

CH 683966 A5



CONFEDERAZIONE SVIZZERA

UFFICIO FEDERALE DELLA PROPRIETÀ INTELLETTUALE

⑪ CH 683966 A5

⑤① Int. Cl.⁵: A 61 K 31/495
C 07 D 237/32

Brevetto d'invenzione rilasciato per la Svizzera ed il Liechtenstein

Trattato sui brevetti, del 22 dicembre 1978, fra la Svizzera ed il Liechtenstein

⑫ **FASCICOLO DEL BREVETTO** A5

⑳ Numero della domanda: 531/93

㉔ Data di deposito: 19.02.1993

㉔ Brevetto rilasciato il: 30.06.1994

㉔ Fascicolo del
brevetto pubblicato il: 30.06.1994

㉔ Titolare/Titolari:
L.I.M.A.D. Marketing Export & Import Anstalt c/o
Galaxy Management S.A., Genève

㉔ Inventore/Inventori:
Minin, Leonid, Genève
Saizev, Slava, Genève

㉔ Mandatario:
Troesch Scheidegger Werner AG, Zürich

⑤④ **Composti della classe dei ftalidrazidici come sostanze attive in agenti anti-ipossici e di difesa.**

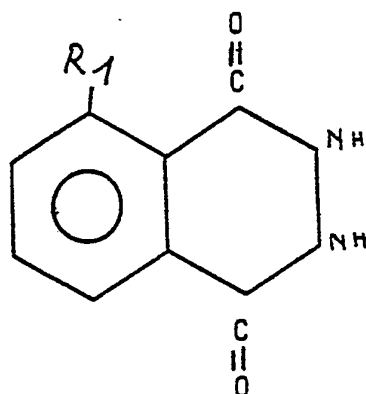
⑤⑦ L'invenzione riguarda l'uso di derivati ftalidrazidici e loro sali come agenti anti-ipossici e di difesa, con particolare riguardo all'uso della 5-aminoftalidrazide e suoi sali, quando somministrati in dosi elevate.



CH 683966 A5

Descrizione

La presente invenzione riguarda composti della classe dei ftalidrazidici aventi la formula generale



con $R_1 = -H -NH_2$.

I derivati ftalidrazidici hanno sorprendentemente mostrato di possedere proprietà finora sconosciute anti-ipossia e di difesa in organismi viventi animali.

Tali proprietà consistono nella possibilità di svolgere un'accentuata azione anti-ipossica e di difesa in caso di somministrazione nell'organismo in dosi di 10-300 mg/kg.

Sono stati fatti tentativi di utilizzare il 2,3 diidro ftalazina -1,4 dione ed alcuni dei suoi derivati per diminuire il livello del colesterolo nel sangue (Hall J.M. et al: Effect of 2,3-dihydrophthalazine-1,4-dione on Sprague-Dawley rats lipid metabolism and serum lipoproteins. Biomed Biochem Acta V.47(4-5) p. 423-433; 1988) mediante la modificazione della concentrazione delle protezioni lipidiche di densità molto bassa. Tuttavia, a causa di una certa manifestazione di tossicità, l'uso del preparato in questo contesto è stato limitato.

L'azione antitossica e di difesa dei derivati di questo gruppo di composti non erano note e non erano state descritte in letteratura.

Noi, per la prima volta, siamo riusciti a scoprire un meccanismo nuovo, del tutto unico, di azione delle ftalidrazidi, che si è manifestato solo con l'uso di grandi dosi in vivo.

Questo meccanismo di azione unico scoperto non scaturisce dall'analisi delle proprietà chimiche.

È stato da noi dimostrato in modo sperimentale che derivati ftalidrazidici aventi diversi radicali che sostituiscono gli atomi di idrogeno dell'anello benzolico o di raggruppamenti laterali, quali 2,3-diidroftalazina-1,4-dione; 5-amino-2,3-diidroftalazina-1,2 dione; sale sodico della 5-amino-2,3-dione 4-amino-2,3-diidroftalazina-1,2-dione; 4,5-diamino-2,3-diidroftalazina-1,2-dione; 4-metil-4,5-diamino-2,3-diidroftalazina-1,2-dione, possiedono un'accentuata attività farmacologica e, se somministrati nelle dosi sopra indicate, svolgono anche un'azione anti-ipossica e di difesa eliminando gli esiti dell'eccessiva attività dei leucociti.

I due composti 4-aminoftalidrazide e 5-aminoftalidrazide hanno dimostrato di possedere l'effetto terapeutico maggiore. Tuttavia, la 5-aminoftalidrazide ed i suoi sali durante le prove effettuate successivamente (farmacologiche e tossicologiche) ha soddisfatto i requisiti prestabiliti e pertanto è stato prescelto come preparato di base adatto ad essere utilizzato in medicina.

Dati chimici

a) Proprietà fisiche

La 5-aminoftalidrazide appartiene alle piridazine a basso peso molecolare (inferiore a 200). Punto di fusione : $> 250^{\circ}C$.

Profilo di pH solubilità:

pH 6,5 c = 2mM

pH 7,4 c = 12mM

Il coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua è pH dipendente.

a pH 7,4 c = 0,2

b) Proprietà chimiche

pK = 6,3

Stabilità: il composto è stabile in condizioni anidre (tempo di conservazione 1 anno). Esso è qualche volta instabile in soluzioni acquose (probabilmente per coossidazione con alcune miscele di quelle presenti in concentrazioni in tracce. Tempo di scadenza per la soluzione acquosa > 10–20 ore.

Rotazione attiva: assente.

5 Dati tossicologici

a) Tossicità acuta

10 Prove di tossicità acuta sono state effettuate su due specie animali (topi, ratti). Sono stati usati più di 80 topi e 100 ratti. Il farmaco viene introdotto p.o. ed i.p. in dosi da 500 a 2500 mg/kg (dose singola). Il periodo di osservazione è di 14 giorni. Non si osservano variazioni morfologiche nei tessuti di fegato, rene, cuore, cervello. La percentuale di esiti letali nei gruppi sperimentali non supera quella dei gruppi di controllo.

15 b) Tossicità mutagenica

La tossicità mutagenica viene valutata mediante i sistemi di prova batterica di Ames. Queste prove vengono effettuate in ceppi di *S. typhi* TA 100, TA 102, TA 97. Si usa il sistema attivatore microsomico del fegato di ratto indotto mediante metilcolantrene. I dati mostrano che la 5-aminoftalidrazide non possiede né attività inibitoria né mutagenica in concentrazioni tra 0,01 e 2 mg/ml.

c) Tossicità di riproduzione

25 Prove teratogene e di embriotossicità vengono effettuate su 58 ratti femmine gravide. La dose singola viene iniettata intraperitonealmente al giorno 1, 3, 7, 10, 14 o 17 di gravidanza (60 mg/kg). I ratti vengono decapitati al 21° giorno di gravidanza e si osservano gli uteri ed i feti. Non si rivela alcuna anomalia dei feti. I siti di impianto, il numero, il peso e la mortalità dei feti non differiscono da quelli del gruppo di controllo.

30 d) Citotossicità

Le cellule usate come obiettivi sono linfociti, macrofagi e fibroblasti. Una vitalità dopo esposizione di 24 ore in vitro con 5-aminoftalidrazide in concentrazioni di 0,01–0,8 mmoli/litro viene stabilita mediante incorporazione e/o sintesi proteinica. Non si osserva alcuna atossicità per tutte le dosi provate.

35 L'attività allergenica del preparato è stata studiata sui porcellini d'India nella somministrazione del preparato sia per via sottocutanea sia per os non si sono osservate manifestazioni di allergia. Nella sede di somministrazione, anche in caso di grandi dosi, non si sono rilevati eritemi. Non si sono osservate neppure proprietà di irritazioni locali in caso di somministrazione nella dose di 20–100 mg.

40 Studio dell'influenza sul sistema nervoso centrale

Per lo studio delle proprietà farmacologiche sul sistema nervoso centrale si sono utilizzate dosi da 40 a 80 mg/kg di peso. La scelta della dose era basata su criteri di sicurezza dell'impiego dei medicinali.

45 Gli effetti neurofarmacologici sono stati studiati su topi maschi di razza indefinita che avevano raggiunto la maturità sessuale. A questi topi, del peso di 18,0–20,0 g, è stata somministrata una soluzione del preparato per via intraddominale, gli effetti neurofarmacologici sono stati studiati sulla base del cambiamento del riflesso naturale dell'orientamento, dell'aggressività provocata, della modifica del tono muscolare. Il cambiamento del senso dell'orientamento naturale è stato registrato secondo la metodica in uso. Per studiare l'influenza sull'aggressività provocata si è utilizzata la metodica della stimolazione elettrica (si trasmette corrente elettrica che provoca dolori).

50 La modifica del tono muscolare è stata valutata secondo la metodica del «perno girevole».

Il preparato in dosi da 40 e 80 mg/kg di peso non ha soppresso il riflesso naturale di orientamento, non ha causato alterazioni del tono muscolare e non ha modificato la soglia della sensibilità al dolore.

55 È stata studiata l'influenza del preparato sulla durata della narcosi provocata con Hexenalum: si è somministrato il preparato in dosi da 10 e 30 mg/kg di peso, 15 minuti prima di somministrare la soluzione di Hexenalum nella dose di 80 mg/kg. Nelle dosi studiate la 5-aminoftalidrazide non ha provocato un prolungamento attendibile del sonno indotto dal Hexenalum.

60 Studiando l'attività anticonvulsiva del preparato si è stabilito che la somministrazione preventiva del preparato ai topi in dosi di 40 e 80 mg/kg di peso non sconsiglia le convulsioni da Corazolum e Stricnina, provocate con la titolazione endovenosa dei preparati convulsivi. Nelle dosi sopraindicate la 5-aminoftalidrazide non ha attenuato le convulsioni sviluppatesi.

Ricerca degli effetti del sale sodico della 5-aminoftalidrazide sul sistema cardiovascolare

65 L'influenza del sale sodico della 5-aminoftalidrazide sulla pressione arteriosa (PA) è stata studiata su

ratti maschi del peso di 230,0–270,0 g, narcotizzati con uretano, in esperimento forzato. La registrazione della pressione arteriosa è stata eseguita su nastro mediante un chimografo elettrico.

Contemporaneamente abbiamo registrato l'elettrocardiogramma nel secondo posizionamento standard ed il cambiamento della frequenza e della profondità della respirazione mediante la capsula di Morey. Abbiamo somministrato 5-aminofthalidrazide nella vena femorale sotto forma di soluzione acquosa preparata in soluzione al 2% di bicarbonato di sodio ($\text{Ph} = 8,2$) in dosi da 40 mg/kg, da 80 mg/kg di peso e 50 mg/kg. La ricerca sulla 5-aminofthalidrazide è stata effettuata su 16 ratti.

Risultati: La somministrazione endovenosa della soluzione all'1% della 5-aminofthalidrazide alla velocità di 0,6 ml/min., era seguita da un breve aumento della pressione arteriosa in media dell' $1,57 \pm 5,93\%$ in confronto al livello iniziale. Non si sono osservate brusche oscillazioni di aumento della pressione arteriosa durante la somministrazione della 5-aminofthalidrazide sia nella dose di 40 mg/kg, sia nella dose di 50 mg/kg di peso. 5 minuti dopo l'inizio della somministrazione della 5-aminofthalidrazide la pressione arteriosa diminuiva gradualmente e, in media, dopo 30 minuti ritornava al livello iniziale.

Le oscillazioni del livello della pressione arteriosa 30 minuti dopo la somministrazione della 5-aminofthalidrazide erano in media di $2,79 \pm 0,72$ in confronto alla pressione arteriosa di partenza.

Durante l'esecuzione dell'esperimento non si sono osservati cambiamenti nei parametri elettrocardiografici del cuore, non si sono rivelate neppure soppressioni delle funzioni della respirazione in casi di somministrazione della 5-aminofthalidrazide in dosi da 20 mg/kg e 50 mg/kg di peso.

Pertanto lo studio sperimentale della 5-aminofthalidrazide somministrata in dosi da 40 e 50 mg/kg di peso non ha evidenziato una sua influenza negativa sul sistema cardio-vascolare e sulla respirazione. La tendenza osservata all'aumento della pressione arteriosa, subito dopo la somministrazione endovenosa, può essere spiegata come reazione di risposta (compensatoria) del sistema cardio-vascolare dei ratti al cambiamento della riserva alcalina del sangue; questo fattore è stato dimostrato dalla somministrazione della soluzione al 2% di bicarbonato di sodio.

Varietà dei medicinali:

Le varietà dei medicinali più utilizzate sono state: fiale per le iniezioni endovenose ed intramuscolari, supposte per la somministrazione per via rettale, soluzioni per gargarismi.

1) La preparazione del sale di sodio della 5-aminofthalidrazide è adatta per la somministrazione per via intramuscolare ed endovenosa.

Il sale di sodio della 5-aminofthalidrazide, con un grado di purezza non inferiore al 96–98%, è stato diluito nel minor volume possibile di acqua particolarmente deionizzata, ed è stato versato in fiale dalle pareti opache, in modo che in ciascuno vi fossero 100 mg di preparato. Abbiamo quindi liofilizzato le fiale, le abbiamo chiuse con un tappo sterile, saldato i tappi e le abbiamo sterilizzate mantenendole alla temperatura di 140–160°C per 60 minuti.

I contenitori utilizzati per gli animali contenevano una quantità maggiore di preparato: 250 mg.

Le soluzioni acquose del preparato conservano l'attività completa per 60–80 minuti.

L'elevata efficacia terapeutica del preparato è determinata dalle seguenti proprietà:

1) Dall'azione antiossidante in vivo, stabilita sulla base del cambiamento del contenuto di etano e pentano nell'aria espirata dagli animali sottoposti ad esperimento.

2) Dalla diminuzione della capacità di adesione dei leucociti.

Quest'ultimo fattore è assai importante, poichè è noto che in caso di ipossie acute (infarto del miocardio, insulto, ecc.), estesi tratti di tessuto vengono lesi dai prodotti dell'attività dei leucociti. Questi infatti penetrano nel focolaio ischemico alla ripresa della circolazione sanguigna.

L'attacco leucocitario è alla base della reazione di rigetto nei trapianti degli organi e dei tessuti.

Infine la formazione di un eccesso di radicali liberi di ossigeno nei tessuti colpiti nei pazienti affetti da psoriasi, determina, in misura notevole, l'insorgere dei sintomi clinici della malattia.

Il periodo di emivita del preparato in caso di somministrazione endovenosa sotto forma di sale di sodio in dosi di 100–200 mg/kg è di 65–75 min., tuttavia gli effetti manifestatisi (il cambiamento della proprietà di adesione dei leucociti) viene fissato nel corso di 6–11 ore.

La durata dell'effetto anti-ipossico viene determinata dalla dose di preparato somministrata; tuttavia, anche accrescendo le dosi oltre i 100 mg/kg, tale effetto praticamente non aumenta. In caso di somministrazioni in dosi di 60–80 mg, l'attività antiipossica dell'azione del sale di sodio della 5-aminofthalidrazide supera quella degli antiossidanti finora utilizzati nella pratica medica (dibunolo, istidina, orgateina, ecc.). Per conservare l'azione il preparato deve essere somministrato ogni 12 ore.

Queste proprietà del preparato possono essere sfruttate con esito positivo nella rianimazione, dove il numero dei preparati efficaci è alquanto limitato.

L'infarto del miocardio, per quantità di esiti letali, occupa un posto preminente tra le malattie acute. L'apice della mortalità viene raggiunto al 3°–6° giorno dell'inizio della malattia, quando nel miocardio avviene il processo di rinnovo della circolazione.

Gli antiossidanti, analoghi al preparato proposto, non danno l'effetto terapeutico desiderato poichè i

leucociti, penetrando nel tessuto ischemico colpito, non solo liberano i radicali dell'ossigeno che ledono i tessuti, ma anche enzimi e proteine tossiche.

Il sale sodico della 5-aminofthalidrazide, somministrato una volta per via endovenosa in dosi di 150–250 mg/kg, elimina dopo 6 ore il 75% dei leucociti precedentemente penetrati, e con questo garantisce la sopravvivenza del tessuto colpito. Nello stesso tempo il contenuto di leucociti nel sangue degli animali sottoposti agli esperimenti è aumentato di 2,5 volte.

Aumenta anche contemporaneamente la possibilità di sopravvivenza degli animali trattati. Nel gruppo sperimentale (cui era stato somministrato il preparato) la percentuale di animali sopravvissuti ha raggiunto l'80% ($P < 0,01$), mentre nel gruppo di controllo, costituito da animali trattati con antiossidanti, tale percentuale è stata solo del 50% ($P > 0,05$).

Il preparato proposto pertanto, sia in rapporto al grado di efficacia terapeutica, sia in relazione al meccanismo dell'azione, non ha analoghi nel momento attuale.

Le iniezioni intramuscolari di 5-aminofthalidrazide si sono rivelate meno efficaci, il numero di animali sopravvissuti è aumentato (60%), ma in percentuale inattendibile ($P > 0,05$).

Risultati simili sono stati ottenuti anche su un modello di insulto ischemico. In una serie di casi, mediante la somministrazione del preparato, si è riusciti a prevenire gli esiti della ipossia acuta focale. Tuttavia, in questo caso, una sola somministrazione del preparato si è rivelata insufficiente e l'effetto terapeutico maggiore è stato ottenuto dopo due somministrazioni del preparato ad intervalli di 12 ore. Le ricerche morfologiche effettuate hanno confermato i risultati ottenuti.

L'orientamento della medicina che si sta rapidamente sviluppando in questi ultimi anni, cioè il trapianto degli organi e dei tessuti non può svilupparsi in modo completo a causa della mancanza di mezzi terapeutici che prevengano l'attacco leucocitario del trapianto.

I preparati (analoghi) utilizzati a questo scopo, ormoni, immunodepressivi, ecc., comportano molte complicanze ed effetti collaterali e non sono abbastanza efficaci, neppure in caso di impiego combinato.

Le analisi comparate hanno dimostrato che il preparato proposto in dosi di 100–200 mg/kg di peso, supera per efficacia i preparati ormonali finora conosciuti (corticosteroidi) ad azione prolungata.

Il trattamento è stato iniziato il secondo giorno dopo il trapianto cutaneo da un altro animale ed è stato protratto per 45–50 giorni.

La somministrazione combinata di sale della 5-aminofthalidrazide, di ormoni ed immunodepressivi, ha consentito di aumentare il numero degli attecchimenti degli etero-trapianti, fino al 40% dei casi. Negli altri casi si è riusciti ad ottenere un notevole allungamento del periodo di rigetto.

Per il trattamento della psoriasi, attualmente vengono utilizzati i corticosteroidi, mezzi antimicotici, ad esempio ciclosporine, ecc.

Tuttavia nella maggioranza dei casi perfino il trattamento combinato si è rivelato inefficace.

La somministrazione quotidiana ai pazienti in dosi di 12–20 mg/kg ha modificato il quadro clinico della malattia.

Si è manifestata una dinamica positiva, è cioè scomparso il prurito, è diminuita la temperatura, si è ridotta la superficie della zona colpita.

Tuttavia l'effetto terapeutico del preparato aumentava notevolmente qualora i tratti cutanei venissero trattati anche con una soluzione al 4% di 5-aminofthalidrazide in soluzione al 10% di DMSO. In tal caso si è riusciti ad eliminare tutte le manifestazioni patologiche in breve tempo, cioè 10–12 giorni. Contemporaneamente, in questo periodo, è avvenuta l'epitelizzazione delle pustole.

Nelle formazioni patologiche residue, con l'analisi istologica (prelievi biotici), si è fissata la diminuzione (dell'80–92%) del contenuto dei neutrofili nelle cellule epidermiche alterate.

Questi ultimi sintomi visivi della malattia sono scomparsi al 45°–55° giorno dall'inizio del trattamento. La recidiva è stata osservata nei 4–8 mesi seguenti e, pertanto, una volta ogni quattro mesi è opportuno effettuare sui pazienti un trattamento di prevenzione per 10–15 giorni con una dose di preparato di 10–15 mg/kg senza trattamento locale dei tessuti cutanei.

L'azione del preparato, utilizzato in dosi notevoli, è stata confermata in numerosi casi.

In tutti i casi, è stata dimostrata la sua elevata efficacia terapeutica ed i vantaggi che esso offre in confronto ai preparati analoghi finora conosciuti.

Le ricerche farmacologiche effettuate hanno dimostrato l'assenza di tossicità in caso di somministrazione del preparato nell'organismo animale.

Esempio 1

Abbiamo valutato l'attività farmacologica sulla base della resistenza degli animali all'ipossia. Pertanto abbiamo posto gli animali (topi del peso di 18–20 gr) in una camera barica e li abbiamo «portati» ad un'altezza di 10.400 metri alla velocità di 100 metri al secondo. Abbiamo somministrato il preparato per via endovenosa in 0,1 ml. di soluzione fisiologica in dosi da 10 a 300 mg. In alcuni casi, a causa della cattiva solubilità, abbiamo iniettato i derivati sotto forma di sospensione. Agli animali di controllo abbiamo somministrato 0,1 ml. di soluzione fisiologica.

Si è evidenziato che l'effetto principale dei diversi preparati si è manifestato nelle dosi da 10 a 200 mg/kg.

ftalidrazide: 10–15 mg/kg
 5-aminoftalidrazide: 60–80 mg/kg
 5-aminoftalidrazide sale di sodio: 50–70 mg/kg
 4-aminoftalidrazide: 105–130 mg/kg
 4,5-aminoftalidrazide: 150–180 mg/kg
 4,5-metilaminoftalidrazide: 160–200 mg/kg

Anche il grado di accentuazione dell'effetto terapeutico non era uguale, ed il periodo di vita degli animali sottoposti ad esperimento è oscillato in limiti compresi tra 88 e 299 secondi, mentre negli animali di controllo oscillava ed era di $41 \pm 2,5$.

L'attività farmacologica maggiore è stata manifestata dal sale di sodio della 5-aminoftalidrazide in dosi da 60–80 mg/kg, 222 ± 45 ; l'attività farmacologica minore dalla dimetildiamminoftalidrazide cioè 89 ± 12 .

Conclusione: i derivati ftalidrazidici possiedono un accentuato effetto anti-ipossico.

Esempio 2

Gli esperimenti per provare la resistenza degli animali all'ipossia ipobarica sono stati eseguiti su 120 topi maschio del peso di 18,0–20,0 che avevano raggiunto la maturità sessuale.

Agli animali, 5 minuti prima dell'esperimento, sono state somministrate per via intramuscolare le seguenti dosi:

al primo gruppo (gruppo di controllo) 0,1 ml di soluzione fisiologica, al secondo gruppo (gruppo di raffronto) una soluzione oleosa al 20% nella dose di 30 mg/kg
 al terzo gruppo 5-aminoftalidrazide nella dose di 30 mg/kg
 al quarto gruppo 5-aminoftalidrazide nella dose di 60 mg/kg
 al quinto gruppo 5-aminoftalidrazide nella dose di 80 mg/kg
 al sesto gruppo 5-aminoftalidrazide nella dose di 150 mg/kg
 al settimo gruppo il preparato nella dose di 200 mg/kg

Il periodo di tolleranza dell'ipossia è stato determinato sollevando gli animali fino all'altezza di 10.400 metri alla velocità di 100 metri al secondo.

Come si può desumere dai dati riportati nella tabella, in tutti i casi il preparato prolunga la vita in condizioni di ipossia ipobarica. Tuttavia, se nella dose di 30 mg/kg di peso, il preparato possiede un'efficacia terapeutica inferiore all'azione del noto antiossidante dibunolo, qualora si aumenti la quantità del preparato somministrato fino a 100 mg, quest'ultimo supera l'efficacia del dibunolo in modo attendibile ($P < 0,001$).

L'effetto terapeutico maggiore è stato registrato con la somministrazione della dose di 80 mg/kg. L'ulteriore aumento della quantità di preparato somministrato non ha fatto aumentare l'effetto terapeutico raggiunto.

Esempio 3

Si sono seguiti esperimenti su 60 ratti precedentemente preparati, ai quali 30 giorni prima dell'inizio dell'esperimento principale era stata applicata una legatura su un tratto dell'arteria coronarica.

Quindi, dopo aver provocato una leggera narcosi, mediante la strozzatura del vaso abbiamo creato un massiccio focolaio di ischemia del miocardio e, 12–15 minuti dopo abbiamo ripristinato bruscamente la circolazione sanguigna.

Abbiamo somministrato il sale di sodio in dosi da 30, 100, 200, 250 mg/kg di peso, per via endovenosa, subito dopo aver allentato la legatura. Nel gruppo di controllo ai ratti è stata somministrata una soluzione fisiologica, mentre nel gruppo di confronto si è somministrato l'antiossidante dibunolo (soluzione oleosa al 20% in una dose di 30 mg/kg).

Si è stabilito quanto segue: 1) Nella serie di esperimenti di controllo la mortalità degli animali ha raggiunto il 60%. L'apice degli esiti letali si aveva al secondo giorno. 2) Nel gruppo di raffronto si è registrata la tendenza all'aumento della sopravvivenza degli animali, tuttavia i risultati ottenuti non erano attendibili ($P > 0,05$).

3) Anche la dose di 30 mg/kg non preveniva la morte degli animali $P > 0,05$, sebbene nel gruppo di raffronto si notassero dei sintomi evidenti del manifestarsi dell'effetto terapeutico. 4) L'aumento della dose del preparato fino a 100 mg/kg ed oltre portava ad un incremento del numero degli animali sopravvissuti ($P < 0,01-0,001$).

La percentuale degli animali sopravvissuti è oscillata nelle diverse serie dall'80 al 100% e non è dipesa, sostanzialmente, dall'ulteriore aumento della dose di preparato somministrato. L'aumento ulteriore della dose di preparato è stata determinata da difficoltà tecniche.

L'analisi morfologica del miocardio ha mostrato la presenza di estesi focolai di necrosi nella serie di controllo. Nel gruppo sperimentale, visivamente la zona di lesione non era evidenziata. I microfocolai di necrosi erano poco numerosi e diffusi.

Pertanto si può concludere che il maggior effetto terapeutico si è manifestato in caso di somministrazione endovenosa del preparato in dosi da 100 mg/kg fino a 300 mg/kg di peso.

Esempio 4

Abbiamo eseguito gli esperimenti su 50 topi delle piramidi ai quali, in condizioni di leggera narcosi, abbiamo applicato una legatura sul ramo della carotide. 7 minuti dopo, abbiamo allentato la legatura e ripristinato la circolazione sanguigna nella zona ischemica. La mortalità degli animali nel gruppo di controllo ha raggiunto la percentuale del 50% e non è stata assolutamente evitata dall'azione del dibunolo, dell'istodine e degli altri antiossidanti.

Il preparato somministrato in dosi da 30 mg/kg di peso non ha influito in modo attendibile sul decorso del processo patologico. La percentuale di animali sopravvissuti non è aumentata ($P > 0,05$).

Un effetto terapeutico accentuato è stato ottenuto in caso di somministrazione endovenosa del preparato nella dose di 100 mg/kg. Sono sopravvissuti 9 su 10 animali di questo gruppo.

In 8 casi erano assenti i sintomi del deficit neurologico.

In caso di somministrazione intramuscolare nella stessa dose, l'effetto terapeutico era irrilevante. Sono sopravvissuti 6 animali su 10, mentre i sintomi del deficit neurologico sono stati registrati in 3 casi. Si è stabilito pertanto che la somministrazione intramuscolare del preparato non è efficace.

L'ulteriore aumento della quantità di preparato non ha fatto registrare un incremento attendibile della sopravvivenza degli animali in confronto alla dose di 100 mg/kg. Con una somministrazione di 150 mg/kg, la quantità di animali sopravvissuti raggiungeva la percentuale dell'80%, ma in 2 casi si sono registrati sintomi della lesione del sistema nervoso centrale.

Due somministrazioni del preparato con un intervallo di 12 ore nella dose di 100 mg/kg ha garantito la sopravvivenza di 9 animali senza sintomi di deficit neurologico.

È necessario sottolineare che nella serie di esperimenti di controllo si sono registrati i sintomi del deficit neurologico almeno nella metà degli animali sopravvissuti.

Si può pertanto affermare che il preparato in dosi da 100 mg/kg somministrato due volte può essere utilizzato con esito positivo per il trattamento delle più diffuse e gravi malattie del sistema nervoso, alterazione acute della circolazione sanguigna cerebrale.

Esempio 5

Gli esperimenti sono stati effettuati su 30 cincillà. Si è asportato ai cincillà un tratto cutaneo della misura di 2×2 cm. ed il difetto così formatosi è stato ricolmato con 20 eterotrapianto. Gli animali sono stati suddivisi in tre gruppi.

Il primo gruppo è stato trattato con la terapia tradizionale (Prednisolone e Ciclosporine); al secondo gruppo si è somministrato quotidianamente per via endovenosa 5-aminofthalidrazide nella dose di 150 mg/kg; sul terzo gruppo si è effettuato un trattamento combinato.

Per valutare l'efficacia del preparato si è fissato il periodo del rigetto e si sono effettuate ricerche morfologiche.

Come ci si aspettava, l'azione terapeutica meno accentuata è stata manifestata dalla terapia tradizionale. Il rigetto del trapianto avveniva tra il 31° e il 42° giorno. Nella seconda serie di esperimenti questo periodo è aumentato in modo attendibile fino a 56–70 giorni, mentre nel terzo gruppo i sintomi del rigetto del trapianto si presentano dopo 120–180 giorni. In quattro casi non si sono verificati cambiamenti per un anno (non sono state effettuate osservazioni ulteriori). All'esame morfologico non si sono registrati sintomi di rigetto del trapianto.

Conclusione: la 5-aminofthalidrazide, somministrata per via endovenosa, rallenta notevolmente ($P < 0,01$) il processo di rigetto, in confronto alla terapia tradizionale. Se combinato con i mezzi conosciuti, in una serie di casi, previene addirittura completamente il rigetto.

Esempio 6

Paziente K, a. 35, M., malato da 5 anni. In questo periodo curato più volte in ospedale. Lamenta prurito, debolezza generale, sensazioni sgradevoli in tratti cutanei. Alla visita risulta che sulla cute sono presenti numerose macchie eritematose, singole pustole di forma tonda. Diagnosi: psoriasi in fase di acutizzazione.

Il preparato è stato somministrato al paziente per via endovenosa in dosi da 12 mg/kg. Dopo 10 giorni di trattamento sono scomparsi il prurito e la debolezza, è diminuita la temperatura, si sono ridotte le manifestazioni cutanee.

Al 20° giorno i tratti colpiti dei tessuti cutanei sono diminuiti.

Residuavano singole pustole e «papule» sulle superfici flessorie delle mani.

I sintomi di acutizzazione della malattia si sono manifestati dopo 4 mesi; questo fatto testimoniava l'insufficienza del trattamento in corso.

Un ulteriore ciclo di trattamenti della durata di 12 giorni ha consentito di eliminare i sintomi principali e ha provocato una durevole remissione degli stessi.

Esempio 6A

Paziente V., a. 42, M. malato da 13 anni, curato numerose volte. Tuttavia negli ultimi due anni la te-

rapia tradizionale veniva utilizzata senza esito. Il paziente lamentava prurito, debolezza generale. Alla visita: colpiti notevoli tratti cutanei, numerose pustole, concentrazioni di macchie eritromatose. Diagnosi: psoriasi, forma generalizzata.

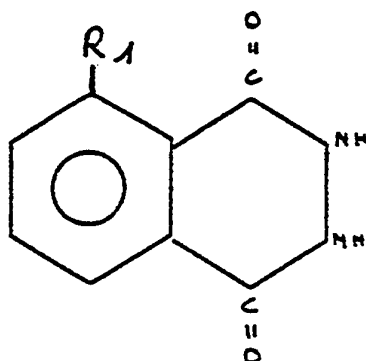
La somministrazione del preparato nella dose di 20 mg/kg di peso per 10 giorni ha portato all'eliminazione del prurito e all'attenuazione delle manifestazioni cutanee. L'ulteriore applicazione sulla cute di una soluzione del preparato in soluzione al 15% di DMSO ha garantito una rapida scomparsa delle manifestazioni cutanee, comprese le pustole.

L'analisi istologica dei prelievi bioptici delle formazioni cutanee residue ha evidenziato una notevole diminuzione del numero dei neutrofili nelle cellule epidermiche.

Dopo un trattamento di 30 giorni la cute risultava completamente pulita, il periodo di remissione è aumentato fino a 8 mesi.

Rivendicazioni

1. Composti della classe dei ftalidrazidici aventi la formula generale



con $R_1 = -H, -NH_2$

e loro sali farmaceuticamente accettabili, come sostanze attive in agenti anti-ipossici e di difesa.

2. Composto secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto di essere il sale dell'5-aminoftalidrazide, sostanza attiva in agenti anti-ipossici e di difesa ad uso endovenoso per il trattamento degli infarti e per prevenire il rigetto dei trapianti.

3. Impiego del sale della 5-aminoftalidrazide per la preparazione di medicinali ad uso combinato locale e parenterale per il trattamento della psoriasi.

4. Impiego secondo la rivendicazione 3, caratterizzato dal fatto che il medicinale ad uso locale sotto forma di soluzione contiene 20-30% di DMSO.