



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 699 09 794 T2 2004.06.09

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 089 753 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 699 09 794.0

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/RU99/00188

(96) Europäisches Aktenzeichen: 99 928 267.6

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 99/066948

(86) PCT-Anmeldetag: 27.05.1999

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 29.12.1999

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 11.04.2001

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 23.07.2003

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 09.06.2004

(51) Int Cl.⁷: A61K 38/05

A61K 38/06

(30) Unionspriorität:

98111342 23.06.1998 RU

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, NL, SE

(73) Patentinhaber:

Obschestvo s Ogranichennoi Otvetstvennostju
"Klinika Institut a Bioregulyatsii i, St. Petersburg,
RU

(74) Vertreter:

Gramm, Lins & Partner, 30173 Hannover

(72) Erfinder:

KHAVINSON, Vladimir Khatskelevich,
St.Petersburg, RU; MOROZOV, Vyacheslav
Grigorievich, Vsevolozhsk, Leningradskaya obl.,
188710, RU; MALININ, Vladimir Viktorovich,
St.Petersburg, RU; SERY, Sergei Vladimirovich,
Vsevolozhsky, Leningradskaya obl., 188710, RU

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG EINES DIPEPTIDS FÜR WIEDERHERSTELLUNGSPROZESSE

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingereicht, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Beschreibung im Bereich der Erfindung

[0001] Die Erfindung liegt im Bereich der Pharmakologie, d. h. pharmazeutische Mittel, die Peptide enthalten und ihre Zusammensetzungen, die eine prophylaktische und/oder therapeutische Anwendung in der Medizin als Stimulatoren der Geweberegeneration bei eitrig-entzündlichen Krankheiten und nachoperativen Komplikationen, Ernährungskrankheiten, Erkrankungen und Verletzungen der Haut und Mukosa Membran, Schädigungen durch Strahlung, thermische und chemische Faktoren, begleitet von Störungen des Reparaturprozesses.

[0002] Die Erfindung betrifft die Anwendung des Dipeptids L-lysyl-L-glutaminsäure (L-Lys-L-Glu) als Arznei, das die Reparaturprozesse bei Personen, die dieses benötigen, stimuliert.

Hintergrund der Erfindung

[0003] Als Arzneimittel die in ihrer Anwendung zu dem Erfindungsgemäßen am stärksten analog sind, gibt es eine Gruppe von Präparaten, die Stoffwechselprozesse stimulieren: Derivate von Pyrimidin (Methyliracil, Pentoxyl) und biogene Präparaten (Actovegin, Solcoseryl) (1).

[0004] Die Nachteile des Methyluracils bestehen in kutanen, allergischen Reaktionen (urticaria eruption), manchmal treten Kopfschmerzen und Schwindel auf. Die Oralverabreichung von Pentoxyl kann Dyspepsie aufgrund der irritierenden Wirkung des Arzneimittels hervorrufen. Der Nachteil von Actovegin und Solcoseryl besteht in der kleinen Mengen an wirksamen Substanzen in den Arzneimitteln, einer verlängerten Behandlung und einer begrenzten Anwendung in Bezug auf das Stadium der Wunde, genauso wie eine niedrige Wirksamkeit bei der Behandlung von eitrig Wunden. Diese Arzneimittel produzieren einen deutlich stimulierenden Effekt auf die Leukopoese.

[0005] Das Dipeptid L-Lys-L-Glu ist als Komponente bei der Peptidsynthese bekannt (2).

[0006] Es ist allgemein bekannt, dass L-Lys-L-Glu Dipeptid eine immunmodulierende Wirkung aufzeigt, (3) und WO 9503067. Diese Aktivität des Dipeptids charakterisiert allerdings nur seine immunbiologische Wirkung, dies ist aber keine offensichtliche und miteinander verbundene Manifestierung der Eigenschaften des Dipeptids, Reparaturprozesses zu stimulieren und spezifiziert keine Indikation der klinischen Anwendung. Die unten dargestellten Beispiele für das Dipeptid L-Lys-L-Glu in seiner stimulierenden Wirkung auf die Reparaturprozesse bestätigen objektiv die Abwesenheit einer Korrelation zwischen den bekannten und den beanspruchten Eigenschaften. EP 0 165 492 offenbart die Verwendung von Lys-Pro Dipeptid für eine verbesserte Heilung bei Verletzungen.

Offenbarung der Erfindung

[0007] Die beanspruchte Erfindung richtet sich auf die Lösung des Problems des Erhalts einer von einem Peptid stammenden Substanz, die in der Lage ist, Reparaturprozesse zu stimulieren.

[0008] Erfindungsgemäß wird die Verwendung von L-Lys-L-Glutaminsäure Dipeptid (L-Lys-L-Glu) zur Herstellung eines Peptidpräparates zur Prophylaxe und/oder Behandlung von Erkrankungen, die eine Stimulation der Geweberegeneration benötigen, vorgeschlagen, wobei die Erkrankung zu der folgenden Gruppe gehört: eitrig-entzündliche Krankheiten und nachoperative Komplikationen, Ernährungskrankheiten, Haut- und Schleimhautkrankheiten und -verletzungen; Bestrahlungsnachwirkungen, chemische und thermische Faktoren.

[0009] Das Dipeptid wird durch ein klassisches Verfahren zur Peptidsynthese in Lösung erhalten (4). Bisher unbekannte Eigenschaften des L-Lys-L-Glu Dipeptids in der Stimulation von Reparaturprozessen wurden experimentell gefunden.

[0010] Erfindungsgemäß besteht das pharmazeutische Peptidpräparat aus einem pharmazeutischen annehmbaren Träger und einer wirksamen Menge von L-Lys-L-Glu oder einem seiner Salze.

[0011] Erfindungsgemäß kann das pharmazeutische Peptidpräparat Salze der Aminogruppe (Acetat, Hydrochlorid, Oxalat) oder der Carboxylgruppen (Salze der Metalle Natrium, Kalzium, Lithium, Zink, Magnesium oder andere organische und anorganische Kationen, z. B. Ammonium, Triethylammonium) enthalten.

[0012] Der Ausdruck „pharmazeutisches Peptidpräparat“, wie er hier verwendet wird, bedeutet die Verwendung des Dipeptids in irgendeiner Arzneiform, die eine therapeutische Wirkung bei der Behandlung von Erkrankungen, die eine Stimulation der Geweberegeneration benötigen, aufzeigt.

[0013] Der Ausdruck „wirksame Menge“, wie er hier verwendet wird, bedeutet die Anwendung einer Menge an wirksamer Grundsubstanz, die in Übereinstimmung mit den quantitativen Indizes der Aktivität und Toxizität, sowie dem zur Verfügung stehenden Wissen, in seiner Arzneiform wirksam ist. Um pharmazeutische Zusammensetzungen, die erfindungsgemäß verwendet werden können, zu erhalten, wird das vorgeschlagene Dipeptid oder dessen pharmazeutisch annehmbaren Derivate als aktiver Inhaltsstoff und ein pharmazeutischer Träger.

ger gemäß anerkannten pharmakologischen Verfahren zur Formulierung vermischt.

[0014] Der Träger kann verschiedene Formen aufzeigen, diese hängen von der Arzneiform des Präparats ab, wie es für die Verabreichung vorgesehen ist, z. B. parenteral, oral, intranasal oder lokal (z. B. als Verabreichungen oder Salben).

[0015] Alle bekannten pharmazeutischen Komponenten können zur Herstellung der Zusammensetzungen in bevorzugten Dosen zu oralen oder lokalen Anwendung verwendet werden.

[0016] Zur parenteralen (intranasalen) Verabreichung umfasst der Träger üblicherweise steriles Wasser, obwohl auch andere Inhaltsstoffe, die zur Stabilität oder zur Aufrechterhaltung der Sterilität beitragen, verwendet werden können.

[0017] Erfundungsgemäß ist das Dipeptid bei Verabreichung von Dosen von 0,01 bis 100 µg/kg Körpergewicht wirksam, obwohl auch geringere (höhere) Dosen unter Berücksichtigung der Schwere und dem Auftreten der Erkrankung verwendet werden können.

[0018] Das pharmazeutische Peptidpräparat wird zur parenteralen, intranasalen, oralen und lokalen Verabreichung vorgeschlagen. Die Erfindung ist geeignet zur Verwendung bei Menschen und Tieren, die eine solche Stimulation benötigen.

[0019] Die Stimulation der Regenerationsprozesse durch Verabreichung des Arzneimittels, das als aktive Substanz das Dipeptid L-lysyl-L-Glutaminsäure (L-Lys-L-Glu) oder dessen chemische Modifikation in Form eines Salzes oder andere Derivate enthält, wird aufgezeigt durch Aktivierung des Zellstoffwechsels und des regulierenden Effekts auf die Prozesse der Proliferation und Differenzierung der Zellen in verschiedenen Geweben. Das Verfahren ist zur prophylaktischen und therapeutischen Anwendung geeignet, wobei das Objekt, das dieses braucht, Dosen von 0,01 bis 100 µg/kg mindestens einmal am Tag über einen Zeitraum, der notwendig ist, um eine therapeutische Wirkung zu erzielen, wie 10 bis 40 Tage unter Berücksichtigung der Ausbildung und Schwere der Erkrankung, erhält.

[0020] Die Verwendung des Dipeptids schließt die Herstellung der Präparate zur Prophylaxe und Behandlung von Erkrankungen, bei der eine Stimulation der Geweberegeneration notwendig ist, ein; eitrig-entzündliche Prozesse und postoperative Komplikationen, Ernährungsstörungen, Haut und Schleimhauterkrankungen und Verletzungen, Bestrahlungsnachwirkungen, thermische und chemische Faktoren, begleitet von Verschiebungen der Reparaturprozesse.

Industrielle Anwendbarkeit

[0021] Die Erfindung wird mit Hilfe von Beispielen zur Synthese des Dipeptids der Formel L-lysyl-L-Glutaminsäure (L-Lys-L-Glu) (Beispiel 1), Tests zur Toxizität und biologischen Aktivität des Dipeptids (Beispiele 2, 3, 4 und 5) und Beispiele der Ergebnisse der klinischen Anwendung des Dipeptids, das deren pharmazeutische Eigenschaften aufzeigt und die Möglichkeit des Erzielen einer therapeutischen Wirkung bestätigt, dargestellt (Beispiele 6, 7, 8). Bezug wird auch auf die Abbildungen genommen.

KURZE BESCHREIBUNG DER ABBILDUNGEN

[0022] **Fig. 1A** zeigt PCNA positive Kerne proliferierender Zellen im Wachstumsbereich des Duodenums. Avidin-Biotin-Peroxidase Verfahren, $\times 100$. Bestrahltes Tier.

[0023] **Fig. 1B** zeigt PCNA positive Kerne proliferierender Zellen im Wachstumsbereich des Duodenums. Avidin-Biotin-Peroxidase Verfahren, $\times 100$. Bestrahlte Tiere + L-Lys-L-Glu Dipeptid.

[0024] **Fig. 2A** zeigt Serotonin immunpositive Zellen in der mukosalen Membran des Duodenums. Streptavidin-Biotin-Peroxidase Verfahren $\times 100$. Bestrahlte Tiere.

[0025] **Fig. 2B** zeigt Serotonin immunpositive Zellen in der mukosalen Membran des Duodenums. Streptavidin-Biotin-Peroxidase Verfahren $\times 100$. Bestrahlte Tiere + L-Lys-L-Glu Dipeptid.

[0026] **Fig. 3A** zeigt Metallotionein immunpositive Zellen in der mukosalen Membran des Duodenums (histotopografische Lokalisierung der MLT-positiven Zellen. Streptavidin-Biotin-Peroxidase Verfahren, $\times 100$. Bestrahlte Tiere.

[0027] **Fig. 3B** zeigt Metallotionein immunpositive Zellen in der mukosalen Membran des Duodenums (histotopografische Lokalisierung der MLT-positiven Zellen. Streptavidin-Biotin-Peroxidase Verfahren, $\times 100$. Bestrahlte Tiere + L-Lys-L-Glu Dipeptide.

[0028] **Fig. 4A** zeigt Mastzellen in der mukosalen Membran des Duodenums. Selektive Färbung mit Toluidin blau, pH 0,5- $\times 100$. Bestrahlte Tiere.

[0029] **Fig. 4 B** zeigt Mastzellen in der mukosalen Membran des Duodenums. Selektive Färbung mit Toluidin blau, pH 0,5- $\times 100$. Bestrahlte Tiere + L-Lys-L-Glu Dipeptide.

Beispiel 1. Synthese von L-Lys-L-Glu Dipeptid

1. N_{α},N_{ϵ} -Dibenzylloxycarbonyl-L-lysyl- γ -benzyl-Glutaminsäure (I)

[0030] 0,154 g (0,65 mmol) γ -Benzyl-Glutaminsäure wurden in 3 ml Dimethylformamid suspendiert und 0,091 ml (0,65 mmol) Triethylaminen wurden unter Röhren hinzugefügt, anschließend wurden 0,300 g (0,59 mmol) N-Oxysuccinimidether des N_{α},N_{ϵ} -Dibenzylloxycarbonyl-L-lysyls hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde innerhalb von 12 Stunden bei Raumtemperatur umgesetzt. Anschließend wurde das Lösungsmittel im Vakuum unter 40°C abgezogen und 10 ml H_2SO_4 zu dem Rest gegeben. Das Produkt wurde zweimal mit Ethylacetat (30 x 2) extrahiert. Die organische Schicht wurde mit H_2SO_4 und Wasser bis zur Neutralreaktion gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Lösungsmittel-Destillation wurde unter Vakuum bei 40°C durchgeführt und der Rest wurde in 1-2 ml Ethylazetat gelöst. Das Produkt wurde mit Hexan ausgefällt und im System Ethylazetat/Hexan rekristallisiert. Das Produkt wurde filtriert und unter Vakuum über P_2O_5 getrocknet. Die Ausbeute war 0,0330 g (88%). Der Koeffizient R_f war 0,81 (Benzol : Azeton 1 : 1, Silufol).

2. L-lysyl-L-Glutaminsäure

[0031] Geschütztes Dipeptid (1) (0,330 g) wurde in 10 mg Methanol gelöst, es wurden 3 ml Wasser hinzugegeben und über Kohlenstoff / Palladium hydriert. Eine Kontrolle wurde mit Dünnschichtchromatographie durchgeführt. Nach Beendigung der Hydratisierung wurde der Katalysator abfiltriert, und der Rest wurde in einer minimalen Menge Wasser gelöst und mit Methanol präzipitiert. Das Produkt wurde filtriert, mit Ethanol gewaschen und unter Vakuum über P_2O_5 getrocknet. Die Ausbeute war 0,110 g (85 %). Die Schmelztemperatur war 194 bis 196°C. (α) $\gamma^{20} = +20,0^\circ$ ($c = 3,0; H_2O$). $R_f = 0,54$ (Azeton: Wasser 1 : 3, „Merk“). Elektrophorese: $E_{Gly} = 1,96$; $E_{his} = 0,98$ (1400 Volt, 45 min., 2% Essigsäure, „Watmann 3MM“).

[0032] Um die entsprechenden Salze der Carboxylgruppen zu erhalten, wurden dem freien Dipeptid entsprechende Mengen einer wässrigen Lösung des Hydroxids des entsprechenden Metalls hinzugefügt ($NaOH$, KOH , $ZnOH_2$, $LiOH$, $CaOH_2$, NH_4OH). Um das Triethylammonium Salz zu erhalten, wurde das gleiche Verfahren mit Triethylamin als Base durchgeführt.

Beispiel 2. Untersuchung zur Toxizität von L-Lys-L-Glu Dipeptid

[0033] Die Untersuchung zur allgemeinen toxischen Wirkung des Dipeptids L-Lys-L-Glu wurde gemäß den „Regeln zur präklinischen Bestimmung der Sicherheit von pharmakologischen Substanzen (GLP)“ durchgeführt.

[0034] Der Zweck der Studie besteht in der Identifikation von tolerierbaren toxischen Dosen des Arzneimittels, Bestimmung des Stadiums und des Charakters der pathologischen Veränderungen in verschiedenen Organen und Systemen des Organismus und Bestimmung der Korrelation zwischen toxischer Wirkung in bezug auf die Dosis und die Dauer der Arzneiverabreichung.

[0035] Die Bestimmung der akuten Toxizität des Dipeptids L-Lys-L-Glu wurde gemäß Kerber durchgeführt. Die Studie wurde bei 66 weißen männlichen Inzuchtmäusen mit einem Körpergewicht von 20-23 g durchgeführt, diese wurden unter Standardbehandlung gehalten und mit einer Standardernährung in Käfigen aufbewahrt. Die Tiere wurden zufällig in sechs gleiche Gruppen a' 11 Mäuse unterteilt. Die Tiere wurden einer einzelnen intramuskulären Verabreichung des Arzneimittels, 0,25 ml in Dosen von 1 mg/kg, 2 mg/kg, 3 mg/kg, 4 mg/kg, 5 mg/kg, ausgesetzt, dies war mehrere Tausendfach über der empfohlenen therapeutischen Dosis bei einem klinischen Versuch. Die Kontrolltiere wurden mit einer Natriumchloridlösung gleicher Menge behandelt.

[0036] Nach 72 Stunden und nach 14 Tagen verstarb keines der Tiere irgendeiner Gruppe. Keine Veränderung im allgemeinen Zustand, Verhalten, Bewegungsaktivität, Haar- oder Hautintegument oder physiologischen Ausscheidungen.

[0037] Somit zeigt das L-Lys-L-Glu Dipeptid in Dosen, die die für klinische Tests empfohlene Dosis mehrere Tausendfach überschreitet, keine toxischen Wirkungen auf, dies deutet auf eine breite therapeutische Anwendbarkeit des Arzneimittels.

[0038] Die Untersuchung der subakuten Toxizität des L-Lys-L-Glu Dipeptids wurde an 60 weißen Inzuchtratten mit einem Körpergewicht von 150 bis 250 g durchgeführt. Die Tiere der Experimentalgruppen wurden täglich einer einzelnen intramuskulären Verabreichung des Arzneimittels für 90 Tage in Dosen von 1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 3 mg/kg in 0,5 ml Natriumchloridlösung ausgesetzt. Den Tieren der Kontrollgruppen wurde Natriumchloridlösung in gleicher Menge verabreicht.

[0039] Während des gesamten Untersuchungszeitraums wurden die Tiere täglich kontrolliert. Das Verhalten der Tiere wurde aufgezeichnet, genauso wie das Freß- und Trinkverhalten, der Zustand der Haare und mukosalen Oberflächen. Die Tiere wurden wöchentlich gewogen. Die morphologische Zusammensetzung und die Eigenschaften des peripheren Bluts wurden vor und am 30sten, 60sten und 90sten Tag der Arzneiverabreitung untersucht.

chung untersucht. Biochemische und Koagulationsindizes des Bluts wurden nach Beendigung des Experiments bestimmt.

[0040] Die chronische Toxizität des erfundungsgemäßen L-Lys-L-Glu Dipeptids wurde bei Langzeitverabreichung an Ratten mit einem Körpergewicht von 150 bis 250 g untersucht. Die Tiere der Experimentalgruppen wurden täglich einer intramuskulären Gabe oder Substanz in Dosen von 1 mg/kg, 0,3 mg/kg, 3 mg/kg in 0,5 ml Natriumchloridlösung über 6 Monate ausgesetzt. Das Verhalten der Tiere, genauso wie das Ess- und Trinkverhalten, der Zustand der Haare und der mukosalen Oberflächen wurde beobachtet. Die Tiere wurden in den ersten drei Monaten des Experiments täglich gewogen und anschließend einmal im Monat. Drei Monate nach Beginn der Gabe und nach Beendigung des Experiments wurden hematologische und biochemische Untersuchungen durchgeführt. Die Funktionen des cardiovasculären Systems, Leber, Pancreas, Niere und Nebenniere wurden untersucht. Nach Beendigung der Arzneimittelverabreichung wurden einige Tiere pathomorphologischen Untersuchungen unterworfen, mit dem Ziel verschiedene Bereiche des Gehirns und des Rückenmarks, Herz, Aorta, Lunge, Leber, Endokrin- und Immunsystem zu untersuchen.

[0041] Die Bestimmung des allgemeinen Zustandes des Tieres, der morphologischen und biochemischen Indizes des peripheren Bluts, des morphologischen Zustands der intrinsischen Organe, des cardiovasculären und Atmungssystems, der Leber und Nierenfunktion zeigte keine pathologischen Veränderungen des Organismus.

[0042] Die Untersuchung der subakuten und chronischen Toxizität des L-Lys-L-Glu Dipeptids zeigte die Abwesenheit von Nebeneffekten der Langzeitgabe des Arzneimittels in Dosen, die die therapeutische 100 bis 1000fach überschritt.

Beispiel 3. Einfluss des L-Lys-L-Glu Dipeptids auf die Heilung von eitrigen gequetschten Schnittwunden des Weichgewebes

[0043] Die Wirksamkeit des L-Lys-L-Glu Dipeptids wurde an einem Modell von eitrigen gequetschten Schnittwunden in Weichgeweben an Oberschenkeln bei „Chinchilla“ Kaninchen beiderlei Geschlechts mit ein Körpergewicht von 2 bis 3 kg untersucht. Die Kaninchen wurden in dem Bereich des Weichgewebes der Oberschenkel rasiert mit einem anschließenden Schnitt von 5 cm Länge und 2 cm Tiefe. Das Weichgewebe (Muskel, subkutanes Fett) wurde mit Kocher's Pinzetten gequetscht und mit der pathogenen Mischung: *Staphylococcus aureus*, Stamm 186, infiziert. Anschließend wurde die Wunde vernäht. Nach 72 Stunden wurde die Naht geöffnet, und die Wunde wurde mit 3% Wasserstoffperoxidlösung behandelt.

[0044] Den Tieren der Experimentalgruppe wurde intramuskulär jeden Tag für fünf Tage mit dem Dipeptid L-Lys-L-Glu in einer einzelnen Dosis von 1 µg pro Injektion injiziert. Den Kontrollkaninchen wurde Natriumchloridlösung gemäß dem gleichen Schema injiziert. Beim Behandlungsverfahren wurden die Wunden mit einem antiseptischen Arzneimittel zur externen Anwendung behandelt.

[0045] Die Bestimmung der Wirksamkeit des L-Lys-L-Glu Dipeptids in dem Fortschreiten der Regression des Entzündungsprozesses bezog sich auf die Abstoßung der Kruste und der Entfernung von pyonekrotischer Masse aus der Wunde, dem Auftreten von granulärem Gewebe in der Wunde und dem Beginn der Epithelbildung an den Ecken. Mit dem Ziel, objektive Kriterien für das Fortschreiten des Heilungsprozesses zu identifizieren, wurden Indizes analysiert, die halbquantitative Eigenschaften verschiedener zellulärer Elemente und Strukturen des granulären Gewebes an den Tagen 6, 14, 21, 28 und 40 wiedergeben. Weiterhin wurde die Aktivität der Gewebeenzyme bestimmt (5, 6, 7).

[0046] Als Ergebnis der Untersuchung wurde festgestellt, dass die Tiere aller Gruppen in der ersten Phase der Entzündung am 6. Tag eine ausgeweitete Nekrose in dem umgebenen Gewebe mit einem dünnen Rand an granulärem Gewebe mit diffusen frischen Fibroblasten und einzelnen Histiozyten aufzeigten. In der Phase der Proliferation waren schmale Foci einer Nekrose umringt von einer breiten Schicht granulären Gewebes mit Auftreten von Gefäßen und Lymphozyten. Die Menge an Histiozyten nahm zu, und die Makrophagen bildeten Kluster in den nekrotischen Bereichen. Die Fibroblasten waren gestreckt und hatten dünne Nuclei. Besonders verstärkt waren Prozesse der zellulären Aktivierung bei den Tieren der Experimentalgruppe (Tabelle 1). In der Phase der Narbenbildung zeigten diese Tiere Foci von Nekrose umgeben mit einer Schicht granulären Gewebes mit reifen Fibroblasten. Zwischen den Fibroblasten wurde eine Schicht von kollagenen Fasern gefunden. Interstitielle Substanzen, die sich innerhalb der nekrotischen Bereiche befanden, enthielten Prekollagen Fasern, Fibroblasten, Histiozyten, dies legt einen Resorptionsprozess und einen Austausch des nekrotischen Gewebes mit frischem granulärem Gewebe nahe.

[0047] Ein hervortretendes Merkmal der Antwort des Gewebes auf die Verabreichung von L-Lys-L-Glu Dipeptid bestand in der hohen Aktivität der sauren Phosphatase in Histiozyten zum Zeitpunkt der Proliferation (14–28 Tage). In neuen Foci von Leukozyten Infiltrationen, genauso wie im vaskulären Endothel wurde eine starke Aktivität der alkalischen Phosphatase beobachtet. In der Narbenbildungsphase wurde ein hoher Gehalt an saurer Phosphatase in Histiozyten und von alkalischer Phosphatase in Leukozyten und Gefäßen festgestellt (Tabelle 2).

[0048] Die beobachteten Veränderungen beweisen eine Intensivierung des Zellstoffwechsels in Geweben, das Fördern eines schnellen Säuberns der Wundenoberfläche von nekrotischem Gewebe mit anschließender Epithelbildung in der Wunde (Tabelle 3).

Beispiel 4. Einfluss des L-Lys-L-Glu Dipeptids auf die kompensatorische Regenerierung der Leber nach teilweiser Hepatektomie

[0049] Die Untersuchung wurde bei 26 weißen männlichen Inzuchtratten mit einem Gewicht von 150 bis 200 g durchgeführt. Die Tiere wurden in die folgenden drei Gruppen unterteilt:

1. Gruppe: gesunde Tiere
2. Gruppe: Kontrolle (Ratten, die einer teilweisen Hepatektomie unterzogen wurden, wobei 2/3 der Leber entfernt wurde)
3. Gruppe: Ratten, die der Operation unterzogen wurden und anschließend (2 und 24 Stunden nach der Operation) wurden zwei subkutane Injektionen des L-Lys-L-Glu Dipeptids (0,1 µg pro Ratte) durchgeführt.

[0050] Gleichzeitig wurden die Tiere der ersten und zweiten Gruppe mit dem gleichen Volumen Natriumhydrochlorid injiziert. Die entfernte Leber wurde in Formalin fixiert. Die operierten Ratten wurden mit Hilfe von Ether 32 bzw. 96 Stunden nach der Operation getötet. Die Ratten der Kontrollgruppe wurden zur gleichen Zeit getötet. Deren Leber wurde in Formalin fixiert. Durch Nachfärben der Präparate mit Hematoxilin-Eosin wurde der mitotische Index in den Leberzellen definiert, genauso wie die Menge an polyploiden Zellen in der S-Phase des Zellzyklus (die Menge an sich teilenden Zellen).

[0051] Die Untersuchung der Mitose-Aktivität der sich regenerierenden Leberzellen 32 Stunden nach teilweiser Hepatektomie zeigte, dass die Zahl der Mitosen und der Zellen in der S-Phase des Zellzyklus zweifach größer war als in der Leber der gesunden Tiere. Dieser Unterschied ist im Falle der Injektion von Natriumhydrochlorid nicht deutlich, während die Zunahme der Mitosen, der DNA synthetisierenden Zellen und der Gesamtmenge an sich teilenden Zellen nach Gabe des L-Lys-L-Glu Dipeptids deutlich war.

[0052] Die Untersuchung der Leberpräparationen 96 Stunden nach Hepatektomie bewies, dass sowohl Ratten, denen Natriumhydrochlorid als auch solche denen L-Lys-L-Glu Dipeptid injiziert wurde, eine deutliche Intensivierung der Mitose-Aktivität der Hepatozyten aufzeigt. Ein Vergleich der Daten der dritten und der zweiten Gruppe zeigte, dass die Ratten, denen L-Lys-L-Glu Dipeptid injiziert wurde, eine doppelt so große Zahl an Mitosen aufwies als die Ratten, denen Natriumhydrochlorid injiziert wurde. Die Zahl der Zellen in der S-Phase jedes Zellzyklus bei der dritten Gruppe von Ratten unterschied sich nicht signifikant von der Zahl der Hepatozyten in der S-Phase der zweiten Gruppe, obwohl insgesamt die Zahl der sich teilenden Zellen 96 Stunden nach Hepatektomie in der regenerierten Leber der mit L-Lys-L-Glu Dipeptide injizierten Ratten 75% größer war als bei den Ratten, denen Natriumhydrochlorid injiziert wurde (Tabelle 4).

[0053] Somit konnte gezeigt werden, dass Ratten, denen L-Lys-L-Glu Dipeptide injiziert wurde, 96 Stunden nach teilweiser Hepatektomie eine Intensivierung der Mitose-Aktivität der Hepatozyten aufzeigt, dies zeigt die Beschleunigung der reparativen Prozesse der Leber.

Beispiel 5. Einfluss des L-Lys-L-Glu Dipeptids auf die Regeneration von intestinaler mukoser Membran nach Verletzung durch Bestrahlung

[0054] Die Untersuchung wurde an 24 Monate alten weißen männlichen Ratten der Wistar Linie durchgeführt, Gewicht 90 bis 100 g. Die folgenden drei Gruppen von Tieren wurden untersucht:

1. Gruppe: gesunde Tiere
2. Gruppe: Kontrolle (bestrahlte Tiere)
3. Gruppe: bestrahlte Tiere, denen L-Lys-L-Glu Dipeptid injiziert wurde.

[0055] Eine einzelne γ Bestrahlung von sechs Gy, die das „Syndrom des intestinalen Tod“ induziert, wurde mit einem Kobaltapparat „GUB 20000“ mit einer Dosiskapazität von 200 rad/min, durchgeführt.

[0056] L-Lys-L-Glu Dipeptid wurde 24 Stunden nach Bestrahlung intraperitoneal über 5 Tage mit 0,5 µg in 0,5 ml Natriumhydrochlorid injiziert. Die Tiere der ersten und zweiten Gruppen erhielten Natriumhydrochlorid gemäß dem gleichen Schema.

[0057] Die Untersuchung der Wirkung des L-Lys-L-Glu Dipeptids wurde im proximalen Bereich des Duodenums der bestrahlten Tiere durchgeführt.

[0058] Die Tiere wurden unter Nembutal-Narkose (50 mg/kg) am achten Tag nach Bestrahlung getötet (Beginn der Regeneration des Reparaturzeitraums). Teile des Duodenums wurden gemäß Karnovsky für 24 Stunden fixiert für die Elektronenmikroskopie.

[0059] Die ultrastrukturelle Untersuchung wurde mit dem JEM-100S Mikroskop (JEOL, Japan) mit ultradünnen mikroskopischen Schnitten, hergestellt mit dem LKB-7A Ultra-Mikrotom (LKB, Schweden), durchgeführt,

diese wurden mit Uranylacetat und Bleicitrat gefärbt.

[0060] Mastzellen wurden selektiv mit 1% Lösung Toluidin blau (Fluka) in 0,5 M HCl mit einem pH von 0,5 gefärbt (8,9). Um die Proliferationsaktivität der Zellen zu untersuchen, wurden Maus monoklonale Antikörper gegen das nukleäre Zell-Proliferations Antigen (PCNA), 1 : 50 verdünnt (Klon PC 10, Calbiochem, USA) und Avidin-Biotin Peroxidase zum Aufzeigen der Mausimmunoglobuline (Vectastain, USA) verwendet. Serotonin positive Zellen wurden dargestellt mit Hilfe des polyklonalen Kaninchenantikörpers gegen Serotonin (unverdünnt) und Streptavidin-Biotin-Peroxidase Kit (Bio-Genex, USA). Um MTL positive Zellen aufzuzeigen, wurden Kaninchen Antikörper gegen Metallthioneine verwendet (1 : 2000).

[0061] Die immunhistochemische Identifizierung der Antigene auf histologischen Schnitten wurde gemäß den Bedingungen für Immunperoxidaseverfahren gemacht (10,11).

[0062] Die quantitative Untersuchung wurde mit Hilfe des Systems zur Computeranalyse von mikroskopischen Bildern IMSTAR (Imstar, Frankreich) und der lizenzierten Anwendungsverfahren Morphostar-2 und Col-quat-2 durchgeführt gemäß den allgemeinen Prinzipien der Stereologie in der Morphometrie (12, 13). Für jedes Tier wurde die Berechnung der entsprechenden Strukturen in 10 verschiedenen Untersuchungsbereichen bei drei Schnitten des untersuchten Organs durchgeführt. Der Mitose-Index (I_{mit}) und der Index der proliferierenden Fähigkeit (I_{pcna}) der Duodenumzellen wurde in 10 bis 15 Standardabschnitten mit Gesamtmengen von nicht weniger als 1000 Nuclei von Enterozyten definiert. Der Testbereich zum Auffinden von Serotonin-positiven- und Mastzellen deckte nicht weniger als 3 mm² ab. MTL positive Zellen wurden in 100 Duodenum Krypten gezählt.

[0063] Nach Ionenbestrahlung war am Tag 8 eine teilweise, in manchen Fällen sogar totale, Wiederherstellung der Ultrastruktur der Enterozyten zu beobachten, es traten allerdings nach wie vor hyperplastische („geschwollene“) Mitochondrien, Ödeme des endoplasmatischen Retikulums und fokale Vakuolisierung des Zytosplasmas auf, die endokrinen Zellen schauten zu diesem Zeitpunkt im Prinzip unverändert aus.

[0064] Quantitative Veränderungen im Duodenum am B. Tag nach Total γ -Bestrahlung mit 6 Gy des Darms zeigten die folgenden spezifischen Merkmale: I_{PCNA} in den intestinalen Krypten stieg auf 46,5%, während der Mitose-Index bis auf 4,2% stieg (Tabelle 5). Diese Daten bestätigen, dass die Wiederherstellung des Mukosaeipithels in den überlebenden Tieren sehr schnell vor sich ging, während der Pool an Gefäßzellen im intestinalen Epithel zu diesem Zeitraum in einem Stadium der Hyperregeneration war (**Fig. 1a**).

[0065] Histologische Untersuchung der Präparate, die mit Hematoxilin und Eosin gefärbt wurden, bestätigen ebenfalls den Beginn der Normalisierungsprozesse des Epithelaufbaus. Die Ergebnisse der Computeranalyse zeigten allerdings, dass die zahlenmäßige Dichte der Enterochromaffin Zellen (**Fig. 2a**) und MTL-positiven Zellen (**Fig. 3a**) noch nicht die Niveaus der gesunder Tiere aufzeigte (MTL-positiv = Metallothionein-positiv).

[0066] Die Menge an Mastzellen der mukosalen Grundplatte der bestrahlten Tiere war um das 10fache vermindert (**Fig. 4a**), dies bestätigt die starke Bestrahlungssensitivität der Mastzellen vom mukosalen Typ gegenüber ionisierender Strahlung, genauso wie die sehr langsame Wiederherstellung ihrer Zahl, selbst wenn sie sublethalen Dosen ausgesetzt sind.

[0067] Es ist bemerkenswert, dass die Injektion des L-Lys-L-Glu Dipeptids die Strukturen des zytoplasmatischen Retikulums und die des Plattenkomplexes der endokrinen Zellen des Duodenums aktiver macht, dies zeigt die stimulierende Wirkung auf die Syntheseprozesse und die Hormonsekretion.

[0068] Gemäß den Ergebnissen der morphometrischen Analyse tritt in den Krypten der Gedärme der bestrahlten Tiere nach Injektion von L-Lys-L-Glu Dipeptid eine bemerkenswerte Beschleunigung des Wiederherstellungsverfahrens auf (**Fig. 1b**). Der PCNA-Index geht auf 49,8%, während der Mitose-Index sich auf 4,7% erhöht (Tabelle 5). Die quantitative Dichte der Enterochromaffin Zellen stellte sich praktisch auf die der gesunden Tiere ein. Es bestand eine Tendenz der Erhöhung der Zahl und Intensität von immungefärbten MTL positiven Zellen an der Kryptenbasis (**Fig. 3b**).

[0069] Die Verwendung von L-Lys-L-Glu Dipeptid intensiviert das Proliferationspotential von Gefäßzellen des Darms und stärkt die morphofunktionelle Regeneration der intestinalen Mukosa nach allgemeiner γ -Bestrahlung mit einer Dosis von 6 Gy.

[0070] Somit zeigt die Experimentalstudie, dass L-Lys-L-Glu Dipeptid nicht toxisch ist, dass es Stoffwechselprozesse und die Proliferationsaktivität von Zellen in irgendeinem Gewebe aktiviert, um so deren Wiederherstellung zu verbessern.

[0071] Die Eigenschaften des L-Lys-L-Glu Dipeptids, die sich während der experimentellen pre-klinischen Untersuchung darstellten, erlauben eine prophylaktische und/oder therapeutische Verwendung als Stimulans zur Gewebewiederherstellung bei eitrigen entzündlichen Erkrankungen, postoperativen Komplikationen, Ernährungskrankheiten, Haut und Mukosa Verletzungen und Erkrankungen, Bestrahlung, thermischen und chemischen Nachwirkungen, begleitet von Reparaturprozesszuständen.

[0072] Die Beispiele der klinischen Studien des beanspruchten Dipeptids, wie sie unten gezeigt sind, zeigen dessen pharmakologische Eigenschaften und bestätigt dessen Patentfähigkeit.

Beispiel 6. Wirksamkeit der Verwendung des L-Lys-L-Glu Dipeptids zur Behandlung bei der Entzündung der Speicheldrüsen und Sialolithiasis

[0073] 45 Patienten wurden untersucht. Von diesen hatten 27 Personen eine Entzündung der Speicheldrüse, 4 davon hatten Parotitis. 18 Personen litten an Sialolithiasis der Unterkieferdrüsen. Das Durchschnittsalter der Patienten war 35–40. Alle Patienten mit der Sialolithiasis hatten entfernte Steine. 30 Patienten (15 von diesen hatten eine Entzündung der Speicheldrüse, die anderen 15 hatten Sialolithiasis) wurden einer täglichen intramuskulären Injektion von L-Lys-L-Glu Dipeptid von 1 µg über 5 Tagen unterworfen.

[0074] Die Patienten der Kontrollgruppe wurden einer Standardbehandlung unterworfen: antibakterielle, Desensibilisierungstherapie, Joddimexidverbände, physische Therapie (Ultraschall, 5–10% Kaliumjodidelektrotherapie des Drüsenbereichs), lokale Behandlung (Waschen der Drüsen mit einer antiseptischen Lösung und Antibiotika).

[0075] Die Patienten, die eine Sialolithiasis aufzeigten und mit L-Lys-L-Glu Dipeptid behandelt wurden, zeigten keinen Auswurf von Eiter aus den Drüsengängen, im postoperativen Zeitraum heilte die Wunde in der Mundhöhle beim ersten Verheilen ohne irgendwelche Nachwirkungen. Ein Schwellen und eine Infiltration des Weichgewebes und der mukosalen Membran der Mundhöhle war am 3.–4. Tag nach der Operation abgeklungen. Die Größe der Drüse nahm deutlich ab, und die Schmerzen verschwanden.

[0076] Die Patienten, die eine Entzündung der Speicheldrüsen hatten und die mit L-Lys-L-Glu Dipeptid behandelt wurden, hatten am 4.–5. Tag nach Behandlung keine Schmerzen in der Drüse mehr und der Auswurf an Eiter aus den Drüsengängen stoppte, die Speichelbildung nahm zu, die Schwellung und die Infiltration des Weichgewebes verschwand; beim Abtasten war die Größe der Drüse deutlich verringert, und sie wurde schmerzfrei. Der Allgemeinzustand der Patienten verbesserte sich. Die Laborwerte normalisierten sich ebenfalls.

[0077] Somit half die Verwendung von L-Lys-L-Glu Dipeptid bei der Reduktion der Zahl der Entzündungen, beschleunigte die Regeneration bei Wunden und verkürzte den Behandlungszeitraum.

Beispiel 7. Wirksamkeit von L-Lys-L-Glu Dipeptid bei der Behandlung von eitrigen Entzündungserkrankungen verschiedener Lokalisation

[0078] L-Lys-L-Glu Dipeptid wurde bei der komplexen Behandlung von 15 Patienten, die Fleischwunden mit verzögerter Granulierung in oberen und unteren Extremitäten hatten und 19 Patienten, die Phlegmone im Kiefer und Gesichtsknochenbereich hatten, verwendet. 1 µg der Präparation wurde jeden Tag für 10 Tage intramuskulär injiziert. Die Wirksamkeit der Behandlung wurde in ihrer Dynamik gemäß den Veränderungen der Aktivität der Wundenzyme und dem Zeitraum der Heilung untersucht.

[0079] Es wurde gefunden, dass L-Lys-L-Glu Dipeptid sich als am wirksamsten bei Patienten mit geringer Aktivität der eiweißspaltenden Wundenzyme im ersten und zweiten Stadium des Wundheilungsprozesses herausstellte, mit nekrotischem Zytogramm und langsamer Heilung. L-Lys-L-Glu Dipeptid erhöht die Aktivität der Wundfermente in der ersten Phase des Heilungsprozesses, verursachte eine Adaption der Restrukturierung in der Wunde und fördert die Synthese der sauren Phosphatasen in Histozyten, der alkalischen Phosphatasen in Leukozyten und Zytochrom C in Makrophagen und verstärkt die Reparaturprozesse. Das Injizieren des Dipeptids hilft einer beschleunigten Reinigung der Wunde von nekrotischen Geweben und Heilen der Wunde aufgrund der Makrophagen, Fibroblasten und Leukozytenaktivierung im Entzündungsfokus.

[0080] L-Lys-L-Glu Dipeptid-Behandlung führte zu einer schnelleren Abwicklung des lokalen Entzündungsprozesses, Verbesserung des allgemeinen Zustandes des Patienten und der Kürzung des Behandlungszeitraums.

[0081] Beispiel 8. Wirksamkeit der Verwendung des L-Lys-L-Glu Dipeptids bei Krebspatienten mit postoperativen Komplikationen

[0082] L-Lys-L-Glu Dipeptid wurde bei der komplexen Behandlung von 9 Patienten mit verzögert granulierenden Wunden nach operativer Behandlung bei Lungenkrebs des zweiten bis dritten Stadiums und Magenkrebs im zweiten bis dritten Stadium verwendet. Im pre-operativen Zeitraum wurden die Patienten einer Gesamtbestrahlungstherapie unterworfen, unter Verwendung von großen Bereichen der Komplexkonfiguration eines linearen Elektronenbeschleunigers (dessen Leistung ist 4,3 Mev) und einer Gamma-Therapievorrichtung „Rokus-M“ im Bremsmodus. In bestimmten Fällen war eine Komponente der kombinierten Therapie eine Chemotherapie.

[0083] Beginnend mit dem 3. Tag nach der Operation wurde 1 µg L-Lys-L-Glu Dipeptid über 10 Tage intramuskulär injiziert.

[0084] Es stellte sich heraus, dass die Verwendung dieses Präparats die Ödeme und Schmerzen im Wundbereich reduzierten und sowohl die Entfernung von nekrotischem Gewebe aus der Wunde als auch die Bildung postoperativer Narben beschleunigte. Während des Injektionszeitraums wurden die folgenden Faktoren beobachtet: Normalisierung der Temperatur, Verbesserung des Appetits und schnellere Gewichtszunahme.

[0085] Die Verwendung des L-Lys-L-Glu Dipeptids als Teil der komplexen Therapie bei Krebspatienten stimuliert somit die Reparaturprozesse in den Geweben, fördert die Verbesserung des Allgemeinzustandes des Patienten und reduziert die Behandlungszeit.

[0086] Die klinische Anwendung von L-Lysyl-L-Glutaminsäure (L-Lys-L-Glu) wird durch die durch experimentelle Untersuchungen erhaltenen Daten bestätigt, dies zeigt, dass das Präparat ein wirksames Arzneimittel gegenüber Störungen des Reparaturprozesses ist.

REFERENZEN

1. M. Mashkovsky Medicinal Substances. Zweiteilig, Moskau: Medizin 1993, Teil 2, S. 161–191.
2. SERVA-Katalog.-Heidelberg, 1987/88. -PE 1-PE40.
3. Patent der Russischen Föderation N 2080120 „Medicinal substances possessing immune-modulating activity". BIN 15.27.05.97
4. H. -D. Yakubke, X. Eshkait. Aminoacids, peptides, proteins: Transl. from German./Moscow, Mir, 1985. -456 p.
5. V. Balin, D. Madai, D. Tsvigailo. Local Treatment of purulent surgical skin and subcutaneous fat diseases in the conditions of regulated activity of wound enzymes. /St. Petersburg, 1996.-37 p.
6. V. Kolodin, O. Kuznetsov Quantitative cytochemical revealing of enzymes in the cess culture after the Rowse virus infecting//Vopr. Oncol. (Problems in Oncology).-1975.-Vo1.21, N 9.P.65–71.
7. M. Berston Histochemistry of Enzymes. -Moscow, Mir, 1965.-454 p.
8. Enerback L., Miller H. R. P., Mayrhofer G. Methods for the identification and characterization of mast cells by light microscopy//Mast cell differentiation and heterogeneity/Eds. A. D. Beifus et al. Raven Press, New York, 1986.-P.405-416.
9. Stead R. H., Dixon M. F., Bramwell N. H. Mast cells are closely apposed to nerves in the human gastrointestinal mucosa//Gastroenterology.-1987.-Vol 87.-P. 575–585
10. Polack G., van Norden S. Introduction into immunocytochemistry: modern methods and problems: Transl. from English. -Moscow, Mir, 1987.-74 p.
11. Kvetnoy I., Yuzhakov V. Staining endocrine tissue and elements of APUD-system//Microscopic technique: Manual/Eds. D. Sarkisov, Y. Perov.-Moscow, Medicine, 1966.-P.375–418.
12. G. Avtandilov. Medical morphometry. Manual. Moscow, 1990.-384 p.
13. Weibel E. R., Kistler G. S., Scherle W. F. Practical stereological methods for mophometric cytology//J. Cell Biol.-1966. – Vol 30. -P.23-38.

Tabelle 1

Einfluss von L-Lys-Glu Dipeptid auf die Dynamik zellulärer Elemente und Strukturen bei Kaninchen mit eitrigen gequetschten Schnittwunden des Weichgewebes

Tiergruppe	Beobachtungszeit (Tage)	Zelluläres Element und Struktur (Bewertungspunkte)				
		Fibroblasten	Histiozyten	Leukozyten	Makrophagen	Nekrose
Kontrolle	6 2 3			5	2	5
	14	3	3	5	2	4
	21	4	4	4	3	4
	28	4	4	2	3	2
	40	4	4	2	5	2
Dipeptid L-Lys-L-Glu	6	4*	4	5	3	3*
	14	5*	5*	5	3	2*
	21	5	5	4	2	2*
	28	5	4	4*	2	1
	40	6*	6*	2	2*	1

* - P < 0,05 in Vergleich zu den Indizes der Tiere der Kontrollgruppe

Anmerkung:

- 1 Punkt: abwesend;
- 2 Punkte: einzeln (Spuren);
- 3 Punkte: einige wenige;
- 4 Punkte: diffus (moderat);
- 5 Punkte: viele;
- 6 Punkte: sehr viele.

Tabelle 2

Einfluss von L-Lys-L-Glu Dipeptid auf die Aktivität von Gewebeenzymen in Kaninchen mit eitrigen gequetschten Schnittwunden des Weichgewebes

Gruppe der Tiere	Beobachtungszeitraum (Tage)	Saure Phosphotase in Histiozyten (Bewertungspunkte)	Akalische Phosphatase in Leukozyten (Bewertungspunkte)	Alkalische Phosphatase in Gefäßen (Bewertungspunkte)
Kontrolle	6	3		3 2
	14	4	4	4
	21	4	4	3
	28	3	5	3
	40	3	5	2
Dipeptide L-Lys-L-Glu	6	5*	6*	6*
	14	6*	6*	5
	21	5	5	5*
	28	5*	6	4
	40	5*	5	4*

* - P < 0,05 in Vergleich zu den Indizes der Tiere der Kontrollgruppe

Anmerkung:

- 1 Punkt: abwesend;
- 2 Punkte: einzeln (Spuren);
- 3 Punkte: einige wenige;
- 4 Punkte: diffus (moderat);
- 5 Punkte: viele;
- 6 Punkte: sehr viele.

Tabelle 3

Einfluss des L-Lys-L-Glu Peptids auf die Dauer des Wundheilungsprozesses bei Kaninchen mit eitrigen gequetschten Schnittwunden des Weichgewebes

Gruppe der Tiere	Zeitraum des Fortsetzens von nekrotisierender Gewebeabstoßung von der Wundoberfläche (Tage)	Zeitraum des kompletten Entfernens von nekrotisierendem Gewebe von der Wundoberfläche (Tage)	Zeitraum der Epithelbildung der Wunde (Tage)
Kontrolle	12,9 \pm 1,2	21,1 \pm 3,2	31,8 \pm 1,7
L-Lys-L-Glu Dipeptid	8,3 \pm 1,1*	14,2 \pm 1,3*	24,9 \pm 1,9*

* = P < 0,05 in Vergleich zu den Indizes der Kontrolltiere

Tabelle 4

Einfluss des L-Lys-L-Glu Dipeptids auf die Zahl der sich teilenden Zellen in der sich regenerierenden Leber von Ratten 32 und 96 Stunden nach teilweiser Hepatektomie
(% der Gesamtzahl der Leberzellen)

Gruppe der Tiere	Beobachtungszeitraum		Mitose-Index	% Zellen in der Phase der DNA Synthese	Gesamtzahl der sich teilenden Zellen
Gesunde Tiere + Natriumhydrochlorid	—		0,682 \pm 0,013	1,752 \pm 0,463	3,403 \pm 0,498
Kontrolle (teilweise Hepatektomie + Natriumhydrochlorid)	32 Stunden	Vorher [°]	0,431 \pm 0,019	1,043 \pm 0,127	1,474 \pm 0,143
		Nachher [°]	1,364 \pm 0,595	2,063 \pm 0,474	3,427 \pm 1,066
	96 Stunden	Vorher [°]	0,417 \pm 0,053	0,924 \pm 0,091	1,342 \pm 0,060
		Nachher [°]	2,012 \pm 0,146*	3,417 \pm 0,295*	5,429 \pm 0,388*
teilweise Hepatektomie + L-Lys-L-Glu Dipeptid	32 Stunden	Vorher [°]	0,450 \pm 0,067	0,870 \pm 0,100	1,320 \pm 0,159
		Nachher [°]	2,314 \pm 0,461**	3,882 \pm 0,839**	6,196 \pm 1,279**
	96 Stunden	Vorher [°]	0,294 \pm 0,084	0,982 \pm 0,141	1,276 \pm 0,128
		Nachher [°]	4,846 \pm 0,334*&	4,664 \pm 1,315**	9,510 \pm 1,609*#

* = P < 0,001 in Vergleich zu den Indizes vor Operation;

** = P < 0,05 in Vergleich zu den Indizes vor Operation;

& = P < 0,001 in Vergleich zu den Indizes der Tiere der Kontrollgruppe

= P < 0,05 in Vergleich zu den Indizes der Tiere der Kontrollgruppe.

° Vor oder nach teilweiser Hepatektomie

Tabelle 5

Einfluss des L-Lys-L-Glu Dipeptids auf die quantitativen Eigenschaften der Hauptparameter der Regeneration des Duodenums bei Ratten bezogen auf die Daten durch Computeranalyse von morphologischen Bildern

Gruppe der Tiere	I_{mit} , %	I_{PCNA} , %	P_{ser} , %	$N_{MC}/1\text{mm}^2$	$N_{MT}/100\text{ Krypten}$
Gesunde Tiere	2,9 \pm 0,1	44,8 \pm 0,2	0,64 \pm 0,02	169 \pm 23	132 \pm 8
Kontrolle (bestrahlte Tiere + physiologische Lösung)	4,2 \pm 0,4*	46,5 \pm 0,7*	0,43 \pm 0,08*	18 \pm 2*	75 \pm 8*
Bestrahlte Tiere + L-Lys-L-Glu Dipeptid	4,7 \pm 0,1*	49,8 \pm 0,7**	0,71 \pm 0,09	24 \pm 3*	102 \pm 9*

* - $P < 0,05$ im Vergleich zu den Indizes gesunde Tiere;

** - $P < 0,05$ im Vergleich zu den Indizes der Kontrollgruppe.

Anmerkung:

I_{mit} ist der Mitoseindex (%) = $N_{mit}/N_{total} \times 100$

I_{pcna} ist der Index der Zellproliferations-Fähigkeit: PCNA (%) = $N_{pcna}/N_{total} \times 100$;

P_{ser} ist die Volumendichte der Serotonin-immunpositiven Zellen (ein integrierter Index des Gehalts an Serotonin-immunpositiven Zellen im Gewebevolumen (%));

$N_{MC}/1\text{ mm}^2$ ist die Menge an Mastzellen pro 1 mm²;

$N_{MT}/200$ Krypten ist die Menge an MTL-positiven Zellen von 100 Darmkrypten

DATENBLATT

[0087] Patentinhaber: Obschestvo s Ogranichennoi Otvetstvennostju "Klinika Instituta Bioregulyatsii i Gerontologii, pr. Dinoamo, 3, St. Petersburg 197110/RU

Vertreter: GRAMM, LINS & PARTNER GbR Freundallee 13, D-30173 Hannover

Aktenzeichen: 99928267.6-2107

Veröffentlichungsnummer: 1 089 753

Bezeichnung der Erfindung: USE OF A DIPEPTIDE FOR STIMULATING REPAIR PROCESS

Aktenzeichen des DPMA für das Europäische Patent: 699 09 794.0-08

Patentansprüche

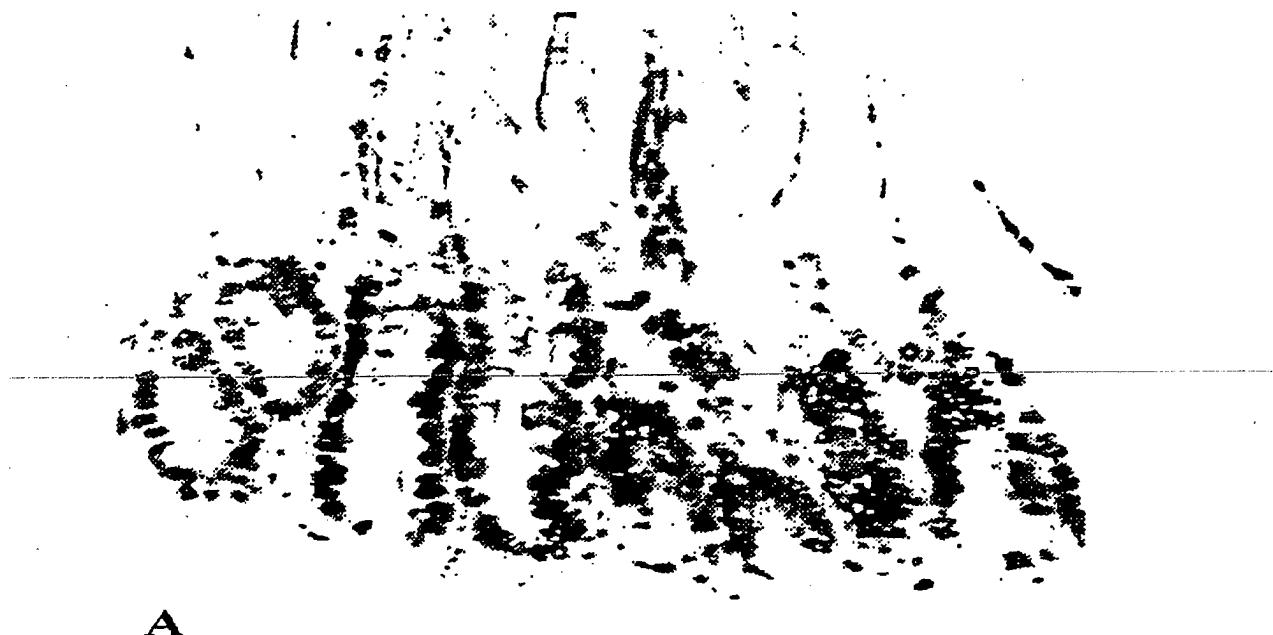
1. Verwendung des Dipeptids L-Lysyl-L-Glutaminsäure (L-Lys-L-Glu) für die Herstellung einer Peptidzubereitung für die Prophylaxe und/oder Behandlung von Krankheiten, die die Stimulation einer Geweberegeneration erfordern, wobei die Krankheit zu der folgenden Gruppe gehört: eitrig-entzündliche Krankheiten und nachoperative Komplikationen, Ernährungskrankheiten, Haut- und Schleimhautkrankheiten und -verletzungen; Bestrahlungsnachwirkungen, chemische und thermische Faktoren.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Peptidzubereitung aus einem pharmazeutisch zulässigen Träger und einer wirksamen Menge L-Lys-L-Glu oder eines seiner Salze besteht.

3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Peptid angeboten wird als Dipeptid, welches Salze der Aminogruppe enthält, insbesondere Acetat, Hydrochlorid, Oxalat.
4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Peptid angeboten wird als Dipeptid, welches Salze von Carboxylgruppen enthält, insbesondere Salze von Natrium, Kalium, Lithium, Kalzium, Zink, Magnesium oder organischen und nicht-organischen Kationen, insbesondere Ammonium, Triethylammonium.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Peptidzubereitung als Medikament für parenterale, intranasale oder orale Verabreichung oder lokale Applikation angeboten wird.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Dosiseinheit des Dipeptids oder seines Salzes auf 0,01 bis 100 µg je kg Körpergewicht eines Patienten eingestellt ist.

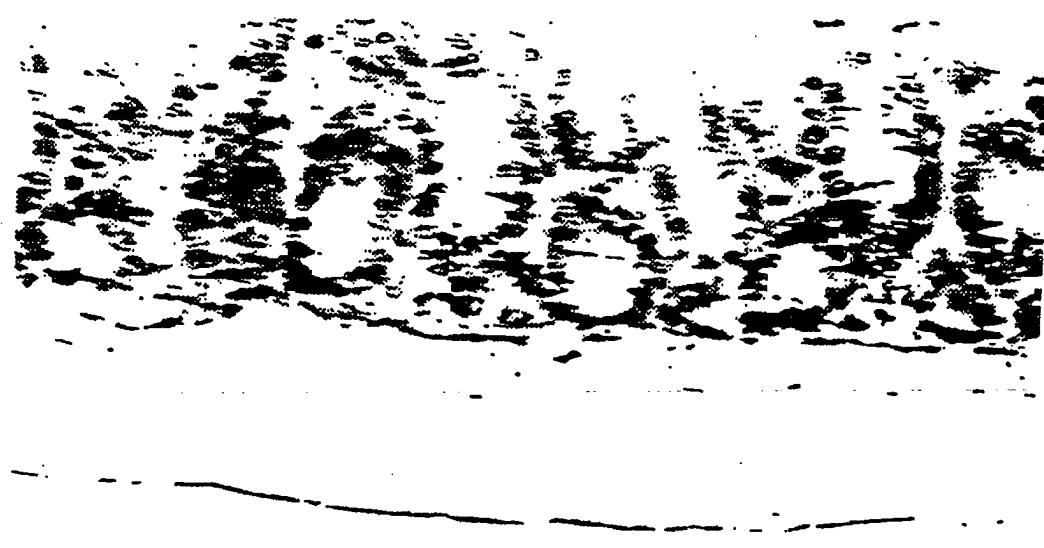
Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



A

Figur 1 a.



B

Figur 1 b.



Figur 2a.



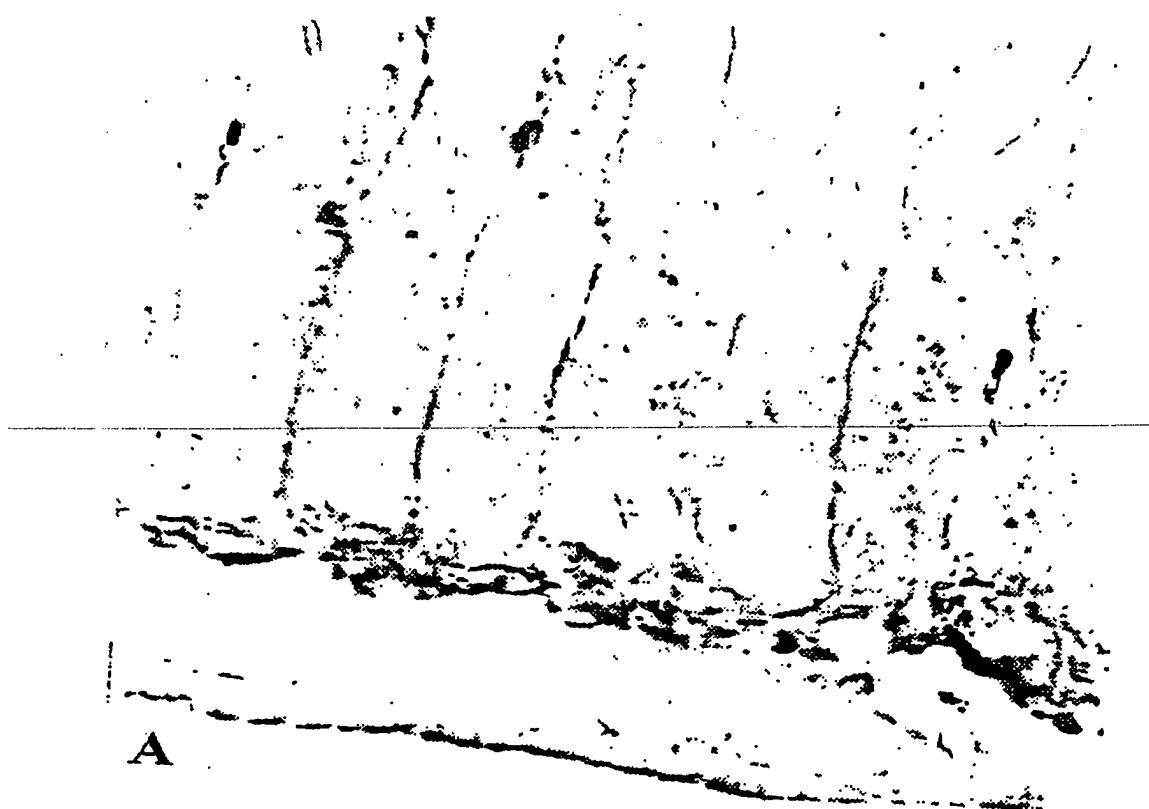
Figur 2b.



Figur 3a.



Figur 3b.



Figur 4a.



Figur 4b.