



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 302 067**

51 Int. Cl.:
C07K 5/103 (2006.01)
A61K 38/07 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04808996 .5**
86 Fecha de presentación : **07.12.2004**
87 Número de publicación de la solicitud: **1758923**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **07.03.2007**

54 Título: **Sustancia peptídica que restaura la función del miocardio.**

30 Prioridad: **22.06.2004 RU 2004118699**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.07.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.07.2008

73 Titular/es: **"Access Bioscience" CJSC**
1 Kropotkina str., Office 314
Saint-Petersburg 197101, RU

72 Inventor/es: **Khavinson, Vladimir Khatskelevich;**
Ryzhak, Galina Anatolievna;
Grigoriev, Evgeny Iosifovich y
Ryadnova, Irina Yurievna

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Sustancia peptídica que restaura la función del miocardio.

5 La invención se relaciona con medios medicinales de tratamiento de enfermedades cardiovasculares y se puede utilizar como unos medios de restauración de la función del miocardio en la terapia de diferentes formas de esta patología.

10 En la actualidad subsiste el problema de la prevención y la terapia de las enfermedades cardiovasculares debido a la severidad y expansión de esta última. Se ha revelado una tendencia hacia el desarrollo incrementado de la patología cardiovascular, que estipula la incapacidad y mortalidad anteriores. A este respecto el desarrollo de nuevas sustancias medicinales para la terapia de enfermedades cardiovasculares es de crecimiento público cada vez mayor.

15 Las formas más extensas de la patología cardíaca se relacionan con la isquemia cardíaca, que ocurre como un resultado de alteraciones del sistema vascular y en sus formas severas pueden generar infarto del miocardio en la sociedad actual. La enfermedad cardíaca conduce a condiciones tales como contracción del miocardio alterada, excitación y capacidad conductiva. A pesar de eso, uno debe distinguir un grupo separado de enfermedades del músculo cardíaco. La terapia de las cuales se limita principalmente a terapia de refuerzo general y es bastante sintomática. Estas enfermedades incluyen distrofia del miocardio, miopatías y cardiomiopatías.

20 Entre los medios de la prevención de isquemia de miocardio existen sustancias farmacológicas de diferentes grupos, que incluyen agonistas para calcio: amlodipina, verapamil, felodipin (Register of Pharmaceutical Substances of Russia. Drug Encyclopedia - Moscow, 2003. - p.90, p. 180, p. 865 (rus.) y beta adrenobloqueadores, similares a propanolol, pindolol (Register of Pharmaceutical Substances of Russia. Drug Encyclopedia - Moscow, 2003. - p.700, p. 659 (rus.)). Una peculiaridad de la acción de estas sustancias consiste en la reducción de la necesidad de oxígeno del miocardio, así como también un efecto inotrópico negativo. Otra clase de preparaciones extensamente aplicadas se representa por preparaciones nitrosas (diferentes formas de nitrosorbida y mononitrato, nitromint- preparación de nitroglicerina en aerosol limpio) (Register of Pharmaceutical Substances of Russia. Drug Encyclopedia - Moscow, 2003. - p.588, p. 332, p. 587).

30 De estas preparaciones uno también puede utilizar glicósidos cardíacos sintéticos y naturales (preparations of Digitalis L., Strophanthus, Convallaria L.) (MD. Mashkovskij. Medicinal preparations. Moscow, Novaya Volna. 2004. - p. 215 (rus.)). Junto con los glicósidos cardíacos la actividad del corazón se puede mejorar mediante cardiotónicos no glicósidos. Los cardiotónicos incluyen preparaciones simpatomiméticas (adrenérgicas) de dobutamina y dopamina. (Register of Pharmaceutical Substances of Russia. Drug Encyclopedia - Moscow, 2003. -p. 296, p. 305 (rus.)). Ciertas propiedades cardiotónicas se revelan por sustancias que ejercen efecto positivo general sobre los procesos metabólicos en el organismo.

40 Estas preparaciones tienen una desventaja - ellas ejercen efectos colaterales y tienen contraindicaciones. En particular, la mayoría de tales preparaciones ejercen un efecto supresor sobre la sensibilidad del miocardio sobre la excitación, induce arritmias, fallas cardíacas, hipotonía, bradicardia, así como también síndrome de cancelación.

45 Entre las preparaciones medicinales conocidas utilizadas para la terapia del miocardio es necesario mencionar la actovegina (Register of Pharmaceutical Substances of Russia. Drug Encyclopedia - Moscow, 2003. - p.63 (rus.) como una preparación efectiva sobre el metabolismo celular y que mejora los procesos metabólicos dependientes de energía en los tejidos, sin embargo su actividad no es específica.

50 Existen preparaciones de péptido conocidas, que ejercen un efecto sobre la función del miocardio. Ellas incluyen péptidos opiodes (A.F. Usynin, V.S. Pavlenko, V.V. Khlystov. Ischemic myocardium damage and the influence of certain pharmacological substances on it in experimental rats. Actual Issues of Cardiology. Issue 2 - Tomsk, Tomsk University Publishing, 1987. - p. 116-118 (rus.) y dalargina, su análogo sintético (Register of Pharmaceutical Substances of Russia. Drug Encyclopedia - Moscow, 2003. - p.249 (rus.)).

55 El Dalargin se conoce por ser aplicado a la terapia de infarto del miocardio como medio de prevención de fibrilaciones de los ventrículos del corazón (Patente RU N°2032422 "Method of myocardium infarction therapy", MKI6 A61K38/00, 1995). Más aún, hay una sustancia conocida, que permite el mejoramiento del estado funcional del miocardio por medio de la corrección de las alteraciones metabólicas basado en la aplicación combinada de dalargina y solcoseril (Patente RU N°2061484 Method of "myocardium infarction therapy on its acute stage", MKI6 A61K35/14, A61K38/33, 1996).

60 El cordialin, un complejo estandarizado de péptido de bajo peso molecular del corazón se conoce por tener un efecto cardioprotector en el periodo de restauración cuando se administra después de un envenenamiento agrícola, TMTD, que origina daños a los cardiomiocitos (Base de datos Biosis, número de acceso de base de datos PREV 199395091835).

65 También se conoce una preparación de polipéptido (Patente RU No. 1417242 para la invención "Method of obtaining of the substance restoring myocardium function", MKI A 61K 35/24, 1989), obtenido de corazón de animal y que revela similitud de la actividad biológica, que es el análogo más cercano, que sirve como un prototipo para unos medios farmacológicos (composición farmacéutica).

Sin embargo, esta aplicación de la preparación se limita debido al método complejo de su obtención, bajo rendimiento de sustancias activas, variabilidad significativa de sus propiedades físicas y químicas, así como también debido a la posibilidad de los efectos colaterales en la forma de reacciones alérgicas.

5 Es valioso notar que la sustancia de péptido reivindicada-tetrapéptido no tiene ningún análogo en términos de estructura.

La invención reivindicada está destinada a obtener nuevas sustancias biológicamente activas de naturaleza de péptido que restaura la función del miocardio.

10 El resultado técnico de la invención consiste en la creación de una nueva sustancia de péptido, así como también de la preparación farmacológica (composición farmacéuticamente), que contiene esta sustancia de péptido activo, que, se incluye en la medicación, contribuye a la restauración de la función del miocardio.

15 La posibilidad de la realización objetiva del resultado técnico mientras se utiliza la invención se ha confirmado por los datos confiables mostrados en los ejemplos, que contienen datos experimentales, obtenidos en los métodos estandarizados en este campo.

Esta invención se refiere a los nuevos alanil-glutamyl-aspartil-arginina tetrapéptidos con fórmula general Ala-Glu-Asp-Arg de secuencia 1 [SEQ ID NO: 1].

20 El tetrapéptido se obtiene utilizando el método clásico de síntesis de péptido en la solución (Jacubke H-D., Eschkeit H. Amino acids, peptides, proteins. Traducción del Alemán- Moscú, Mir Publishing Company, 1985 - 456 p.). Esta invención se refiere a alanil-glutamyl-aspartil-arginina tetrapéptido con la Fórmula general Ala-Glu-Asp-Arg de secuencia 1 [SEQ ID NO:1], que revela la actividad biológica, que consiste en la restauración de la función del miocardio.

La actividad del Ala-Glu-Asp-Arg tetrapéptido, ayuda en la restauración de la función del miocardio, se revela en el curso de su estudio en caso de patología experimental, en particular cuando se utilizan los siguientes patrones:

- 30 • Efecto del tetrapéptido en el curso del infarto del miocardio experimental en el caso de vasoligación de arteria coronaria en ratas;
- Efecto del tetrapéptido en el estatus de corazón aislado en el caso de perfusión e isquemia;
- 35 • Efecto del tetrapéptido en el caso de distrofia por adrenalina en miocardio de rata;
- Detección de la actividad protectora del tetrapéptido en caso de miocardiopatías toxicoquímicas experimentales;
- 40 • Efecto del tetrapéptido en el desarrollo del resultado de arritmia cloro-calcio en ratas;
- Efecto del tetrapéptido en el crecimiento de explantes de cultivo cardiaco órgano típicos de ratas en pubertad;
- 45 • Efecto del tetrapéptido en bioenergéticos de cardiomiocitos.

Se sabe que las patologías descritas anteriormente se caracterizan por la formación de zonas de necrosis de cardiomiocitos, reacciones dependientes de oxígeno desbalanceadas en el miocardio: procesos de oxidación biológica con déficit creciente de energía, el gasto incrementado de compuestos macroérgicos, la acumulación de compuestos oxidados insuficientemente, productos de oxidación de peróxido lípido. La transferencia de calcio y el metabolismo se alteran, así como también la distribución de los últimos entre los grupos celulares y el espacio intercelular. Los cambios observados conducen a la alteración en la función, la contracción incrementada de compuestos macroérgicos, la acumulación de compuestos insuficientemente oxidados, productos de oxidación de peróxido lípido. Los cambios observados conducen a la interrupción de la función de contracción del miocardio, así como también arritmia, y origina el desarrollo de la patología cardiovascular.

55 El estudio experimental muestra que el tetrapéptido Ala-Glu-Asp-Arg no es tóxica.

Esta invención también se refiere a la preparación farmacológica (composición farmacéuticamente preparada) que restaura la función del miocardio y que contiene una cantidad efectiva de tetrapéptido alanil-glutamyl-aspartil-arginina como su base activa, con la Fórmula general Ala-Glu-Asp-Arg de secuencia 1 [SEQ ID NO: 1].

60 La noción "medios farmacológicos (sustancia)" de acuerdo con esta patente implica el uso de tal forma medicinal que contiene la cantidad efectiva de tetrapéptido con la Fórmula general Ala-Glu-Asp-Arg, que puede hallar un uso profiláctico y/o terapéutico en medicina como una preparación que restaura la función del miocardio.

65 La noción "cantidad efectiva" de acuerdo con esta reivindicación implica el uso de tal una cantidad de base de péptido activa, que en cumplimiento con los índices cuantitativos de su actividad y toxicidad, así como también con respecto al conocimiento disponible, serán efectivos en esta forma de droga.

Con el fin de obtener las composiciones farmacéuticas presentadas en esta invención, el tetrapéptido sugerido se mezcla como un ingrediente activo con un portador farmacéuticamente aceptable de acuerdo con los métodos de formación de compuestos utilizados en farmacéutica.

El portador puede tener diferentes formas, que dependen de la forma farmacéutica de la preparación, que se debe administrar en el organismo, por ejemplo, parenteralmente u oralmente.

Los componentes farmacéuticos conocidos se pueden utilizar en el proceso de producción de las composiciones en la dosificación preferida para administración oral.

En el caso de la administración parenteral el portador usualmente incluye 0.9% de solución de cloruro de sodio o agua estéril, aunque otros ingredientes, que contribuyen a la estabilidad de la preparación, también se pueden incluir.

La materia objeto de la invención se explica por las tablas.

La tabla 1 muestra el efecto del tetrapéptido Ala-Glu-Asp-Arg sobre los índices bioquímicos en miocardio de rata en caso de infarto experimental (variante de tratamiento).

La tabla 2 muestra el efecto del tetrapéptido Ala-Glu-Asp-Arg sobre el estatus de corazón de conejillo de indias aislado (variante de tratamiento).

La Tabla 3 muestra el efecto del tetrapéptido Ala-Glu-Asp-Arg sobre los índices de capacidad de contracción del corazón de rata aislado después de isquemia.

La tabla 4 muestra el efecto del tetrapéptido Ala-Glu-Asp-Arg sobre los índices de oxidación de lípido peróxido en miocardio de ratas en el caso de distrofia por adrenalina 24 horas después de su inducción.

La tabla 5 muestra el efecto del tetrapéptido Ala-Glu-Asp-Arg sobre la actividad deshidrogenasa y el contenido de glicógeno en miocardio de rata en 4 horas después de distrofia por adrenalina.

La tabla 6 muestra el efecto del tetrapéptido Ala-Glu-Asp-Arg en los índices citomorfológicos en miocardio en caso de envenenamiento de rata con disulfuro de tiuran tetrametilo.

La tabla 7 muestra el efecto del tetrapéptido Ala-Glu-Asp-Arg sobre los índices que reflejan el desarrollo y el resultado de la anemia por calcio-cloro en ratas.

La tabla 8 muestra el efecto del tetrapéptido Ala-Glu-Asp-Arg en el crecimiento de explantes de tejido de miocardio organotípico.

La tabla 9 muestra el efecto del tetrapéptido Ala-Glu-Asp-Arg sobre índices bioquímicos y morfológicos de sangre periférica de conejillo de indias.

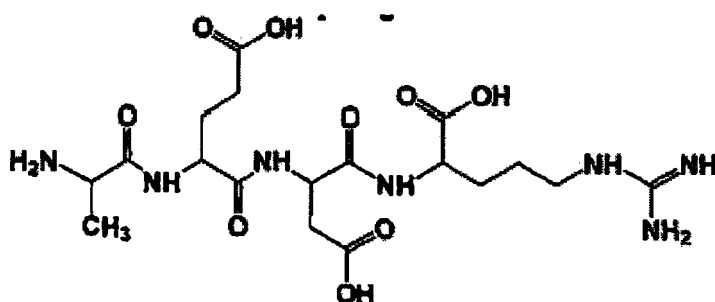
Esta invención se ilustra por un ejemplo de síntesis del tetrapéptido con la Fórmula Ala-Glu-Asp-Arg (Ejemplo 1), mediante ejemplos, que confirman la actividad biológica del tetrapéptido (ejemplos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8), mediante un ejemplo de prueba de toxicidad por tetrapéptido (ejemplo 9) que demuestra sus propiedades farmacológicas y confirma la actividad terapéutica de la composición farmacéutica.

Ejemplo 1

Síntesis del tetrapéptido Ala-Glu-Asp-Arg

1. Nombre de producto: L-alanil-L-glutamil-L-aspartil-L-arginina

2. Fórmula estructural: H-ala-Glu-Asp-Arg-OH



ES 2 302 067 T3

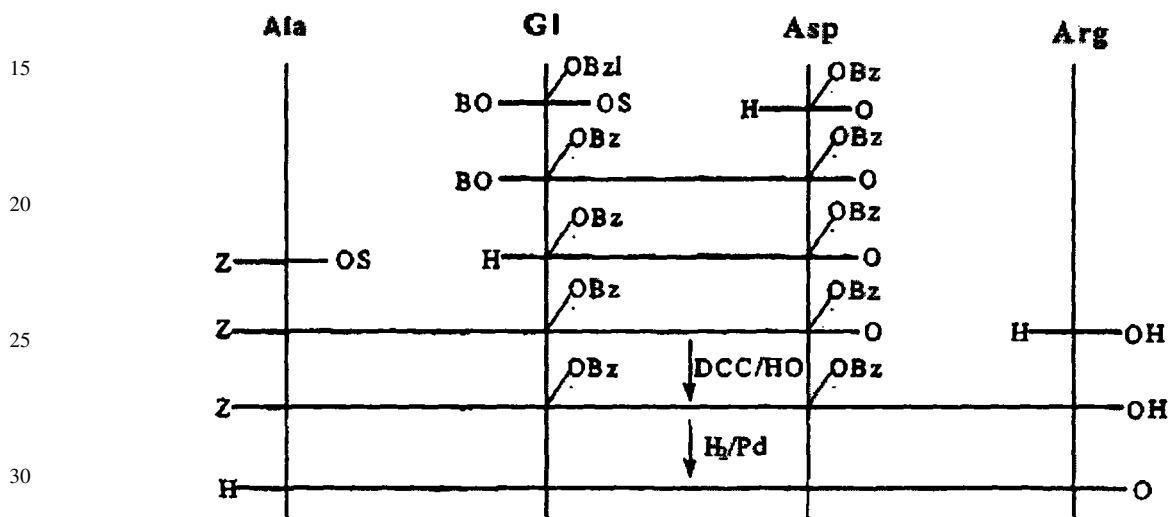
3. Fórmula Molecular sin par de iones: $C_{18}H_{31}N_7O_9$

4. Peso Molecular sin par de iones: 489,48

5. par de ión: acetato

6. Apariencia: polvo amorfo blanco sin olor

7. Método de síntesis: el péptido se obtiene mediante un método clásico de síntesis en una solución mediante el siguiente esquema:



Z- grupo benciloxycarbonilo;

BOC- grupo terc-butiloxycarbonilo;

OSu - éster de N-oxisuccinimida;

OBzI - bencil éster;

DCC - N,N'-diciclohexilcarbodiimida;

HOBT - N-oxibenzotriazol.

Se utiliza N,N'-dimetilformamida como un disolvente. Cuando se agrega ácido aspártico, la defensa del grupo α -COOH se aplica por salificación con trietilamina. El grupo protector BOC se remueve con solución de ácido trifluoroacético (TFA) y el grupo Z protector- con hidrogenación catalítica. El producto se aísla y purifica por el método de cromatografía líquida de alto desempeño preparativa (HPLC) sobre una columna de fase inversa.

8. Propiedades del producto terminado:

- análisis de aminoácido: Glu 1,08; Asp 1,08; Ala 1,00; Arg 1,07;
- contenido de péptido 98,01% (por HPLC, 220 nm);
- TLC - individual, $R_f = 0,59$ (acetonitrilo-ácido acético-agua 5:1:3);
- Contenido de humedad: 8%;
- pH de 0,001% de solución: 4,58;
- polvo rotario específico: $[\alpha]_D^{22}$: -24° ($c=1$, H_2O).

Ejemplo de síntesis

1) *BOC-Glu(OBzl)-Asp(OBzl)-OH (I), N-terc-butiloxicarbonil-(γ-bencil)-glutamyl-(β-bencil)-aspartato*

5 4,34 g (0,01 mol) de éster N-oxisuccinimida de ácido N-terc-butiloxicarbonil-(γ-bencil)glutámico BOC-GIU(OB-ZI)-OSU se disuelve en 20 ml de dimetilformamida, y se agrega con 1,72 ml (0,0125 mol) de trietilamina y 2,80 g (0,0125 mol) de aspartato de β-bencil. La mezcla se agita durante 24 horas a temperatura ambiente. Después de eso el producto se precipita con solución de ácido sulfúrico 0.5 N (150 ml), se extrae mediante acetato de etilo (3x30 ml), se lava en solución de ácido sulfúrico 0.5 N (2x20 ml), agua, 5% de solución de bicarbonato de sodio (1x20 ml), agua, 10 solución de ácido sulfúrico 0.5 N (2x20 ml), agua. El producto se seca sobre sulfato de sodio anhidro. El Acetato de etilo se filtra y se remueve *in vacuo* a 40°C. El residuo se seca *in vacuo* sobre P₂O₅. Se obtiene 5.68 g (≈ 100%) de aceite.

R_f = 0.42 (benceno-acetona 2:1; Placas Sorbfil, Gel de sílice 8-12 μm, desarrollado por UV y cloro/benzidino).

15 2) *TFA-H-Glu(OBzl)-Asp(OBzl)-OH (II), trifluoroacetato de (γ-bencil)-glutamyl-(β-bencil)aspartato*

5.68 g (≈ 0.01 mol) de N-terc-butiloxicarbonil-(γ-bencil)glutamyl-(β-bencil) aspartato (I) se disuelve en 20 ml de mezcla de ácido trifluoroacético-diclorometano (3:1). Dos horas después el disolvente se remueve *in vacuo* a 40°C. La 20 remoción se repite con otra porción de diclorometano (2x10 ml). El residuo se seca *in vacuo* sobre NaOH. 5.80 g (≈ 100%) de aceite se obtiene. R_f = 0.63 (n-butanol-piridino-ácido acético-agua, 15:10:3:12).

3) *Z-Ala-Glu(OBzl)-Asp(OBzl)-OH (III), N-carbobenzoxialanil-(γ-bencil)-glutamyl-(β-bencil)aspartato*

25 5.65 g (0.01 mol) de trifluoroacetato de (γ-bencil)-glutamyl-(β-bencil)aspartato (II) se disuelve en 10 ml de dimetil-formamida y se agrega con 2.80 ml (0.02 mol) de trietilamina y 4.14 g (0.013 mol) de éster de N-oxisuccinimida de N-carbobenzoxialanina. La mezcla se agita durante 24 horas a temperatura ambiente.

El producto se precipita con solución de ácido sulfúrico 0.5 N (150 ml), se extrae mediante acetato de etilo (3x30 30 ml), se lava en solución de ácido sulfúrico 0.5 N (2x20 ml), agua, 5% de solución de bicarbonato de sodio (1x20 ml), agua, solución de ácido sulfúrico 0.5 N (2x20 ml), agua. El producto se seca sobre sulfato de sodio anhidro. El Acetato de etilo se filtra y se remueve *in vacuo* a 40°C. El residuo se cristaliza en el sistema de acetato de etilo/hexano. El producto se filtra y se seca *in vacuo* sobre P₂O₅. El rendimiento es 4.10 g (66%). La temperatura de fusión (T_m) igual a 154°C.

35 R_f = 0.48 (benceno-acetona, 1:1), R_f = 0.72 (N-butanol-piridino-ácido acético-agua, 15:10:3:12).

4) *Z-Ala-Glu(OBzl)-Asp(OBzl)-Arg-OH (IV), N-carbobenzoxialanil-(γ-bencil)glutamyl-(β-bencil)aspartilarginina*

40 5,0 g (8 mmol) de N-carbobenzoxialanil-(γ-bencil)-glutamyl-(β-bencil)aspartato (III) y 1,35 g (10 mmol) de N-oxibenzotriazol se disuelve en 20 ml de dimetilformamida. La mezcla se enfría a 0°C. Se agrega 2,0 g (10 mmol) de solución de N,N'-diciclohexilcarbodiimida enfriada en 5 ml, la mezcla se agita durante 20 minutos. Luego la suspensión fría de HCl·H-Arg-OH, se agrega 5,00 g (24 mmol) de clorhidrato de arginina en 15 ml de dimetilformamida. La mezcla se agita a esta temperatura durante 2 horas y se deja para mezclar durante una noche a temperatura ambiente. 45 El precipitado de diciclohexilurea y el exceso de arginina se filtra. 0,5 l de H₂SO₄ 2N se vierte en el filtrado hasta que aparece el precipitado amarillo. La mezcla se deja en el refrigerador durante una noche. El precipitado se disuelve en 100 ml de n-butanol saturado con 2% de ácido acético, y se lava varias veces en 2% de ácido acético. La capa orgánica se lava con agua hasta que el valor del pH se hace neutro, y se remueve *in vacuo*. El residuo se cristaliza en dietil éster, luego se filtra y se seca sobre P₂O₅. El rendimiento es 2,5 g (45%). R_f = 0,88 (n-butanol-ácido acético-agua 4:1:1).

50 5) *H-Ala-Glu-Asp-Arg-OH (V), alanil-glutamyl-aspartil-arginina*

Se hidrata 2,50 g de N-carbobenzoxialanil-(γ-benzil)glutamyl-(β-bencil)aspartilarginina (HI) en un sistema de metanol-agua (5:1) sobre catalizador Pd/C. La terminación de la reacción de desbloqueo se monitorea por TLC en 55 sistema benceno/acetona (2:1) y acetonitrilo/ácido acético/agua (5:1:3). Cuando la reacción finaliza el catalizador se filtra, el filtrado se remueve *in vacuo* y el residuo se cristaliza en el sistema de agua/metanol. El producto se seca *in vacuo* sobre KOH. El rendimiento es 1,00 g (70%).

R_f = 0,59 (acetonitrilo-ácido acético-agua, 5:1:3). Para purificación, 250 mg de la sustancia se disuelve en 4 ml de 60 0.01% de ácido trifluoroacético y se somete a HPLC sobre una columna de fase inversa que mide 50x250 mm (Diasorb-130-C16T, 7 μm). La cromatografía empleada es Beckman System Gold, 126 Solvent Module, Módulo Detector de Disposición de Diodos de 1 68.

Condiciones de cromatografía A: 0,1% de TFA; B: MeCN/0,1% de TFA; grad. B 0 → 10% en 100 min. La muestra 65 de volumen es 5 ml, la detección se conduce por 215 nm, exploración por 190-600 nm, proporción de flujo igual a 10 ml/min.

La fracción se selecciona dentro de 49,0-54,0 min. El disolvente se remueve *in vacuo* en una temperatura que no excede 40°C. La purificación se repite utilizando el método HPLC bajo las mismas condiciones. La fracción se selecciona dentro de 32-48 min. El disolvente se remueve, la remoción se repite múltiples veces (5 veces) con 10 ml de 10% de solución de ácido acético. El residuo se disuelve finalmente en 20 ml de agua desionizada y liofilizada. 110 mg de preparación purificada en la forma de un polvo blanco inodoro amorfo se obtiene.

6) Análisis del producto terminado

• Contenido de la base activa (péptido) se define por HPLC en columna Supelco LC-18-DB, LC-18-DB 4,6x250 mm, grad. LC-18-DB. A: 0,1% de TFA; B: MeCN/0,1% de TFA; grad. B 0→10% en 30 min. La proporción de flujo es igual a 1 ml/min. La detección por 220 nm, exploración por 190-600 nm, el volumen de la muestra es 20 μ l. Contenido d Péptido - 98,01%;

• El contenido de aminoácido se define en un analizador AAA“T-339” Prague después de 24 horas de hidrólisis en 6 N HCl en 125°C. Glu 1,08; Asp 1,08; Ala 1,00; Arg 1,07;

• TLC: individual, $R_f = 0,59$ (acetonitrilo-ácido acético-agua, 5:1:3). Placas Sorbfil, Gel de sílice, se desarrolla en cloro/benzidino;

• Contenido de humedad: 8% (gravimétricamente, de acuerdo con la pérdida de masa por secado - 20 mg en 100°C). pH de 0,001% de solución: 4,58 (potenciométricamente);

• Energía rotaria específica: $[\alpha]_D^{22}$: -24° (c=1, H₂O), “Polamat A”, Carl Zeiss Jena.

Ejemplo 2

Efecto del tetrapéptido en el curso del infarto de miocardio experimental en el caso de vasoligación de arteria coronaria en ratas

Se conducen experimentos en 40 ratas mongrel blancas que pesa cada una 180-200 g. Los animales se subdividen aleatoriamente en dos grupos, 20 animales cada uno. Se induce infarto del miocardio (MI) mediante vasoligación de la arteria coronaria izquierda. El tetrapéptido Ala-Glu-Asp-Arg se administra a los animales intraperitonealmente en la dosis de 0,05 μ g por animal en 0,9% de solución de NaCl tres veces- en 1, 3 y 5 horas después de oclusión coronaria. Las ratas se decapitan en 6 y 24 horas después de cirugía. Los animales sometidos a la cirugía, que reciben intraperitonealmente 0.9% de solución de NaCl, sirven como control. El tamaño de la zona MI se identifica gravimétricamente. Los fragmentos de miocardio se fijan para microscopia electrónica y de luz como el control. El tamaño de la zona MI se identifica gravimétricamente. Los fragmentos de miocardio se fijan para microscopia electrónica y de luz, parte del material se congela en nitrógeno líquido para estudios bioquímicos.

Los resultados de la experimentación se exhiben en la tabla 1. La administración del tetrapéptido Ala-Glu-Asp-Arg origina una reducción confiable en la proporción de mortalidad en ratas durante las primeras 24 horas después de infarto (45% en el control y 15% en ratas tratadas con tetrapéptido). Histológicamente esto se manifiesta en una reducción significativa de las zonas de necrosis en animales tratados con tetrapéptidos ya durante las primeras horas del desarrollo de la enfermedad. El análisis de las dinámicas de índices bioquímicos mostró que la preparación de péptido redujo significativamente el contenido de glucosa en la sangre, que se origina por una isquemia de miocardio aguda, por casi 1.5 meses. Esto se debe principalmente a la actividad normal retenida de los marcadores de deshidrogenasa lactato-enzimas (LDH) y creatinfosfoquinasa (CPK). El efecto protector del tetrapéptido en este modelo también se manifiesta en el mantenimiento de contenido de glicógeno en el tejido del miocardio, este índice se reduce por tres veces en la ausencia en la administración de la preparación.

Los cambios ultra estructurales en el estado de los cardiomicitos se estudia utilizando el microscopio electrónico. El estudio de 180 electronogramas revela un efecto protector especialmente pronunciado del tetrapéptido, juzgado por el hecho de que la estructura de las mitocondrias permanece intacta, en 24 horas desde el inicio del MI. Bajo el efecto de la preparación, el coeficiente de eficiencia de energía de mitocondria (el producto de la cantidad media total de cristales y el total de áreas de mitocondria en un electrograma en caso de patología del producto del mismo índice en proporción de corazón normal, expresado en porcentaje) se incrementa significativamente con respecto a los animales de control (93,2±2,3 y 41,5±2,4 correspondientemente, $p<0,05$).

Así, el tetrapéptido reduce confiablemente el daño isquémico del preinfarto de miocardio y estimula los procesos reparativos en este, que hace que los cardiomiocitos retengan su supervivencia y normalicen su ultra estructura, mientras que los animales de control muestran severidad incrementada en el daño isquémico, que finaliza en su muerte.

Ejemplo 3

Efecto del tetrapéptido sobre el status de corazón aislado en el caso de perfusión e isquemia

5 El experimento se conduce bajo condiciones de perfusión en corazones aislados de 60 conejillos de india macho, por Langerdorft. Los animales se subdividen aleatoriamente en varios grupos, cada grupo consiste de 6 animales. La isquemia cardiaca total se induce por medio de ajustar completamente la manguera de solución de perfusión durante 30 minutos. Luego la repercusión se desarrolla bajo las mismas condiciones como antes para la isquemia (grupo de control). En animales experimentales la perfusión se desarrolla junto con el tetrapéptido Ala-Glu-Asp-Arg en las concentraciones de 0,002-0,05 $\mu\text{g/ml}$. Las contracciones mecánicas se registran, biotatos, que pesan aproximadamente 10 mg, son varias veces severo tomados desde la parte superior del corazón, luego el contenido de dialdegida malon (MDA) se identifica en ellos. Los corazones al final del experimento y parcialmente antes de la isquemia se congelan en nitrógeno líquido para identificación de contenido ATP, ADP y AMP.

15 Otro experimento se enfocó en estudiar el efecto de los tetrapéptidos sobre la restauración de la capacidad cardiaca de ratas aisladas para contracción después de un periodo de isquemia. El estudio se condujo en tres grupos, ocho animales en cada uno, en el caso de modo de trabajo de músculo cardiaco adicionalmente tenso, bajo condiciones de ritmo de contracción inducido y temperatura de solución de perfusión incrementada hasta 37°C.

20 Los resultados de este experimento se exhiben en las tablas 2 y 3. El análisis de los datos recibidos sugiere que los efectos del tetrapéptido sobre el corazón isquémico y normal difieren. La administración de los tetrapéptidos no influencia el status del corazón normal, mientras en el caso de la isquemia la introducción de las preparaciones en el perfusato en dosis pequeñas de 0,002 a 0,005 $\mu\text{g/ml}$ influencia favorablemente la función cardiaca en el caso de la isquemia. Se registra un incremento en la energía y amplitud de las contracciones cardiaca, así como también un incremento significativo en el contenido de fosfatos macroérgicos, contenido MDA que no difiere significativamente de la norma. La adición de tetrapéptidos en la solución perfusional en la concentración de 0,005 $\mu\text{g/ml}$ origina una mejora confiable de la fusión de contracción-amplitud de contracciones incrementadas (hasta $75 \pm 12\%$ del nivel inicial, $43 \pm 7\%$ en el control). La velocidad de contracción y la relajación son significativamente mayores en los animales experimentales, el conducto coronario se incrementa significativamente hasta $10,8 \pm 1,6$ ml/min según se compara con los animales de control ($8,5 \pm 0,4$ ml/min, $p < 0,05$).

35 Las demás series de experimentos conducidos en doce corazones de ratas se apoyan en el estudio del efecto protector de los tetrapéptidos en caso de su adición en el perfusato en la concentración de 10 ng/ml antes de la inducción de isquemia. Luego se conduce estimulación "severa" (frecuencia 5Hz) en el corazón y se estima la actividad de contracción. El estudio del efecto protector de los tetrapéptidos en caso de su administración antes de isquemia inducida mostró que, el tetrapéptido en la dosis de 0,005 $\mu\text{g/ml}$ restringe el crecimiento de contracción durante el periodo de isquemia y contribuye a su reducción en el curso de la repercusión, mientras que los corazones de control después de la estimulación no mostraron restauración de la actividad de contracción normal en el caso de re-perfusión, y las contracciones se terminaron completamente ya después de 5 minutos de repercusión. La administración del tetrapéptido en una muy pequeña dosis de 0,005 $\mu\text{g/ml}$ preservó el corazón, que estuvo en el borde de la detención, a partir de fibrilación y reducción de actividad de contracción, restauración del valor del último índice.

Ejemplo 4

45 *Efecto del tetrapéptido sobre el curso de distrofia de adrenalina en miocardio de rata*

Se conduce el experimento en 30 ratas mongrel blancas con un peso corporal de 180-200 g. Los animales se subdividen aleatoriamente en tres grupos, cada grupo consiste de 10 animales. Se induce distrofia de adrenalina al administrar la solución de adrenalina fresca ("Serva", USA) intraperitonealmente en la dosis de 2 mg/kg. Los animales de control reciben 0,9% de solución NaCl. Luego los animales experimentales se trataron de 1 a 5 horas con tetrapéptido Ala-Glu-Asp-Arg en la dosis de 0,05 μg por animal en 0,9% de solución de NaCl. En 4 horas desde el inicio de los biotatos del músculo cardiaco de experimento que pesan aproximadamente 10 mg se toman para la identificación de la actividad deshidrogenasa cardiaca y contenido de glicógeno en el miocardio. En 24 horas, los animales se sacrifican por decapitación momentánea. Los fragmentos de ventrículo izquierdo se congelan en hidrógeno líquido. En rodajas criostáticas se identifica istoquímicamente la actividad de succinato de hidrogenasa (SDH) así como también NADN-deshidrogenasa (NADN-DH), lactatodeshidrogenasa y contenido de glicógeno.

60 Los resultados de estudio se exhiben en las tablas 4 y 5.

Los estudios muestran que la administración del tetrapéptido en conjunto con la estimulación fuerte adrenérgica del miocardio reduce confiablemente la intensidad del proceso POL, que es uno de los factores de daño del miocardio en este modelo. 24 horas después de la inducción de distrofia de miocardio la cantidad de conjugado dieno en el miocardio de animales experimentales se reduce significativamente al normal según se compara con los animales de control (110 ± 17 y 176 ± 24 nmol/g de tejido correspondientemente, $p < 0,05$).

El estudio histoquímico de la actividad deshidrogenasa y el contenido de glicógeno en el tejido del miocardio durante las primeras horas desde la administración de adrenalina (tabla 5) revela, que el tetrapéptido reduce significa-

tivamente la actividad de lactato de deshidrogenasa, que contribuye a la reducción de acidosis y mejor mantenimiento del músculo cardíaco bajo condiciones de agotamiento de oxígeno. Esto se confirma por la cantidad de glicógeno retenida en los corazones de las ratas, que recibe el tetrapéptido, según se compara con animales de control ($0,168 \pm 0,021$ y $0,112 \pm 0,0,17$ unidades de densidad óptica correspondientes).

Así, la administración del tetrapéptido de Ala-Glu-Asp-Arg ejerce el efecto protector con respecto a la influencia de la adrenalina en sistemas enzimáticos del organismo, que permite reducir la intensidad excesiva de los procesos de peroxidación de lípido y reducir el desarrollo de pequeños focos necrobióticos por distrofia del miocardio por adrenalina.

Ejemplo 5

Actividad protectora del tetrapéptido en miocardiopatía toxicoquímica experimental en caso de envenenamiento por disulfuro de tetrametil tiouran

El experimento se conduce en 40 ratas mongrel blancas con peso corporal de 220-230 g. Los animales se subdividen aleatoriamente en cuatro grupos. La intoxicación de los animales con veneno industrial de disulfuro tetrametil tiuran (TMTD) se conduce en la forma de curso de 20 días de 5% de solución TMTD de aceite en la dosis de 25 mg/kg intragastricamente. El tetrapéptido se administra durante por lo menos 10 días del experimento intramuscularmente en la dosis de $0,05 \mu\text{g}$ por animales en 0,9% de solución NaCl estéril. Luego de la expiración de los términos indicados se sacrifican los animales de control y los experimentales mediante decapitación momentánea. Los fragmentos de miocardio se fijan al 12% en solución de formalina. Se tiñen rodajas de parafina mediante hematoxolin-eosina, así como también por Van Gison, Brachet, son sudan III, IV. Los animales intactos sirven como control.

Los resultados del estudio se exhiben en la tabla 6.

El estudio morfológico revela el efecto del tetrapéptido en caso de envenenamiento de animales con veneno industrial TMTD. Los resultados del estudio morfométrico e histológico mostraron que, la administración del tetrapéptido en animales intactos reduce algo el llenado del miocardio, así como también el volumen del núcleo de los cardiomiocitos (al 11% y 14% de forma correspondiente). De nuevo el fondo del daño TMTD influencia esta preparación que contribuye significativamente a la restauración de la proporción nuclear-citoplásmica (de $0,16 \pm 0,02$ en condiciones de intoxicación hasta $0,28 \pm 0,03$), volumen de estroma reducido (de $0,218 \pm 0,01 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$ en animales intoxicados hasta $0,180 \pm 0,02 \text{ cm}^3/\text{cm}^3$), incrementa el volumen de parenquima hasta los volúmenes normales.

Así, el estudio muestra que los tetrapéptidos restauran la estructura del miocardio y normalizan la proporción de volumen principal en el músculo cardíaco de animales intoxicados. Esto es una evidencia del efecto positivo de la preparación en la restauración acelerada de la función cardíaca en caso de intoxicación por veneno industrial.

Ejemplo 6

Efecto del tetrapéptido en el desarrollo y superación de arritmia cloro-calcio en ratas

El experimento se conduce en 60 ratas mongrel blancas con peso de 180-200 g. Los animales se subdividen aleatoriamente en 6 grupos, cada grupo consiste de 10 animales. Las ratas e narcotizan con uretano y reciben 220 mg/kg de 10% de solución de CaCl_2 . Se administra tetrapéptido Ala-Glu- Asp-Arg a los animales intraperitonealmente, una vez en las dosis de $0,05$ - $1,0 \mu\text{g}/\text{kg}$ en 0,9% de solución NaCl estéril.

Los resultados del estudio, mostrados en la tabla 7, muestran que, $0,2 \mu\text{g}/\text{kg}$ es la dosis más eficiente. El tetrapéptido reduce la proporción de muerte de los animales, reduce significativamente la frecuencia de desarrollo de fibrilación de ventrículo, incrementa la frecuencia de restauración del ritmo de seno después de la primera administración de CaCl_2 , así como también una dosis de arritmogen tolerable. La preparación en la dosis de $0,2 \mu\text{g}/\text{kg}$ y $0,5 \mu\text{g}/\text{kg}$ contribuye a la normalización de la frecuencia de las contracciones cardíacas (FHC): en este caso las ratas con bradicardia muestran un incremento de FHC al 12,3-48,6%, y las ratas con taquicardia inicial muestran una reducción FHC a los límites normales, originados por el tetrapéptido.

Así, la administración de tetrapéptidos Ala-Glu-Asp-Arg contribuye a la normalización de la función cardíaca en el caso de arritmia.

Ejemplo 7

Efecto del tetrapéptido en el crecimiento de explantes de cultivo cardíaco organotípicos de ratas en puerta

Los explantes de tejido cardíaco (de ventrículos izquierdo y derecho) de ratas Wistar en pubertad se cultivan en platos petri con cubierta de fondo de colágeno. El medio nutritivo está compuesto de 35% de medio Eagle, 35% de solución Hanx, 25% de suero de becerro fetal y 5% de extracto de embrión de pollo con glucosa, insulina, gentamicina

y glutamina. El tetrapéptido Ala-Glu-Asp-Arg se agrega en el medio de cultivo y se fija en concentraciones de 0,01 a 20,0 ng por ml de medio nutritivo. Después de tres días de incubación a temperatura de 37°C, el incremento en el área de los explantes se identificó utilizando microscopio de fase de contraste. La actividad biológica de la preparación se expresa en el cambio del índice cuadrado (SI) de los explantes cultivados en el medio que contiene el péptido, según se compara con el control.

Los resultados de este experimento se muestran en la tabla 8, que muestra, que el tetrapéptido Ala-Glu-Asp-Arg estimule el crecimiento de los explantes de cultivo cardiaco organotípicos en un amplio alcance de concentraciones. En la zona de intenso crecimiento bajo la influencia de tetrapéptido se encontró miocardiocitos con características de núcleo grande redondo para cardiomiocitos inmaduros, así como también células endoteliales y fibroblastos. El método inmunohistoquímico de detección de antígeno nuclear proliferativo (PCNA) con posterior análisis de computador de imágenes microscópicas revela, que el mejoramiento del potencial proliferativo celular juega el papel líder en el efecto del tetrapéptido Ala-Glu-Asp-Arg.

Así, la administración del tetrapéptido Ala-Glu-Asp-Arg contribuye a la población acelerada de la población de miocardiocito normales y por lo tanto estimula la función del tejido del miocardio.

Ejemplo 8

Efecto del tetrapéptido en cardiomiocitos bioenergéticos

Los cardiomiocitos se extraen del músculo cardiaco de ratas en pubertad por vahouny. El consumo de oxígeno por cardiomiocitos aislados se registra polarográficamente en una temperatura de 30°C. Parte de la suspensión de cardiomiocitos se oxigena por saturación por carbogen durante 1-3 horas a temperatura ambiente. La otra parte de la suspensión no se oxigena (condiciones de hipoxia moderada). El succinato se agrega en la concentración de 1×10^{-4} M, y el estímulo de consumo de oxígeno mostró el alcance de daño de los bioenergéticos de la célula por hipoxia. El tetrapéptido se introduce en el medio en la concentración de 10 ng/ml.

Los resultados de estudio mostraron que, la administración de los tetrapéptidos en el medio normaliza el proceso de oxidación de succinato. De esta manera, en las condiciones de hipoxia de coeficiente de estimulación de respiración (índice de respiración en la presencia de succinato para índice de proporción de respiración inicial) hace $7,35 \pm 0,26$, y la administración del tetrapéptido reduce esta tasa a $1,97 \pm 0,26$. Mientras tanto el consumo de oxígeno no se altera si el tetrapéptido se agrega dentro de la suspensión de células oxigenadas. Se revela, que la administración de los tetrapéptidos en el medio incrementa la oxidación $\text{NAD} \cdot \text{H}_2$ por cardiomiocitos. Así, el tetrapéptido normaliza los bioenergéticos de cardiomiocito en las condiciones de privación de oxígeno al inhibir selectivamente la oxidación de ácido succínico y al contribuir con la oxidación $\text{NAD} \cdot \text{H}_2$.

Estudios adicionales conducidos sobre rodajas de miocardio tomadas de diferentes animales revelan el efecto de inhibición de tetrapéptido sobre la actividad de la succinato deshidrogenasa que presumiblemente destaca la influencia protectora del tetrapéptido sobre los procesos respiratorios en células de miocardio en caso de hipoxia.

Ejemplo 9

Estudio de toxicidad común del tetrapéptido

La toxicidad común del tetrapéptido Ala-Glu-Asp-Arg se estudia de conformidad con los requerimientos establecidos en "Manual for experimental (pre-clinical) study of new pharmaceutical substances" (2000): toxicidad aguda en caso de administración única de la sustancia, así como también una toxicidad crónica y subaguda en caso de administración a largo plazo del tetrapéptido.

El experimento ayuda en el estudio de la toxicidad aguda y se conduce en 66 ratas macho mongrel blancas con peso corporal de 20-23 g. Los animales se subdividen aleatoriamente en seis grupos iguales. La sustancia se suministra una vez, intramuscularmente, en 0,25 ml de volumen, en dosis de 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg y 5 mg/kg en 0,9% de solución NaCl estéril. Los animales de control reciben 0,9% de solución de NaCl.

El estudio de la toxicidad subaguda se conduce en 60 ratas macho mongrel blancas con peso corporal de 160-240 g. Los animales experimentales reciben diariamente una vez al día, durante 90 días, intramuscularmente la sustancia en la dosis de 1 $\mu\text{g/kg}$, 0,1 mg/kg, 1 mg/kg en 0,5 ml de 0,9% de solución de NaCl. Los animales de control reciben 0,9% de solución NaCl en el mismo volumen. Antes de la administración de la sustancia, así como también en el día 30, 60 y 90 después del inicio del curso de la composición morfológica y las propiedades de sangre periférica del animal se estudian. Luego de la terminación del experimento se estudian los índices bioquímicos y de coagulación de la sangre del animal.

Los estudios de toxicidad crónica se conducen durante seis meses, basados en la duración de la administración clínica recomendada de la preparación, en 96 conejillos de india machos con peso corporal de 300-340 g. Los animales experimentales reciben el tetrapéptido diariamente, una vez al día, intramuscularmente, durante seis meses en las dosis

de 1 $\mu\text{g/kg}$, 0,1 mg/kg y 1 mg/kg en 0,5 ml de 0,9% de solución NaCl. Los animales de control reciben 0,9% de solución NaCl en el mismo volumen y durante el mismo horario. Los métodos comunes se utilizan para la identificación de la cantidad de eritrocitos, hemoglobina, reticulocitos, trombocitos, leucocitos, así como también de la Fórmula de leucocito, proporción de sedimentación de heritrocito (ESR) y resistencia de heritrocito en la sangre periférica de los animales. Junto con este contenido de proteína general en el suero sanguíneo se estima por el método de Lowry, así como también de potasio y sodio utilizando el método de espectrofotometría de plasma. Se conduce después de la terminación del experimento el estudio farmacológico del cerebro y la espina dorsal, ganglio de médula espinal, ganglio tiroide, ganglio paratiroide, ganglios adrenales, testículos, glándula pituitaria, corazón, pulmones, aorta, hígado, riñón, vejiga urinaria, páncreas, estómago, intestino delgado, intestino grueso, timo, bazo, nodos linfáticos y médula ósea. El estudio de toxicidad aguda revela, que una administración sencilla del tetrapéptido a los animales en la dosis de 5000 veces que exceden la dosis terapéutica, recomendada para administración clínica, no origina reacciones tóxicas, que proporciona un amplio diapason terapéutico de la sustancia.

El estudio de la toxicidad crónica y subaguda del tetrapéptido muestra la ausencia de efectos colaterales en caso de administración a largo plazo de la sustancia en las dosis, que exceden aquellas terapéuticas en 100-1000 veces. El estudio del efecto terapéutico en la composición morfológica de la sangre del conejillo de indias revela el incremento en cantidad de leucocitos en tres y seis meses después del inicio de la administración de la sustancia (tabla 9). El otro índice refleja la composición morfológica de la sangre de los animales que permanece bastante tiempo sin cambio. No se registra influencia significativa de la preparación de ESR, así como también en la resistencia de eritrocitos y en los índices bioquímicos de suero sanguíneo.

La evaluación del estado general de los animales, así como también de los índices morfológicos y bioquímicos de la sangre periférica, el estado morfológico de órganos internos, el estado del sistema respiratorio y vascular, de las funciones del hígado y el riñón no muestra cambios patológicos en el organismo.

La ausencia de toxicidad general permite a la sustancia farmacéutica recomendada, que contiene el tetrapéptido como un agente de péptido activo, para estudios clínicos.

TABLA 1

Índice	Control		Tetrapéptido	
	6 horas	24 horas	6 horas	24 horas
Tamaño de zona de necrosis, % de masa de ventrículo	44,1 $\pm$ 1,7	56,2 $\pm$ 1,4	38, 1 $\pm$ 1,8*	49, 6 $\pm$ 1,6*
Índice de muerte	7	2	2	1
Contenido en el suero de sangre:				
-glucosa, mmol/l	4,55 $\pm$ 0,23	3,9 $\pm$ 0,15	3,12 $\pm$ 0,09	3,01 $\pm$ 0,11
- LDH, nmol/s.l	311 $\pm$ 11	252 $\pm$ 19	309 $\pm$ 16	201 $\pm$ 15*
- CPK, nmol/s.l	1326 $\pm$ 64	1073 $\pm$ 24	961 $\pm$ 52*	923 $\pm$ 38
Contenido de glicógeno en el miocardio, g/kg de tejido	0,36 $\pm$ 0,07	0,38 $\pm$ 0,06	1,05 $\pm$ 0,12	1,18 $\pm$ 0,12**
*p<0,05 según se compara con el control;				
**p<0,01 según se compara con el control.				

TABLA 2

Índices y condiciones experimentales	Antes de isquemia	Reperusión	
		15 min	30 min
Amplitud de contracciones, % de inicial control	100	72±9	75±8
- Tetrapéptido (0,002 µg/ml)	100	70±13	81±16
- Tetrapéptido (0,005 µg/ml)	100	89±6*	93±5*
- Tetrapéptido (0,01 µg/ml)	100	61±4*	64±3*
- Tetrapéptido (0,05 µg/ml)	100	38±13*	32±9*
MDA, nmole/g de tejido			
- control	230±12	195±23	201±19
- Tetrapéptido (0,002 µg/ml)	225±23	216±5	220±12
- Tetrapéptido (0,005 µg/ml)	168±25*	231±7	186±10
- Tetrapéptido (0,01 µg/ml)	203±18	248±8	220±9
- Tetrapéptido (0,05 µg/ml)	156±28*	264±13*	252±11*
Carga energía (µmol de fosfato de adenosina/g de tejido)			
- control	7,56±0,25	-	3,32±0,16
- Tetrapéptido (0,002-0,005 µg/ml)	7,68±0,21	-	6,01±0,23*
- Tetrapéptido (0,05 µg/ml)	7,78±0,14	-	2,98±0,35

*P<0,011 según se compara con el control.

TABLA 3

Parámetros de contracción para reperusión 10 min					
Grupo de animal	Amplitud de contracciones, % de inicio	Alcance de contracción, mm	Máxima velocidad de contracción, % de inicio	Máxima velocidad de relajación, % de inicio	Conducto coronario ml/min
control	43 ± 7	1,2 ± 0,5	42 ± 7	46 ± 5	8,5 ± 0,4
Tetrapéptido 0,005 µg/ml	75 ± 12*	1,3 ± 0,4	56 ± 10*	69 ± 8*	10,8 ± 1,6*
0,05 µg/ml	36 ± 10*	2,5 ± 0,3	28 ± 7*	28 ± 6*	9,6 ± 0,7

*p<0,05 según se compara con el control.

TABLA 4

Grupo del animal	Órgano	Contenido de conjugados dieno, nmol/g de tejido	Contenido de dialdehído, nmol/g de tejido
Control	Corazón	112 ± 21	169 ± 19
	Hígado	125 ± 18	186 ± 27
Adrenalina	Corazón	176 ± 24*	153 ± 14
	Hígado	146 ± 34	356 ± 54*
Adrenalina+tetrapéptido	Corazón	110 ± 17**	173 ± 25
	Hígado	92 ± 11**	270 ± 56*

*p<0,05 según se compara con el control;

**p<0,01 según se compara con el índice después de administración de adrenalina

TABLA 5

Parámetro de estudio	Condiciones experimentales		
	Control	Adrenalina	Adrenalina+tetrapéptido
Contenido de glicógeno, unidad de densidad óptica relativa	0,143 ± 0,016	0,112 ± 0,017*	0,168 ± 0,021**
Actividad de enzima en tejido de miocardio:			
LDH, unidad de densidad óptica relativa	0,142 ± 0,006	0,193 ± 0,10*	0,154 ± 0,011*
SDH, unidad de densidad óptica relativa	0,275 ± 0,021	0,297 ± 0,012	0,284 ± 0,013
NADN-DH, unidad de densidad óptica relativa	0,334 ± 0,009	0,329 ± 0,014	0,034 ± 0,019
*p<0,05 según se compara con el control;			
**p<0,01 según se compara con el índice de adrenalina después de administración.			

TABLA 6

Índice	Control	Tetrapéptido	TMTD	TMTD+tetrapéptido
Volumen de núcleo de cardiomicito μm^3	336.2 ± 5,4	386,2 ± 2,1*	276,3 ± 15.9*	365,4 ± 13,8**
Volumen de estroma cm^3/cm^3	0,143 ± 0,03	0,159 ± 0,05	0,218 ± 0,01*	0,180 ± 0,02**
Volumen de vasos, $V_{\text{cap}}/V_{\text{cmc}}$	0,06 ± 0,008	0,08 ± 0,006*	0,11 ± 0,03*	0,07 ± 0,02**
Volumen de parenquima, cm^3/cm^3	0,81 ± 0,03	0,82 ± 0,04	0,76 ± 0,02*	0,83 ± 0,02**
Proporción de núcleo-citoplásmica	0,29 ± 0,02	0,40 ± 0,04*	0,16 ± 0,02*	0,28 ± 0,03**
* p<0,01 según se compara con el control;				
** p<0,01 según se compara con el índice en animales no tratados con el tetrapéptido; por porción de volumen de $V_{\text{cap}}/V_{\text{cmc}}$ -capilares a cardiomiocitos.				

TABLA 7

Grupo, preparación, dosis	Muerte después de la primera administración de arritmógeno, % absorbancia.	Frecuencia de restauración de ritmo de seno después de primera administración de CaCl_2 , %	Frecuencia de desarrollo de fibrilación de ventrículo en el curso del experimento, %	Dosis de arritmógeno tolerable máxima mg/kg
Control (CaCl_2)	7(70)	20.0	60.0	220

ES 2 302 067 T3

Tetrapéptido en concentración				
0.05 µg/kg	5(50)	27,0	60,3	220
0.1 µg/kg	5(50)	29,6	45,8	220
0.2 µg/kg	3(30)	49.0*	35,2*	440
0.5 µg/kg	4(40)	39.5*	39,1 *	440
1.0 µg/kg	6(60)	16.3	43,6	220
*p<0,05 según se compara con el control.				

TABLA 8

Índice	Concentración del tetrapéptido, ng/ml							
	0,01	0,05	0,1	0,5	1,0	2,0	10,0	20,0
SI, % con respecto al control	10	20*	22*	20*	15**	20*	27*	8
* p<0,05 según se compara con el control.								

TABLA 9

Índice	Administración del tetrapéptido (1 µg/kg)			
	3		6	
	Control (n=24)	(n=24)	Control (n=24)	(n=24)
Eritrocitos , x10 ¹² /l	5,3±0,6	5,4±0,2	5,4±0,3	5,2±0,4
Hemoglobina g/l	14,2±1,4	13,8±1,2	14,5±1,3	14,2±0,6
Reticulocitos , %	1,3±0,07	1,2±0,07	1,1±0,05	1,3±0,08
Trombocitos , x10 ⁹ /l	143,7±7,9	143,6±8,4	144,5±8,6	144,9±9,8
Leucocitos x10 ⁹ /l	9,4±0,5	11,2±0,8*	9,6±0,5	11,9±0,5*
Neutrófilos Stab, %	0,31±0,04	0,27±0,07	0,33±0,04	0,36±0,05
Neutrófilos segmentados%	45,8±2,1	44,9±2,5	46,2±3,5	43,4±3,2
Eosinófilos, %	0,69±0,05	0,64±0,04	0,72±0,04	0,75±0,08
Basófilos, %	0,61±0,04	0,69±0,05	0,72±0,03	0,71±0,05
Monocitos, %	2,5±0,02	2,4±0,03	2,6±0,06	2,5±0,05
Linfocitos , %	48,9±2,5	50,7±2,4	51,3±2,7	52,7±2,2
ESR, Mm/hora	1,69±0,05	1,87±0,07	2,01±0,05	2,05±0,04
Resistencia eritrocito, % NaCl				
-Máximo	0,41±0,02	0,43±0,04	0,42±0,04	0,44±0,04
-Mínimo	0,32±0,05	0,33±0,02	0,34±0,04	0,35±0,05
Proteína general en suero de sangre, g/l	72,9±3,1	72,6±3,3	73,1±3,4	73,1±3,6
Sodio en el suero sanguíneo, mmol/l	153,9±5,7	154,8±6,8	155,5±6,2	154,6±6,9
Potasio en el suero sanguíneo mmol/l	5,1±2,3	5,3±1,8	5,2±2,1	5,4±2,2
*- P<0,05 según se compara con el control.				

REIVINDICACIONES

1. Tetrapéptido alanil-glutamil-aspartil-arginina con la Fórmula general: secuencia 1 Ala-Glu-Asp-Arg [SEQ ID NO: 1].

2. Tetrapéptido alanil-glutamil-aspartil-arginina con la Fórmula general: secuencia 1 Ala-Glu-Asp-Arg [SEQ ID NO:1], que revela actividad biológica, que se manifiesta en la restauración de la función del miocardio.

3. Sustancia farmacológica de naturaleza péptido que restaura la función del miocardio, que contiene el agente de péptido activo y un portador admisible farmacéuticamente, y se **caracteriza** por el hecho que, contiene una cantidad efectiva de tetrapéptido Ala-Glu-Asp-Arg [SEQ ID NO:1] como un agente de péptido activo.

4. Sustancia de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizada** por el hecho de que está destinada para administración oral o parenteral.

ES 2 302 067 T3

LISTA DE SECUENCIAS

5	<110> SANKT-PETERBURGSKAYA OBSHESTVENNAYA ORGANIZATSIYA "SANKT-PETERBURGSKIY INSTITUT BIOREGULYATSII I GERONTOLOGIL SZO RAMN".
	<120> Sustancia de péptido que restaura la Función de miocardio
10	<130> IBG/10/04
	<150> RU 2004118699
	<151> 2004-06-22
15	<160> 1
	<170> Versión patente 3.1
20	<210> 1
	<211> 4
	<212> PRT
25	<213> Secuencia artificial
	<220>
30	<223> El tetrapéptido alanil-glutamil-aspartil-arginina restaura la función del miocardio al influenciar el potencial proliferativo de las células, la normalización de bioenergéticos y la ultra estructura de los cardiomiocitos, así como también reduce la intensidad de los procesos de peroxidación de lípido en células de miocardio.
	<400> 1
35	Ala Glu Asp Arg 1
40	
45	
50	
55	
60	
65	