



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(21) Numer zgłoszenia: **412443**

(51) Int.Cl.
A61K 31/47 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **22.05.2015**

(54) **Zastosowanie medyczne kwasu kynureninowego i jego soli**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
05.12.2016 BUP 25/16

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
30.04.2019 WUP 04/19

(73) Uprawniony z patentu:

WOŹNIAK ANNA,
Jakubowice Konińskie Kolonia, PL
TURSKI WALDEMAR, Lublin, PL
ŻARNOWSKI TOMASZ, Lublin, PL
REJDAK ROBERT, Lublin, PL
CZUCZWAR MIROSŁAW, Lublin, PL
ŁAŃCUT MIROSŁAW, Kolonia Trawniki, PL
PIWOWARCZYK PAWEŁ, Lublin, PL
TURSKA MONIKA, Lublin, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

ANNA WOŹNIAK,
Jakubowice Konińskie Kolonia, PL
WALDEMAR TURSKI, Lublin, PL
TOMASZ ŻARNOWSKI, Lublin, PL
ROBERT REJDAK, Lublin, PL
MIROSŁAW CZUCZWAR, Lublin, PL
MIROSŁAW ŁAŃCUT, Kolonia Trawniki, PL
PAWEŁ PIWOWARCZYK, Lublin, PL
MONIKA TURSKA, Lublin, PL
ROMAN PADUCH, Lublin, PL

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest nowe zastosowanie kwasu kynureninowego i jego farmaceutycznie dopuszczalnych soli w leczeniu ubytków nabłonka rogówki oka.

Rogówka to bardzo ważna struktura gałki ocznej, która z racji swego eksponowanego położenia narażona jest na działanie szkodliwych czynników zewnętrznych. Ubytek w obrębie nabłonka rogówki nazywany jest erozją rogówki. Jest to jedna z najczęstszych przyczyn zgłaszania się pacjentów do okulistów w trybie nagłym. Objawami klinicznymi erozji jest silny ból, łzawienie i światłowstręt. Może wystąpić spadek ostrości wzroku, a także w niektórych przypadkach zakażenie rogówki mogące spowodować trwałe obniżenie ostrości wzroku a nawet ślepotę.

Uszkodzenie i ubytek nabłonka rogówki może być spowodowany działaniem czynników zewnętrznych, takich jak czynniki mechaniczne, chemiczne, termiczne i promieniowanie oraz biologiczne. Najczęściej urazy powierzchni oka wywołane są obecnością ciała obcego pod powieką lub w rogówce. Również u osób noszących soczewki kontaktowe może dochodzić do ubytków nabłonka rogówki.

W zespole nawrotowych erozji nabłonka rogówki przyczyną mogą być przebyte wcześniej urazy rogówki, dystrofie obejmujące nabłonek rogówki (Cogana, Messmanna), istotę właściwą (plamkową, ziarnistą, kraciastą, Reisa-Bücklersa) oraz dystrofie śródbłonkowe w związku z występującą dekompenzacją rogówki oraz degeneracją. Występowanie erozji nawrotowych towarzyszy wielu schorzeniom okulistycznym, takim jak dysfunkcja gruczołów Meiboma i powiek, zaburzenia filmu łzowego, zwyrodnienia po urazach termicznych, chemicznych czy po zapaleniach rogówki, w niedoborze komórek rąbkowych.

Mogą również wystąpić erozje powstające bez uchwytnego przyczyny, które nazywane są erozjami idiopatycznymi.

Uszkodzenie nabłonka rogówki powoduje zaburzenie naturalnej bariery ochronnej zabezpieczającej głębsze warstwy rogówki przed infekcjami. W takich sytuacjach może dojść do owrzodzeń rogówki.

Leczenie urazów powierzchniowych polega na stosowaniu kropli lub maści z antybiotykiem. Większość erozji ulega regeneracji w ciągu 48 godzin. Czas ten wydłuża się u chorych w zaawansowanym wieku, chorych na cukrzycę lub z zespołem suchego oka ponadto przy towarzyszącej infekcji opryszczkowej, chorobie autoimmunologicznej, a także przy wahaniach hormonalnych w przebiegu miesiączki, ciąży, menopauzy.

Ponieważ ubytki nabłonka rogówki mogą być przyczyną uciążliwych dolegliwości i poważnych komplikacji zdrowotnych, poszukiwane są substancje, które przyspieszają ich gojenie się.

W trakcie poszukiwania substancji przyspieszających gojenie się nabłonka rogówki nieoczekiwanie okazało się, że kwas kynureninowy o wzorze ogólnym 1 oraz jego sole, mogą mieć zastosowanie do wytwarzania leków do leczenia ubytków nabłonka rogówki mimo, że w badaniach *in vitro* kwas kynureninowy zmniejszał metabolizm i proliferację komórek nabłonka rogówki człowieka.

Kwas kynureninowy jest metabolitem tryptofanu powstającym na szlaku przemian kynureniny. Występuje on w tkankach i płynach ustrojowych w organizmie człowieka i innych ssaków. Jest on wchłaniany z przewodu pokarmowego i osiąga wysokie stężenie we krwi i tkankach (*Kuc i wsp., Amino Acids. 2008, 35: 503–5*). Kwas kynureninowy występuje w żółci i ślinie (*Paluszkiewicz i wsp., Amino Acids. 2009; 37: 637–41; Kuc i wsp., Pharmacol Rep. 2006, 58: 393–8*). Kwas kynureninowy jest wydalany z moczem (*Hiratsuka i wsp., Int J Tryptophan Res. 2012; 5: 33–47*).

Znane jest działanie kwasu kynureninowego hamujące rozwój stresu oksydacyjnego i zapobiegające peroksydacji lipidów w niedrożności jelit (*Kaszaki i wsp., Neurogastroenterol Motil, 2008, 20, 53–62*). Kwas kynureninowy wywiera również działanie przeciwbólowe (*Näsström i wsp., Eur J Pharmacol, 1992, 212, 21–9*).

Znane jest także działanie ochronne kwasu kynureninowego w zwierzęcych modelach wrzodu żołądka (*Glavin i wsp., Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry. 1989;13(3-4):569–72, Res Commun Chem Pathol Pharmacol. 1989;64:111–9*).

Znane jest zastosowanie kwasu kynureninowego i jego pochodnych do wytwarzania leków stosowanych w leczeniu stanów chorobowych przebiegających ze wzmożoną perystaltyką jelit (*Kaszaki i wsp., Neurogastroenterol Motil, 2008, 20, 53–62*), a także w dnie moczanowej i stwardnieniu rozsianym (WO/2008/087461). Kwas kynureninowy jest także skuteczny w leczeniu wstrząsu septycznego (WO/2006/117624).

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie kwasu kynureninowego o wzorze ogólnym 1 i jego soli do leczenia ubytków nabłonka rogówki oka, a zwłaszcza do przyspieszenia gojenia się ich. Zastosowanie kwasu może mieć miejsce także do przyspieszenia gojenia się ubytków nabłonka rogówki w chorobach oczu.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że kwas kynureninowy oraz jego sole o wzorze 1, znacząco przyspiesza gojenie się ubytków nabłonka oka, dzięki czemu może on znaleźć zastosowanie w medycynie i weterynarii.

Aktywność ta została potwierdzona następującymi wynikami badań.

Przebieg doświadczeń.

P r z y k ł a d 1. Badania in vitro – cytotoksyczność i metabolizm komórkowy

Badania zostały przeprowadzone na linii komórkowej nabłonka rogówki człowieka (10.014 pRSV-T). Komórki o gęstości $1,5 \times 10^5$ komórek/ml były hodowane w 96-dołkowych, płaskodennych płytkach. Roztwór kwasu kynureninowego był dodawany do podłoża w stężeniach końcowych od 1 do 10 mM. Czas inkubacji wynosił 24 i 48 godzin. Cytotoksyczność (test wychwytu czerwieni obojętniej – NR) oraz metabolizm komórkowy (test MTT) były badane przy pomocy metod spektrofotometrycznych.

Wyniki

Kwas kynureninowy w stężeniach 1–10 mM zmniejszał metabolizm komórek w sposób zależny od dawki (Tabela 1). Kwas kynureninowy w stężeniach 2,5–10 mM zmniejszał proliferację komórek nabłonka rogówki (Tabela 2).

T a b e l a 1

Wpływ roztworu kwasu kynureninowego na metabolizm komórek nabłonka rogówki mierzony w teście MTT.

Stężenie kwasu kynureninowego [mM]	Po 24 godzinach inkubacji [% kontroli]	Po 48 godzinach inkubacji [% kontroli]
1	40	39
2,5	34	36
5	29	31
10	24	24

T a b e l a 2

Wpływ roztworu kwasu kynureninowego na proliferację komórek nabłonka rogówki mierzoną w teście NR.

Stężenie kwasu kynureninowego [mM]	Po 24 godzinach inkubacji [% kontroli]	Po 48 godzinach inkubacji [% kontroli]
1	87	96
2,5	86	87
5	68	73
10	52	56

P r z y k ł a d 2. Badania in vitro – migracja

Badania zostały przeprowadzone na linii komórkowej nabłonka rogówki człowieka (pRSV-T). Roztwór kwasu kynureninowego był dodawany do podłoża w stężeniu $75 \mu\text{M}$. Czas inkubacji wynosił 48 godzin. Użyto systemu „transwell migration assay”. Komórki barwiono metodą Giemsa. Komórki które przemieściły się przez pory membrany zliczano pod mikroskopem świetlnym (Olympus BX51; powiększenie: 40x).

Wyniki

Kwas kynureninowy powodował znaczne zwiększenie intensywności migracji komórek nabłonka rogówki (Tabela 3).

Tabela 3
Wpływ roztworu kwasu kynureninowego na migrację komórek nabłonka rogówki.

Substancja	Liczba komórek	%
Warunki kontrolne	13 ± 2,6	100
Kwas kynureninowy	27 ± 7,0	208

Przykład 3. Badania in vivo

Badania przeprowadzono na dorosłych królikach. W znieczuleniu ogólnym usuwano nabłonek rogówki na powierzchni o średnicy 6 mm w obu oczach. Roztwory kwasu kynureninowego w stężeniu 0,002%, 0,1% i 1%, podawano 5x dziennie do oka prawego w odstępach 3-godzinnych w godzinach 8.00–20.00, a do lewego oka roztwór soli fizjologicznej w tych samych godzinach. Szybkość gojenia się ubytków nabłonka oceniano w lampie szczelinowej po zabarwieniu fluoresceiną dwukrotnie w ciągu doby (8.00 i 20.00) przez okres 3 dni lub do całkowitego zagojenia się rany. Sporządzano dokumentację fotograficzną i mierzono obszar ubytku programem EPCO 2000.

Wyniki

Nie stwierdzono toksycznego lub drażniącego oddziaływania badanych roztworów na rogówkę. U zwierząt, którym podawano kwas kynureninowy w kroplach o stężeniu 0,002% i 0,1% parametry gojenia się ubytków były takie same jak w oczach kontrolnych. U zwierząt, którym podawano kwas kynureninowy w kroplach o stężeniu 1% wielkość ubytku w drugim dniu po rozpoczęciu podawania kwasu kynureninowego była mniejsza, a szybkość gojenia się ubytków była większa niż w oczach kontrolnych (Tabela 4 i 5).

Tabela 4
Wpływ 1% roztworu kwasu kynureninowego na wielkość ubytku nabłonka rogówki.

Czas [godziny]	Oko kontrolne - % wielkości ubytku	Oko, do którego podawano kwas kynureninowy - % wielkości ubytku
0	100	100
12	83	84
24	40	45
36	11	4 *
48	3	0

* $p < 0,05$ w porównaniu do odpowiedniej kontroli

Tabela 5

Wpływ 1% roztworu kwasu kynureninowego na szybkość gojenia się ubytku nabłonka rogówki.

Czas [godziny]	Oko kontrolne	Oko, do którego podano kwas
	– szybkość gojenia się ubytku [% wielkości ubytku/12 godzin]	kynureninowy - szybkość gojenia się ubytku [% wielkości ubytku/12 godzin]
0-12	17	16
12-24	43	38
24-36	29	41*
36-48	8	4

* $p < 0,05$ w porównaniu do odpowiedniej kontroli

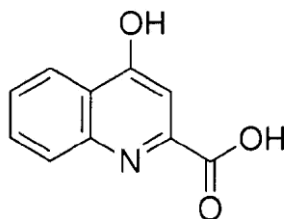
Przeprowadzone badania po raz pierwszy wskazują, że kwas kynureninowy przyspiesza gojenie się ubytków nabłonka rogówki oka.

Kwas kynureninowy i jego sole mogą być użyte do wytworzenia leku stosowanego do przyspieszenia gojenia się ubytków nabłonka rogówki oka, który może być podawany wszystkimi dostępnymi drogami podawania leków okulistycznych, w tym: miejscowo do worka spojówkowego w postaci kropli lub maści albo uwalniany z soczewek kontaktowych lub innych aplikatorów. Wymagana dawka zależy od wielu czynników, a w szczególności od rodzaju związku chemicznego, postaci leku, drogi podania, wieku i stanu zdrowia pacjenta. Na podstawie badań własnych wykazano, że podanie roztworu kwasu kynureninowego w kroplach do oczu w stężeniu 0,002% i 1% u królika było dobrze tolerowane.

Zastrzeżenia patentowe

1. Kwas kynureninowy o wzorze 1 i jego sole do zastosowania w leczeniu ubytków nabłonka rogówki oka, a zwłaszcza do przyspieszenia gojenia się ubytków nabłonka rogówki oka.
2. Kwas kynureninowy według zastrz. 1 **znamienny tym**, że stosuje się go do przyspieszenia gojenia się ubytków nabłonka rogówki w chorobach oczu.

Rysunek



Wzór ogólny 1

