego mieszania się z innymi składnikami kompozycji, również i inne aktywne fizjologicznie składniki. Kompozycja farmaceutyczna do zastosowania może być wytworzona dowolnymi przydatnymi sposobami, zazwyczaj przez równomierne wymieszanie związku(ów) aktywnego(ych) z płynami lub drobno rozdrobnionym stałym nośnikiem, lub obydwoma, w pożądanych proporcjach, i wówczas, jeśli to konieczne, uformowania otrzymanej mieszaniny w pożądany kształt.

Kompozycja farmaceutyczna do zastosowania według wynalazku może występować w postaci płynnej lub półstałej.

Postać kompozycji farmaceutycznej do zastosowania zależna jest od postaci, w jakiej wytwarza się kompozycję.

Półstałe postacie wykonania kompozycji farmaceutycznej do zastosowania do podawania miejscowego według niniejszego wynalazku obejmują, ale bez ograniczania się do, maści, kremy, pasty, żele.

Płynne postacie wykonania kompozycji farmaceutycznej do zastosowania do podawania miejscowego według niniejszego wynalazki obejmują, ale bez ograniczania się do, toniki, balsamy, lotiony, spraye, pianki, roztwory, emulsje, wodne lub oleiste zawiesin.

Dawki oraz częstość dawkowania będą określone poprzez wykwalifikowanego specjalistę z dziedziny medycyny w zależności od właściwości poszczególnej kompozycji do stosowania miejscowego oraz rodzaju i stopnia zaawansowania zaburzenia dermatologicznego, które ma być leczone lub któremu chce się zapobiec. Ilość nanoszonej kompozycji farmaceutycznej będzie zależeć od czynników takich jak konkretny związek, zastosowanie dla którego jest przeznaczona kompozycja, drogi podawania, i kondycja leczonego pacjenta – wszystkie z tych parametrów dawkowania znajdują się w zakresie możliwym do określenia przez przeciętnych specjalistów w medycynie.

Należy również zauważyć, że opisane związki i farmaceutycznie dopuszczalne kompozycje farmaceutyczne do zastosowania można stosować w terapiach skojarzonych, to jest związki i farmaceutycznie dopuszczalne kompozycje farmaceutyczne do zastosowania można podawać równocześnie, przed lub po jednym lub większej liczbie innych pożądanych leczniczych lub medycznych zabiegów. Konkretnie połączenie terapii (leczenia lub zabiegów) do stosowania w reżimie skojarzonym uwzględni zgodność żądanego leczenia i/lub zabiegów i żądanego efektu terapeutycznego, jaki należy osiągnąć. Należy również zauważyć, że stosowane terapie mogą pozwolić na osiągnięcie żądanego efektu dla takiego samego zaburzenia (przykładowo, opisany związek można podawać równocześnie z innym

środkiem stosowanym do leczenia takiego samego zaburzenia), lub mogą pozwolić na osiągnięcie różnych efektów (np. zwalczanie wszelkich szkodliwych skutków). Stosowane tutaj dodatkowe środki terapeutyczne, które zazwyczaj podaje się w leczeniu lub profilaktyce konkretnej choroby lub stanu, są znane jako „odpowiednie dla tej leczonej choroby lub stanu”.

Ilość dodatkowego środka terapeutycznego obecnego w kompozycji farmaceutycznej do zastosowania według wynalazku będzie nie większa niż ilość, którą zwykle podawałoby się w kompozycji zawierającej ten środek terapeutyczny jako jedyny środek aktywny.

Ogólnie, związek opisany powyżej jest obecny w kompozycji farmaceutycznej do zastosowania według wynalazku w ilości od około 0,0001 procent wagowo do około 15 procent wagowo względem całkowitej masy kompozycji, korzystnie od około 0,01 procent wagowo do około 5 procent wagowo względem całkowitej masy kompozycji, najkorzystniej od około 0,1 procent wagowo do około 2 procent wagowo względem całkowitej masy kompozycji.

W celu leczenia stanów zapalnych skóry i błon śluzowych, kompozycja do stosowania miejscowego farmaceutyczna do zastosowania jest miejscowo nakładana bezpośrednio na dotknięty chorobą obszar w dowolny konwencjonalny sposób dobrze znany w stanie techniki, na przykład, przy użyciu zakraplacza lub patyczka aplikacyjnego, w postaci mgiełki przez aplikator aerozolowy, przez śródskórny lub przezskórny plaster lub przez proste rozprowadzenie mechaniczne kompozycji objętej wynalazkiem na dotkniętym chorobą obszarze.

Ogólnie, ilość kompozycji stosowana do miejscowego nakładania na dotknięty chorobą obszar mieści się w zakresie od około 0,0001 g/cm<sup>2</sup> obszaru powierzchni skóry do około 0,5 g/cm<sup>2</sup>, korzystnie 0,001 g/cm<sup>2</sup> do około 0,2 g/cm<sup>2</sup> obszaru powierzchni skóry. Zazwyczaj, polecana jest 0,005 do 0,1 g/cm<sup>2</sup> aplikacji dziennie przez okres trwania leczenia, podawana jeden lub więcej razy dziennie, pojedynczo lub dawkach wielokrotnych.

#### KRÓTKI OPIS FIGUR

**FIG. 1** przedstawia zmiany grubość ucha spowodowane wywołaniem stanu zapalnego (przez DNCB) a następnie podjęciem leczenia miejscowego z zastosowaniem urolityny w dawce 0,2 i 1,0% lub jej nośnika wazeliny białej. Pozytywną grupę kontrolną stanowiły szczury leczone kompozycją 1% hydrokortyzonu. Grupę kontrolną negatywną stanowiły szczury bez wywołania stanu zapalnego. Zastosowane symbole w porównaniach post-hoc oznaczają: # - Wazelina vs. Kontrola negatywna; † - 1% Hydrokortyzon vs. Kontrola negatywna; & - 0,2% Urolityna A vs. Kontrola negatywna; γ - 1,0% Urolityna A vs. Kontrola negatywna; χ - 1% Hydrokortyzon vs. Wazelina; \* - 0,2% Urolityna A vs. Wazelina; Φ - 0,2% Urolityna A vs. Wazelina; Ω - 1,0% Urolityna A vs. 1% Hydrokortyzon. Jeden, dwa lub trzy symbole oznaczają istotność porównań na poziomie odpowiednio p < 0,05, p < 0,01, p < 0,001.

**FIG. 2** przedstawia zmiany częstości odruchów drapania spowodowane wywołaniem stanu zapalnego (przez DNCB) a następnie podjęciem leczenia miejscowego z zastosowaniem urolityny w dawce 0,2 i 1,0% lub jej nośnika wazeliny białej. Pozytywną grupę kontrolną stanowiły szczury leczone kompozycją 1% hydrokortyzonu. Grupę kontrolną negatywną stanowiły szczury bez wywołania stanu zapalnego. Zastosowane symbole w porównaniach post-hoc oznaczają: # - Wazelina vs. Kontrola negatywna; † - 1% Hydrokortyzon vs. Kontrola negatywna; & - 0,2% Urolityna A vs. Kontrola negatywna; γ - 1,0% Urolityna A vs. Kontrola negatywna; χ - 1% Hydrokortyzon vs. Wazelina; \* - 0,2% Urolityna A vs. Wazelina; Φ - 0,2% Urolityna A vs. Wazelina; Ω - 1,0% Urolityna A vs. 1% Hydrokortyzon. Jeden, dwa lub trzy symbole oznaczają istotność porównań na poziomie odpowiednio p < 0,05, p < 0,01, p < 0,001.

**FIG. 3** przedstawia ogólną liczbę leukocytów [n/1 × 10<sup>9</sup>] oraz ich udział procentowy u szczurów negatywnej grupy kontrolnej (bez wywołania stanu zapalnego), właściwej grupy kontrolnej (z wywołanym atopowym zapaleniem skóry poddanych oddziaływaniu wazeliny), pozytywnej grupy kontrolnej (z wywołanym atopowym zapaleniem skóry poddanych oddziaływaniu 1% hydrokortyzonu) i grup szczurów z wywołanym atopowym zapaleniem skóry poddanych oddziaływaniu badanych związków aktywnych (0,2 i 1,0% urolityny A). Zastosowane symbole w porównaniach post-hoc oznaczają: # - Wazelina vs. Kontrola negatywna; † - 1% Hydrokortyzon vs. Kontrola negatywna; & - 0,2% Urolityna A vs. Kontrola negatywna; γ - 1,0% Urolityna A vs. Kontrola negatywna; \* - 0,2% Urolityna A vs. Wazelina; Φ - 0,2% Urolityna A vs. Wazelina. Jeden, dwa lub trzy symbole oznaczają istotność porównań na poziomie odpowiednio p < 0,05, p < 0,01, p < 0,001.

**FIG. 4** przedstawia ogólną liczbę monocytów [ $n/1 \times 10^9$ ] oraz ich udział procentowy u szczurów negatywnej grupy kontrolnej (bez wywołania stanu zapalnego), właściwej grupy kontrolnej (z wywołanym atopowym zapaleniem skóry poddanych oddziaływaniu wazeliny), pozytywnej grupy kontrolnej (z wywołanym atopowym zapaleniem skóry poddanych oddziaływaniu 1% hydrokortyzonu) i grup szczurów z wywołanym atopowym zapaleniem skóry poddanych oddziaływaniu badanych związków aktywnych (0,2 i 1,0% urolityny). Zastosowane symbole w porównaniach post-hoc oznaczają: # – Wazelina vs. Kontrola negatywna; † – 1% Hydrokortyzon vs. Kontrola negatywna; & – 0,2% Urolityna A vs. Kontrola negatywna;  $\gamma$  – 1,0% Urolityna A vs. Kontrola negatywna; \* – 0,2% Urolityna A vs. Wazelina;  $\Phi$  – 0,2% Urolityna A vs. Wazelina. Jeden, dwa lub trzy symbole oznaczają istotność porównań na poziomie odpowiednio  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ .

**FIG. 5** przedstawia ogólną liczbę neutrofilii [ $n/1 \times 10^9$ ] oraz ich udział procentowy u szczurów negatywnej grupy kontrolnej (bez wywołania stanu zapalnego), właściwej grupy kontrolnej (z wywołanym atopowym zapaleniem skóry poddanych oddziaływaniu wazeliny), pozytywnej grupy kontrolnej (z wywołanym atopowym zapaleniem skóry poddanych oddziaływaniu 1% hydrokortyzonu) i grup szczurów z wywołanym atopowym zapaleniem skóry poddanych oddziaływaniu badanych związków aktywnych (0,2 i 1,0% urolityny). Zastosowane symbole w porównaniach post-hoc oznaczają: # – Wazelina vs. Kontrola negatywna; † – 1% Hydrokortyzon vs. Kontrola negatywna; & – 0,2% Urolityna A vs. Kontrola negatywna;  $\gamma$  – 1,0% Urolityna A vs. Kontrola negatywna; \* – 0,2% Urolityna A vs. Wazelina;  $\Phi$  – 0,2% Urolityna A vs. Wazelina. Jeden, dwa lub trzy symbole oznaczają istotność porównań na poziomie odpowiednio  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ .

**FIG. 6** przedstawia ogólną liczbę limfocytów [ $n/1 \times 10^9$ ] oraz ich udział procentowy u szczurów negatywnej grupy kontrolnej (bez wywołania stanu zapalnego), właściwej grupy kontrolnej (z wywołanym atopowym zapaleniem skóry poddanych oddziaływaniu wazeliny), pozytywnej grupy kontrolnej (z wywołanym atopowym zapaleniem skóry poddanych oddziaływaniu 1% hydrokortyzonu) i grup szczurów z wywołanym atopowym zapaleniem skóry poddanych oddziaływaniu badanych związków aktywnych (0,2 i 1,0% urolityny). Zastosowane symbole w porównaniach post-hoc oznaczają: # – Wazelina vs. Kontrola negatywna; † – 1% Hydrokortyzon vs. Kontrola negatywna; & – 0,2% Urolityna A vs. Kontrola negatywna;  $\gamma$  – 1,0% Urolityna A vs. Kontrola negatywna; \* – 0,2% Urolityna A vs. Wazelina;  $\Phi$  – 0,2% Urolityna A vs. Wazelina. Jeden, dwa lub trzy symbole oznaczają istotność porównań na poziomie odpowiednio  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ .

**FIG. 7** Wykres przedstawiający wpływ urolityny A (UA), urolityny B (UB) oraz izo-urolityny A (iUA) na zewnątrzkomórkowy poziom białka S100A8/A9. Urolityny inkubowane były w 3 stężeniach (40, 10 oraz 1  $\mu\text{M}$ ) z neutrofilami wyizolowanymi z obwodowej krwi ludzkiej. Znamienność statystyczna: \*\* –  $p < 0,001$  wobec kontroli stymulowanej (test Dunnetta); # – znamienność statystyczna ( $p < 0,001$ ) wobec kontroli niestymulowanej; ST – kontrola stymulowana; NST – kontrola niestymulowana.

**FIG. 8** przedstawia histologię zmian skórnych szczurów w modelu atopowego zapalenia skóry – zmiany leczone kompozycją urolityny A. Niewielkiego stopnia hiperplazja naskórka, infiltracja komórek jednojądrzastych (komórek tucznych) i neutrofilii. Niewielki naciek komórek zapalnych wokół naczyń krwionośnych.

**FIG. 9** przedstawia histologię zmian skórnych szczurów w modelu atopowego zapalenia skóry – zmiany leczone wazeliną. Znaczna hiperplazja naskórka, hiperkeratoza naskórka, infiltracja komórek jednojądrzastych (komórek tucznych).

**FIG. 10** przedstawia histologię zmian skórnych szczurów w modelu atopowego zapalenia skóry – zmiany leczone wazeliną. Gąbczastość naskórka powstała na skutek rozdzielania niezmiennych keratynocytów przez wysięk gromadzący się między komórkami.

**FIG. 11** przedstawia prawidłowy obraz histologiczny skóry u szczura bez wywołania atopowego zapalenia skóry.

## METODYKA BADAWCZA

### *Ocena in vivo skuteczności urolityny A w leczeniu atopowego zapalenia skóry w modelu szczurzym*

#### Materiały i metody:

Model zwierzęcy, na którym została wykazana aktywność urolityny A można odnosić do wszelkich schorzeń skórnych o podłożu zapalnym. Podobnie jak ma to miejsce w przypadku wskazań do stosowania hydrokortyzonu, który w badaniu użyto jako kontrolę pozytywną.

Urolityna A została otrzymana na drodze syntezy wg Bialonska i wsp. (Bialonska et al., 2009) lub zakupiona w Sigma-Aldrich. Maść zawierająca urolitynę A została przygotowana poprzez wemulgowanie odważonej substancji w podłoże stałe (wazelina biała) przy użyciu unguatora.

Do badań użyto szczury szczepu Wistar w wieku 5–6 tygodni (w momencie rozpoczęcia doświadczenia) utrzymywane w standardowych warunkach ze swobodnym dostępem do paszy i wody. Zwierzęta podzielono na 5 grup, każda po 8 osobników. W celu przygotowania kompozycji, 2,4-Dinitrochlorobenzenu (DNCB), indukującej stan zapalny, DNCB rozpuszczano w 70% etanolu do końcowego stężenia 1,5% (w/v). Kompozycję leczniczą stanowiła maść przygotowana na bazie wazeliny białej z dodatkiem 0,2% lub 1,0 % urolityny A. Maść kontrolną stanowiła wazelina biała bez dodatku urolityny A.

Indukcja chronicznego atopowego zapalenia skóry polegała na miejscowym 9-krotnym naciśnięciu 60  $\mu$ l 1,5% 2, 4-dinitrochlorobenzenu (DNCB) na każdą (zewnątrzną i wewnętrzną) powierzchnię prawego ucha w okresie 3 tygodni (3-krotnie w ciągu tygodnia). Kontrolę negatywną stanowiło prawe ucho szczurów bez wywoływania stanu zapalnego.

Leczenie atopowego zapalenia skóry 0,2% lub 1,0% kompozycją urolityny oraz wazeliną białą (kontrola) lub 1,0% kompozycją hydrokortyzonu (kontrola pozytywna) rozpoczynano osiem dni po wywołaniu uczulenia – jeden dzień przed czwartą aplikacją DNCB. Maści z dodatkiem odpowiedniej dla grupy substancji leczniczej наносzono w całkowitej objętości około 20  $\mu$ l na każdą powierzchnię ucha jeden dzień przed oraz 6 godzin po każdej aplikacji DNCB (przez okres 3 tygodni). Negatywną grupę kontrolną stanowiły szczury bez wywołanego stanu zapalnego i traktowane wazeliną białą w schemacie analogicznym do kompozycji urolityny A lub hydrokortyzonu.

#### Ocena efektywności kompozycji:

Pomiar grubości ucha.

Grubość ucha oceniano przy zastosowaniu elektronicznej minisuwmiarki dzień przed wywołaniem zapalenia (dzień 0) a następnie w dniu 4 i 8 przed wdrożeniem leczenia oraz w 4, 8, 12, 16, 22 i 26 dniu terapii kompozycją urolityny A (odpowiednio w 12, 16, 20, 24, 28 i 32 dniu od wywołania stanu zapalnego).

Pomiar poziomu świądu

Pomiar poziomu świądu (mierzony odruchami drapania) oceniano jako całkowitą częstość odruchów drapania przez 10 minut bezpośrednio po naniesieniu DNCB w 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 i 32 dniu doświadczenia). Drapanie definiowano jako pojedynczy lub serię kilku odruchów drapania łapą skierowanego w miejsce naniesienia DNCB.

Morfologia krwi obwodowej

Próbki krwi o objętości 2 ml pobierano do strzykawek (zawierających heparynę jako antykoagulant) z serca w znieczuleniu ogólnym (izofluran) w 32 dniu doświadczenia. Badanie przeprowadzono z wykorzystaniem automatycznego analizatora hematologicznego DIATRON. Analiza krwi obwodowej obejmowała ocenę elementów morfotycznych krwi: erytrocytów, leukocytów i trombocytów oraz ustalenie liczby i procentowego udziału różnych typów leukocytów – WBC a także wartości wskaźników erytrocytarnych: stężenie hemoglobiny (HGB), wartość hematokrytu (HCT), średnią objętość krwinki czerwonej (MCV), średnią masę hemoglobiny w krwince (MCH) i średnie stężenie hemoglobiny w krwince (MCHC).

Ocena histologiczna

Ocenę histologiczną przeprowadzano na skórze uszu szczurów z wywołanym stanem zapalnym i na skórze uszu szczurów z grupy kontrolnej pobranej w 32 dniu doświadczenia. Ocenę przeprowadzono na 20  $\mu$ m skrawkach skóry barwionych standardowo hematoksyliną/eozyną (H&E) dla oceny nacieku komórek zapalnych, natomiast błękitem toluidyny dla oceny obecności komórek tucznych.

Analiza statystyczna

Otrzymane wyniki doświadczeń analizowane były za pomocą programu Statistica 7.1 (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) i przedstawiane jako wartości średnie  $\pm$  SE. Istotność statystyczna ustalona została na poziomie  $P \leq 0,05$ . Wyniki o ustalonym rozkładzie normalnym w teście D'Agostina i Pearsona opracowywano przy użyciu dwu- lub trójczynnkowej analizy wariancji (ANOVA). Parametryczna analiza post-hoc dla poszczególnych punktów czasowych przeprowadzona była za pomocą testu Bonferroni.

Wyniki:

*Zmiany miejscowe (obrzęk i przekrwienie ucha) i systemowe (zmiany morfologii krwi) zmiany zapalne wywołane DNCB:*

Zmiany miejscowe

Analiza z wykorzystaniem 2-czynnikowej analizy wariancji (ANOVA) wykazała, że 8-dniowy okres sensytyzacji skóry ucha przy zastosowaniu 1,5% DNCB spowodował powstanie stanu zapalnego przejawiającego się istotnym [ $p < 0,001$  – efekt główny DNCB] i gwałtownym [ $p < 0,001$  – interakcja DNCB x Czas] obrzękiem oraz zaczerwienieniem małżowiny usznej (FIG. 1).

Drapanie

W ocenie behawioralnej stwierdzono wystąpienie odruchów drapania w odpowiedzi na stan zapalny wywołany DNCB od 4 dnia wywołania stanu zapalnego ( $p < 0,05$ ). 2-czynnikowa ANOVA przeprowadzona dla całego okresu indukcji zapalenia wykazała, że efekt ten był podobny we wszystkich grupach przed rozpoczęciem procesu leczenia (do 8 dnia) zarówno w odniesieniu do intensywności jak i zwiększania częstości odruchów w badanym przedziale czasowym okresu sensytyzacji.

*Wpływ miejscowej terapii z wykorzystaniem urolityny-A na zmiany zapalne wywołane DNCB:*

Hamowanie zmian miejscowych

Obrzęk ucha, zastosowany, jako parametr atopowego zapalenia skóry ulegał zmniejszeniu po wprowadzeniu miejscowej terapii zarówno po zastosowaniu urolityny A [ $p < 0,001$ ] jak i hydrokortyzonu [ $p < 0,01$ ] (FIG. 1), przy czym analiza z wykorzystaniem 2-czynnikowej ANOVA wykazuje iż efekt ten był silniejszy w przypadku zastosowania urolityny [F(1,28) = 6,16;  $p < 0,05$ ], Istotny efekt stwierdzono również dla zastosowanej dawki urolityny, która była efektywniejsza przy stężeniu 1% [ $p < 0,05$  – porównanie dawek urolityny pomiędzy sobą]. Analiza wariancji przeprowadzona oddzielnie dla każdej dawki urolityny wykazała również, że istotnie większy efekt przeciwzapalny w porównaniu do hydrokortyzonu uzyskano jedynie przy stężeniu 1% [ $p < 0,05$  – Urolityna A 1% vs. Hydrokortyzon 1%] przy braku istotnie większej efektywności przy dawce 0,2% [Urolityna A 0,2% vs. Hydrokortyzon 1%].

Istotny efekt interakcji: badany związek przeciwzapalny (urolityna A vs. hydrokortyzon) x czas wskazuje na odmienny profil czasowy oddziaływania przeciwzapalnego badanych kompozycji, charakteryzujący się większą efektywnością terapeutyczną hydrokortyzonu w początkowym okresie terapii (do 12 dnia) w porównaniu do urolityny, która zarówno przy dawce 0,2 jak i 1% była efektywniejsza w późniejszym okresie podjętego leczenia [ $p < 0,01$ ] (od 12 do 28 leczenia). Stopniowe zmniejszanie się obrzęku stwierdzono również po zastosowaniu wazeliny, jako nośnika substancji aktywnych [ $p < 0,01$  – efekt główny czasu), jednak efekt ten był istotnie słabszy w porównaniu do zastosowanych substancji czynnych.

Skuteczność przeciwświądowa (Drapanie)

W ocenie behawioralnej stwierdzono zmniejszanie częstości drapania po zastosowaniu zarówno urolityny A [ $p < 0,001$ ] jak i hydrokortyzonu [ $p < 0,01$ ], przy czym efekt ten był silniejszy w odniesieniu do urolityny [ $p < 0,05$  – efekt] (FIG. 2). Większy efekt hamowania odruchów drapania przez urolitynę determinowany jest zastosowaniem odpowiedniej dawki urolityny, która była efektywniejsza przy stężeniu 1% [ $p < 0,05$  – porównanie dawek urolityny pomiędzy sobą]. Analiza wariancji przeprowadzona oddzielnie dla każdej dawki urolityny wykazała również, że istotnie większy efekt hamowania odruchów drapania w porównaniu do hydrokortyzonu uzyskano jedynie przy stężeniu 1% [ $p < 0,05$  – Urolityna A 1% vs. Hydrokortyzon 1%] przy braku istotnie większej efektywności przy dawce 0,2% [ $p = 0,39$ ] – Urolityna A 0,2% vs. Hydrokortyzon 1%]. Brak istotności efektu interakcji dotyczącego zmian częstości odruchów drapania w badanym przedziale czasowym w zależności od badanej kompozycji przeciwzapalnej (interakcja: urolityna A vs. hydrokortyzon x czas) wskazuje, że w przeciwieństwie do zwiększonej efektywności przeciwobrzękowej hydrokortyzonu w początkowym okresie terapii (do 12 dnia) w porównaniu do urolityny, efektu takiego nie stwierdzono w odniesieniu do hamowania odruchów drapania. Stopniowe zmniejszanie się odruchów drapania stwierdzono również po zastosowaniu wazeliny, jako nośnika substancji aktywnych [ $p < 0,01$  – efekt główny czasu), jednak efekt ten był istotnie słabszy w porównaniu do zastosowanych substancji czynnych.

*Zmiany w morfologii krwi wywołane atopowym zapaleniem skóry i leczeniem kompozycjami przeciwzapalnymi:*

Układ białokrwikowy

Wyższy poziom leukocytów u szczurów z grupy kontrolnej, poddanych działaniu DNCB, spowodowany był głównie wzrostem ogólnej liczby monocytów (z przekroczeniem norm przewidzianych dla szczura) oraz neutrofilii (z zachowaniem norm przewidzianych dla szczura), a w konsekwencji wzrostem ich udziału procentowego w ogólnym parametrze WBC. Grupa szczurów z wywołanym stanem zapalnym i poddanych działaniu wazeliny białej jak nośnika urolityny A charakteryzowała się również ogólnym wzrostem limfocytów w całkowitej puli leukocytów, jednak z uwagi na wzrost liczby monocytów i neutrofilii, ich udział procentowy był niższy niż u szczurów z grupy kontrolnej. Podjęcie leczenia z zastosowaniem 1% hydrokortyzonu jako kontroli pozytywnej spowodowało istotne obniżenie poziomu WBC ( $P < 0,05$ ).

Obniżenie poziomu WBC uzyskano również przy zastosowaniu badanej kompozycji urolityny A, który przy stężeniu substancji aktywnej na poziomie 0,2% obniżał wartości WBC na poziomie podobnym do 1% hydrokortyzonu [ $p < 0,05$ ], natomiast przy stężeniu 1% na poziomie  $p < 0,01$ . Wyższy poziom istotności efektu 1% urolityny nie skutkował jednak istotnie większym efektem hamowania wzrostu WBC przez tę kompozycję w porównaniu do 1% hydrokortyzonu. Należy zaznaczyć, że hamowanie wzrostu poziomu WBC zarówno przez 1% hydrokortyzon jak i badana kompozycja urolityny A w obu zastosowanych stężeniach, tj. 0,2 oraz 1% nie było w pełni skuteczne. Finalne wartości WBC pozostawały na wyższym poziomie w porównaniu do grup szczurów kontroli negatywnej (bez wywołania atopowego zapalenia skóry).

Jak wspomniano powyżej, wzrost poziomu WBC indukowanego atopowym zapaleniem skóry warunkowany było wzrostem populacji monocytów, neutrofilii i limfocytów. Hamowanie tego procesu przez hydrokortyzon odbywało się jednak tylko poprzez obniżenie populacji monocytów i neutrofilii, natomiast z uwagi na dużą zmienność poziomu limfocytów w grupie leczonej tą kontrolną kompozycją, nie odnotowano istotnych różnic ich poziomu w porównaniu do grupy kontrolnej poddanej oddziaływaniu wazeliny. W porównaniu z kompozycją 1% hydrokortyzonu zastosowanie urolityny A w obu stężeniach hamowało istotnie wzrost poziomu wszystkich trzech populacji leukocytów.

Układ erytrocytarny.

W ocenie parametrów czerwonekrwińcowych stwierdzono obniżenie poziomu zawartości hemoglobiny w erytrocytach (MCH i MCHC) w grupie szczurów z wywołanym atopowym zapaleniem skóry i poddanych leczeniu kompozycją 1% hydrokortyzonu [ $p < 0,05$ ]. Efektu takiego nie obserwowano jednak w grupach z wywołanym atopowym zapaleniem skóry i leczonych zarówno kompozycją urolityny A w dwu zastosowanych stężeniach 0,2 oraz 1,0% oraz grupie kontrolnej poddanej oddziaływaniu jedynie wazeliny. Świadczy to o tym, że obniżenie poziomu hematokrytu w pierwszej z omawianych grup wywołane było bezpośrednim oddziaływaniem hydrokortyzonu a nie efektem atopowego zapalenia skóry.

Grupa szczurów leczonych kompozycją 1% hydrokortyzonu charakteryzowała się również obniżeniem poziomu parametru RDW [ $p < 0,05$ ], czego nie obserwowano w pozostałych grupach badawczych, a co w konsekwencji można tłumaczyć oddziaływaniem hydrokortyzonu.

Obserwowane zmiany w poziomie hematokrytu i RDW mieściły się w granicach wartości fizjologicznych u szczura. Należy jednak zaznaczyć, że chociaż pojedynczo wskaźniki RDW-% i fl nie mają znaczenia klinicznego to przy współwystępującym obniżeniu zawartości hemoglobiny w erytrocytach i zachowanych prawidłowych wartościach RBC można stwierdzić tendencję do anemii niedobarwliwej wywołanej długotrwałym oddziaływaniem hydrokortyzonu.

W odniesieniu do pozostałych wartości parametrów układu erytrocytarnego, tj. RBC, HGB i HCT, MCV nie obserwowano zmian wywołanych atopowym stanem zapalnym i oddziaływaniem zarówno hydrokortyzonu jak i urolityny.

Układ płytkowy

W ocenie parametrów czerwonekrwińcowych stwierdzono wzrost liczby trombocytów (PLT –  $1 \times 10^9$ ) oraz trombokrytu (PCT%) w grupie szczurów z wywołanym atopowym zapaleniem skóry, przy czym wzrost ten był nieznacznie wyższy i osiągał istotnie wyższe wartości w porównaniu do negatywnej grupy kontrolnej [ $p < 0,05$ ] jedynie u szczurów poddanych leczeniu 1% hydrokortyzonem (PLT) oraz w przypadku parametru PCT% u szczurów poddanych oddziaływaniu wazeliny [ $p < 0,05$ ] lub 1% hydrokortyzonu [ $p < 0,01$ ]. Inne parametry układu płytkowego, tj. MPV (fl) i PDW (fl) oraz PDWcv (%) nie podlegały

zmianom zarówno w wyniku wywołania atopowego zapalenia skóry jak i leczenia podjętego z zastosowaniem hydrokortyzonu lub urolityny.

Obserwowane zmiany w poziomie liczby trombocytów (PLT –  $1 \times 10^9$ ) oraz trombokrytu (PCT%) mieściły się w granicach wartości fizjologicznych u szczurów.

#### **Wpływ urolityny A na poziom S100A8/A9**

W celu porównawczego zbadania aktywności biologicznej urolityn, związki te otrzymano na drodze syntezy chemicznej, a następnie zbadano ich aktywność wobec uwalniania kalprotektyny przez stymulowane neutrofile. Krew obwodowa została pobrana od zdrowych dawców (w wieku 20–35 lat) w Regionalnym Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Warszawie. Badanie prowadzono zgodnie z założeniami Deklaracji Helsińskiej. Dawcy byli niepalący i nie przyjmowali żadnych leków. Neutrofile wyizolowano z użyciem standardowej metody (Piwowarski et al., 2014a). Neutrofile następnie zawieszono w HBSS. Do 440  $\mu$ l zawiesiny komórek ( $3 \times 10^5$  kom/ml) dodano 50  $\mu$ l urolityny A, urolityny B lub izourolityny A w odpowiednim stężeniu (aby uzyskać finalne stężenia 40, 10 i 1  $\mu$ M) oraz 10  $\mu$ l roztworu LPS (finalne stężenie 10 ng/ml). Komórki inkubowano w 37°C przez 30 min, następnie zwirowano w 4°C, 400 rcf przez 10 min. Eksperyment przeprowadzono na próbkach krwi pobranych od 4 różnych dawców w podwójnych powtórzeniach. Wpływ urolityn na wytwarzanie S100A8/A9 został określony przy użyciu metody immunochemicznej ELISA (R&D Systems).

#### **Wyniki:**

Urolityna A jako jedyna spośród badanych związków należących do grupy urolityn inkubowana z ludzkimi neutrofilami powodowała znaczące zmniejszenie zewnątrzkomórkowego poziomu białka S100A8/A9 (kalprotektyny). Wykazana aktywność była zależna od stężenia. Należy również podkreślić, że urolityna A jest do tej pory jedyną substancją, dla której stwierdzono właściwości obniżające zewnątrzkomórkowy poziom S100A8/A9.

*Wpływ miejscowej terapii z wykorzystaniem urolityny A na zmiany zapalne wywołane chorobami skóry o podłożu zapalnym, w szczególności atopowym zapaleniem skóry i łuszczycą.*

Kompozycję leczniczą stanowiła maść przygotowana na bazie wazeliny białej z dodatkiem 1,0% urolityny A. Maść kontrolną stanowiła wazelina biała bez dodatku urolityny A. Na umytą i wysuszoną skórę ochotnicy samodzielnie наносили kompozycję 1,0% urolityny A oraz jako kontrolę sam nośnik – wazelinę białą, w dawce 20 mg maści na powierzchnię 4 cm<sup>2</sup> codziennie, 1 raz dziennie przez okres dwóch tygodni.

W przeprowadzonym badaniu pod uwagę brano następujące parametry: odczucie dyskomfortu po naniesieniu kompozycji na skórę, łatwość aplikacji, odbarwienie skóry w miejscu nanoszenia kompozycji, zaczerwienienie skóry w miejscu nanoszenia kompozycji stopień wysuszenia traktowanego obszaru skóry, odczucie szczypania, pieczenia, swędzenia oraz innego rodzaju dyskomfortu. Osoby biorące udział w badaniu określały swój poziom zadowolenia/niezadowolenia w 10 stopniowej skali, przy czym 0 oznaczało niezadowolenie a 10 zadowolenie ze stosowania kompozycji farmaceutycznej będącej przedmiotem niniejszego wynalazku. Wykazano, że stosowanie kompozycji zawierającej urolitynę A nie powodowało żadnych działań niepożądanych, w odróżnieniu do działań niepożądanych występujących po stosowaniu hydrokortyzonu.

#### **Literatura niepatentowa:**

D'Amico, F., Granata, M., Skarmoutsou, E., Trovato, C., Lovero, G., Gangemi, P., Longo, V., Pettinato, M., Mazzarino, M.C., 2018. Biological therapy downregulates the heterodimer S100A8/A9 (calprotectin) expression in psoriatic patients. *Inflamm Res* 67, 609–616.

Furue, K., Ito, T., Tsuji, G., Kadono, T., Nakahara, T., Furue, M., 2018. Autoimmunity and autoimmune co-morbidities in psoriasis. *Immunology* 154, 21–27.

Liu, C.F., Li, X.L., Zhang, Z.L., Qiu, L., Ding, S.X., Xue, J.X., Zhao, G.P., Li, J., 2018. Antiaging Effects Of Urolithin A On Replicative Senescent Human Skin Fibroblasts. *Rejuvenation Res*.

Papier, A., Strowd, L.C., 2018. Atopic dermatitis: a review of topical nonsteroid therapy. *Drugs Context* 7, 212521.

Tomas-Barberan, F.A., Selma, M.V., Espin, J.C., 2018. Polyphenols' Gut Microbiota Metabolites: Bioactives or Biomarkers? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66, 3593–3594.

- Yadav, K., Singh, D., Singh, M.R., 2018. Protein biomarker for psoriasis: A systematic review on their role in the pathomechanism, diagnosis, potential targets and treatment of psoriasis. *Int J Biol Macromol* 118, 1796–1810.
- Tomas-Barberan, F.A., Gonzalez-Sarrias, A., Garcia-Villalba, R., Nunez-Sanchez, M.A., Selma, M.V., Garcia-Conesa, M.T., Espin, J.C., 2017. Urolithins, the rescue of "old" metabolites to understand a "new" concept: Metabotypes as a nexus among phenolic metabolism, microbiota dysbiosis, and host health status. *Mol Nutr Food Res* 61.
- Deng, Y., Chang, C., Lu, Q., 2016. The Inflammatory Response in Psoriasis: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol* 50, 377–389.
- Eichenfield, L.F.M., Friedlander, S.F.M., Simpson, E.L.M.M., Irvine, A.D.M., 2016. Assessing the New and Emerging Treatments for Atopic Dermatitis. *Semin Cutan Med Surg* 35, S92–96.
- Piwowski, J.P., Granica, S., Stefańska, J., Kiss, A.K., 2016. Differences in Metabolism of Ellagitannins by Human Gut Microbiota ex Vivo Cultures. *J Nat Prod* 79, 3022–3030.
- Pruenster, M., Vogl, T., Roth, J., Sperandio, M., 2016. S100A8/A9: From basic science to clinical application. *Pharmacol Ther*.
- Tomas-Barberan, F.A., Gonzalez-Sarrias, A., Garcia-Villalba, R., Nunez-Sanchez, M.A., Selma, M.V., Garcia-Conesa, M.T., Espin, J.C., 2016. Urolithins, the rescue of "old" metabolites to understand a "new" concept: metabotypes as a nexus between phenolic metabolism, microbiota dysbiosis and host health status. *Mol Nutr Food Res*.
- Weidinger, S., Novak, N., 2016. Atopic dermatitis. *Lancet* 387, 1109–1122.
- D'Haens, G., Sandborn, W.J., Colombel, J.F., Rutgeerts, P., Brown, K., Barkay, H., Sakov, A., Haviv, A., Feagan, B.G., Laquinimod for Crohn's Disease, I., 2015. A phase II study of laquinimod in Crohn's disease. *Gut* 64, 1227–1235.
- Piwowski, J.P., Kiss, A.K., 2015. Contribution of C-glucosidic ellagitannins to *Lythrum salicaria*L. influence on pro-inflammatory functions of human neutrophils. *J Nat Med* 69, 100–110.
- Piwowski, J.P., Kiss, A.K., Granica, S., Moeslinger, T., 2015. Urolithins, gut microbiota-derived metabolites of ellagitannins, inhibit LPS-induced inflammation in RAW 264.7 murine macrophages. *Mol Nutr Food Res* 59, 2168–2177.
- Tuohy, K., Del Rio, D., 2015. Diet-Microbe Interactions in the Gut. Effects on Human Health and Disease. Elsevier.
- Jin, S., Park, C.O., Shin, J.U., Noh, J.Y., Lee, Y.S., Lee, N.R., Kim, H.R., Noh, S., Lee, Y., Lee, J.H., Lee, K.H., 2014. DAMP molecules S100A9 and S100A8 activated by IL-17A and house-dust mites are increased in atopic dermatitis. *Exp Dermatol* 23, 938–941.
- Piwowski, J.P., Granica, S., Kiss, A.K., 2014a. Influence of gut microbiota-derived ellagitannins' metabolites urolithins on pro-inflammatory activities of human neutrophils. *Planta Med* 80, 887–895.
- Piwowski, J.P., Granica, S., Zwierzyńska, M., Stefańska, J., Schopohl, P., Melzig, M.F., Kiss, A.K., 2014b. Role of human gut microbiota metabolism in the anti-inflammatory effect of traditionally used ellagitannin-rich plant materials. *J Ethnopharmacol* 155, 801–809.
- Colombo, E., Sangiovanni, E., Dell'agli, M., 2013. A review on the anti-inflammatory activity of pomegranate in the gastrointestinal tract. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM* 2013, 247145.
- D'Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., Scott, T., 2013. UV radiation and the skin. *Int J Mol Sci* 14, 12222–12248.
- Espin, J.C., Larrosa, M., Garcia-Conesa, M.T., Tomas-Barberan, F., 2013. Biological significance of urolithins, the gut microbial ellagic Acid-derived metabolites: the evidence so far. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM* 2013, 270418.
- Haiser, H.J., Tumbaugh, P.J., 2013. Developing a metagenomic view of xenobiotic metabolism. *Pharmacological research* 69, 21–31.

Schonthaler, H.B., Guinea-Viniegra, J., Wculek, S.K., Ruppen, F., Ximenez-Embun, P., Guio-Carrion, A., Navarro, R., Hogg, N., Ashman, K., Wagner, E.F., 2013. S100A8-S100A9 protein complex mediates psoriasis by regulating the expression of complement factor C3. *Immunity* 39, 1171–1181.

Bengtsson, A.A., Sturfeit, G., Lood, C., Ronnblom, L., van Vollenhoven, R.F., Axelsson, B., Sparre, B., Tuveesson, H., Ohman, M.W., Leanderson, T., 2012. Pharmacokinetics, tolerability, and preliminary efficacy of paquinimod (ABR-215757), a new quinoline-3-carboxamide derivative: studies in lupus-prone mice and a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, repeat-dose, dose-ranging study in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 64, 1579–1588.

Comi, G., Jeffery, D., Kappos, L., Montalban, X., Boyko, A., Rocca, M.A., Filippi, M., Group, A.S., 2012. Placebo-controlled trial of oral laquinimod for multiple sclerosis. *N Engl J Med* 366, 1000–1009.

Ishimoto, H., Shibata, M., Myojin, Y., Ito, H., Sugimoto, Y., Tai, A., Hatano, T., 2011. In vivo anti-inflammatory and antioxidant properties of ellagitannin metabolite urolithin A. *Bioorg Med Chem Lett* 21, 5901–5904.

Larrosa, M., Garcia-Conesa, M.T., Espin, J.C., Tomas-Barberan, F.A., 2010a. Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. *Molecular aspects of medicine* 31, 513–539.

Larrosa, M., Gonzalez-Sarrias, A., Yanez-Gascon, M. J., Selma, M.V., Azorin-Ortuno, M., Toti, S., Tomas-Barberan, F., Dolara, P., Espin, J.C., 2010b. Anti-inflammatory properties of a pomegranate extract and its metabolite urolithin-A in a colitis rat model and the effect of colon inflammation on phenolic metabolism. *J Nutr Biochem* 21, 717–725.

Bialonska, D., Kasimsetty, S.G., Khan, S.I., Ferreira, D., 2009. Urolithins, intestinal microbial metabolites of Pomegranate ellagitannins, exhibit potent antioxidant activity in a cell-based assay. *J Agric Food Chem* 57, 10181–10186.

Bjork, P., Bjork, A., Vogl, T., Stenstrom, M., Liberg, D., Olsson, A., Roth, J., Ivars, F., Leanderson, T., 2009. Identification of human S100A9 as a novel target for treatment of autoimmune disease via binding to quinoline-3-carboxamides. *PLoS Biol* 7, e97.

Odhiambo, J.A., Williams, H.C., Clayton, T.O., Robertson, C.F., Asher, M.I., Group, I.P.T.S., 2009. Global variations in prevalence of eczema symptoms in children from ISAAC Phase Three. *J Allergy Clin Immunol* 124, 1251–1258 e1223.

Breneman, D., Fleischer, A.B., Jr., Abramovits, W., Zeichner, J., Gold, M.H., Kirsner, R.S., Shull, T.F., Crowe, A.W., Jaracz, E., Hanifin, J.M., Tacrolimus Ointment Study, G., 2008. Intermittent therapy for flare prevention and long-term disease control in stabilized atopic dermatitis: a randomized comparison of 3-times-weekly applications of tacrolimus ointment versus vehicle. *J Am Acad Dermatol* 58, 990–999.

Berth-Jones, J., Damstra, R.J., Golsch, S., Livden, J.K., Van Hootehem, O., Allegra, F., Parker, C.A., Multinational Study, G., 2003. Twice weekly fluticasone propionate added to emollient maintenance treatment to reduce risk of relapse in atopic dermatitis: randomised, double blind, parallel group study. *BMJ* 326, 1367.

## Zastrzeżenia patentowe

1. Kompozycja farmaceutyczna zawierająca jedną lub więcej typowych substancji pomocniczych oraz składnik aktywny **znamienna tym**, że jako składnik aktywny zawiera urolitynę A lub jej farmaceutycznie dopuszczalną pochodną, którą stanowi 3,8-dioctan urolityny A, do zastosowania w leczeniu, hamowaniu i zapobieganiu chorobom skóry i błon śluzowych o podłożu zapalnym, przy czym kompozycja jest przeznaczona do zewnętrznego podawania miejscowego.
2. Kompozycja farmaceutyczna do zastosowania według zastrz. 1, **znamienna tym**, że jest stosowana w leczeniu, hamowaniu i zapobieganiu chorobom skóry i błon śluzowych o zwiększonym poziomie kalprotektyny dla obniżenia poziomu kalprotektyny.
3. Kompozycja farmaceutyczna do zastosowania według zastrz. 1–2, **znamienna tym**, że składnik aktywny jest obecny w ilości od około 0,0001 procent wagowo do około 15 procent wagowo względem całkowitej masy kompozycji, korzystnie od około 0,01 procent wagowo do około

- 5 procent wagowo względem całkowitej masy kompozycji, najkorzystniej od około 0,1 procent wagowo do około 2 procent wagowo względem całkowitej masy kompozycji.
4. Kompozycja farmaceutyczna do zastosowania według zastrz. 1–3, **znamienna tym**, że dodatkowo zawiera co najmniej jeden lek wybrany z grupy steroidów, inhibitorów kalcyneuryny, leków o działaniu przeciwbakteryjnym, przeciwgrzybiczym lub przeciwwirusowym, korzystnie wybrany z grupy steroidów lub inhibitorów kalcyneuryny, najkorzystniej lek stanowi inhibitor kalcyneuryny.
  5. Kompozycja farmaceutyczna do zastosowania według zastrz. 1–4, **znamienna tym**, że urolityna A jest jedynym składnikiem aktywnym obecnym w kompozycji.
  6. Kompozycja farmaceutyczna do zastosowania według zastrz. 1–5, **znamienna tym**, że co najmniej jedna farmaceutycznie dopuszczalna substancja pomocnicza jest wybrana spośród nośnika i/albo zarobki i/albo rozcieńczalnika oraz ich kombinacji.
  7. Kompozycja farmaceutyczna do zastosowania według zastrz. 1–6, **znamienna tym**, że farmaceutycznie dopuszczalną substancją pomocniczą jest jeden lub więcej spośród środków ochronnych, adsorbentów, środków łagodzących, środków zmiękczających, środków konserwujących, antyoksydantów, środków nawilżających, środków buforujących i środków solubilizujących.
  8. Kompozycja farmaceutyczna do zastosowania według zastrz. 1–7, **znamienna tym**, że jest przeznaczona do podawania miejscowego na dotknięty chorobą obszar w zakresie od około 0,0001 g/cm<sup>2</sup> obszaru powierzchni skóry do około 0,5 g/cm<sup>2</sup>, korzystnie 0,001 g/cm<sup>2</sup> do około 0,2 g/cm<sup>2</sup> obszaru powierzchni skóry.
  9. Kompozycja farmaceutyczna do zastosowania według zastrz. 1–8, **znamienna tym**, że jest w postaci płynnej, korzystnie w postaci toniku, balsamu, lotionu, pianki, najkorzystniej w postaci toniku.
  10. Kompozycja farmaceutyczna do zastosowania według zastrz. 1–9, **znamienna tym**, że kompozycja jest w postaci półstałej, korzystnie w postaci maści, kremu, pasty, żelu, korzystnie w postaci maści lub kremu, najkorzystniej w postaci maści.
  11. Kompozycja farmaceutyczna do zastosowania według zastrz. 9–10, **znamienna tym**, że kompozycja jest przeznaczona do nanoszenia na dotknięty chorobą obszar manualnie, korzystnie przy użyciu zakraplacza, patyczka aplikacyjnego albo aplikatora aerozolowego.
  12. Kompozycja farmaceutyczna do zastosowania według zastrz. 1–8, **znamienna tym**, że kompozycja jest w postaci transdermalnego systemu terapeutycznego takiego jak plaster śródskórny albo plaster przezskórny.
  13. Kompozycja farmaceutyczna do zastosowania według zastrz. 1–12, **znamienna tym**, że choroby skóry i błon śluzowych wybiera się z grupy składającej się ze stanów zapalnych skóry, stanów zapalnych naczyń, tocznia rumieniowatego, zapalenia skórno-mięśniowego, sklerodermii, stwardnienia rozsianego, olbrzymiokomórkowego zapalenia tętnic, łuszczycy, atopowego zapalenia skóry, łojotokowego zapalenia skóry, kontaktowego zapalenia skóry, pokrzywki, trądziku różowatego, opryszczkowego zapalenia skóry, liszaja płaskiego, mnogich ropni pach, łupieżu różowego Giberta, potówek, aft, pieluszkowego zapalenia skóry, trądziku młodzieńczego, wyprysku kontaktowego niealergicznego, zapalenia tkanki tłuszczowej, zapalenia tkanki łącznej- cellulitis.
  14. Kompozycja farmaceutyczna do zastosowania według zastrz. 13, **znamienna tym**, że chorobą skóry i błon śluzowych jest łuszczycyca.
  15. Kompozycja farmaceutyczna do zastosowania według zastrz. 14, **znamienna tym**, że jest zastosowana dla obniżenia poziomu kalprolektyny.
  16. Kompozycja farmaceutyczna do zastosowania według zastrz. 13, **znamienna tym**, że chorobą skóry i błon śluzowych o podłożu zapalnym jest atopowe zapalenie skóry.
  17. Kompozycja farmaceutyczna do zastosowania według zastrz. 16, **znamienna tym**, że jest stosowana dla obniżenia poziomu kalprolektyny.
  18. Kompozycja farmaceutyczna do zastosowania według zastrz. 1–17, **znamienna tym**, że jedynym składnikiem aktywnym stosowanym dla obniżenia poziomu kalprolektyny w stanach i chorobach skóry i błon śluzowych o podłożu zapalnym jest urolityna A stosowana w chorobach skóry i błon śluzowych o podłożu zapalnym wybranych z grupy składającej się ze stanów zapalnych skóry, stanów zapalnych naczyń, tocznia rumieniowatego, zapalenia skórno-mięśniowego, sklerodermii, stwardnienia rozsianego, olbrzymiokomórkowego zapalenia tętnic,

- łuszczycy, atopowego zapalenia skóry, łojotokowego zapalenia skóry, kontaktowego zapalenia skóry, pokrzywki, trądziku różowatego, opryszczkowego zapalenia skóry, liszaja płaskiego, mnogich ropni pach, łupieżu różowego Giberta, potówek, aft, pieluszkowego zapalenia skóry, trądziku młodzieńczego, wyprysku kontaktowego niealergicznego, zapalenia tkanki tłuszczowej, zapalenia tkanki łącznej- cellulitis.
19. Kompozycja farmaceutyczna do zastosowania według zastrz. 18, **znamienna tym**, że jedynym składnikiem aktywnym stosowanym dla obniżenia poziomu kalprolektyny w stanach i chorobach skóry i błon śluzowych o podłożu zapalnym jest urolityna A stosowana w atopowym zapaleniu skóry.
  20. Kompozycja farmaceutyczna do zastosowania według zastrz. 19, **znamienna tym**, że jedynym składnikiem aktywnym stosowanym dla obniżenia poziomu kalprolektyny w stanach i chorobach skóry i błon śluzowych o podłożu zapalnym jest urolityna A stosowana w łuszczycy.

Rysunki

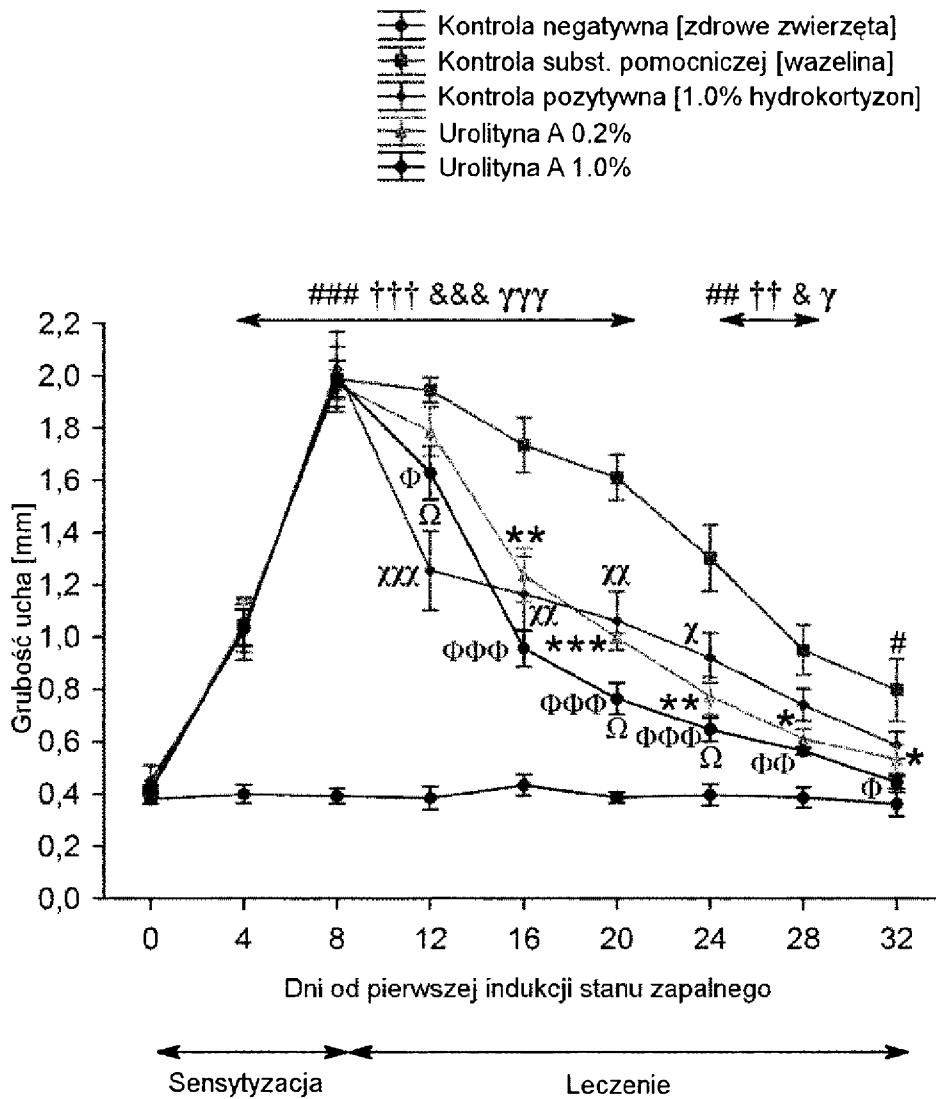


FIG. 1



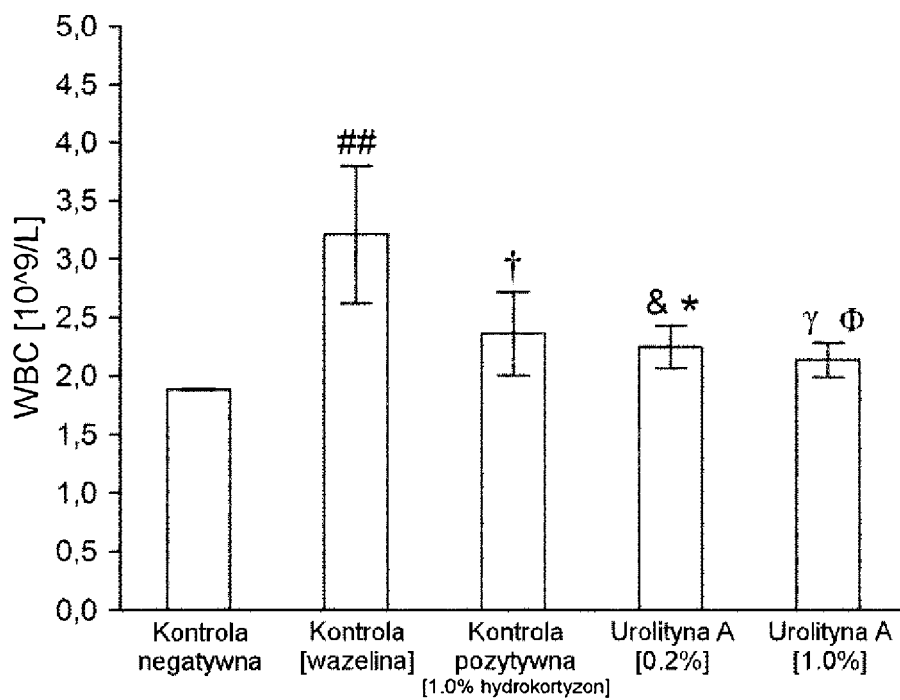


FIG. 3

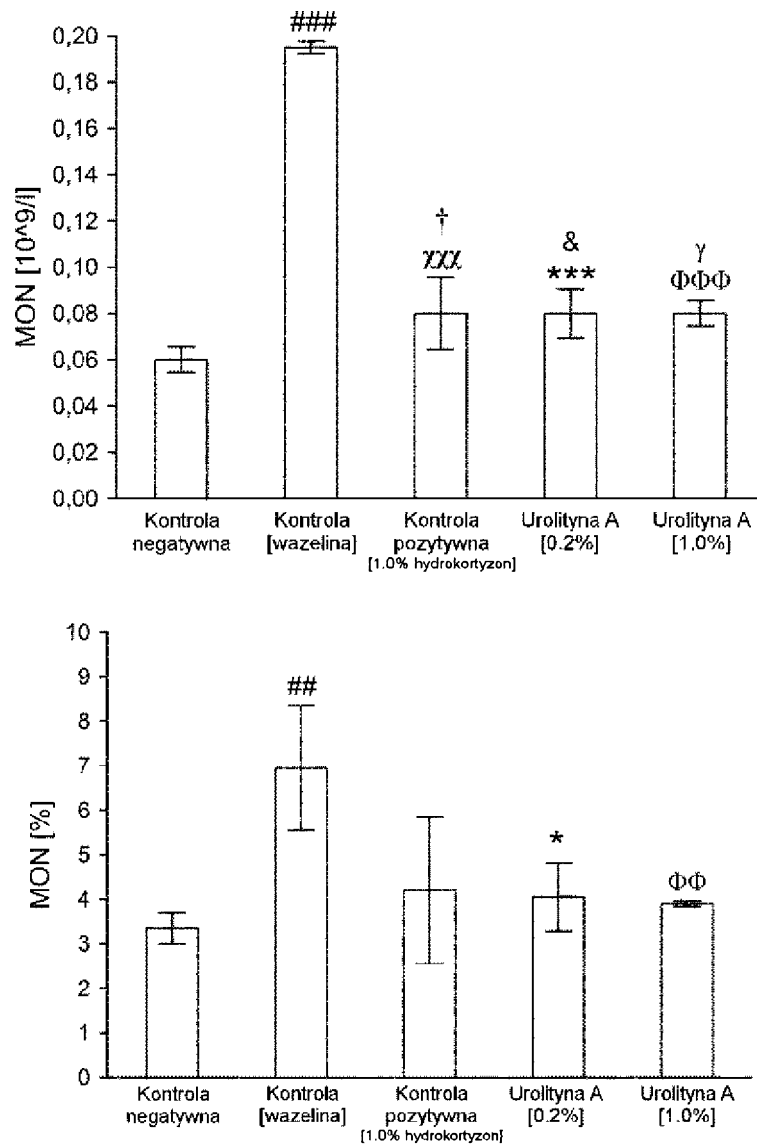


FIG. 4

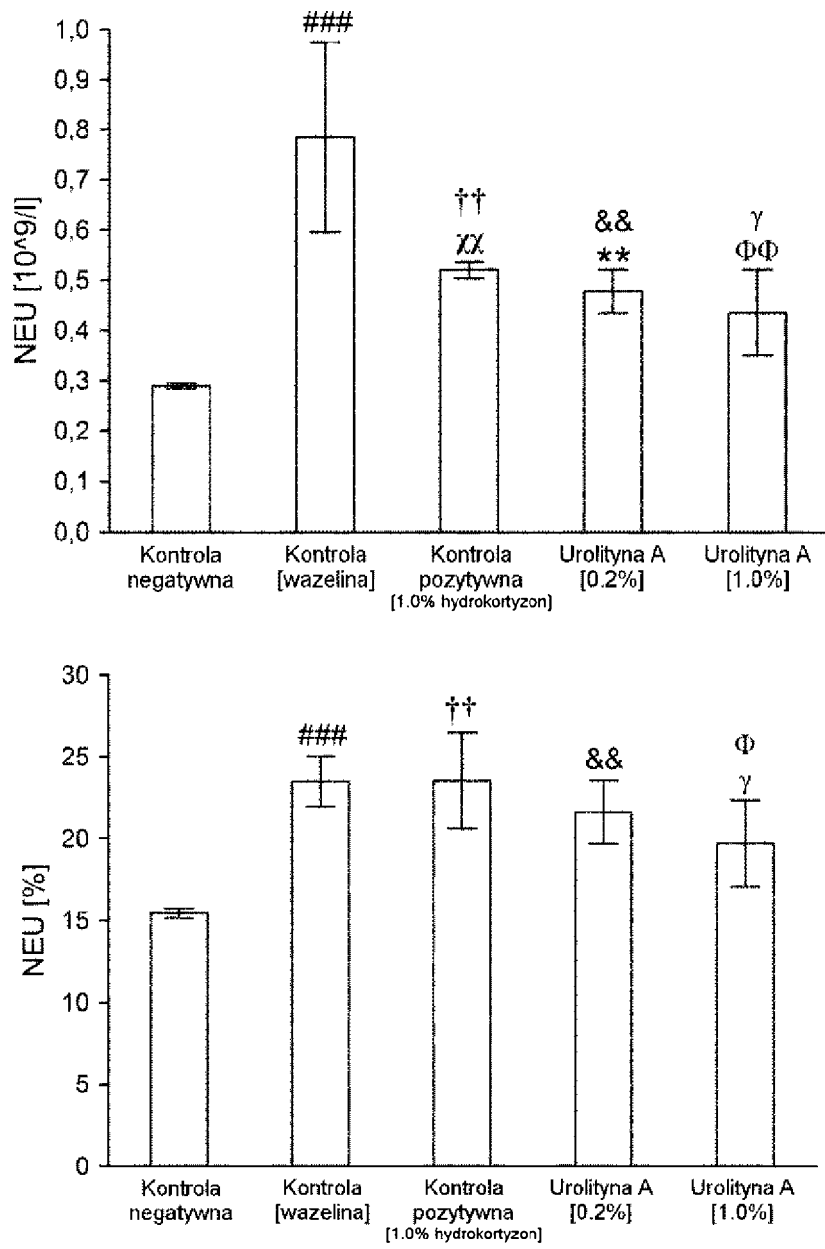


FIG. 5

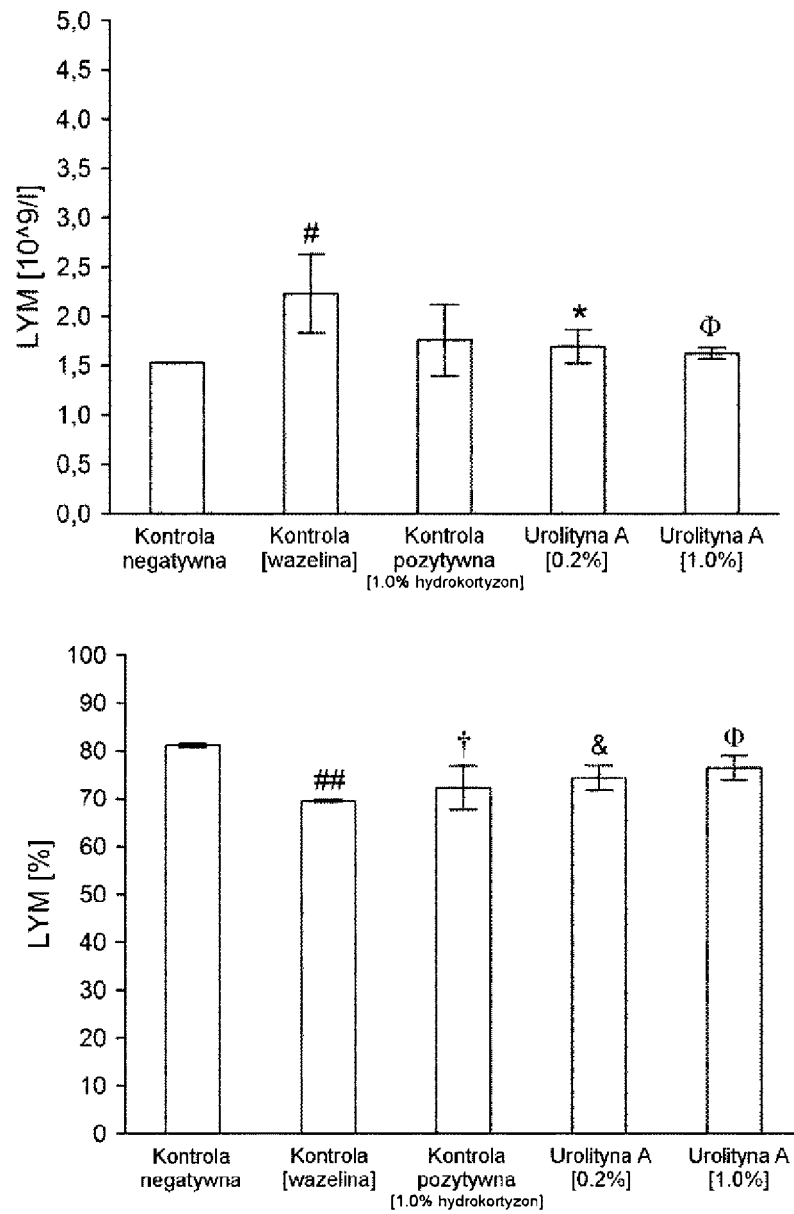


FIG. 6

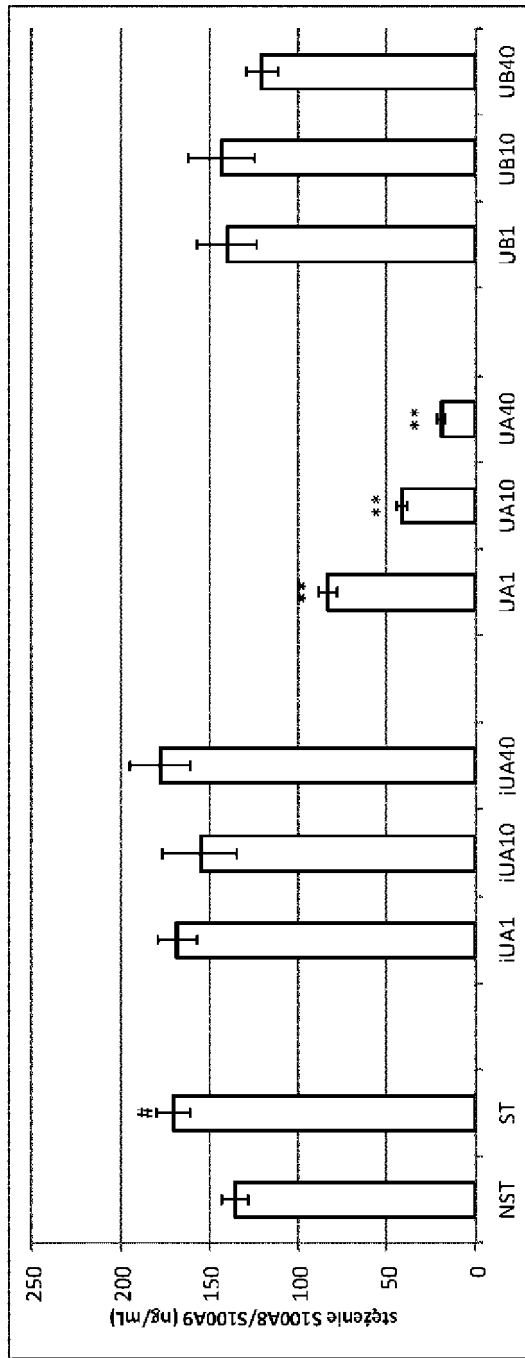


FIG. 7

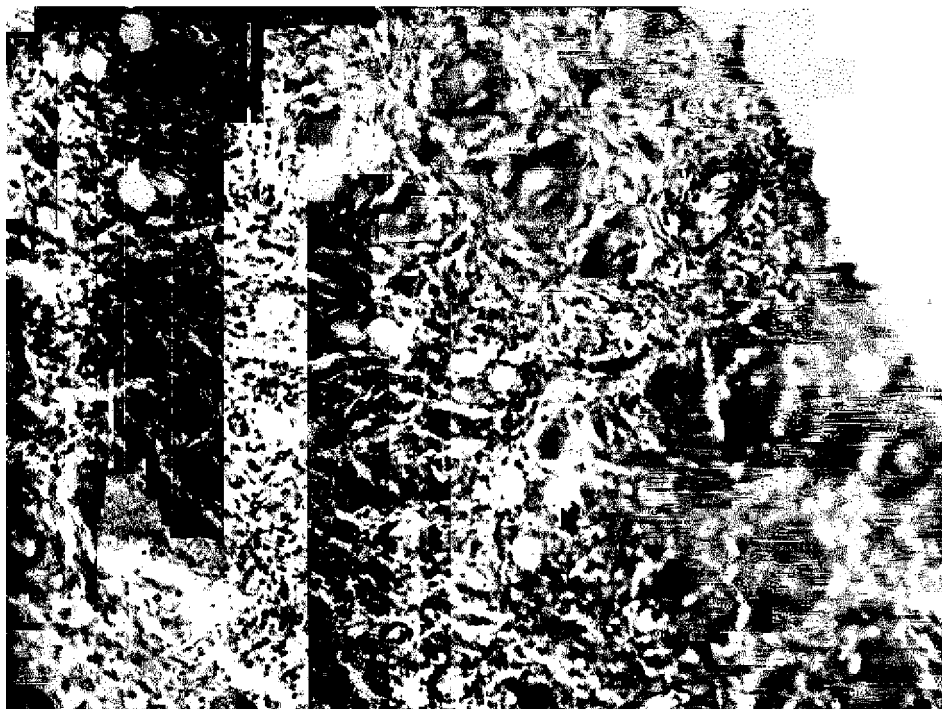
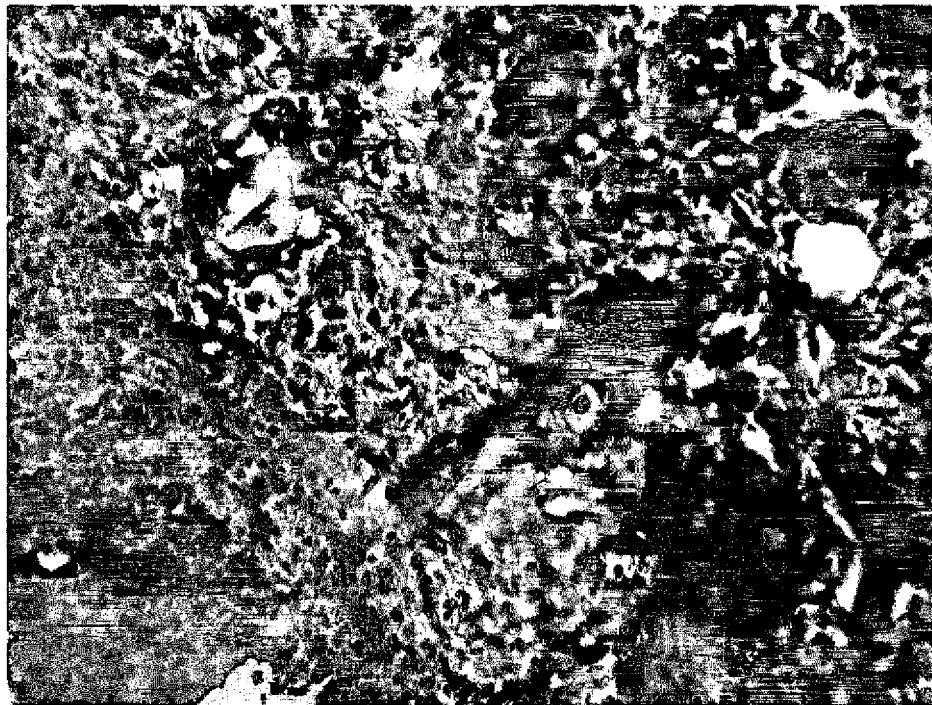


FIG. 8

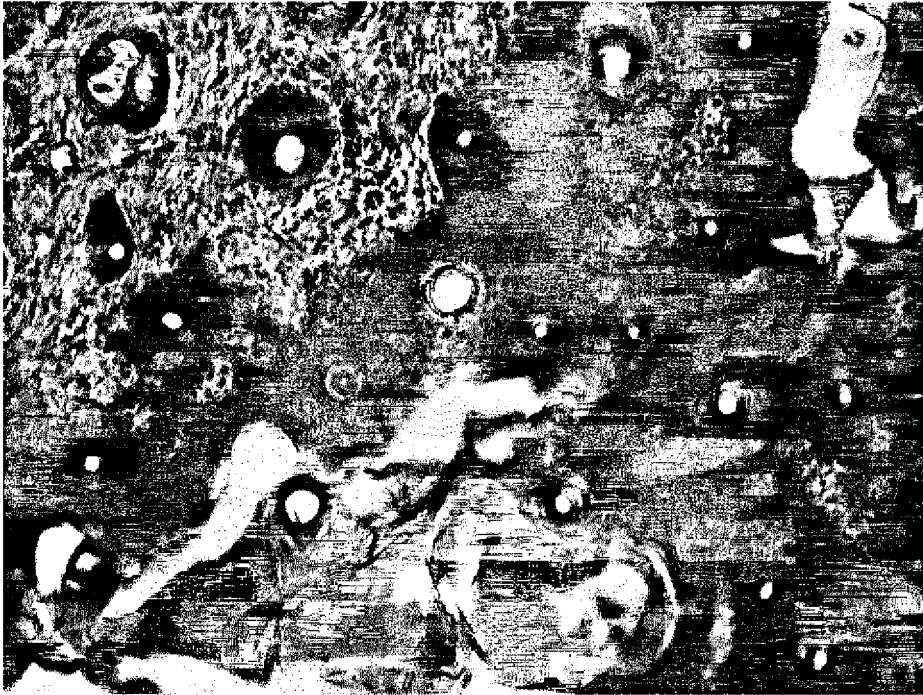


FIG. 9

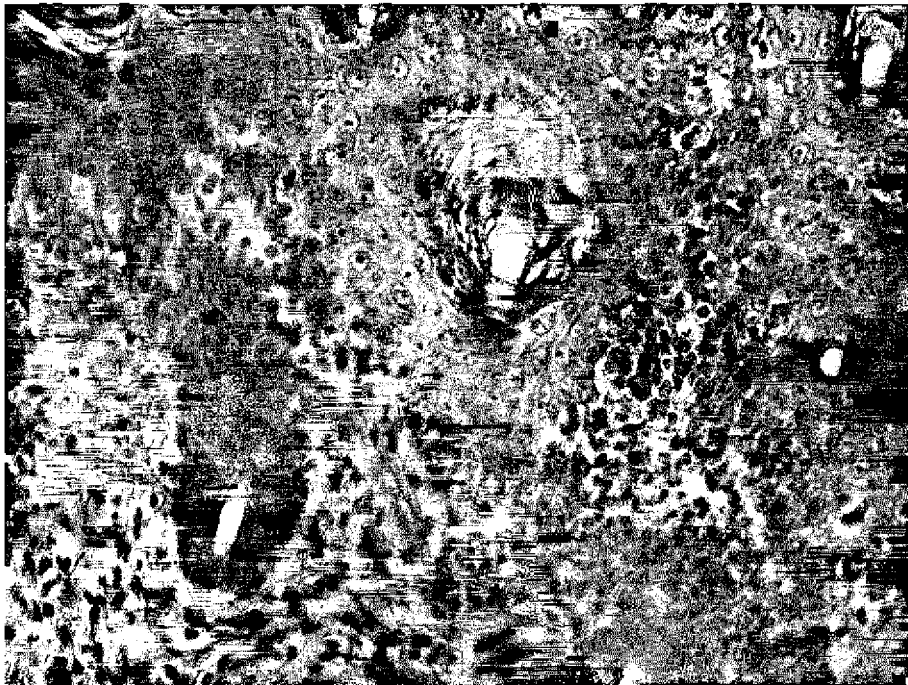


FIG. 10



FIG. 11