



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	101990900132257
Data Deposito	20/07/1990
Data Pubblicazione	20/01/1992

Priorità	01-187658
Nazione Priorità	JP
Data Deposito Priorità	

Priorità	01-344590
Nazione Priorità	JP
Data Deposito Priorità	

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

AGENTE PER LA PREVENZIONE ED IL TRATTAMENTO DELL'OPACITA' DEL CRISTALLINO.

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE INDUSTRIALE del TITOLO :
"AGENTE PER LA PREVENZIONE ED IL TRATTAMENTO
DELL'OPACITÀ DEL CRISTALLINO"
a nome: ASAI GERMANIUM RESEARCH INSTITUTE CO., LTD.

SATO PHARMACEUTICAL CO., LTD.

di nazionalità: giapponese

con sede a : TOKYO (GIAPPONE)

20 LUG. 1990

21002A/90

La presente invenzione concerne un agente per la prevenzione ed il trattamento dell'opacità del cristallino; più in particolare la presente invenzione è relativa ad un agente per la prevenzione ed il trattamento dell'opacità del cristallino che comprende, quali ingredienti efficaci, uno specifico composto organico del germanio o tale specifico composto organico del germanio con amminoguanidina.

La presente invenzione riguarda inoltre un agente di elevata efficacia per la prevenzione ed il trattamento dell'opacità del cristallino, che comprende una combinazione dello specifico composto organico del germanio e di specifici derivati della fenossazina.

Il cristallino dell'occhio è costituito, quali principali componenti, da un 65% circa di acqua e da un 35% circa di proteina, ed il rapporto di proteina contenuta nel cristallino, è superiore a quello presente in altri tessuti. Sotto il controllo di molti processi biologici, la proteina, presente in alta

concentrazione, insieme con l'acqua all'interno delle cellule, forma e mantiene il cristallino in uno stato idrofilico colloidale che gli permette di conservare la trasparenza. Se il cristallino, che dovrebbe essere trasparente, diviene opaco a causa di alcune eziologie, la quantità di luce in grado di raggiungere la retina, comunque, diminuisce. Quindi generalmente l'acutezza visiva, attraverso il cristallino, si deteriora a seconda del grado di opacità indotta.

Poichè l'eziologia dell'incidenza dell'opacità del cristallino è diversificata, è abbastanza difficile trattarla in modo generale. Uno dei meccanismi proposti è che le proteine del cristallino solubili in acqua, della membrana e insolubili in acqua, sopra descritte, che contengono un numero notevole di gruppi S-H (gruppi tiolo), che vengono trasformati in legami S-S per mezzo di reazioni di ossidazione biologica, danno luogo alla formazione di prodotti di aggregazione insolubili, che portano all'opacificazione del cristallino. L'altra spiegazione più attendibile è che le proteine sopra menzionate reagiscano con gli zuccheri, non enzimaticamente ed irreversibilmente, dando luogo alla formazione di una miscela di reazione detta prodotti di Amadori, le cui reazioni sono reazioni generali tra

i gruppi amminici delle proteine ed i gruppi carbonilici degli zuccheri, note come reazione di Maillard. Tale reazione di Maillard viene considerata come la reazione chiave del processo d'invecchiamento. Questa spiegazione è considerata una delle possibili spiegazioni dell'eziologia dell'opacità del cristallino.

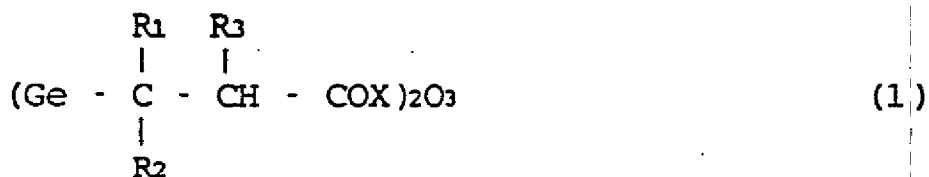
Esempio tipico di malattia associata all'opacità del cristallino, è la cataratta, che può essere distinta in cataratta congenita e cataratta acquisita. La seconda può essere ulteriormente classificata come cataratta senile, cataratta traumatica, cataratta diabetica e altre. In ciascun tipo di cataratta, la formazione dei prodotti di Amadori viene considerata una causa dell'opacità.

Un problema certamente evidente è che, in questo campo, non è stato ancora determinato alcun trattamento terapeutico per la prevenzione dell'opacità del cristallino o per la riduzione dell'opacità, se essa si presenta. Questo indica che, per quanto riguarda l'opacificazione del cristallino, molti problemi non sono stati ancora risolti, compreso tra questi, la cataratta e quindi agenti specifici per la prevenzione ed il trattamento dell'opacità del cristallino non sono stati sviluppati. Quindi vengono

correntemente impiegati agenti che esercitano significativi effetti solo nel recupero della acutezza visiva e nel bloccare lo sviluppo dell'opacificazione. Obbiettivo della presente invenzione è di fornire un agente capace di prevenire e trattare in modo efficace l'opacità del cristallino, sulla base di quanto già noto nella tecnica e sopra descritto.

Un altro obbiettivo della presente invenzione è di fornire un agente privo di tossicità o di effetti collaterali, poichè tali agenti dovrebbero essere somministrati per lungo tempo.

Allo scopo di raggiungere i suddetti obbiettivi, la presente invenzione è formulata in modo tale da fornire un agente per la prevenzione ed il trattamento dell'opacità del cristallino, agente che contiene, quale componente efficace, un composto organico del germanio rappresentato dalla formula:



[dove R_1 - R_3 rappresentano atomi di idrogeno, gruppi alchilici inferiori, che possono essere uguali tra loro o differenti, scelti in un insieme comprendente il gruppo metile, l'etile, ecc. o gruppi fenili sostituiti o non sostituiti;

X rappresenta un gruppo ossidrile, un gruppo o-alchile inferiore, un gruppo amminico o un O^-Y^+ (dove Y rappresenta un metallo quale il sodio, il potassio, ecc. o un composto avente un gruppo basico quale il lisozima e un amminoacido basico, ecc.)].

Allo scopo di raggiungere i suddetti obbiettivi, la presente invenzione è realizzata in modo tale da fornire un agente per la prevenzione ed il trattamento dell'opacità del cristallino, agente che contiene, quali componenti efficaci, il composto organico del germanio rappresentato dalla formula (1) e l'amminoguanidina.

Allo scopo di raggiungere i suddetti obbiettivi, la presente invenzione è realizzata, inoltre, in modo tale da fornire un agente per la prevenzione ed il trattamento dell'opacità del cristallino, agente che contiene, quali componenti efficaci, il composto organico del germanio rappresentato dalla formula (1) e specifici derivati della fenossazina.

Breve descrizione delle Figure.

La Fig.1 è un grafico che mostra lo stato di sopravvivenza in topi affetti da senilità accelerata.

La Fig.2 è un grafico che mostra un confronto dello stato di sopravvivenza tra il gruppo trattato con gocce oculari ed un gruppo di controllo.

La Fig. 3 è un diagramma che mostra la distribuzione percentuale dei sintomi nel cristallino.

La Fig. 4 è una fotografia di un cristallino opaco di un animale, prima del trattamento con le gocce oculari.

La Fig.5 è una fotografia dello stato dello stesso cristallino dell'animale in Fig.4, un mese dopo il trattamento con gocce oculari.

La Fig.6 è un grafico che mostra il progresso nella formazione di prodotti di Amadori da albumina di siero bovino e D-glucosio, e l'effetto dell'agente della presente invenzione sulla formazione di prodotti di Amadori da albumina di siero bovino e D-glucosio.

La Fig.7 è un grafico che mostra l'effetto dell'agente della presente invenzione sui prodotti di Amadori ottenuti da albumina di siero bovino e D-glucosio.

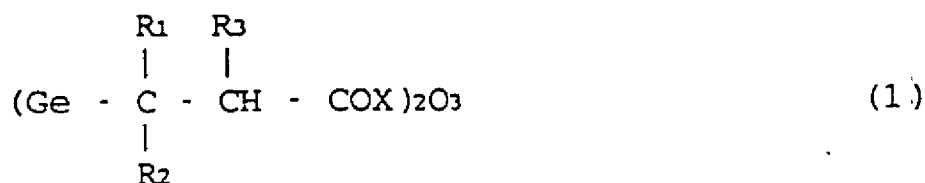
Le Figure dalla 8 alla 13 mostrano la distribuzione percentuale dei sintomi nel cristallino, in ciascun gruppo trattato con gocce oculari.

Le Figure dalla 8 alla 10 mostrano i risultati della somministrazione delle gocce oculari, contenenti il presente agente, a gruppi di topi aventi un'età superiore ad un mese.

Le Figure dalla 11 alla 13 mostrano i risultati della somministrazione delle gocce oculari, contenenti il

presente agente, ad animali di età superiore ai 5 mesi.

La presente invenzione sarà ora spiegata in dettaglio. L'agente per la prevenzione ed il trattamento dell'opacità del cristallino contiene, quale componente efficace, il composto organico del germanio rappresentato dalla formula (1):



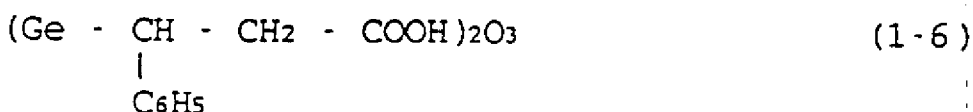
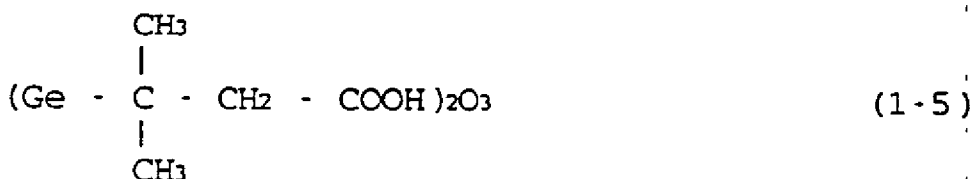
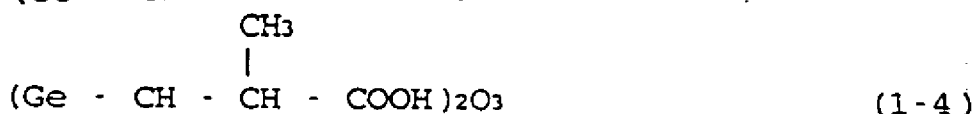
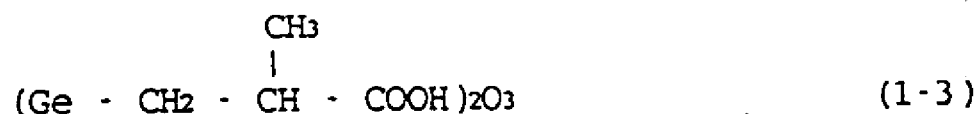
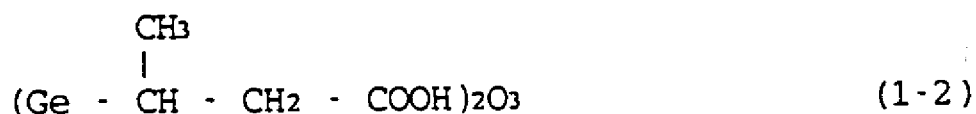
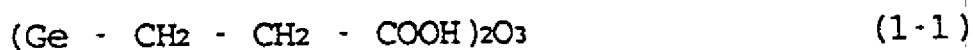
Per prima cosa sarà illustrato il composto.

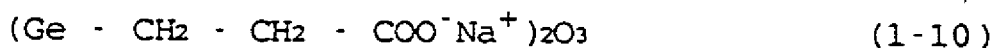
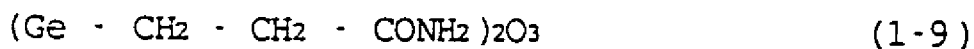
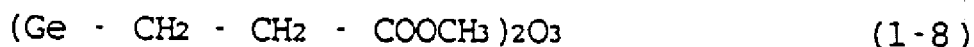
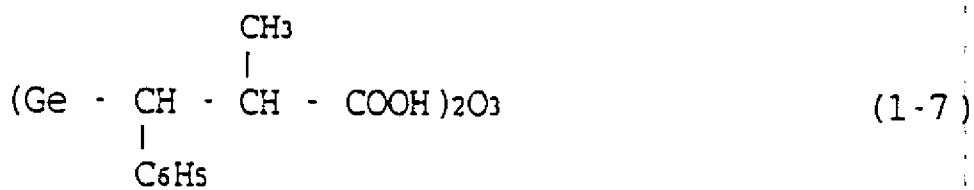
La struttura principale del composto è costituita da un acido germilpropionico in cui l'atomo di germanio è legato ad un derivato dell'acido propionico avente tre sostituenti R_1 , R_2 e R_3 ed un gruppo funzionale contenente ossigeno, cioè OX, e gli atomi di germanio della struttura principale sono legati agli atomi di ossigeno in un rapporto 2:3.

Ognuno dei sostituenti R_1 - R_3 rappresenta un atomo di idrogeno, un cosiddetto gruppo alchilico inferiore, cioè un gruppo metile, un etile, un propile, un butile, ecc. o un gruppo fenile sostituito o non sostituito; il sostituito X rappresenta un gruppo ossidrile, un o-alchile inferiore, un gruppo amminico

o un O^-Y^+ che rappresenta il sale dell'acido carbossilico. Il sostituyente Y rappresenta un metallo quale il sodio, il potassio, e simili, (il metallo non è necessariamente monovalente), o un composto basico rappresentato da un amminoacido basico e simili, quali il lisozima o la lisina.

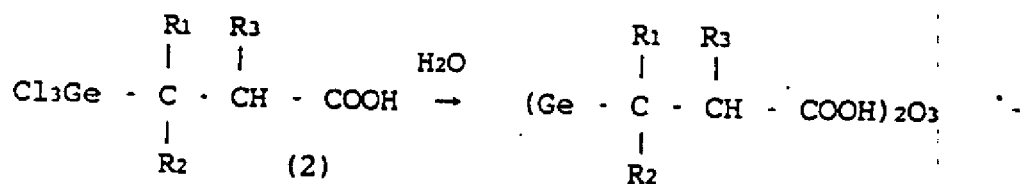
I sostituenti R_1 e R_2 ed il sostituyente R_3 sono legati all'atomo di germanio, rispettivamente, in posizione α e β . Quindi gli esempi di composto organico del germanio da impiegare, in accordo con la presente invenzione, sono qui di seguito illustrati:





I composti organici del germanio aventi le suddette strutture possono essere preparati mediante vari procedimenti.

Il composto in cui X è un gruppo OH nella formula (1) può essere preparato per esempio, come mostrato nella seguente reazione:



Si può cioè idrolizzare un acido trialogenogermilpropionico, in cui i sostituenti R_1 - R_3 sono stati preliminarmente introdotti, cioè un acido triclorogermilpropionico (2) ed analoghi.

D'altra parte il composto in cui X è un gruppo O-alchile inferiore può essere ottenuto, per esempio, per reazione del cloruro di tionile, ecc., con il suddetto composto (2) in modo da trasformare tale composto nel corrispondente alogenuro dell'acido e per

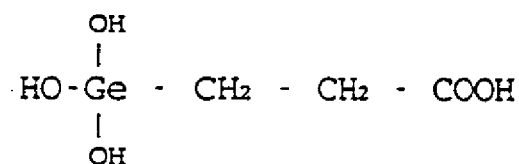
successiva reazione con l'alcol, corrispondente al suddetto gruppo O-alchile inferiore, seguita da idrolisi del prodotto risultante. Il composto di formula (1), in cui X è un gruppo NH_2 , può essere ottenuto, per esempio, per reazione del suddetto alogenuro dell'acido con ammoniaca, seguita poi da idrolisi.

Il composto di formula (1), contenente il gruppo COO^-Y^+ , quale sostituyente X, in cui Y è un metallo, può essere ottenuto, per esempio, per reazione di un idrossido del metallo con il suddetto composto (1), mentre il composto contenente, come sostituyente Y, un gruppo basico, può essere soggetto ad una reazione acido-base nota.

I composti organici del germanio, ottenuti nei modi sopra indicati, sono sottoposti ad analisi strumentale per ottenere gli spettri di risonanza magnetica nucleare (NMR) e di assorbimento infrarosso (IR), ed i risultati supportano in modo netto il fatto che tali composti possano essere rappresentati dalla formula (1).

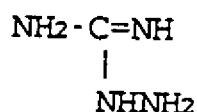
Le suddette formule rappresentano i composti organici del germanio allo stato cristallino, composti che, in soluzione acquosa, si idrolizzano, formando legami germanio-ossigeno. Il suddetto composto (1-1)

trasforma, per esempio, la sua struttura originaria nella seguente struttura:



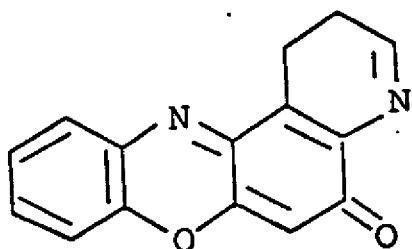
Tra i suddetti composti, il composto (1-1) può essere preferito proprio perchè facilmente disponibile.

L'amminoguanidina, impiegata nella presente invenzione, è rappresentata dalla seguente formula:

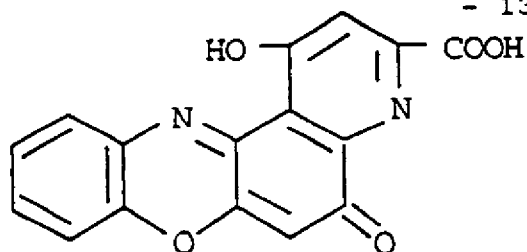


ed è un composto noto come un reagente fortemente nucleofilo.

Il derivato della fenossazina, da utilizzare secondo la presente invenzione, è rappresentato dalla seguente struttura principale:



e più precisamente è l'acido 1-idrossi-5-osso-5H-pirido(3,2-a)fenossazina-3-carbossilico (denominazione generica: pirenossina) di formula:



o può essere preferibile un suo sale con un metallo quale il sodio, il potassio e così via.

Questo composto è stato convenzionalmente impiegato per il trattamento della cataratta. I risultati di tale trattamento sono stati riportati in lavori accademici (vedi per esempio Japanese Clinical Ophthalmology 11:272, 1957).

Gli altri derivati della fenossazina, rappresentati dalla suddetta formula di struttura principale, sono pubblicamente descritti nella pubblicazione del brevetto giapponese N. 10570/1980.

L'agente per la prevenzione ed il trattamento dell'opacità del cristallino, secondo la presente invenzione, contiene quale componente efficace il composto organico del germanio sintetizzato nel modo prima visto, o il composto organico del germanio insieme con l'amminoguanidina sopra menzionata, o il composto organico del germanio con il derivato della fenossazina sopra descritto; essi possono essere preparati sotto forma di gocce oculari, preferibilmente insieme con composti noti quali l'acido borico, il cloruro di sodio, l'idrossido di

sodio, il cloruro di benzalconio, l'acido ϵ -amminocaproico, l'acido metil p-ossiamminobenzoico ed il clorobutanolo.

La solubilità del composto organico del germanio e degli analoghi, quali componenti efficaci della presente invenzione, può essere aumentata impiegando gocce oculari basiche.

Poichè il composto organico del germanio, quale componente efficace della presente invenzione, presenta delle caratteristiche di tossicità estremamente bassa e pochi effetti collaterali, la quantità da impiegare nelle gocce oculari può essere determinata in maniera relativamente libera. Tale quantità sarà prevista nell'intervallo, per esempio, 0,5 - 5 %, rispetto alla quantità totale di gocce oculari. In alternativa, per la goccia oculare contenente, quali agenti principali, il composto organico del germanio e l'amminoguanidina, il composto organico del germanio viene impiegato in una quantità compresa tra 10^{-5} e 10^{-7} circa, rispetto al contenuto in amminoguanidina.

Le gocce oculari contenenti il composto organico del germanio e il derivato della fenossazina, quali agenti principali, possono essere preparate in modo tale che 1 ml di goccia oculare contenga 5-500 mg del composto

organico del germanio e 0,05-0,5 mg del derivato fenossazinico.

I derivati della fenossazina sono stati impiegati nel trattamento della cataratta per un lungo periodo di tempo e ne è stata quindi valutata e verificata la sicurezza.

Inoltre l'agente contenente il composto organico del germanio e l'agente contenente il derivato fenossazinico possono essere preparati in anticipo e separatamente, e possono poi essere mescolati per preparare l'agente della presente invenzione, a seconda delle necessità.

La prova degli effetti dell'agente della presente invenzione, effettuata su topi affetti da senilità accelerata e suscettibili di opacità del cristallino, indica la presenza di effetti, quali la diminuzione del numero di occhi che presentano opacità e l'aumento di occhi trasparenti, dovuti all'azione delle gocce oculari contenenti l'agente della presente invenzione.

Gli esperimenti in vitro, impiegando un α -cristallino, ottenuto da cristallino di bovino, e glucosio dimostrano che il presente agente contenente, quale componente efficace, il composto organico del germanio descritto sopra o contenente il composto organico del germanio e l'amminoguanidina, può

prevenire l'opacificazione del cristallino o ridurre l'opacità nel cristallino, bloccando la formazione dei prodotti di Amadori e decomponendo tali prodotti, una volta formati, in sostanze ad inferiore peso molecolare.

La presente invenzione sarà ora spiegata nei seguenti esempi.

ESEMPIO 1

(1) Procedimento

Diciotto topi, affetti da senilità accelerata, dell'età di 10 mesi (5 maschi e 13 femmine) furono suddivisi in due gruppi; ad un gruppo costituito da 10 topi fu somministrata una sola goccia oculare dell'agente della presente invenzione che conteneva il composto organico del germanio (1-1) in un rapporto, del 4%, 4 volte al giorno, per 6 giorni alla settimana, per oltre 123 giorni, mentre l'altro gruppo di 8 topi fu impiegato come gruppo di controllo, senza somministrazione di gocce oculari. I due gruppi furono tenuti ed alimentati in condizioni identiche.

I cristallini di ciascun soggetto furono esaminati al microscopio, mentre il soggetto si trovava sotto anestesia per iniezione intraperitoneale di 0,7 ml/kg di sodio nembutal. L'esame fu eseguito quattro volte, cioè prima dell'inizio dell'esperimento e dopo 39, 78

e 123 giorni dall'inizio.

(2) Risultati

Sopravvivenza dei topi affetti da senilità accelerata.

Prima dell'inizio degli esperimenti il numero totale di topi affetti da senilità accelerata era di 18, come mostrato in Fig.1. Il numero totale di sopravvissuti mostrava una graduale diminuzione fino all'età di 12 mesi, cioè una diminuzione dal giorno 1 al giorno 39, ed una diminuzione ulteriore di 5 unità al giorno 78. Il numero dei sopravvissuti mostrava, comunque, una rapida diminuzione dall'età di 14 mesi, corrispondente al giorno 123, in poi. Il numero totale dei sopravvissuti era cioè diminuito della metà o più.

Fu poi confrontata la sopravvivenza al giorno 123 tra il gruppo trattato con le gocce oculari e il gruppo di controllo. Come mostrato in Fig.2, nel gruppo trattato con le gocce oculari fu rilevata la morte di 3 topi su 10, mentre nel gruppo di controllo fu rilevata la morte di 6 topi su 8. Quindi risultò chiaramente dimostrato che il gruppo trattato con le gocce oculari presentava una maggiore sopravvivenza.

Sintomi presenti nel cristallino di topi affetti da senilità accelerata e stato di sopravvivenza

I cristallini dei topi, affetti da senilità accelerata dell'età di 10 mesi furono sottoposti ad esame

microscopico. Fu conseguentemente osservata una soggettiva differenza nell'incidenza dell'opacificazione del cristallino. Le condizioni di opacità del cristallino furono classificate in tre tipi: cioè trasparenza, indurimento del nucleo e opacità. Il cristallino trasparente non presenta alcun sintomo anormale e quindi, attraverso esso, è possibile osservare i vasi della retina. In un cristallino, in cui è stata diagnosticata l'insorgenza di indurimento del nucleo, tale indurimento del nucleo si insinuò nello strato intermedio corticale, seguito da cerchi concentrici sotto forma di leggere onde sulla superficie polare. Da un punto di vista istologico, fu osservato un certo strato di delimitazione con diverse proprietà di responso alla colorazione, tra la regione circostante il nucleo e lo strato superficiale corticale, e furono osservate, a lato dei cerchi concentrici, porzioni di diverse dimensioni, rientranti o sporgenti. La diagnosi di opacità del cristallino fu invece fatta basandosi sull'osservazione dell'insorgenza di opacità di forma assiale nella normale corteccia. Tra questi non si osservarono notevoli opacità del cristallino prima del giorno 78 dall'inizio degli esperimenti.

Effetti dell'agente della presente invenzione,
somministrato per mezzo di gocce oculari.

La Tabella 1, sotto, mostra i risultati dell'osservazione del cristallino nel gruppo trattato con gocce oculari e nel gruppo di controllo, prima dell'inizio dell'esperimento, e ai giorni 39, 78 e 123 dall'inizio.

TABELLA 1

Gruppo trattato

	0	39	78	123 giorni
Trasparenza	3	0	4	0 occhi
Indurimento del nucleo	13	16	6	9
Opacità	4	2	6	3

Gruppo di controllo

	0	39	78	123 giorni
Trasparenza	3	0	0	0 occhi
Indurimento del nucleo	11	12	6	2
Opacità	0	0	4	2

La figura 3 mostra le percentuali di osservazioni dei suddetti cristallini. Nel gruppo trattato con gocce oculari la proporzione di cristallini opachi, che era del 20% prima della somministrazione delle gocce oculari, diminuì all'11%; la proporzione di cristallini trasparenti, che era del 15% prima delle

gocce oculari, diminuì a 0 al giorno 39 e successivamente aumentò fino al 38% al giorno 78. Come sopra descritto, gli effetti delle gocce oculari, contenenti l'agente della presente invenzione, sono chiaramente dimostrati.

Al contrario, nel gruppo di controllo, la proporzione di occhi trasparenti diminuì, mentre quella di occhi opachi aumentò all'aumentare dell'età. L'inasprimento dei sintomi risultò notevole.

Le Fig.4 e 5 mostrano il confronto con gli effetti rilevati, in seguito alla somministrazione dell'agente della presente invenzione, nello stesso campione di occhi.

Il cristallino in Fig. 4 mostra una leggera opacità, e lo stesso cristallino, un mese più tardi in Fig.5, mostra, per quanto riguarda la trasparenza, un considerevole miglioramento.

Grazie alle gocce oculari si rilevarono miglioramenti anche di sintomi locali: la diminuzione nel numero di cerchi concentrici, che fu osservata nei cristallini in cui era stato diagnosticato un indurimento del nucleo, e la diminuzione del cambiamento della struttura arcuata equatoriale, cioè della deformazione della curvatura del cristallino dovuta all'età.

ESEMPIO 2

(1) Procedimento

Procedimento che utilizza α -cristallino di bovino.

Uguali quantità, 20 mg/ml, di α -cristallino, ottenuto da cristallino bovino (prodotto dalla Sigma Co.), e 200 mM di D-glucosio furono mescolate e 100 microlitri della miscela risultante furono posti in una piastra da microtitolazione a 96 pozzetti. In ogni pozzetto furono poi aggiunte le soluzioni di 200 mM di cloruro di amminoguanidina e 20 mM di composto organico del germanio (1-1) sopra descritte, diluendo 5 volte per ogni diluizione, con il metodo di titolazione a compartimento chiuso. Una porzione di 7 microlitri di soluzione fu presa da un pozzetto, dopo il tempo prefissato, e diluita con 133 microlitri di un tampone fosfato 50 mM. Quindi la soluzione diluita fu posta in una colonna TSK-G3000SW, munita di un sistema a cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC), a cui furono collegati, per una rivelazione simultanea, un rivelatore di fluorescenza, per una lunghezza d'onda di eccitazione di 350 nm ed una lunghezza d'onda di fluorescenza di 440 nm, ed un rivelatore ultravioletto per 280 nm.

In tal modo i prodotti di Amadori, ottenuti dall' α -cristallino e dal D-glucosio, furono raccolti, lavati,

e successivamente risospesi in 0,5 mol di tampone fosfato e risuddivisi in piastra da microtitolazione a 96 pozzetti, in modo da esaminare gli effetti del composto organico del germanio (1-1) e dell'amminoguanidina.

Procedimento che utilizza albumina di siero bovino.

Uguali quantità, 200 mg/ml, di albumina di siero bovino in tampone fosfato 0,5 M (pH 7,4) e 400 mM di D-glucosio furono mescolate e ad esse furono poi aggiunte 3 mM di NaN_3 . L'amminoguanidina e il composto organico del germanio (1-1), sopra descritti, furono preparati separatamente e in modo che le loro concentrazioni fossero uguali ad un certo numero di concentrazioni prefissate, secondo il metodo della titolazione in compartimento chiuso, e furono quindi aggiunti alla suddetta soluzione. Impiegando l'intensità della fluorescenza come indicatore, furono esaminati i loro effetti sulla formazione dei prodotti di Amadori. In alternativa una miscela di albumina di siero bovino e di D-glucosio fu riscaldata a 37°C, per un lungo periodo di tempo, per ottenere i prodotti di Amadori. L'aggiunta del composto organico del germanio (1-1) e dell'amminoguanidina fu effettuata durante il processo di riscaldamento e successivamente fu effettuata nel tempo, tramite HPLC, la misurazione per

valutarne gli effetti.

(2) Risultati

Procedimento che utilizza α -cristallino bovino.

Sebbene la somministrazione di una dose di sola amminoguanidina, ad una concentrazione inferiore, abbia piuttosto promosso la formazione di prodotti di Amadori, è stato chiaramente dimostrato che l'agente della presente invenzione, contenente il composto organico del germanio (1-1), da una più bassa concentrazione ad una più alta, era efficace nel sopprimere la formazione dei prodotti di Amadori. Inoltre l'agente della presente invenzione, contenente il composto organico del germanio (1-1) e l'amminoguanidina, sopprime la formazione dei prodotti di Amadori che era stata osservata nel gruppo a cui era stata somministrata la sola amminoguanidina. In aggiunta, il grado di formazione dei prodotti di Amadori era inferiore per tutto l'intervallo di concentrazione, nel suddetto gruppo rispetto ai controlli positivi.

Una dose di sola amminoguanidina di 40 mM o 200 mM risultò efficace nei confronti della solubilizzazione reversibile dei prodotti di Amadori prodotti dall' α -cristallino. L'agente della presente invenzione, contenente il composto organico del germanio (1-1),

risultò efficace ad una concentrazione di 20 mM e l'agente della presente invenzione, contenente il composto organico del germanio (1-1) e l'amminoguanidina, risultò efficace a basse concentrazioni, rispettivamente, 800 microM e 320 microM.

I risultati sono parzialmente mostrati in Tabella 2.

I dati in Tabella 2 rappresentano i valori integrali dell'intensità della fluorescenza misurata da un rivelatore di fluorescenza con lunghezza d'onda di eccitazione a 350 nm e lunghezza d'onda di fluorescenza a 440 nm.

TABELLA 2

		Amminoguanidina cloridrata (nM)		
		0	4	20
Composto	0	825*	812	368
(1-1)	0,010240	407	352	263
(microM)	0,051200	321	390	232

Il valore ottenuto con il solo α -cristallino fu 137.

Il valore marcato con l'asterisco * fu ottenuto quando del D-glucosio venne aggiunto all' α -cristallino.

Procedimento che utilizza albumina di siero bovino.

Fu confermato che l'albumina di siero bovino e il D-glucosio formavano prodotti di Amadori di intensità

di fluorescenza superiore a 4×10^4 per 50 giorni. Il sistema sperimentale fu analizzato tramite HPLC e i risultati mostrano un notevole aumento di quantità di dimeri e trimeri dell'albumina di siero bovino.

Al sistema fu aggiunto l'agente della presente invenzione, contenente il composto organico del germanio (1-1) (4 mM) e l'amminoguanidina (200 mM), che portò ad una significativa soppressione della formazione di prodotti di Amadori.

La cooperazione tra il composto organico del germanio (1-1) e l'amminoguanidina fu confermata, in accordo con i risultati. I risultati sono mostrati in Fig.6. Il sistema sperimentale fu sottoposto ad analisi mediante HPLC ed i picchi corrispondenti ai dimeri e ai trimeri dell'albumina risultarono inferiori, mentre apparve un picco corrispondente a sostanze a più basso peso molecolare.

Una miscela di albumina di siero bovino e di D-glucosio fu riscaldata a 37°C, per 9 settimane, per ottenere una quantità sufficiente di prodotti di Amadori, e ad essa fu aggiunto l'agente della presente invenzione, contenente il composto organico del germanio (1-1) (20 mM) e l'amminoguanidina (200 mM). Come mostrato in Fig.7, fu osservata una significativa soppressione della formazione dei prodotti di Amadori,

che indica la presenza, anche in questo sistema, di un'azione di cooperazione tra il composto organico del germanio (1-1) e l'amminoguanidina.

Quando il sistema fu sottoposto all'analisi tramite HPLC, il picco corrispondente ai trimeri dell'albumina risultò essere divenuto il picco principale ed apparve il picco corrispondente a sostanze di più basso peso molecolare, mostrando un picco di assorbimento ultravioletto intenso ed una diminuita fluorescenza.

Questi risultati indicano che la formazione dei prodotti di Amadori era stata alterata e che le proteine che ne costituivano la struttura, si erano trasformate in sostanze a più basso peso molecolare.

ESEMPIO 3

Furono impiegati, quali animali da esperimento, topi, affetti da senilità accelerata: dodici topi di un mese d'età e dodici topi di 5 mesi. I due gruppi di età furono divisi in tre gruppi. Al gruppo 1 fu data la soluzione contenente 0,05 mg/ml dell'acido 1-idrossi-5-osso-5H-pirido(3,2-a)fenossazina-3-carbossilico (denominazione generica: pirenossina) (a cui si farà riferimento, da qui in poi, come alla soluzione di pirenossina); al gruppo 2 fu data sia una soluzione al 4%, contenente il composto organico del germanio (1-1) (a cui ci riferiremo come alla

soluzione Ge), sia la soluzione di pirebossina; al gruppo 3, quale gruppo di controllo, fu somministrata una soluzione placebo di acqua distillata contenente un agente di soppressione dell'attività superficiale. La somministrazione fu realizzata tramite gocce oculari, 4 volte al giorno, 6 giorni alla settimana. Prima dell'inizio della somministrazione delle gocce, ed ai giorni 30, 60, 90 e 120 dall'inizio, fu indotta la midriasi, impiegando del Midorin P (nome del prodotto), in tutti i soggetti sotto anestesia per iniezione intraperitoneale di 0,7 ml/kg di sodio nembutal, prima di osservarne il cristallino allo stereomicroscopio.

In questo esempio il cristallino dei topi, affetti da senilità accelerata, può essere classificato, a grandi linee, secondo quattro voci: cioè, trasparenza, formazione di cerchi concentrici, distorsione e opacità corticale. Con il termine "trasparenza" si intende lo stato in cui non sono presenti nel cristallino sintomi anormali ed in cui quindi, attraverso esso, si possono osservare i vasi della retina; con il termine "formazione di cerchi concentrici" si intende lo stato in cui si osservano sul cristallino da 2 a 5 anelli in cerchi concentrici; con il termine "distorsione" si intende l'incidenza

della distorsione dell'immagine sul fondo dell'occhio a causa della rifrazione anormale del cristallino; con il termine opacità corticale si intende l'incidenza dell'opacità a forma di cuneo o diffusa.

Due di tali sintomi, la formazione di cerchi concentrici e la distorsione, furono contemporaneamente rilevati in alcuni cristallini ed in questi casi, il sintomo che mostra i più forti cambiamenti fu scelto come sintomo anormale.

1. Esperimenti di somministrazione di gocce oculari a partire da 1 mese dalla nascita.

Occhi di topi di un mese d'età e affetti da senilità accelerata, furono esaminati prima della somministrazione delle gocce oculari. La maggior parte degli occhi, compresi quelli del gruppo di controllo, presentava un cristallino trasparente senza alcun sintomo anormale; in un soggetto del gruppo 2 (a cui sono somministrate, nello stesso tempo, la soluzione pirenossinica e la soluzione Ge) furono contemporaneamente rilevate una debole opacità corticale e nessuna anoftalmia dell'occhio.

L'esame che fu effettuato il giorno 30, dall'inizio della somministrazione delle gocce oculari, dimostrò che l'opacità corticale osservata prima della somministrazione delle gocce oculari, era scomparsa.

Inoltre, in un occhio del gruppo 1 (gruppo a cui è somministrata la soluzione pirenossinica), in un occhio del gruppo 2 (somministrazione simultanea della soluzione pirenossinica e della soluzione Ge) ed in due occhi del gruppo 3 (gruppo di controllo), erano presenti cerchi concentrici a forma di anello. L'esame effettuato al giorno 60, dall'inizio del trattamento con gocce oculari, indicò che, in un occhio del gruppo 1 ed in 4 occhi del gruppo 3, erano state osservate anomalie del cristallino quali la formazione di cerchi concentrici e la distorsione.

L'esame effettuato al giorno 90, dall'inizio del trattamento con gocce oculari, indicò che i 6 occhi con cristallino trasparente del gruppo 1, presentavano la formazione di cerchi concentrici (in 4 occhi) e di distorsione (in 2 occhi), il che sta ad indicare l'insorgenza di una cataratta ad uno stadio iniziale. Quattro occhi del gruppo 3 con cristallino distorto, non presentarono alcun cambiamento rispetto ai sintomi osservati nel precedente esame. Al contrario i cristallini del gruppo 2 erano in buone condizioni e i cristallini furono così diagnosticati trasparenti.

L'esame effettuato al giorno 120, dall'inizio del trattamento, mostrò che la distorsione, che era stata osservata in due occhi del gruppo 1 al giorno 90, era

Opacità

corticale 0 1 0 0 0 0 0 0 0

Sintomi

	Giorno 90			Giorno 120		
Gruppo trattato	1	2	3	1	2	3
N. di occhi	6	7	4	6	5	4
Trasparenza	0	7	0	0	5	0
Formazione di cerchi concentrici	4	0	0	6	0	1
Distorsione	2	0	4	0	0	3
Opacità corticale	0	0	0	0	0	0

Esperimenti di somministrazione di gocce oculari a
partire da 5 mesi dalla nascita.

Una traccia di cerchi concentrici, sotto forma di uno o due anelli, cominciava già ad apparire intorno al cristallino negli occhi di topi, affetti da senilità accelerata e dell'età di cinque mesi, ma la trasparenza del fondo dell'occhio fu comunque giudicata buona. Perciò essi furono temporaneamente classificati come cristallini trasparenti, prima dell'inizio del trattamento con gocce oculari.

L'esame che fu condotto al giorno 30, dall'inizio della somministrazione delle gocce oculari, mostrò chiaramente in due cristallini del gruppo 2 ed in 4 cristallini del gruppo 3, dei cerchi concentrici,

mentre gli occhi del gruppo 1 non presentarono alcuna variazione.

L'esame, condotto al giorno 60, dall'inizio della somministrazione delle gocce oculari, mostrò che i gruppi 1 e 2 presentavano buoni progressi, tanto che tutti gli occhi dei topi furono classificati come trasparenti, mentre, in quattro occhi del gruppo 3, si era indotta la formazione di cerchi concentrici, accompagnata da distorsione.

L'esame, condotto al giorno 90, dall'inizio della somministrazione delle gocce oculari, mostrò, per quanto riguardava i gruppi 1 e 2, l'insorgenza di notevoli cambiamenti che causavano formazione di cerchi concentrici (in 12 occhi) e distorsione (in 2 occhi). Anche nel gruppo 3, venne diagnosticata, per 4 occhi, distorsione ed un intenso cambiamento del corrispondente cristallino.

L'esame, condotto al giorno 120, dall'inizio della somministrazione delle gocce oculari, mostrò la formazione di cerchi concentrici in tutti i cristallini del gruppo 1 e del gruppo 2 (14 cristallini); in particolare la tendenza all'inasprimento di tale sintomo, accompagnata da distorsione, fu osservata in 4 occhi del gruppo 1 (gruppo di somministrazione della soluzione

Opacità

corticale 0 0 0 0 0 0 0 0 0

Sintomi

	Giorno 90			Giorno 120		
Gruppo trattato	1	2	3	1	2	3
N. di occhi	6	8	4	6	8	4
Trasparenza	0	0	0	0	0	0
Formazione di cerchi concentrici	4	8	0	2	8	1
Distorsione	2	0	4	4	0	2
Opacità corticale	0	0	0	0	0	1

Come chiaramente mostrato nell'esempio 3, l'effetto di prevenzione o quello di blocco del progresso della cataratta furono osservati su topi affetti da senilità accelerata dei gruppi 1 e 2 e confrontati con quelli del gruppo 3.

Per il gruppo a cui è stata somministrata la sola soluzione pirenossinica, comunque, fu osservata la presenza di un piccolo numero di topi con cataratta in stadio avanzato. Cioè i suddetti effetti non vanno necessariamente indicati come effetti assoluti. Al contrario nel gruppo 2, cioè nel gruppo a cui è stata somministrata la combinazione della soluzione Ge e della soluzione pirenossinica, tutti i cristallini rimasero trasparenti per un lungo periodo di tempo.

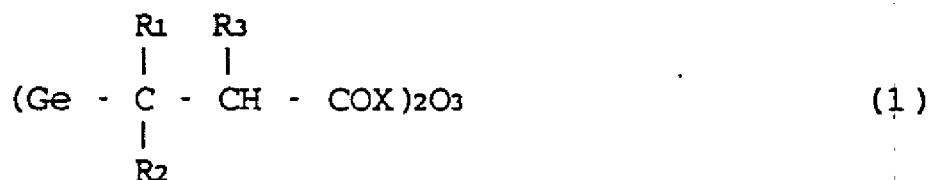
Oltre ai suddetti effetti, furono ottenuti notevoli miglioramenti in quanto cristallini con gravi sintomi, per esempio, di opacità corticale, recuperarono la trasparenza.

Nel suddetto esempio, anche gli altri composti, oltre al composto (1-1), una volta somministrati, mostrarono effetti approssimativamente identici a quelli sopra descritti.

La presente invenzione è come è stata descritta e quindi l'agente della presente invenzione è un eccellente agente per la prevenzione ed il trattamento dell'opacità del cristallino.

RIVENDICAZIONI

1. Un agente per la prevenzione ed il trattamento, dell'opacità del cristallino, contenente quale componente efficace un composto organico del germanio rappresentato dalla formula:



[dove R_1 - R_3 rappresentano atomi di idrogeno, gruppi alchilici inferiori, che possono essere uguali tra loro o differenti, scelti in un insieme

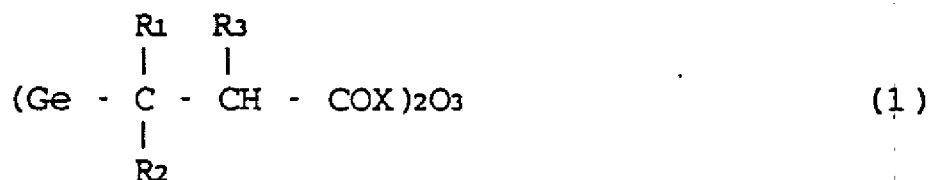
Oltre ai suddetti effetti, furono ottenuti notevoli miglioramenti in quanto cristallini con gravi sintomi, per esempio, di opacità corticale, recuperarono la trasparenza.

Nel suddetto esempio, anche gli altri composti, oltre al composto (1-1), una volta somministrati, mostrarono effetti approssimativamente identici a quelli sopra descritti.

La presente invenzione è come è stata descritta e quindi l'agente della presente invenzione è un eccellente agente per la prevenzione ed il trattamento dell'opacità del cristallino.

RIVENDICAZIONI

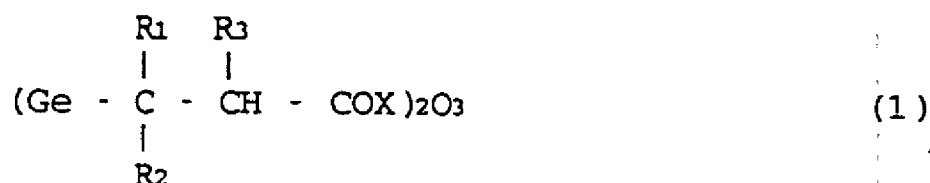
1. Un agente per la prevenzione ed il trattamento dell'opacità del cristallino, contenente quale componente efficace un composto organico del germanio rappresentato dalla formula:



[dove R_1 - R_3 rappresentano atomi di idrogeno, gruppi alchilici inferiori, che possono essere uguali tra loro o differenti, scelti in un insieme

comprendente il gruppo metile, l'etile, ecc. o gruppi fenili sostituiti o non sostituiti; X rappresenta un gruppo ossidrile, un gruppo o-alchile inferiore, un gruppo amminico o un O^-Y^+ (dove Y rappresenta un metallo quale il sodio, il potassio, ecc. o un composto avente un gruppo basico quale il lisozima e un amminoacido basico, ecc.)).

2. Un agente per la prevenzione ed il trattamento dell'opacità del cristallino, contenente quale componente efficace un composto organico del germanio rappresentato dalla formula:

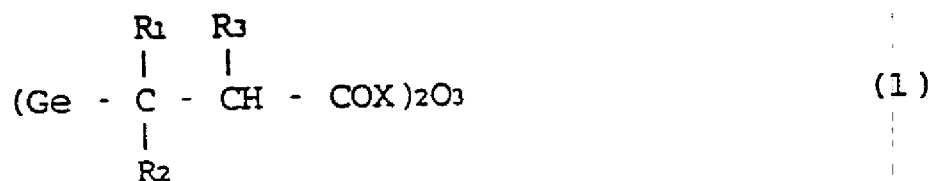


[dove R_1-R_3 rappresentano atomi di idrogeno, gruppi alchilici inferiori, che possono essere uguali tra loro o differenti, scelti in un insieme comprendente il gruppo metile, l'etile, ecc. o gruppi fenili sostituiti o non sostituiti; X rappresenta un gruppo ossidrile, un gruppo o-alchile inferiore, un gruppo amminico o un O^-Y^+ (dove Y rappresenta un metallo quale il sodio, il potassio, ecc. o un composto avente un gruppo

basico quale il lisozima e un amminoacido basico, ecc.)],

e l'amminoguanidina.

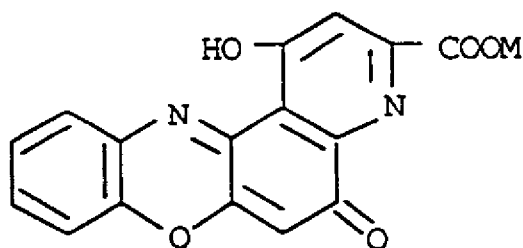
3. Un agente per la prevenzione ed il trattamento dell'opacità del cristallino, secondo le rivendicazioni 1 o 2, in cui il composto organico del germanio rappresentato dalla formula (1) è il composto in cui i sostituenti R_1-R_3 sono idrogeni e X è un gruppo ossidrile.
4. Un agente per la prevenzione ed il trattamento dell'opacità del cristallino, secondo le rivendicazioni dalla 1 alla 3, dove l'agente viene preparato sotto forma di gocce oculari, insieme a componenti noti quali l'acido borico, il cloruro di sodio, l'idrossido di sodio o il cloruro di benzalconio, l'acido ξ -amminocaproico, l'acido metil p-ossiamminobenzoico, il clorobutanolo e così via.
5. Un agente per la prevenzione ed il trattamento dell'opacità del cristallino, contenente quale componente efficace un composto organico del germanio rappresentato dalla formula:



[dove R_1-R_3 rappresentano atomi di idrogeno, gruppi alchilici inferiori, che possono essere uguali tra loro o differenti, scelti in un insieme comprendente il gruppo metile, l'etile, ecc. o gruppi fenili sostituiti o non sostituiti; X rappresenta un gruppo ossidrile, un gruppo o-alchile inferiore, un gruppo amminico o un O^-Y^+ (dove Y rappresenta un metallo quale il sodio, il potassio, ecc. o un composto avente un gruppo basico quale il lisozima e un amminoacido basico, ecc.)],

e un derivato fenossazinico.

6. Un agente per la prevenzione ed il trattamento dell'opacità del cristallino, secondo la rivendicazione 5, in cui il composto organico del germanio, rappresentato dalla formula (1), è il composto in cui i sostituenti R_1-R_3 sono idrogeni e X è un gruppo ossidrile.
7. Un agente per la prevenzione ed il trattamento dell'opacità del cristallino, secondo le rivendicazioni 5 o 6, in cui il derivato della fenossazina è rappresentato dalla formula:



[dove M è un atomo di idrogeno o un metallo quale il sodio, il potassio e così via].

8. Un agente per la prevenzione ed il trattamento dell'opacità del cristallino, secondo le rivendicazioni dalla 5 alla 7, contenente il sale sodico del composto organico del germanio e/o quello del derivato fenossazinico.
9. Un agente per la prevenzione ed il trattamento dell'opacità del cristallino, secondo le rivendicazioni dalla 5 alla 8, agente che viene preparato sotto forma di gocce oculari, insieme a componenti noti quali l'acido borico, il cloruro di sodio, l'idrossido di sodio o il cloruro di benzalconio, l'acido ϵ -amminocaproico, l'acido metil p-ossiamminobenzoico, il clorobutanolo e così via.
10. Un agente per la prevenzione ed il trattamento dell'opacità del cristallino, secondo le rivendicazioni dalla 5 alla 9, in cui almeno il composto organico del germanio ed il derivato fenossazinico vengono preparati separatamente nella formulazione voluta e tali formulazioni risultanti vengono mescolate per essere utilizzate, a seconda della necessità.

1 MANDATARI

(firma)

(per sé o per gli altri)

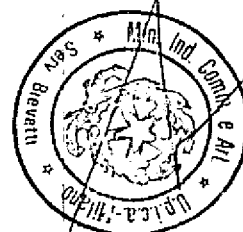


FIG. 1

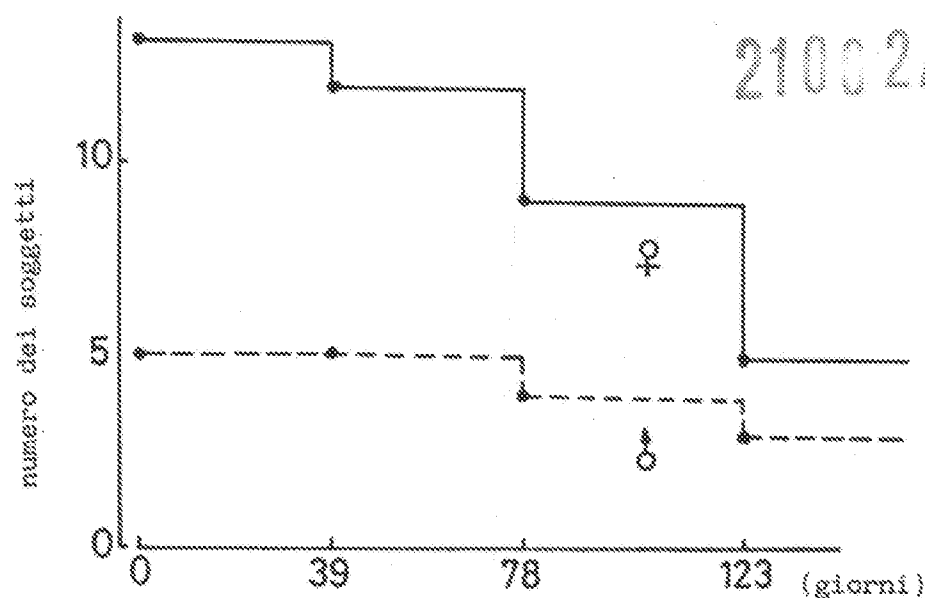
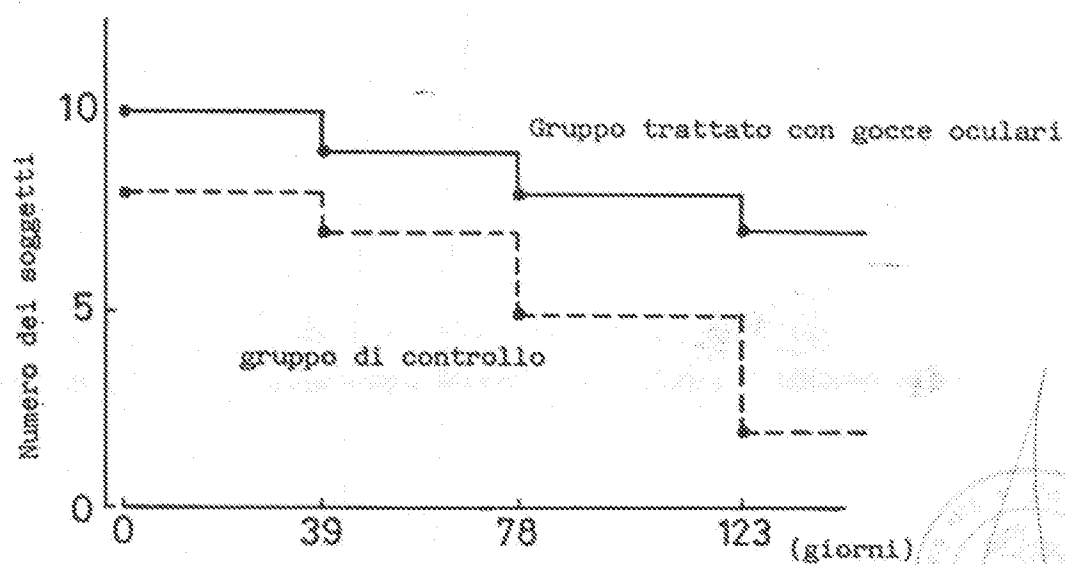


FIG. 2



I RAPPRESENTANTI

(firma)

R. Scott

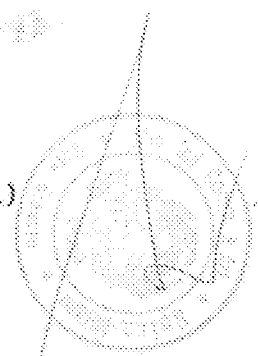
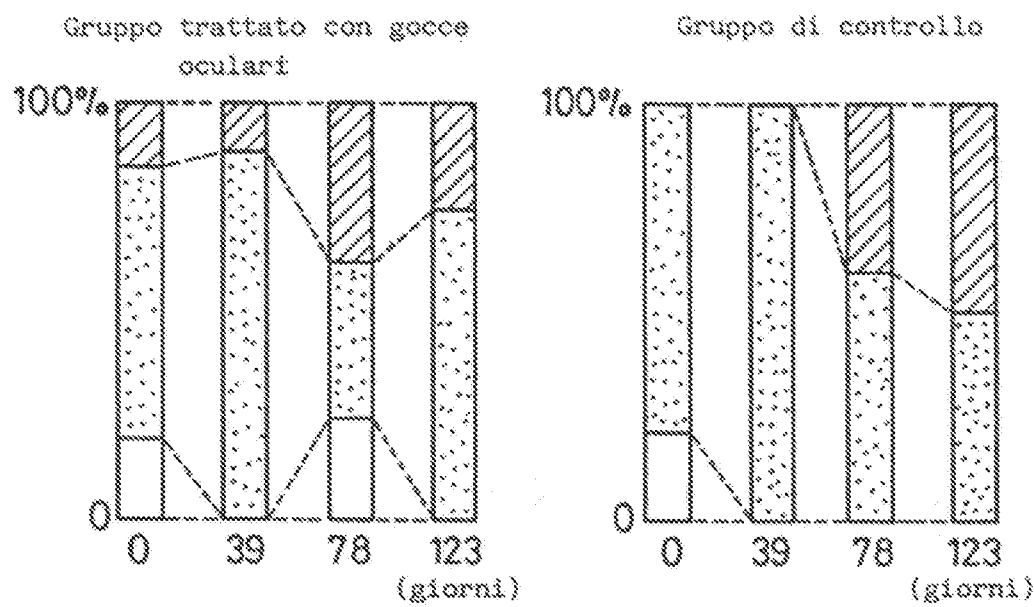
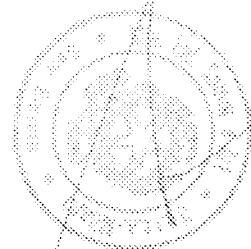


FIG. 3 2100 2A/90



-  Opacità
-  Indurimento del nucleo
-  Trasparenza



I. BAZZANI
(Dir.)

R. G. Lott
(Dir. di Ricerche)

FIG. 4 2100 2A/90

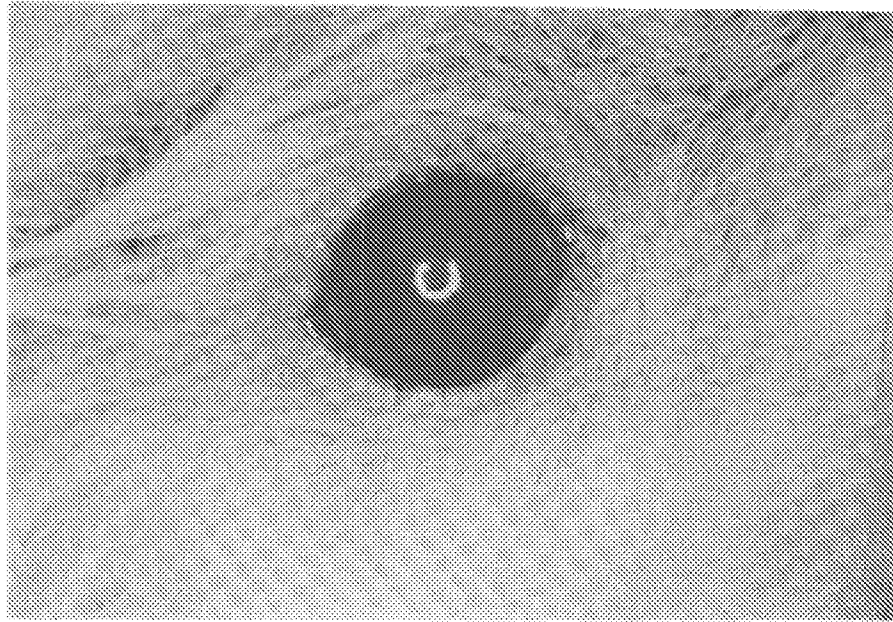
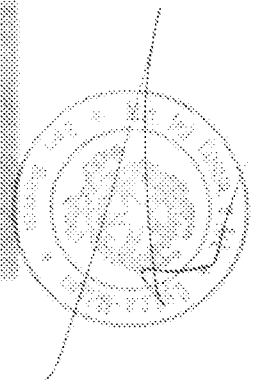
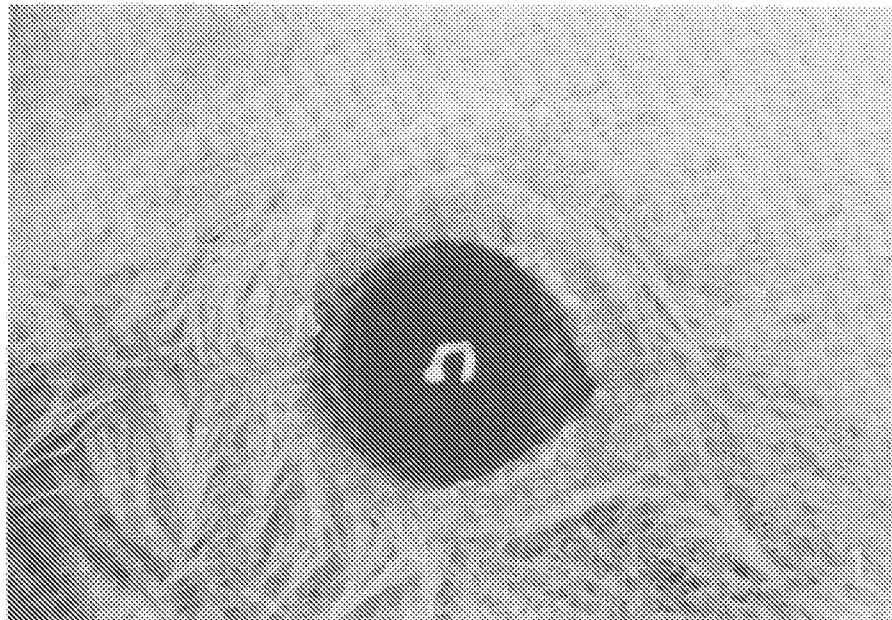


FIG. 5



1. MANDATARI:

(firma)

[Handwritten signature]

FIG. 6

- Albumina di siero bovino + D-glucosio
- ▲— Albumina di siero bovino
- Aggiunta dell'agente della presente invenzione

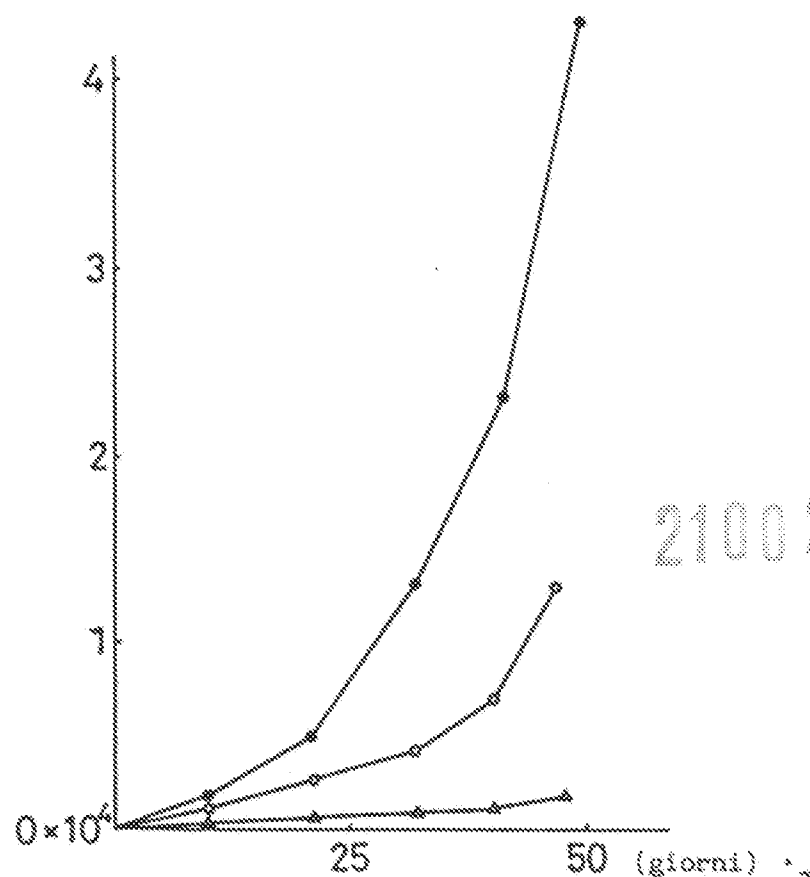
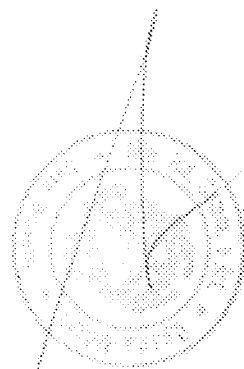
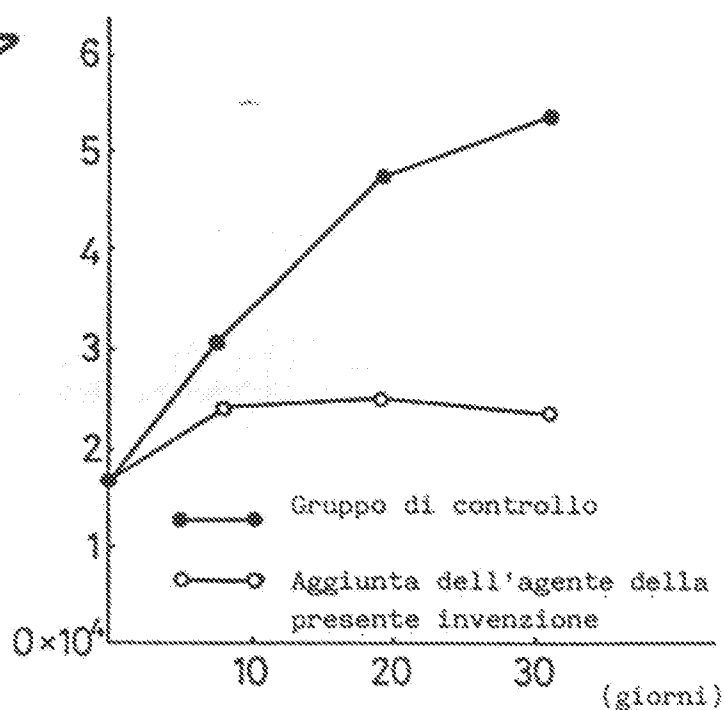
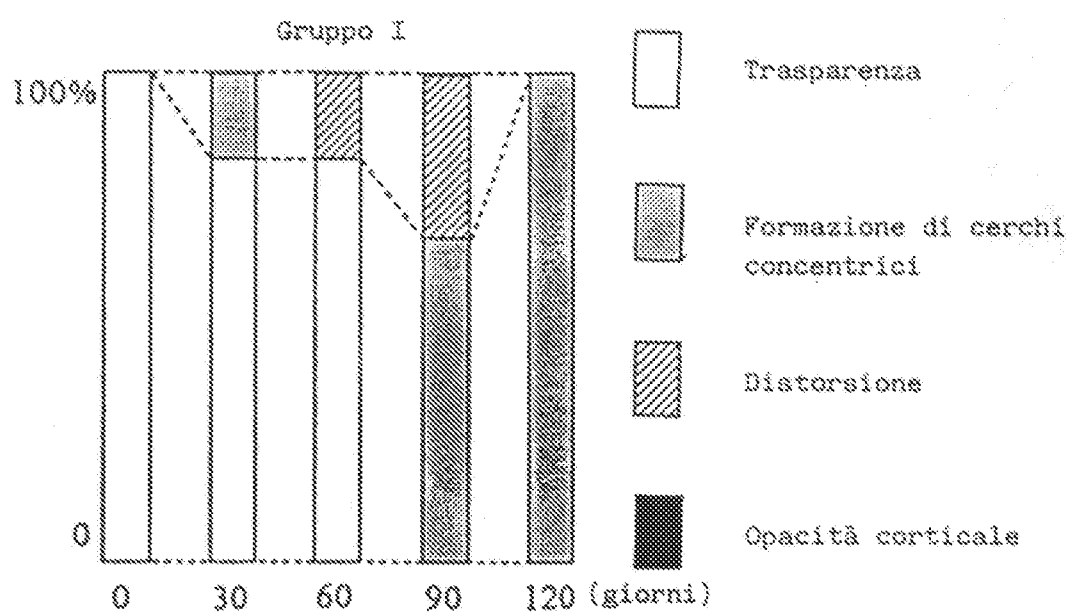


FIG. 7



Redatto:
(Firma) *[Signature]*

FIG. 8



2100 2A/90

FIG. 9

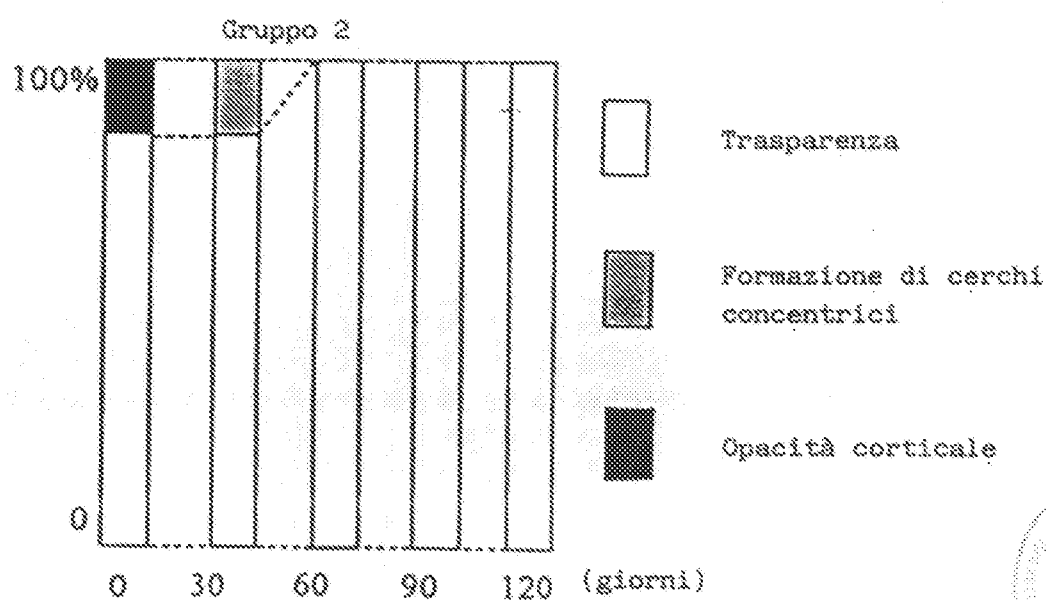
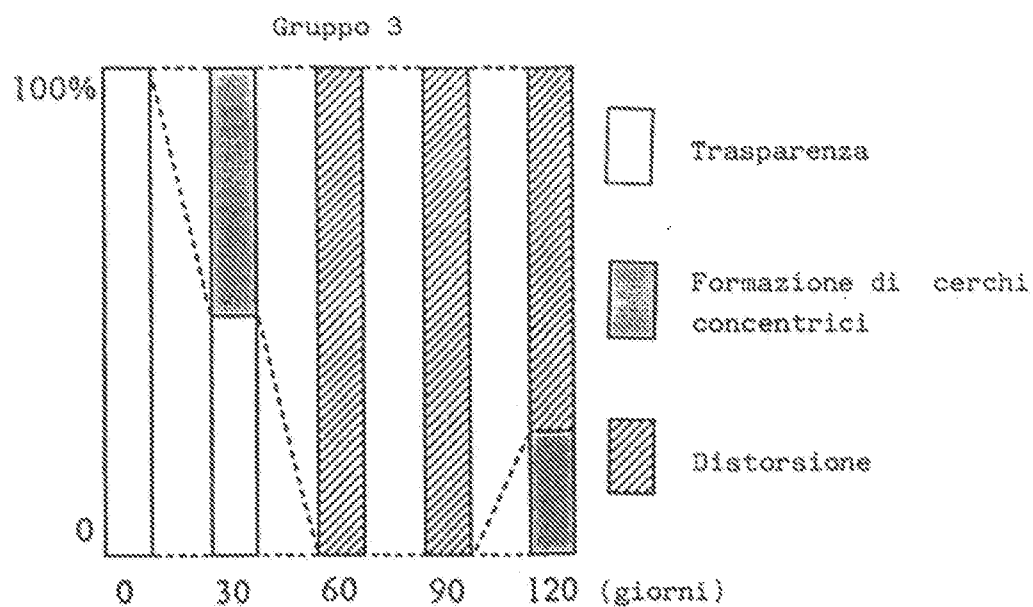
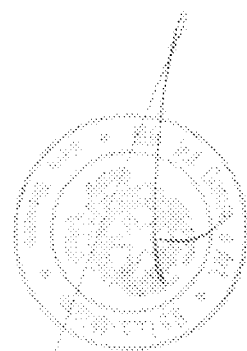
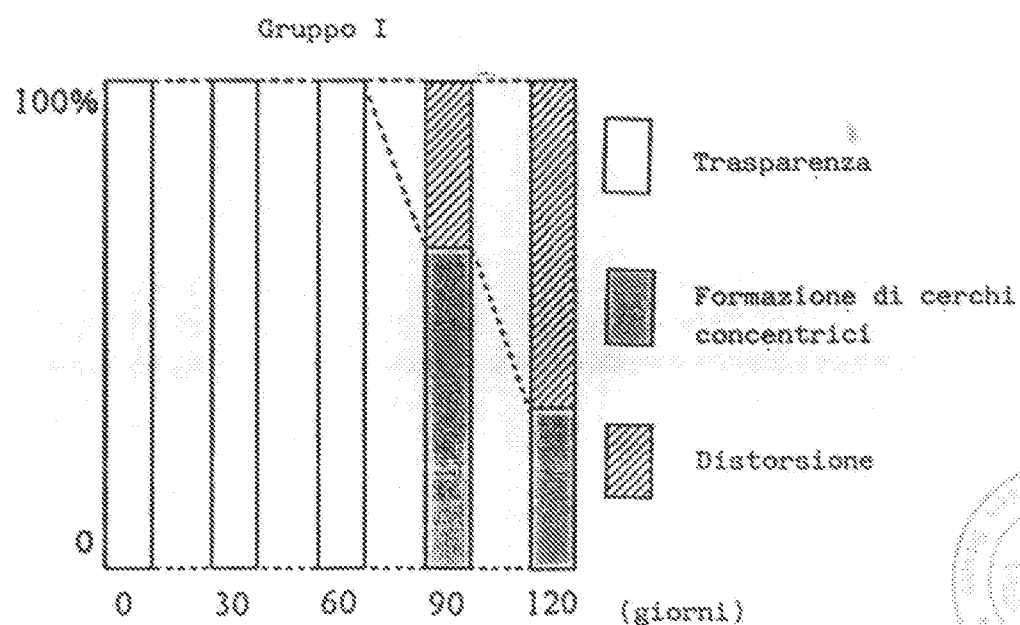


FIG. 10



2100 2A/30

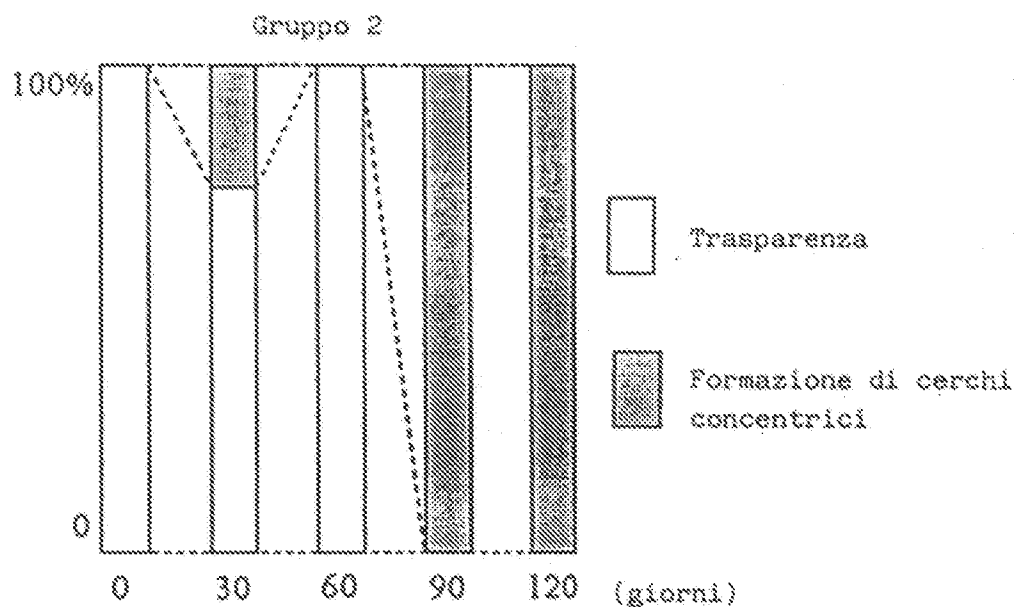
FIG. 11



2100 2A/30

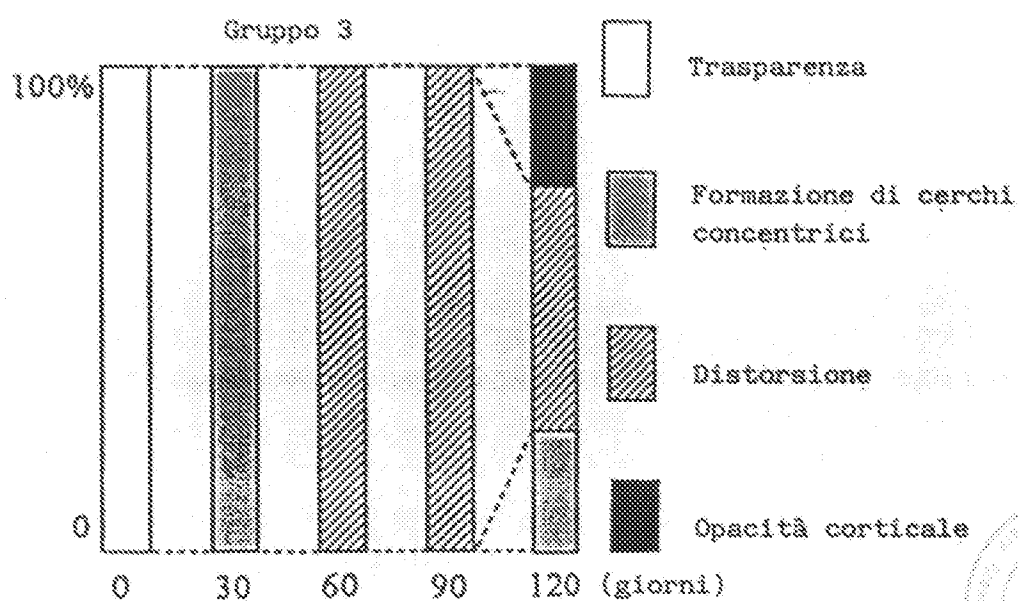
2100 2A/30

FIG.12



2100 2A/90

FIG.13



MANDATARI:

(Ricevuto)

(per sé o per gli altri)

