

(19)



(10) **LT 5421 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

- (11) Patento numeris: **5421** (51) Int. Cl. (2006): **C07K 5/00**
A61K 38/07
A61P 3/00
- (21) Paraiškos numeris: **2006 024**
- (22) Paraiškos padavimo data: **2006 04 05**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2007 02 26**
- (45) Patento paskelbimo data: **2007 05 25**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: **PCT/RU2004/000318**
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: **2004 08 09**
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: **2006 04 05**
- (30) Prioritetas: **20030135605, 2003 12 10, RU**
- (72) Išradėjas:
Vladimir Khatskelevich KHAVINSON, RU
Vladimir Viktorovich MALININ, RU
Evgeny Iosifovich GRIGORIEV, RU
Galina Anatolievna RYZHAK, RU
- (73) Patento savininkas:
SANKT-PETERBURGSKAYA OBSHESTVENNAYA ORGANIZATSIYA „SANKT-PETERBURGSKIY INSTITUT BIOREGULYATSII I GERONTOLOGII SZO RAMN”,
pr. Dinamo 3, 197110 St. Petersburg, RU
- (74) Patentinis patikėtinis:
Reda ŽABOLIENĖ, Advokatės Redos Žabolienės kontora METIDA, Gedimino
pr. 45-6, LT-01109 Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:
Tetrapeptidas, reguliuojantis kraujo gliukozės lygį, sergant cukriniu diabetu
- (57) Referatas:

Šis išradimas yra skirtas medicinos sričiai ir gali būti naudojamas kaip medžiaga, galinti reguliuoti gliukozės kiekį gydant arba stengiantis išvengti cukrinio diabeto. Pasiūlytas naujas biologiškai aktyvus tetrapeptidas lizil-glutamil-aspartil-triptofanas, kurio bendroji formulė $\text{Lys-Glu-Asp-Trp-NH}_2$, galintis reguliuoti gliukozės kiekį, ir farmakologinė medžiaga, turinti efektyvų kiekį tetrapeptido lizil-glutamil-aspartil-triptofano, kurio bendroji formulė $\text{Lys-Glu-Asp-Trp-NH}_2$. Pasiūlytas cukrinio diabeto prevencijai ir (arba) gydymui skirtas vaistas, kuris susideda iš šios farmakologinės medžiagos, turinčios efektyvų kiekį $\text{Lys-Glu-Asp-Trp-NH}_2$ tetrapeptido kaip

veikliojo peptidinio agento, skiriant pacientui 0,1 - 30 $\mu\text{g/kg}$ kūno masės dozėmis mažiausiai vieną kartą per dieną laiko tarpą, reikalingą terapiniam efektui pasiekti.

Šis išradimas yra skirtas medicinos sričiai ir gali būti naudojamas cukrinio diabeto gydymui kaip gliukozės koncentraciją reguliuojanti medžiaga.

Kaip artimiausi simptominiai šios medžiagos analogai yra žinomi insulino preparatai, naudojami 1 tipo cukriniam diabetui gydyti. Geriausias preparatas yra rekombinantinis arba genetiškai modifikuotas trumpo veikimo žmogaus insulino preparatas: aktrapidas, humulinas R, insumanas R, biosulinas R ir prolanguoto veikimo žmogaus insulino preparatai: protofanas, humulinas N, inuman-basalis ir biosulinas N – trumpalaikio ir prolanguoto veikimo žmogaus insulino analogai. Preparatai humalogas ir novorapidas yra ultratrumpo poveikio grupės preparatai, jie pasižymi greitu poveikiu ir šiek tiek per trumpu maksimalios reikšmės laikotarpiu, lyginant su trumpo poveikio insulinais; jie veiksmingai mažina gliukozės kiekį po valgio. Vis tik insulino terapija yra pakaitinė terapija, kuri gali duoti komplikacijas, tokias kaip alerginės reakcijos, hipoglikeminės būklės, rezistentiškumas insulinui ir pounsulininė lipodistrofija. Antro tipo cukrinio diabeto gydymas taip pat pasikeitė, įvedus į klinikinę praktiką trumpalaikio poveikio preparatus, tokius kaip novonormas arba repaglinidas ir starliksas. Tradiciškai yra naudojami sulfonilkarbamidai, tokie kaip: glibenklamido grupė, glipizidas, gliklazido grupė, glikvidonas ir amarilis (glimepiridas), kuris yra prolanguoto veikimo preparatas ir turi daug privalumų, lyginant su kitais šios grupės preparatais. Diabetonas MR ir glibenez-retardas yra prolanguoto poveikio preparatai. Reikia pažymėti, kad cukriniu diabetu sergantys pacientai dažnai pasižymi taip vadinamu antriniu rezistentiškumu sulfonilkarbamidams, kuris atsiranda dėl padidintos arba liekamosios insulino sekrecijos. Sulfonilkarbamidai turi daug šalutinių poveikių: virškinimo sutrikimus, alergines reakcijas, kaulų čiulpų funkcijos slopinimą, toksinius poveikius į kepenis ir inkstus, hipoglikemiją. Taip pat yra naudojami biguanidai, tokie kaip metforminas (gliukofagas, sioforas ir t.t.), glitazonai arba insulino sensibilizatoriai: aktozė ir avandia, ir alfa-glikozidazės inhibitoriai: akarbozė ir meglitolis. Šie peroralinio vartojimo

preparatai didina audinių jautrumą insulinui ir turi teigiamą normalizuojantį poveikį į angliavandenių metabolizmą. Vis tik jų naudojimas gali būti apribotas dėl mažo efektyvumo arba šalutinių poveikių (Balabolkin M.I., Diabetology. – M.: Meditzina, 2000. – 672 p.: Register of Pharmaceutical Substances of Russia. Edition 10. – RLS-2003, Moscow. – 2003. – 1438 pp.).

Yra žinomas dekapeptidinis insulino fragmentas (Patent of Russian Federation No.2078769 "Peptide fragment, possessing biological insulin similar activity", International Classification of Inventions (ICI) A61 K 38/28, 1997), pasižymintis panašiu į insuliną biologiniu aktyvumu.

Yra žinomi peptido p277 (žmogaus šiluminio šoko baltymo epitopo (hsp 60) analogai (Patent of Russian Federation No.2159250 "Peptide p277 analogues and pharmacological substances on its basis for treatment and diagnostics of diabetes mellitus", International Classification of Inventions (ICI) AK61 K 39/00, 2000).

Vis dėlto aukščiau minėtuose patentuose aprašytas biologinis aktyvumas rodo šių peptidų panašų į insulino poveikį, ir tai gali būti naudojama sukurti peptidinėms medžiagoms, skirtoms 1 tipo cukriniam diabetui gydyti.

Yra žinomi maži insulino veikimą skatinantys peptidai, aprašyti patente (EP Nr.1268518 "Insulin potentiating peptides", International Classification of Inventions (ICI) C07K5/10; AK61 K 38/07; A61K38/08, 2001), kuris buvo paimtas prototipu farmaciniam preparatui ir cukrinio diabeto prevencijos arba (ir) gydymo būdui. Šie maži peptidai gali tarnauti peptidiniais farmaciniais agentais, kurie gali būti naudojami cukriniam diabetui gydyti.

Reikia pažymėti, kad siūlomas peptidinis junginys yra tetrapeptidas, kuris neturi struktūrinių analogų.

Siūlomas išradimas yra skirtas naujam peptidinės prigimties biologiškai aktyviam junginiui, reguliuojančiam gliukozės kiekį pacientų, sergančių 2 ir 1 tipo cukriniu diabetu, gauti.

Šiame išradime aprašomas naujas sekos 1 [SEQ ID NO:1] tetrapeptidas lizil-glutamil-aspartil-triptofan-amidas, kurio bendroji formulė Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂. Šis tetrapeptidas yra gautas klasikiniu peptidinės sintezės metodu tirpale (Yakubke Kh.-D., Eshkeit Kh. Amino acids, peptides, proteins: Translated from German. – Mir, Moscow. – 1985. – 456 pp.).

Šiame išradime a prašomas sekos 1 [SEQ ID NO:1] tetrapeptidas lizil-glutamil-aspartil-triptofan-amidas, kurio bendroji formulė $\text{Lys-Glu-Asp-Trp-NH}_2$, pasižymintis biologiniu aktyvumu, o būtent, reguliuojantis gliukozės kiekį.

$\text{Lys-Glu-Asp-Trp-NH}_2$ tetrapeptido reguliacinis poveikis į gliukozės kiekį kraujyje buvo parodytas eksperimentiškai aloksaninio diabeto atveju. Manoma, kad aloksaninis diabetas yra susijęs su kasos β -ląstelių pažeidimu ir yra lydimas išreikštos hiperglikemijos dėl insulino trūkumo ir glikoneogenezės aktyvacijos.

Eksperimentiškai įrodyta, kad $\text{Lys-Glu-Asp-Trp-NH}_2$ tetrapeptidas yra netoksiškas.

Šio išradimo vaistinė medžiaga kaip veiklųjį peptidinį agentą turi efektyvų kiekį sekos 1 [SEQ ID NO:1] tetrapeptido lizil-glutamil-aspartil-triptofanamido, kurio bendroji formulė $\text{Lys-Glu-Asp-Trp-NH}_2$, ir reguliuoja gliukozės kiekį cukrinio diabeto atveju.

Šioje paraiškoje naudojamas terminas "vaistinė medžiaga" reiškia panaudojimą bet kokios vaisto formos, kurioje yra bendrosios formulės $\text{Lys-Glu-Asp-Trp-NH}_2$ tetrapeptido, galinčio rasti prevencinį ir (arba) terapinį pritaikymą medicinoje kaip medžiaga, reguliuojanti gliukozės kiekį kraujyje cukrinio diabeto atveju.

Šioje paraiškoje naudojamas terminas "terapiškai efektyvus kiekis" reiškia panaudojimą tokio veikliojo peptidinio agento kiekio, kuris atsižvelgiant į jo aktyvumo ir toksiškumo kiekybinius rodiklius bei specialių prieinamų žinių atžvilgiu bus veiksmingas jo vaisto formoje.

Norint gauti šio išradimo farmacinės kompozicijas, pasiūlytas tetrapeptidas, kaip veiklusis ingredientas, yra sumaišomas su farmaciniu nešikliu pagal farmacijoje priimtus medžiagų maišymo metodus.

Nešiklis gali būti įvairių formų priklausomai nuo medžiagos vaisto formos, pageidaujamos įvedimui į organizmą, pavyzdžiui parenteriniam arba peroraliniam vartojimui.

Norint pagaminti norimos dozuotos formos vaisto kompozicijas peroraliniam vartojimui, gali būti naudojami visi žinomi farmaciniai komponentai.

[nešiklius parenteriniam vartojimui paprastai įeina sterilus vanduo, nors gali būti naudojami kiti ingredientai, reikalingi stabilumui arba sterilumui palaikyti.

Pateiktame išradime numatoma, kad geriau, jei ši vaistinė medžiaga bus skiriama vartoti parenteriniu arba peroraliniu būdu.

Pateiktas išradimas taip pat yra susijęs su cukrinio diabeto prevencijos ir (arba) gydymo būdu, kuris susideda iš skyrimo pacientui vaistinės medžiagos, turinčios kaip veikliojo peptidinio agento efektyvų kiekį tetrapeptido $\text{Lys-Glu-Asp-Trp-NH}_2$ 0,1-30 $\mu\text{g/kg}$ kūno masės dozėmis mažiausiai vieną kartą per dieną tokį laiko tarpą, kad būtų gaunamas terapinis efektas.

Cukrinio diabeto profilaktikos ir (arba) gydymo būdas susideda iš prevencinio arba gydomojo šios vaistinės medžiagos parenterinio arba peroralinio įvedimo.

Pateiktas tetrapeptidas yra veiklus, kai jis įvedamas 0,1-30 $\mu\text{g/kg}$ kūno masės dozėmis, tačiau yra leistinos ir mažesnės (didesnės) dozės priklausomai nuo gydomo patologinio proceso charakterio ir sunkumo.

Pateikto išradimo techninis rezultatas yra gliukozės kiekio reguliavimas dėka insulino sekrecijos padidėjimo ir audinio jautrumo insulinui padidėjimo.

Galimybė gauti objektyvų šios išradimo paraiškos techninį rezultatą yra patvirtinta patikimais eksperimentiniais ir klinikiniais duomenimis, gautais šioje mokslo srityje priimtais metodais.

Išradimas yra pailiustruotas lentelėmis.

1 lentelėje parodytas tetrapeptido $\text{Lys-Glu-Asp-Trp-NH}_2$ poveikis į žiurkių su aloksaniniu diabetu gliukozės kiekį kraujyje (gydymas).

2 lentelėje parodytas tetrapeptido $\text{Lys-Glu-Asp-Trp-NH}_2$ poveikis į žiurkių su aloksaniniu diabetu gliukozės kiekį kraujyje (prevencija ir gydymas).

3 lentelėje parodytas įvairių tetrapeptido $\text{Lys-Glu-Asp-Trp-NH}_2$ dozių poveikis į žiurkių su aloksaniniu diabetu gliukozės kiekį kraujyje.

4 lentelėje parodytas tetrapeptido $\text{Lys-Glu-Asp-Trp-NH}_2$ poveikis į žiurkių su aloksaniniu diabetu insulino kiekį kraujyje.

5 lentelėje parodyti gliukozės toleravimo testo rezultatai bandyme su aloksaninį diabetą turinčiomis žiurkėmis (44-tą dieną po tetrapeptido Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ kurso pabaigos).

6 lentelėje parodytas insulino poveikis į žiurkių su aloksaniniu diabetu gliukozės kiekį kraujyje (28-tą dieną po tetrapeptido Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ kurso pabaigos).

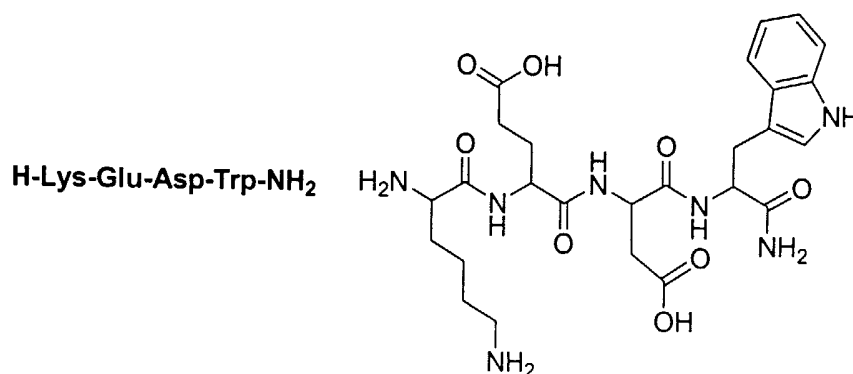
7 lentelėje parodytas pacientų su cukriniu diabetu pasiskirstymas tyrimo metu.

8 lentelėje parodytas tetrapeptido Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ parenterinio vartojimo efektyvumas pacientams, sergantiems 1 ir 2 tipo cukriniu diabetu, kurie buvo gydyti insulinu.

Pateikiamas išradimas yra iliustruojamas tetrapeptido Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ sintezės pavyzdžiu (1 pavyzdys), tetrapeptido Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ biologinio aktyvumo pavyzdžiais (2, 3, 4, 5, 6, 7 pavyzdžiai) ir tetrapeptido Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ klinikinio naudojimo pavyzdžiais, kurie rodo jo farmakologines savybes ir patvirtina galimybę gauti profilaktinį arba (ir) gydomąjį poveikį (8 pavyzdys).

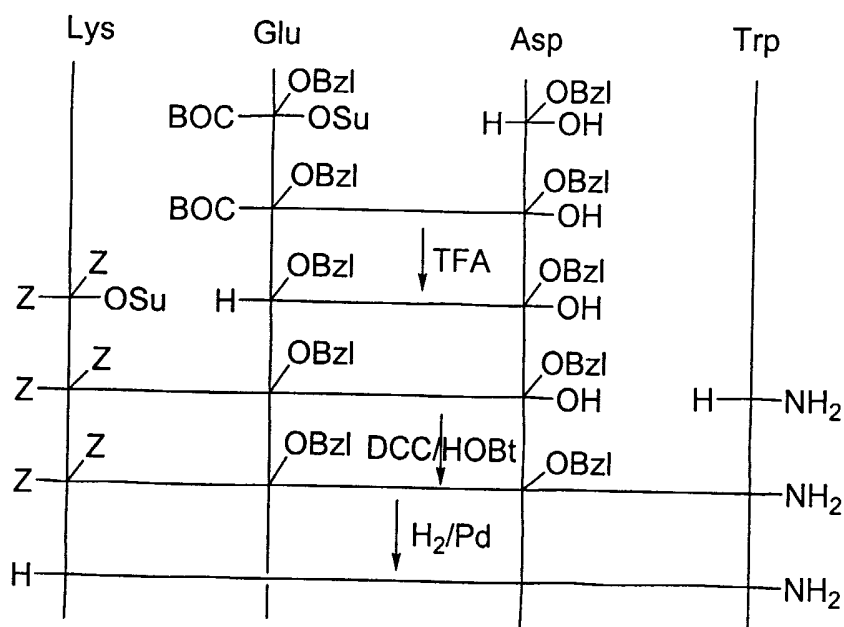
1 pavyzdys. Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptido sintezė

1. Produkto pavadinimas: lizil-glutamil-aspartil-triptofan-amidas
2. Struktūrinė formulė:



3. Molekulinė formulė be jonų poros: C₂₆H₃₇N₇O₈.
4. Molekulinė masė be jonų poros: 575,62.
5. Jonų pora: nėra

6. Išvaizda: balti amorfiniai milteliai be kvapo.
7. Sintezės metodas: Peptidas yra gautas klasikiniu sintezės metodu tirpale pagal toliau duodamą schemą:



- Z - benziloksikarbonilo grupė;
- BOC - tret.-butiloksikarbonilo grupė;
- OSu - N-oksisukcinimido esteris;
- OBzl - benzilo esteris;
- DCC – N,N'-dicikloheksilkarbodiimidis;
- HOBt – N-oksibenzotriazolas.

N,N'-dimetilformamidas buvo naudojamas kaip tirpiklis. Pridėjus asparto rūgšties, α -COOH apsaugai buvo naudojamas druskos su trietilaminu sudarymas. BOC-blokuojanti grupė buvo pašalinama trifluoracto rūgšties (TFA) tirpalu, o Z-blokuojanti grupė – katalitiškai hidrinant. Produktas buvo ekstrahuojamas ir gryninamas preparatine chromatografija naudojant normalios fazės kolonėlę (silikagelis).

Galutinio produkto savybės:

- aminorūgščių analizė

Lys	Glu	Asp	Trp
0,95	1,00	1,06	0,90
- peptido kiekis 97,48 % (pagal ASSCh, 220 nm)

- plonasluoksnė chromatografija (PSCh) – viena medžiaga, $R_f=0,64$ (plokštelė PTSX-P-V-UV Sorbfil, silikagelis STX-IVE 8-12 μm , acetonitrilas:vanduo 3:1);
- drėgmės kiekis: 7 %
- 0,01 % tirpalo pH: 4,05;
- UV spektras: aukščiausias smailės taškas yra ties 280 nm – triptofano indolo žiedas;
- Specifinio sukimo galia: $[\alpha]_D^{23} -26,53^\circ$ ($c=1,0$; H_2O), ("Polamat A", Carl Zeiss Jena.

Sintezės pavyzdžiai:

1. BOC-Glu(OBzl)-Asp(OBzl)-OH (I), N-tret.butiloksikarbonil-(γ -benzil)glutamil-(β -benzil)aspartatas

4.32 g (0.0100 mol) N-tret.butiloksikarbonil-(γ -benzil)glutamo rūgšties N-oksisukcinimido esterio (BOC-Glu(OBzl)-OSu) ištirpinama 20 ml dimetilformamido, pridedama 1,72 ml (0,0125 mol) trietilamino ir 2,80 g (0,0125 mol) β -benzilaspartato. Mišinys maišomas 24 valandas kambario temperatūroje. Po to produktas yra nusodinamas 0,5 N sulfato rūgšties tirpalu (150 ml), ekstrahuojamas etilacetatu (3x30 ml), plaunamas 0,5 N sulfato rūgšties tirpalu (2x20 ml), vandeniu. Produktas džiovinamas bevandeniu Na_2SO_4 . Etilacetatas nufiltruojamas ir pašalinamas vakuume 40°C temperatūroje, liekana džiovinama vakuume virš P_2O_5 . Gaunama 5,68 g ($\approx 100\%$) alyvos. $R_f = 0,42$ (benzenas-acetonas 2:1, Sorbfil plokštelės, silikagelis – 8-12 μm , ryškinama UV šviesa ir chloru/benzidinu).

2. TFA·H-Glu(OBzl)-Asp(OBzl)-OH (II), (γ -benzil)glutamil-(β -benzil)aspartato trifluoracetatas

5,68 g ($\approx 0,01$ mol) N-tret.butiloksikarbonil-(γ -benzil)glutamil-(β -benzil)aspartato (I) ištirpinama 20 ml dichlormetano-trifluoracto rūgšties mišinio (3:1). Po dviejų valandų tirpiklis nugarinamas vakuume 40°C temperatūroje. Nugarinimas pakartojamas pridėjus kitą dichlormetano porciją (2x10 ml). Liekana džiovinama vakuume virš NaOH. Gaunama 5,80 g (≈ 100 %) alyvos. $R_f = 0,63$ (n-butanolis-piridinas-acto rūgštis-vanduo, 15:10:3:12).

3. Z-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Asp(OBzl)-OH (III), N,N^{ϵ} -

dibenziloksikarbonillizil-(γ -benzil)glutamil-(β -benzil)aspartatas

5,65 g (0,01 mol (γ -benzil)glutamil-(β -benzil)aspartato trifluoracetato (II) ištirpinama 10 ml dimetilformamido, pridedama 2,80 ml (0,02 mol) trietilamino ir 6,64 g (0,013 mol) N,N^{ϵ} -dibenziloksikarbonillizino N-oksisukcinimido esterio. Reakcijos mišinys maišomas 24 valandas kambario temperatūroje.

Produktas nusodinamas 0,5 N sulfato rūgšties tirpalu (150 ml), ekstrahuojamas etilacetatu (3x30 ml), plaunamas 0,5 N sulfato rūgšties tirpalu (2x20 ml), 5 % natrio rūgščiojo karbonato tirpalu (1x20 ml), vandeniu ir džiovinamas bevandeniu natrio sulfatu. Etilacetatas nufiltruojamas ir pašalinamas vakuume 40°C temperatūroje. Liekana perkristalinama iš etilacetato/heksano sistemos. Produktas nufiltruojamas ir džiovinamas vakuume virš P_2O_5 . Išėiga yra 6,04 g (72 %). Lydymosi temperatūra (T_{lyd}) yra 142°C . $R_f = 0,60$ (benzenas-acetonas, 1:1).

4. Z-Lys(Z)-Glu(OBzl)-Asp(OBzl)-Pro-OBzl (IV), 1024,15 N,N^{ϵ} -

dibenziloksikarbonillizil-(γ -benzil)glutamil-(β -benzil)aspartil-triptofanamidas

1,8 g (7,2 μmol) triptofanamido hidrochlorido ($\text{HCl}\cdot\text{H-Trp-NH}_2$) suspenduojama 15 ml tetrahidrofurano ir maišant pridedama 1,0 ml (7,2 mmol) trietilamino. Per 5 minutes pridedama 4,0 g (4,8 mmol)

N,N^E-dibenziloksikarbonililzil-(γ -benzil)glutamil-(β -benzil)aspartato (III) ir 0,8 g (5,8 mmol) N-oksibenzotriazolo. Mišinys atšaldomas iki 0 °C temperatūros. Po to 1,2 g (5,8 mmol) N,N'-dicikloheksilkarbodiimido tirpalas atšaldomas iki 0 °C ir įpilama 5 ml tetrahidrofurano. Mišinys maišomas šioje temperatūroje 2 valandas ir paliekamas maišytis per naktį kambario temperatūroje. Reakcijos mišinys supilamas į ledovandens mišinį (9150 ml), liekana sutrinama ir nufiltruojama. Liekana suspenduojama etilacetate (200 ml) ir susidaręs gelis plaunamas iš eilės 1N H₂SO vandenyje (2x100 ml), 5 % NaHCO₃ (2x100 ml), 1N H₂SO₄ (2x100 ml), vandenyje (2x100 ml), sočiame NaCl tirpale. Tirpiklis nugarinamas vakuume ir produktas du kartus perkristalinamas iš izopropilo alkoholio. Išiega 4,9 g (95%), R_f=0,67 (benzenas-acetonas, 2:1).

5. H-Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ (V), lizil-glutamil-aspartil-triptofan-amidas, 575,62

4,7 g N,N^E-dikarbobenzenoksilzil-(γ -benzil)glutamil-(β -benzil)aspartil-triptofan-amido (IV) yra hidrinama metanolio/vandens (5:1) sistemoje ant Pd/C katalizatoriaus. Deblokavimo reakcijos pabaiga kontroliuojama plonasluoksnės chromatografijos metodu benzeno/acetono (2:1) ir acetonitrilo/vandens (1:3) sistemose. Pasibaigus reakcijai, katalizatorius nufiltruojamas, filtratas nugarinamas vakuume, o liekana perkristalinama iš vandens/metanolio sistemos. Produktas džiovinamas vakuume virš KOH. Išiega 2,6 g (90%). R_f=0,64 (acetonitrilas/vanduo, 1:1).

Gryninimui 2,6 g produkto ištirpinama 5 ml acetonitrilo-vandens mišinio (1:3) ir suleidžiama į 21x4,5 cm kolonėlę su "Sigma" silikageliu, 230-400 erdmės (40-63 μ). Eliuojama acetonitrilo-vandens (1:3) sistema. Gauta 1 g chromatografiškai homogeninės medžiagos.

6. Galutinio produkto analizė

- Peptido kiekis buvo nustatytas didelio efektyvumo skystinės chromatografijos metodu, naudojant Nucleosil kolonėlę C18 4,6x250 mm: A: 0,1% TFA; B: MeCN; gradientas B→30% per 30 min. Srauto greitis lygus 1 ml/min. Detekcijos banga 220 nm, skleidimas 190-600 nm srityje, mėginio tūris 20 µl. Peptido kiekis – 97,48 %.

- Aminorūgščių analizė atlikta AAA "T-339" testeriu, Praha.

Lys	Glu	Asp	Trp
0,95	1,00	1,06	0,90

- Plonasluoksnė chromatografija: viena medžiaga, $R_f=0,64$ (acetonitrilas/vanduo, 3:1, Sorbfil plokštelės, 8-12 µm silikagelis, ryškinant chloru/benzidinu ir UV).
- Drėgmės kiekis: 7 % (gravimetriniu būdu, pagal masės sumažėjimą džiovinant, - 20 mg 100°C temperatūroje)
- 0,01 % tirpalo pH: 4,05 (potenciometriškai).
- Specifinio sukimo rodiklis: $[\alpha]_D^{23}:-26,53^\circ$ (c=1,0 H₂O), "Polamat A", Carl Zeiss Jena.
- UV spektras: smailės maksimumas 280 nm – triptofano indolo žiedas, "Beckman DU 650", 0,001% vandeninis tirpalas.

2 pavyzdys. Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptido poveikis į aloksaninio diabeto eigą bandyme su žiurkėmis (gydymo variantas)

Tyrimas buvo atliekamas su 21 baltosios maišytos veislės žiurkių patinėliu, kurių vidutinė kūno masė 375±35 g. Nustačius gliukozės koncentraciją kraujyje, visi gyvūnai buvo atsitiktinai padalinti į 2 grupes. Tada visiems gyvūnams buvo duota vienkartinė intraveninė aloksano tirpalo ("Spofa") injekcija, imant 35 mg/kg dozę. Penkiolikos dienų bėgyje kontroliniams gyvūnams buvo suleidžiama į pilvaplėvę vieną kartą 0,3 ml 0,9 % NaCl tirpalo, o pagrindinės grupės žiurkės gavo 3 µg (0,3 ml 0,9 % NaCl tirpale) Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ dozę vienai žiurkei 11 dienų.

1 lentelėje pateikti šio tyrimo rezultatai, kurie rodo, kad Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptido vartojimas davė patikimą gyvūnų gliukozės kiekio kraujyje sumažėjimą viso tyrimo eigoje 38,4 % (30-47,7%). Su Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptido gliukozės kiekio sumažinimu koreliuojasi gyvūnų mirštamumo sumažėjimas pagrindinėje grupėje. Pavyzdžiui, kontrolinės grupės gyvūnų mirštamumas tyrimo pabaigoje (praėjus 84 dienoms po aloksano įvedimo) buvo 70 %, tuo tarpu kai žiurkių, gavusių Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptidą – 36,4 %. Taigi, Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptido vartojimas du kartus sumažino aloksaninį diabetą turinčių gyvūnų mirštamumą.

3 pavyzdys. Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ poveikis į aloksaninio diabeto eigą bandyme su žiurkėmis (profilaktikos ir gydymo variantas)

Tyrimas buvo atliekamas su 15 baltosios maišytos veislės žiurkių patinėlių, kurių vidutinė kūno masė 375±35 g. Gyvūnai buvo atsitiktinai padalinti į 2 grupes. Kontroliniai gyvūnai gavo vieną kartą per dieną intraveninę 0,3 ml 0,9 % NaCl tirpalo injekciją, o pagrindinės grupės gyvūnai gavo 3 µg (0,3 ml 0,9 % NaCl tirpale) Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptido dozę vienai žiurkei 7 dienas. Po to visiems gyvūnams buvo vieną kartą suleista į veną 1 ml aloksano tirpalo ("Spofa") 35 mg/kg dozė. Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptidas buvo leidžiamas tris dienas po aloksano įvedimo. Po to kontrolinėms žiurkėms buvo duotas antras Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptido kursas nuo 18 iki 28 dienos (viso 11 dienų), imant tą pačią dozę.

Tyrimo rezultatai parodyti 2 lentelėje. Pirmiausia reikia paminėti, kad sveikiems gyvūnams Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptidas nemažina gliukozės kiekio kraujyje. Kontroliniai gyvūnai viso eksperimento metu po aloksano įvedimo rodė cukrinio diabeto vystymąsi, lydimą gliukozės koncentracijos kraujyje didėjimo 1,9 – 4,9 kartus, lyginant su pradiniu kiekiu. Žiurkės, gavusios vieną Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptido kursą, turėjo sumažintą gliukozės kiekį kraujyje 22-30 %,

lyginant su kontrole. Po antrojo Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptido kurso šie gyvūnai rodė visišką gliukozės kiekio kraujyje normalizaciją visais eksperimento laikotarpiais (28-tą, 33-ią, 40-tą dieną), tuo tarpu kai kontrolinės grupės gyvūnų gliukozės kiekis kraujyje buvo atitinkamai padidintas 2, 4,2, 3,8 kartus.

Reikia pažymėti, kad tik 2 žiurkės iš 8 gydytų Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptidu turėjo sunkų cukrinį diabetą, tuo tarpu kontrolinėje grupėje buvo 5 iš 7, taigi kontrolinėje grupėje šis rodiklis buvo 2,9 karto didesnis.

Pabaigus tyrimą (40-tą dieną po aloksano įvedimo) išgyveno 57,1 % kontrolinių gyvūnų, ir 75 % gyvūnų, gydytų Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptidu.

Šio tyrimo rezultatai rodo, kad Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptidas duoda įnašą į gliukozės kiekio normalizaciją aloksaninio diabeto žiurkų atveju, ir ją lydi mirštamumo sumažėjimas.

4 pavyzdys. Skirtingų Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptido dozių poveikis į aloksaninio diabeto eigą bandyme su žiurkėmis

Tyrimas buvo atliekamas su 23 baltosios maišytos veislės žiurkių patinėliais, kurių vidutinė kūno masė 375±35 g. Visi gyvūnai gavo vienkartinę intraveninę 1 ml aloksano tirpalo ("Spofa") 35 µg/kg dozę.

Tada šie gyvūnai buvo atsitiktinai padalinti į 3 grupes. Kontroliniams gyvūnams buvo leidžiama į pilvą 0,3 ml 0,9% NaCl tirpalo vieną kartą per dieną. Antrosios ir trečiosios grupės žiurkės gavo 1 µg (0,1 ml 0,9% NaCl tirpale) ir 10 µg (0,1 ml 0,9% NaCl tirpale) Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptido dozę vienai žiurkei 7 dienas.

3 lentelėje parodyti šio eksperimento rezultatai. Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptido įvedimas žiurkėms, imant 1 µg dozę, davė padidintą gliukozės kiekį 1-ą ir 4-tą dienomis po tetrapeptido kurso atitinkamai 17,3 ir 12,3 % lyginant su kontrolėmis. Duodant Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptidą žiurkėms 10 µg doze, gaunamas dar labiau išreikštas gliukozės kiekio sumažėjimas 30, 23,8, 26, 12,7 %

atitinkamai 1, 4, 7, 17-tą dienomis. Šie duomenys rodo, kad Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptido dozės padidėjimas pastebimai veikia gliukozės kiekį gyvūnų kraujyje.

5 pavyzdys. Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptido poveikis į aloksaninį diabetą turinčių žiurkių gliukozės kiekį kraujyje

Tyrimas buvo atliekamas su 18 baltosios maišytos veislės žiurkių patinėlių, kurių vidutinė kūno masė 375±35 g. Nustačius gliukozės koncentraciją kraujyje, visi gyvūnai buvo atsitiktinai padalinti į 2 grupes. Tada visiems gyvūnams buvo duota vienkartinė intraveninė aloksano tirpalo ("Spofa") injekcija, imant 35 mg/kg dozę. Penkiolikos dienų bėgyje kontroliniams gyvūnams buvo suleidžiama intraperitoniškai vieną kartą per dieną 0,3 ml 0,9 % NaCl tirpalo, o pagrindinės grupės žiurkės gavo 3 µg (0,3 ml 0,9 % NaCl tirpale) vienai žiurkei Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptido dozę 11 dienų.

Bandymo rezultatai pateikti 4 lentelėje, kurie rodo, kad 15-tą dieną po aloksano įvedimo gyvūnai įgavo cukrinį diabetą. Žiurkių, kurioms buvo duodamas Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptidas, insulino kiekis kraujyje 8 dienų bėgyje po medžiagos įvedimo buvo 3,9 kartus didesnis nei kontrolinės grupės žiurkių. Visi tolimesni eksperimento metu vykdyti tyrimai rodė tam tikrą insulino kiekį žiurkių kraujyje (13-18 %), tuo tarpu kai kontrolinių gyvūnų kraujyje insulino iš viso nebuvo. Pabaigus eksperimentą (70-tą dieną po aloksano įvedimo), 62,5 % kontrolinių gyvūnų buvo gyvi, gyvūnų, gavusių Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptido gyvų buvo 70 %.

Šio eksperimento rezultatų analizė rodo, kad Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptido įvedimas gyvūnams su aloksaniniu diabetu palaiko insulino kiekį kraujyje, kuris gali atsirasti dėl dalinio insuliną produkuojančių ląstelių struktūros ir funkcijos palaikymo.

6 pavyzdys. Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptido poveikis į aloksaninį diabetą turinčių žiurkių cukraus kreivės rodiklius (gydymo variantas)

Tyrimas buvo atliekamas su 13 žiurkių patinėlių, įtrauktų į ankstesnius tyrimus (gydymo variantai – praėjus 44 dienoms po to, kai buvo baigtas Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptido panaudojimas). Atskirą grupę sudarė 7 sveikos žiurkės, turinčios tokią pačią kūno masę. Visiems gyvūnams intraveniniu būdu, prieš tai nustačius gliukozės koncentraciją kraujyje, buvo suleista 1 ml 2 % gliukozės tirpalo.

5 lentelėje parodyti bandymo rezultatai, kurie rodo, kad sveikoms žiurkėms po gliukozės suleidimo jos koncentracija po 5 min. buvo – 203,9%, 30 min – 156,3%, 60 min. – 124,6 %, 120 min. – 114,5 % lyginant su pradiniu kiekiu (100%). Kontroliniuose gyvūnuose šis rodiklis buvo atitinkamai 129,8, 127,5, 123,5, 121,1 %. Šie duomenys rodo stiprią kasos funkcijos supresiją po pažeidimo aloksanu. Tas pats rodiklis žiurkėms, kurios buvo gydytos Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptidu, buvo 142,9, 97,3, 95,6, 77,9 %. Šio tyrimo rezultatai rodo, kad Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptidas gali stimuliuoti žiurkių, kenčiančių nuo aloksaninio diabeto, kasos funkciją.

7 pavyzdys. Insulino poveikis į aloksaninį diabetą turinčių žiurkių gliukozės kiekį kraujyje po Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptido vartojimo

Tyrimas buvo atliekamas su 13 žiurkių patinėlių, įtrauktų į ankstesnius tyrimus (gydymo variantas – praėjus 28 dienoms po to, kai buvo baigtas Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptido panaudojimas). Atskirą grupę sudarė 7 sveikos žiurkės, turinčios panašią kūno masę. Visiems gyvūnams intraveniniu būdu buvo suleista insulino (0,3 vienetai) ir po to buvo nustatyta gliukozės koncentracija jų kraujyje.

6 lentelėje parodyti bandymo rezultatai. Sveiki gyvūnai rodė didelį fiziologinį gliukozės kiekio sumažėjimą, tuo tarpu kontrolinių gyvūnų (sergančių aloksaniniu diabetu) šis rodiklis buvo 2,8 karto mažesnis.

Aloksaninį diabetą turintys gyvūnai, paveikti Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptidu, aiškiai rodė, kad gliukozės kiekis sumažėjo po insulino įvedimo beveik 2 kartus, lyginant su kontroline grupe. Šie duomenys rodo Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptido sugebėjimą palaikyti dideliu laipsniu audinio jautrumą insulinui.

Šio tyrimo metu nustatytos Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptido savybės duoda pagrindą rekomenduoti jį naudoti profilaktikoje ir gydymui kaip medžiagą, reguliuojančią gliukozės kiekį kraujyje gydant cukrinį diabetą.

Žemiau parodyti pasiūlyto tetrapeptido klinikinių tyrimų rezultatai rodo jo farmakologines savybes ir patvirtina išradimo įgyvendinimo galimybę.

8 pavyzdys. Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptido vartojimo efektyvumas pacientams, turintiems cukrinį diabetą

Tyrimas buvo atliekamas su 36 pacientais nuo 16 iki 83 metų (7 vyrai, 29 moterys). Dvidešimt trims pacientams buvo diagnozuotas 1 tipo cukrinis diabetas, 13 pacientų – 2 tipo diabetas. Ligos trukmė svyravo nuo 1 iki 30 metų. 32 pacientai gavo insuliną. Dauguma sergančiųjų cukriniu diabetu pacientų turėjo hospitalinę dekomensaciją. Šių pacientų gliukozės kiekis nevalgius svyravo nuo 9,5 iki 27 μm/l; glikozilinto hemoglobino – nuo 7,8 iki 12,7 %. Visiems šiems pacientams buvo skirta griežta dieta. Visi pacientai buvo atsitiktinai suskirstyti į 2 grupes, nepriklausomai nuo amžiaus, lyties, ligos trukmės ir stadijos (7 lentelė). Kartu su standartiniu gydymo būdu 16 pacientų buvo paskirta 10 μg (1 ml 0,9 % NaCl tirpale) Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptido dozė vieną kartą dienoje 10 dienų. Keturiems pacientams, sergantiems 2 tipo cukriniu diabetu kartu su standartiniu gydymo kursu buvo paskirta 100 μg (1 tabletė) Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptido dozė du kartus per dieną prieš valgį 10 dienų. Kontrolinės grupės pacientai gavo 1 ml 0,9 % NaCl tirpalo kaip placebo pagal tą pačią schemą.

Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptido efektyvumo tyrimo rezultatai parodyti 8 lentelėje. Aštuoniems pacientams (iš 16 gydytų insulinu) Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptido kursas davė insulino dienos dozės sumažėjimą vidutiniškai 8 vienetais, ir tai leido pasiekti kompensaciją.

Šešiems pacientams insulino dozė liko nepakitusi ir buvo registruota kompensacija. Tik 2 pacientams, norint pasiekti kompensaciją, insulino dozė buvo padidinta: 1-am pacientui – 4 vienetais, 2-am pacientui – 14 vienetų. Tuo pačiu metu kontrolinėje grupėje (16 insulino gaunančių pacientų) tik 2 pacientams dozė liko nepakitusi, 14 pacientų, norint pasiekti kompensaciją, insulino dozė buvo padidinta 4-8 vienetais.

Pagrindinės grupės pacientams, turintiems 2 tipo cukrinį diabetą (1 pacientas) ir 1 tipo cukrinį diabetą (3 pacientai), kurie gavo Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptidą tabletėmis kasdien, insulino dozė buvo sumažinta 25 vienetais, o pacientams, kurie buvo veikti peroraliniu priešdiabetiniu vaistu, buvo pasiekta visiška kompensacija ir preparatų dozė buvo sumažinta praktiškai du kartus.

Tokiu būdu Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptido vartojimas pacientams, sergantiems cukriniu diabetu, davė audinių jautrumo padidėjimą insulino atžvilgiu ir tam tikru dydžiu kasos funkcijos atsistatymą. Reikia pažymėti, kad buvo užregistruotas gana didelis Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptido efektyvumas, kuris buvo patvirtintas 50 % pagrindinės grupės pacientų insulino kiekio sumažėjimu, tu tarpu kai kontrolinėje grupėje tokio poveikio nebuvo nei vienam pacientui.

Aukščiau pateiktam aprašymui patvirtinti mes pateikiame 3 trumpus išrašus iš ligų istorijų.

Išrašas iš ligos istorijos Nr.1

Pacientė K., 69 metų amžiaus, 2 grupės invalidė. Pacientė serga cukriniu diabetu 17 metų. Nuo 1986 m. ji gavo priešdiabetinį vaistą tabletėmis, nuo 1996 m. šie vaistai buvo pakeisti insulinu. Pacientės apžiūra parodė vėlyvas diabetines komplikacijas.

Diagnozė: 2 tipo cukrinis diabetas, antrinis rezistentiškumas insulinui, diabetinė retinopatija, polineuropatija, diabetinė nefropatija, simptominė hipertenzija.

Priėmus gydyti: gliukozės kiekis kraujyje – 10 $\mu\text{mol/l}$, dvi valandos po valgio – 14 $\mu\text{mol/l}$. Kraujo klinikinė analizė – normali, proteinuria – iki 0,66 g/l, EKG – kairiojo širdies skilvelio hipertrofija. Insulino dienos dozė – 82 vienetai.

Gydymas: dieta, B grupės vitaminai, berlitionas, parenterinė farmacinės kompozicijos, turinčios Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptido, forma, 10 μg į raumenis 10 dienų laikotarpyje.

Išrašant iš ligoninės 18-tą dieną: gliukozės kiekis kraujyje nevalgius – 5,9 $\mu\text{mol/l}$. Insulino dienos dozė – 56 vienetai (sumažėjo 26 vienetais lyginant su pradiniu kiekiu). Aiškiai pagerinti koaguliacijos rodikliai.

Išrašas iš ligos istorijos Nr.2

Pacientas M., 40 metų amžiaus, 2 grupės invalidas. Jis serga cukriniu diabetu 13 metų ir nuo pat ligos pradžios gydytas insulinu.

Diagnozė: 1 tipo cukrinis diabetas, vidutinė stadija, diabetinė retinopatija, polineuropatija, encefalopatija.

Priėmus gydyti: gliukozės kiekis kraujyje nevalgius – 17,8 $\mu\text{mol/l}$. Kraujo ir šlapimo klinikinė analizė – normali. Insulino dienos dozė – 40 vienetų.

Gydymas: dieta, B grupės vitaminai, parenterinė farmacinės kompozicijos, turinčios Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptido, forma, 10 μg į raumenis 10 dienų laikotarpyje.

Išrašant iš ligoninės 15-tą dieną: gliukozės kiekis kraujyje nevalgius – 3,4 $\mu\text{mol/l}$. Insulino dienos norma – 32 vienetai (sumažėjo 8 vienetais lyginant su pradiniu kiekiu).

Išrašas iš ligos istorijos Nr.3

Pacientė L., 83 metų amžiaus. Ji serga cukriniu diabetu 25 metus, buvo gydyta įvairiomis priešdiabetinėmis piliulėmis. Laikosi griežtos dietos, dabartinė pacientės būklė patenkinama.

Diagnozė: 2 tipo cukrinis diabetas, diabetinė retinopatija.

Priėmus gydyti: gliukozės kiekis kraujyje nevalgius – 11 $\mu\text{mol/l}$. Kraujo ir šlapimo klinikinė analizė – normali. Naudoja 2 diabetono tabletes kasdien. Kadangi pacientė parodė rezistentiškumą priešdiabetiniams piliulinams preparatams, jai buvo rekomenduota naudoti insuliną. Bet pacientė atsisakė

gydytis insulinu, todėl jai buvo paskirta peroralinė farmacinės kompozicijos, turinčios Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptido, forma, 100 µg (1 tabletė) du kartus per dieną prieš valgį 10 dienų laikotarpyje kartu su 2 diabetono tabletėmis. Antrąją dieną gliukozės kiekis kraujyje nevalgius buvo 6 µmol/l. Tada diabetono dozė buvo sumažinta du kartus. Pabaigus gydymo kursą Lys-Glu-Asp-Trp-NH₂ tetrapeptidu, gliukozės kiekis kraujyje buvo normos ribose, Dabartinė pacientės būklė patenkinama.

1 lentelė

Gyvūnų grupė	Gliukozės koncentracija kraujyje (mg %)									
	Pradinis lygis	Praėjus 15 dienų po aloksano įvedimo	Praėjus 8 dienoms nuo Lys-Glu- Asp-Trp-NH ₂ tetrapeptido įvedimo	Pabaigus peptido Lys-Glu-Asp-Trp-NH ₂ vartojimą (dienos)						
				1	9	18	28	44	58	
Kontrolė (NaCl)	84,0±5,7	345,0±15,4	360,0±12,3	342,5±17,3	351,4±11,2	368,3±11,2	375,7±11,2	347,2±12,8	332,1±13,7	
n	10	10	9	8	7	6	5	5	3	
Tetrapeptidas Lys-Glu-Asp -Trp-NH ₂	81,1±3,8	333,6±12,4	254,5±16,2*	222,5±10,3*	183,9±10,5*	236,7±10,3*	221,5±11,2*	210,8±9,3*	198,9±11,5*	
n	11	11	11	10	9	9	8	8	7	

* - P<0,001 lyginant su kontrole

* - P<0,001 lyginant su kontrole

2 lentelė

Gyvūnų grupė	Pradinis lygis	Praėjus 7 dienoms nuo Lys-Glu-Asp-Trp-NH ₂ tetrapeptido įvedimo (1 kursas)	Gliukozės koncentracija kraujyje (mg %)					
			Po aloksano įvedimo (dienos)					
			5	14	21	28	33	40
Kontrolė (NaCl)	82,7±0,9	96,4±1,0	351,7±19,4*	333,7±55,8*	345,6±57,8*	156,4±26,4*	383,0±89,3*	405,0±89,8*
n	7	7	7	6	5	5	4	4
Tetrapeptidas Lys-Glu-Asp-Trp-NH ₂	76,8±1,1	94,0±0,8	247,3±17,2**	261,5±39,5**	159,0±32,6**	77,3±1,3 [#]	90,7±5,2 [#]	107,7±6,4 [#]
n	11	11	10	9	9	8	8	7

* - P<0,001 lyginant su kontrole

** - P<0,02 lyginant su kontrole

LT 5421 B

Gyvūnų grupė	Gliukozės koncentracija kraujyje (mg %)									
	Pradinis lygis	Po aloksano įvedimo (dienos)		Po Lys-Glu-Asp-Trp-NH ₂ tetrapeptido įvedimo (dienos)						
		7	14	1	4	7	14	21		
Kontrolė (NaCl)	78,6±4,2	276,4±0,9	272,1±9,8	275,7±9,7	278,6±9,8	277,9±11,1	275,0±10,5	285,0±12,9		
n	7	7	7	7	7	7	6	6		
Tetrapeptidas Lys-Glu-Asp-Trp-NH ₂ (1 mkg)	80,6±2,8	245,6±12,3	261,7±12,3	228,3±10,7*	244,4±12,2*	269,4±8,6	268,8±12,4	272,5±9,9		
n	9	9	9	9	8	8	8	8		
Tetrapeptidas Lys-Glu-Asp-Trp-NH ₂ (10 mkg)	83,9±3,4	247,2±14,0	252,2±7,9	193,3±6,7*	212,2±7,3*	205,6±8,4*	240,0±7,9*	248,3±13,5		
n	7	7	7	7	7	7	6	6		

* - P<0,05 lyginant su kontrole

4 lentelė

Insulino kiekis kraujyje (mkTV/ml)								
Gyvūnų grupė	Pradinis lygis	Praėjus 15 dienų nuo aloksano įvedimo	Praėjus 8 dienoms nuo Lys-Glu-Asp-Trp-NH ₂ tetrapeptido įvedimo	Pabaigus tetrapeptido Lys-Glu-Asp-Trp-NH ₂ vartojimą (dienos)				
				1	9	18	28	44
Kontrolė (NaCl)	24,3±2,1	2,0±0,7	0,8±0,25	0	0	0	0	0
n	8	8	8	7	6	5	5	5
Tetrapeptidas Lys-Glu-Asp-Trp-NH ₂	23,8±2,8	1,5±0,4	3,1±1,1*	3,6±0,7 [#]	3,2±0,5 [#]	4,3±0,5 [#]	4,1±0,6 [#]	3,9±1,1 [#]
n	10	10	10	8	7	7	7	7

* - P<0,05 lyginant su kontrole

[#] - P<0,001 lyginant su kontrole

5 lentelė

Gyvūnų grupė	Pradinis lygis	Laikas po gliukozės įvedimo (min.)			
		5	30	60	120
Sveiki	84,5±4,2	172,3±8,1	132,1±9,1	105,3±6,2	96,8±5,3
n	7	7	7	7	7
Kontrolė (NaCl)	347,2±12,8*	450,5±15,2*	442,7±14,3*	428,9±14,1*	420,5±16,5*
n	5	5	5	5	5
Tetrapeptidas Lys-Glu-Asp-Trp-NH ₂	210,8±9,3 [#]	301,2±10,5 [#]	205,1±11,8 [#]	201,5±13,2 [#]	164,2±12,8 [#]
n	8	8	8	8	8

* - P<0,001 lyginant su sveikais gyūnais

[#] - P<0,05 lyginant su kontrole

LT 5421 B

6 lentelė

Gyvūnų grupė	Gliukozės koncentracija kraujyje (mg %)		Gliukozės kiekio sumažėjimas pradinio kiekio atžvilgiu (%)
	Pradinis lygis	Praėjus 30 min. po insulino įvedimo	
Sveiki	83,5±3,2	29,4±2,2	64,8
n	8	8	
Kontrolė (NaCl)	375,7±11,2*	287,8±12,5*	23,4
n	5	5	
Tetrapeptidas Lys-Glu-Asp-Trp-NH ₂	221,5±11,2 [#]	123,6±8,3 [#]	44,2
n	8	8	

* - P<0,001 lyginant su sveikais gyūnais

[#] - P<0,05 lyginant su kontrole

7 lentelė

Rodiklis	Pacientų grupė	
	Kontrolė (placebas)	Pagrindinė (tetrapeptidas Lys-Glu-Asp-Trp-NH ₂)
Pacientų skaičius	16	20
Vyrai	3	4
Moterys	13	16
Pacientų su 1 tipo cukriniu diabetu skaičius	11	12
Pacientų su 2 tipo cukriniu diabetu skaičius	5	8

8 lentelė

Rodiklis	Pacientų grupė	
	Kontrolė (placebas)	Pagrindinė (tetrapeptidas Lys-Glu-Asp-Trp-NH ₂)
Pacientų skaičius	16	16
Sumažinta insulino dozė, kurios reikia kompensacijai pasiekti	0	8
Ta pati insulino dozė, kurios reikia kompensacijai pasiekti	2	6
Padidinta insulino dozė, kurios reikia kompensacijai pasiekti	14	2

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Tetrepeptidas lizil-glutamil-aspartil-triptofan-amidas, kurio bendroji formulė $\text{Lys-Glu-Asp-Trp-NH}_2$ [SEQ D NO:1].
2. Sekos [SEQ D NO:1] tetrapeptidas lizil-glutamil-aspartil-triptofan-amidas, kurio bendroji formulė $\text{Lys-Glu-Asp-Trp-NH}_2$, pasižymintis gliukozės kiekio reguliavimo biologiniu aktyvumu.
3. Peptidinės prigimties vaistinės medžiagos kompozicija, galinti reguliuoti gliukozės kiekį, turinti veiklų peptidinį agentą ir farmaciniu požiūriu priimtina nešiklį, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad joje kaip veiklusis pagrindas yra efektyvus kiekis tetrapeptido $\text{Lys-Glu-Asp-Trp-NH}_2$.
4. Medžiaga pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėta medžiaga yra pateikta peroraliniam vartojimui tinkamoje formoje.
5. Medžiaga pagal 3 punktą, b e s i s k i r i a n t i tuo, kad minėta medžiaga yra pateikta parenteriniam vartojimui tinkamoje formoje.
6. Farmakologinės medžiagos, turinčios kaip veiklų peptidinį agentą efektyvų kiekį tetrapeptido $\text{Lys-Glu-Asp-Trp-NH}_2$, panaudojimas gamybai vaisto, skirto cukrinio diabeto profilaktikai arba gydymui, skiriant pacientui 0,1-30 $\mu\text{g/kg}$ kūno masės dozėmis bent vieną kartą per dieną laikotarpį, reikalingą terapiniam efektui pasiekti.
7. Farmakologinės medžiagos panaudojimas pagal 6 punktą gamybai vaisto, skirto parenteriniam vartojimui.
8. Farmakologinės medžiagos panaudojimas pagal 6 punktą gamybai vaisto, skirto peroraliniam vartojimui.
9. Farmakologinės medžiagos panaudojimas pagal 7 punktą, kur minėta farmakologinė medžiaga pagal 3-5 punktus yra veikli, kai ji yra vartojama 0,1-30 $\mu\text{g/kg}$ kūno masės dozėmis.