

Identificazione di farmaci attivi
nell'infezione da virus influenzale .
A - PR8 nel Topo (*) (**)

Nel corso di sistematiche indagini da noi dedicate alla ricerca di farmaci attivi in senso chemioprolattico e chemioterapeutico in diverse infezioni da virus, furono identificati alcuni farmaci, la cui attività antivirale si è dimostrata particolarmente intensa nell'infezione da virus influenzale A - PR8 nel topo: i risultati da noi ottenuti ci sono parsi di particolare rilievo e in senso assoluto e in senso relativo, comparativamente a quelli tratti dalla vasta letteratura (1-7) dedicata al problema della chemioterapia antivirale che, com'è noto, rimane nel complesso negativa.

MATERIALI e METODI

A) *Virus*

Il virus influenzale A - PR8 fu ottenuto dall'Ist. Sier. Ital. in liquido allantoideo di uova embrionate, ed adattato al topo con ripetuti passaggi per via nasale. La D.L.₅₀ per la inoculazione per via nasale di cc. 0,05 di una sospensione di tessuto polmonare in brodo oscillo nelle successive varie preparazioni tra $10^{-2,13}$, nei primi passaggi, e $10^{-5,8}$ nei passaggi più recenti; la dose impiegata nelle esperienze fu sempre corrispondente a un multiplo della D.L.₅₀ tale da ottenere costantemente la morte di tutti i controlli con massima epatizzazione polmonare entro 3-6 giorni dalla inoculazione nasale.

(*) Memoria presentata dall'Accademico Domenico Marotta.

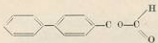
(**) Questa nota sarà oggetto di pubblicazione su altra Rivista.

B) *Animali usati*

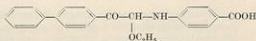
In tutte le esperienze furono usati topi adulti giovani, appartenenti ad un ceppo ibrido o al ceppo Swiss, del peso di gr. 15-20 (nelle singole esperienze fu mantenuta omogeneità di peso e di ceppo tra animali usati come controllo e animali trattati).

C) *Composti*

Tra i molti composti da noi studiati vengono qui riportati solo i risultati ottenuti con due di essi, che ci sono parsi di massima efficacia nell'infezione da virus influenzale, e cioè il derivato bisolfittico della 4-difenilil-chetoaldeide (C. V. 57455) e α -oxo- α -(4-bifenilil)- β -etossi- β -(4-carbossi-fenil)-amino-etano (C. V. 58903).



C. V. 57455



C. V. 58903

Le considerazioni sui rapporti tra costituzione chimica e attività chemio-terapica dei composti, che ci hanno condotto alla realizzazione di questi preparati, verranno riferite in un prossimo lavoro da CAVALLINI e MASSARANI.

I due composti qui presi in considerazione presentano una scarsa solubilità; perciò venne usata per le diverse vie di somministrazione una sospensione (in granuli fini) degli stessi in mestruo di gomma arabica al 3%.

Con la stessa sospensione fu definita come tossicità acuta la D.L.₅₀ per via orale nel topo che è risultata rispettivamente per il C.V. 57455-derivato bisolfittico 1000 mg/Kg e per il C.V. 58903 superiore a 1500 mg/Kg.

Quali vie di somministrazione furono usate quella orale, quella sottocutanea e quella nasale. Per la via nasale venivano instillati senza anestesia eterea ml. 0,05 delle sospensioni preparate in modo tale che tale volume contenesse la dose stabilita del farmaco. Le prove preliminari eseguite con semplice mestruo (gomma arabica 3%) per la stessa via nasale non hanno rivelato inconvenienti. Per la via orale lo stesso mestruo fu usato introducendo ml. 0,10 del liquido contenente il farmaco direttamente con una pipetta nella parte posteriore del cavo orale o sulla lingua. Per la via sottocutanea il mestruo liquido contenente il farmaco in sospensione era iniettato con siringa nel volume di ml. 0,10 contenente la dose desiderata.

Variabile (v. esperienze singole) fu il rapporto di tempo fra inizio di trattamento con i farmaci e l'avvio dell'infezione nell'animale: per lo più vennero presi in considerazione i tempi corrispondenti a 24h. prima dell'inoculazione del virus, alla contemporaneità con questa, a 24 e 48 h. dopo l'inoculazione del virus. La durata del trattamento fu di 10-12 gg. dall'inoculazione del virus.

D) *Valutazione dell'attività antivirale dei composti studiati*

La valutazione dell'efficacia anti-infettiva dei farmaci provati è stata da noi impostata in base agli elementi seguenti, rapportati ai corrispondenti reperti raccolti nei controlli:

- 1) sopravvivenza degli animali;
- 2) tempo di incidenza della conclusione fatale dell'infezione;
- 3) presenza all'autopsia della caratteristica lesione polmonitica;
- 4) titolazione del virus a mezzo dell'emoagglutinazione (su emazie di pollo) a livello del tessuto polmonare, in animali morti per la malattia provocata dal virus influenzale nonostante il trattamento, e in animali sacrificati in apparenza normali, nel caso di sopravvivenza di essi a seguito del trattamento subito (questi venivano sacrificati all'estremo limite del tempo massimale considerato sufficiente per escludere anche la possibilità di morte tardiva, e cioè in 10-12^o g. dall'inoculazione del virus);
- 5) prove di immunità negli animali sopravvissuti eseguite attraverso l'inoculazione di dosi opportune di virus (corrispondenti a 5 D.L.₅₀).

RISULTATI

Vengono riportati separatamente, in due paragrafi successivi, i risultati ottenuti per ciascuno dei due farmaci qui presi in considerazione.

1) *C.V. 57455 Bisolfo*

Un primo gruppo di esperienze riguarda lo studio dell'attività del composto, variando le vie di somministrazione di esso e l'inizio del trattamento in rapporto all'avvio dell'infezione (vedi Tabella 1).

La dose del farmaco usata per la somministrazione sottocutanea corrisponde a mg 250/Kg/ die, e cioè alla metà della dose dimostratasi tossica per la stessa via, in quanto capace di determinare note di sofferenze e anche in alcuni casi la morte dell'animale dopo 4-5 gg. di trattamento; le dosi usate per la somministrazione orale e per quella nasale corrispondono al doppio (mg 500/Kg/die) di quella usata per la via sottocutanea: per queste vie di somministrazione e per queste dosi non furono mai osservati segni di sofferenza dell'animale. Deve essere qui subito sottolineato che mentre le dosi somministrate per la via sottocutanea e per quella orale si possono considerare corrispondenti alla quantità di farmaco penetrato nell'organismo per le due vie, per quelle somministrate per via nasale la quantità del farmaco che si può considerare utilizzata per tale via deve

TABELLA I

VERUS APPEL				FARRAICO 5745 Biondo				RISULTATI			
Numero animali	Via di inoculazione	Dose (spazio D ₁₋₄)	Via di somministrazione	Dose (mg/kg)	Tempo (h) tra l'assunzione dell'inoculo e l'infusione	Insulto (mg)	Morti entro 7 gg	Morti entro 12 gg	Morti entro 17 gg	Lesioni caratteristiche: P	Supervivenza tot. in %
11	nasale	5 D ₁₋₄ (D ₁₋₄ = 10-4,13)	suboculare	250	24 h prima	12 gg	1	—	—	1	10
6	*	*	*	*	1/2 h dopo	11 gg	2	—	—	1	4
15	*	*	*	*	24 h dopo	10 gg	6	2	—	6	7
8	*	*	*	*	48 h dopo	9 gg	8	—	—	8	0
Control- li 16	*	*	*	*	—	—	16	—	—	16	0
12	*	5 D ₁₋₄ (D ₁₋₄ = 10-4,13)	orale	500	24 h prima	12 gg	2	2	—	4	8
6	*	*	*	*	1/2 h dopo	11 gg	1	2	—	3	50
6	*	*	*	*	24 h dopo	10 gg	2	3	—	5	16,6
Control- li 12	*	*	*	*	—	—	12	—	—	12	0
13	*	5 D ₁₋₄ (D ₁₋₄ = 10-4,13)	nasale	500	24 h prima	12 gg	—	—	—	—	13
14	*	*	*	*	1/2 h dopo	11 gg	4	1	—	4	9
19	*	*	*	*	24 h dopo	10 gg	7	2	—	8	10
7	*	*	*	*	48 h dopo	9 gg	6	—	—	6	1
Control- li 16	*	*	*	*	—	—	16	—	—	16	0
6	*	*	*	solo gomma arabica	24 h prima	12 gg	6	—	—	6	0

ritenersi di gran lunga inferiore a quella somministrata (perdita all'esterno per riflesso di difesa nell'esprio, perdita all'interno per passaggio nella faringe).

In realtà, nonostante le considerazioni sopradette, si dimostra chiaramente che la più elevata attività del composto si rivela per la via sottocutanea e per la via nasale; in particolare la via nasale di somministrazione del farmaco appare attiva press'a poco in eguale misura che per la via sottocutanea.

Il dubbio che tale maggiore attività del farmaco per la via nasale potesse ascrivere ad un influenzamento diretto di esso sulla fase di fissazione del virus alle cellule della mucosa nasale, è stato con sicurezza escluso dalla constatazione che tale maggiore attività si riscontra anche quando l'avvio della somministrazione del farmaco avvenga ad infezione virale già decisamente avviata (anche 24 h e perfino 48 h dopo l'instillazione nasale del virus).

Anche per la somministrazione sottocutanea del farmaco è risultata documentata la possibilità di esercitare un'influenza inibitoria sulla malattia virale fino a 24 h dopo l'avvio dell'infezione.

Un'attività decisamente inferiore rivela il farmaco per la via orale, pur dimostrando anche per tale via un chiaro influenzamento sulla evolutività dell'infezione.

Un secondo gruppo di esperienze riguarda lo studio dell'attività del composto somministrato per le diverse vie, variando per ciascuna di esse la dose (v. Tabella n° 2).

Per tutte le vie di somministrazione si osserva un decrescere progressivo di attività col diminuire delle dosi; la dose limite che dimostra ancora un margine di attività si rivela di mg. 62,5/Kg/die per la via orale, di mg. 7,8/Kg/die per la via sottocutanea e di mg. 7,8/Kg/die per la via nasale.

La caduta di attività, che appare attraverso la valutazione del numero dei sopravvissuti, per la dose più elevata somministrata per le diverse vie, e in particolare per la via sottocutanea e per quella nasale si deve probabilmente riferire all'interferenza dell'effetto tossico dimostrato dal farmaco con tale dose, già di per sé sufficiente per la via sottocutanea per determinare dopo 3-4 gg. uno stato di sofferenza dell'animale, che in qualche caso si può concludere con la morte.

Come completamento ai dati raccolti nella tabella 1 e nella tabella 2, deve essere aggiunto che in molti degli animali venuti a morte, a seguito dell'inoculazione del virus, fossero essi controlli o animali in trattamento col farmaco, fu eseguita la titolazione del virus nel polmone a mezzo della emoagglutinazione (su emazie di pollo): mentre nei controlli si ebbe un titolo emoagglutinante medio (su 22 animali) di 1:1047 (con oscillazioni fra un minimo di 1:320 e un massimo di 1:2560), invece negli animali in vario modo trattati (variando il tempo di inizio della somministrazione del farmaco e le dosi di esso), venuti a morte quasi sempre col quadro della polmonite, seppure spesso in epoca più tardiva rispetto ai controlli, i titoli emoagglutinanti medi furono i seguenti (con oscillazione fra un minimo di 0 e un massimo di 1:640): dopo un trattamento per via nasale 1:189 (su 13 animali); dopo trattamento per via sottocutanea 1:358 (su 11 animali); dopo trattamento per via orale 1:533 (su 6 animali).

Per gli animali trattati che non rivelarono segni di malattia e che furono sacrificati in 12° g. dall'inoculazione del virus, la titolazione del virus nei polmoni (ap-

TABELLA II

VIRUS AFR 6				FARMACO 1545 Bisdio				RISULTATI				
Numero animali	Via di inoculazione	Dose (oggetto 10_{100}) 5 DL_{100} ($\text{DL}_{100} = 10^{-2.13}$)	Via di somministrazione	Dose per dose in mg/kg	Tempo inizio trattamento in rapporto all'iniezione	Demna unit.	Morti entro 7 gg	Morti entro 12 gg	Morti entro 17 gg	Lesioni caratteristiche i p.	Sopravvissuta tot.	in %
7	masale	5 DL_{100} ($\text{DL}_{100} = 10^{-2.13}$)	suboculata	500	24 h. prima	12 EG	4	—	—	—	3	43
11	*	*	*	250	*	*	1	—	—	1	10	90,9
6	*	*	*	125	*	*	1	—	—	—	5	83,3
8	*	*	*	62,5	*	*	4	1	—	5	3	37,5
8	*	*	*	31,2	*	*	4	1	—	11	4	50,0
15	*	*	*	15,6	*	*	5	3	—	—	4	26,6
8	*	*	*	7,8	*	*	5	1	—	6	2	25
8	*	5 DL_{100} ($\text{DL}_{100} = 10^{-2.13}$)	orale	1000	*	*	4	—	—	2	4	50
7	*	*	*	500	*	*	3	—	—	3	4	57,2
8	*	*	*	250	*	*	3	—	—	3	5	62,5
7	*	*	*	125	*	*	3	1	—	4	3	43,9
8	*	*	*	62,5	*	*	4	1	1	6	2	25
7	*	*	*	31,2	*	*	5	2	—	7	0	0
7	*	5 DL_{100} ($\text{DL}_{100} = 10^{-2.2}$)	masale	1000	*	*	3	—	—	—	4	56,1
8	*	*	*	500	*	*	0	—	—	—	8	100
8	*	*	*	250	*	*	2	—	—	2	6	75
8	*	*	*	125	*	*	3	—	—	3	5	62,5
7	*	*	*	62,5	*	*	3	—	—	3	4	57,1
8	*	*	*	31,2	*	*	4	—	—	4	4	50
8	*	*	*	15,6	*	*	6	—	—	6	2	25
8	*	*	*	7,8	*	*	6	—	—	6	2	25
Control. 11	8 masale	5 DL_{100} ($\text{DL}_{100} = 10^{-2.13}$)	*				8	—	—	8	0	0
8	*	5 DL_{100} ($\text{DL}_{100} = 10^{-2.2}$)	*				8	—	—	8	0	0

TABELLA III

VIRUS APES			FARMACO 5003				RISULTATI				
Numero animali	Via di inoculazione	Dose (rispetto DL ₅₀)	Via di somministrazione	Dose per die in mg/kg	Tempo, inizio tratt. in rapporto all'inoculazione	Insulti tratt.	Morti 0 gg	Morti 11 gg	Morti 16 gg	Insulti conclivi: P	Superstiti tot. in %
8	nasale	2 DL ₅₀ (DL ₅₀ = 10 ^{-2,13})	sottoculanea	245,1	½ h dopo	10 gg	2	—	—	2	6 75
8	*	*	*	*	24 h dopo	9 gg	4	—	—	4	4 50
8	*	*	*	*	48 h dopo	8 gg	7	1	—	8	0 0
8	*	*	nasale	400,2	½ h dopo	10 gg	3	—	—	3	5 62,5
8	*	*	*	*	24 h dopo	9 gg	5	—	—	5	3 37,5
7	*	*	*	*	48 h dopo	8 gg	6	—	—	6	1 14,2
Control- li	*	*	*	*			8	—	—	8	0 0

parsi del tutto normali all'autopsia), rivelò la indimostrabilità del virus alla prova dell'emoagglutinazione o titoli emoaagglutinanti molto bassi (1:33 su 3 animali, con massimo di 1:80).

Questi risultati documentano che il trattamento con il farmaco in istudio non distrugge il virus a livello del tessuto elettivamente colpito, ma ne modifica con sicurezza la intensità (o la modalità ?) moltiplicativa, così da determinare a livello del polmone una attività emoaagglutinante del virus notevolmente inferiore a quella dei controlli, anche quando la malattia giunga, seppure in genere più rallentatamente, alla sua conclusione fatale attraverso il processo polmonitico.

Un terzo gruppo di esperienze riguarda il comportamento immunitario degli animali sopravvissuti al trattamento con il farmaco: 38 topi sopravvissuti all'infezione attraverso il trattamento con il farmaco, somministrato per le diverse vie e in diverso rapporto di tempo con l'inizio dell'infezione, furono reinoculati per la via nasale (a distanza di 45 gg. dalla prima inoculazione del virus) con 5 D.L.₅₀.

Mentre tutti i controlli morirono con reperto di polmonite massiva entro 4-6 gg. dalla inoculazione, tutti i 38 animali pretrattati con il farmaco sopravvissero in perfetta salute, dimostrando così una totale resistenza immunitaria verso l'infezione.

2) C. V. 58903.

In una prima esperienza (v. Tabella n° 3) si compararono la via di somministrazione nasale e quella sottocutanea, variando l'inizio della somministrazione del farmaco in rapporto all'avvio dell'infezione, ottenuta con la consueta tecnica per via nasale (e cioè mezz'ora dopo, 24 h e 48 h dopo l'inoculazione del virus).

Per l'una e l'altra via l'attività si è manifestata elevata ed è apparsa ancora evidente, anche quando la somministrazione del farmaco si è iniziata 24 h dopo l'avvio della infezione, mentre ha dimostrato tendenza ad esaurirsi quando la somministrazione si è iniziata 48 h dopo l'inoculazione del virus.

In una seconda esperienza (v. Tabella n° 4) è stata studiata l'attività di dosi decrescenti del farmaco somministrato per le consuete tre vie (nasale, sottocutanea e orale) a cominciare da 24 h prima dell'inoculazione del virus.

Risulta ben documentata per tutte e tre le vie di somministrazione del farmaco la persistenza di una evidente attività anche per dosi molto basse (fino a mg. 15 Kg/die).

La titolazione del virus a livello del tessuto polmonare con le prove di emoaagglutinazione (su emazie di pollo) fu eseguita in tutti gli animali venuti a morte, sia come controlli, sia come animali che nonostante il trattamento col farmaco presentarono ugualmente la malattia polmonitica con esito mortale; i titoli emoaagglutinanti medi furono i seguenti:

a) nei controlli: 1:1340 su 24 animali (con oscillazioni tra un minimo di 1:640 e un massimo di 1:2560)

b) dopo trattamento per via nasale: 1:276 su 24 animali

TABELLA IV

VIRUS A/PES				FARMACO 50003				RISULTATI				
Numero animali	Via di inoculazione	Dose (compito D ₅₀)	Via di somministrazione	Dose per die in mg/kg	Tempo inizio trattamento dall'infezione	Periodo totale	Morti entro 7 gg	Morti entro 15 gg	Morti entro 17 gg	Lesioni caratteristiche P	Supervivenza tot.	in %
7	nasale	3 D ₅₀ (D _{L50} = 10-213)	subcutanea	400,2	24 h prima	12 gg	4	—	—	4	3	42,8
7	*	*	*	245,1	*	*	2	—	—	2	5	71,4
8	*	*	*	122,5	*	*	4	—	—	4	4	50
6	*	*	*	61,25	*	*	4	—	—	3	2	40
7	*	*	*	30,6	*	*	5	—	—	5	3	37,5
16	*	*	*	15,3	*	*	10	—	—	10	6	37,5
6	*	*	*	7,65	*	*	4	—	—	4	2	33,3
7	*	*	*	3,8	*	*	6	—	—	6	1	14,2
8	*	3 D ₅₀ (D _{L50} = 10-213)	orale	980,4	*	*	5	—	—	5	3	37,5
8	*	*	*	490,2	*	*	2	—	—	2	2	25
7	*	*	*	245,1	*	*	4	—	—	4	3	42,8
8	*	*	*	122,5	*	*	6	—	—	6	2	25
8	*	*	*	61,25	*	*	6	—	—	6	3	37,5
10	*	*	*	30,6	*	*	8	—	—	8	7	43,8
8	*	*	*	15,3	*	*	5	—	—	5	3	37,5
5	*	*	*	7,65	*	*	5	—	—	5	0	0
6	*	3 D ₅₀ (D _{L50} = 10-213)	nasale	980,4	*	*	3	—	—	3	3	50
8	*	*	*	490,2	*	*	2	—	—	2	6	75
8	*	*	*	245,1	*	*	2	—	—	2	6	75
6	*	*	*	122,5	*	*	3	—	—	3	3	50
7	*	*	*	61,25	*	*	3	—	—	3	4	57,2
8	*	*	*	30,6	*	*	4	—	—	4	4	50
8	*	*	*	15,3	*	*	4	—	—	4	4	50
8	*	*	*	7,65	*	*	7	—	—	7	1	12,5
Control- li: 16	nasale	3 D ₅₀ (D _{L50} = 10-213)					16	—	—	16	0	0

c) dopo trattamento per via sottocutanea : 1 : 355 su 13 animali

d) dopo trattamento per via orale : 1 : 496 su 11 animali

(in *b, c, d*, oscillazioni tra un minimo di 1 : 80 e un massimo di 1 : 1080).

La determinazione del titolo emosagglutinante fu anche eseguita in sospensioni di tessuto polmonare derivato da topi che, non avendo presentato alcun segno di malattia a seguito del trattamento col farmaco, furono sacrificati in 12^a g. dall'inoculazione del virus : dopo trattamento per via nasale : titolo 0 su 6 animali.

Un'ultima esperienza riguarda il comportamento immunitario di 10 topi sopravvissuti all'infezione a seguito del trattamento col farmaco (5 per somministrazione orale e 5 per somministrazione sottocutanea) : questi animali furono reinoculati a distanza di 36 gg. dalla prima inoculazione del virus influenzale A-PR8 per la consueta via nasale con 5 D.L.₅₀ : mentre i 6 controlli morirono tutti in 3-5 gg. con la tipica polmonite, i 10 topi pretrattati dimostrarono tutti una completa resistenza al virus.

DISCUSSIONE

Dall'esame complessivo dei risultati sopraesposti, una prima deduzione può essere tratta : che cioè i due farmaci studiati rivelano in vivo nel topo una notevole attività sull'evoluzione dell'infezione influenzale, anche se usati in dosi bassissime, molto lontane da quelle tossiche (ad esempio il composto C.V. 58903 si è rivelato decisamente attivo per la via sottocutanea e per la via nasale fino a dosi di mg 15/Kg/die, mentre la tossicità appare praticamente nulla anche a dosi molto elevate (fino a mg 1500/Kg).

Si rivelano quindi per i composti da noi studiati due caratteristiche di fondamentale importanza, e cioè : l'evidente dissociazione tra tossicità ed attività antivirale del composto, e la persistente attività anche a dosi molto piccole, con divario quindi molto ampio tra dosi tossiche e dosi attive ; ciò risulta particolarmente evidente per il composto C.V. 58903, nettamente meno tossico del composto C.V. 57455. Queste due fondamentali caratteristiche non possono non aprire la speranza ad una possibilità di applicazione di questi composti anche alla chemioprolifassi ed alla chemioterapia della infezione da virus influenzale nell'uomo.

Un altro dato che riteniamo di notevole importanza, specie sul piano teorico per lo studio del meccanismo d'azione dei farmaci qui considerati, è quello relativo all'attività da essi dimostrata attraverso la somministrazione per via nasale. L'intensità di quest'ultima infatti si è rivelata uguale perfino a quella esercitata con la stessa somministrazione per la via sottocutanea, e talora decisamente superiore a quella della somministrazione orale.

La notevole attività dimostrata da questi farmaci, quando siano somministrati per la via nasale, impone considerazioni d'ordine generale che saranno da noi sviluppate in successivi lavori sulla scorta di altri dati analoghi raccolti per altre infezioni virali e per altri farmaci da noi studiati con simile comportamento.

Per quanto riguarda il meccanismo d'azione dei farmaci studiati, e in particolare la modalità con cui essi interferiscono sulla dinamica del processo infettivo, così da inibire la manifestazione morbosa legata al virus stesso, riteniamo possa avere innanzitutto importanza la constatazione che i farmaci si rivelano attivi sia che vengano somministrati prima dell'inizio dell'infezione (con trattamento che potremmo definire di tipo chemioprolattico), sia che vengano somministrati quando già l'infezione è avviata, anche dopo 24-48 h dall'inoculazione del virus (con trattamento che potremmo definire di tipo chemioterapeutico). Già in base a questa constatazione si può affermare che tali farmaci agiscono al di fuori totalmente della fase di fissazione del virus alla cellula.

Altri dati di notevole interesse, in rapporto a quest'aspetto del problema, possono essere desunti dai risultati ottenuti attraverso la titolazione del virus, a livello dell'organo elettivamente colpito nel topo dall'infezione da virus influenzale, e cioè a livello del polmone. Le prove di emoagglutinazione hanno consentito di mettere in evidenza che anche quando l'animale, nonostante il trattamento con i farmaci studiati, socomba con la tipica manifestazione polmonitica, il titolo emoagglutinante del virus presente a livello del tessuto polmonare risulta decisamente inferiore a quello dei controlli, con un minimo che viene raggiunto proprio negli animali trattati col farmaco per via nasale (ad es. per il composto C.V. 57455 da una media di 1 : 1047 per i controlli a una media di 1 : 189 per gli animali trattati per via nasale; per il composto C.V. 58903 da una media di 1 : 1340 nei controlli a una media di 1 : 276 per gli animali trattati per via nasale); negli animali sacrificati senza segni di malattia virale, dopo trattamento con i farmaci suddetti, il titolo emoagglutinante a livello del polmone o è risultato bassissimo (con un massimo di 1 : 80) o addirittura nullo. Pur riconoscendo che l'attività emoagglutinante del virus influenzale è solo uno degli attributi biologici del virus che può anche dissociarsi da altri, come la capacità infettante, la capacità patogena e la capacità immunizzante (ricerche sono ora in corso per precisare, in parallelo con l'attività emoagglutinante, anche questi altri attributi biologici del virus presente a livello del tessuto polmonare dopo trattamento con i farmaci in studio), tuttavia non si può sottovalutare l'importanza dei dati già raccolti a mezzo delle prove di emoagglutinazione: essi dimostrano che i farmaci studiati, agendo al di fuori totalmente della fase di fissazione del virus alla cellula, incidono manifestamente sulla evolutività del rapporto chimico-biologico tra cellula ospitante e virus in essa ospitato: attraverso questo influenzamento viene ad essere profondamente modificata l'attività biologica del virus, a livello degli elementi cellulari in cui la sua moltiplicazione si avvera, cosicché ne viene inibita o annullata l'attività patogena, e vengono a trovarsi modificati in senso inibitorio anche altri attributi biologici, come l'attività emoagglutinante, che in genere si manifestano in parallelo con il processo moltiplicativo del virus stesso.

Un altro chiarimento di grande importanza per la definizione del nuovo rapporto che viene a stabilirsi tra virus e cellula ospitante, sotto l'influenza dei farmaci qui studiati, ci deriva dalla constatazione che una solida immunità sussiste in tutti gli animali che, dopo essere stati infettati con il virus influenzale, non hanno manifestato segni di malattia a seguito del trattamento subito con i farmaci studiati.

Questa constatazione avvalorata l'interpretazione, affiorante già da tutte le considerazioni precedenti, che l'attività dei farmaci suddetti si espliciti non eliminando il virus influenzale attraverso un'azione di tipo virulicida, e ancor meno impedendone la fissazione a livello delle cellule sensibili, ma modificando profondamente il rapporto cellula-virus, così da annullare la risultante morbosa di esso, e da consentire invece un persistente e solido stato immunitario verso successive reinfezioni.

SOMMARIO

Nella cornice di sistematiche ricerche dedicate allo studio dei farmaci ad attività chemioterapica nelle infezioni da virus, vengono riferiti i risultati ottenuti con due farmaci dimostratisi molto attivi nella infezione da virus influenzale A-PRS nel topo.

Vengono descritte le sostanziali caratteristiche chimiche dei due farmaci (C.V. 57455 — 4-bifenilil-gliossale bisolfito - C.V. 58963 — α -oxo- α -(4-bifenilil)- β -etossi- β -(4-carbossi-fenil)-amino-etano) presi in considerazione.

Sul piano virologico-farmacologico, le caratteristiche fondamentali, rivelate dai due farmaci di fronte all'infezione da virus influenzale nel topo, appaiono le seguenti:

- 1) I farmaci si rivelano attivi per tutte le vie di somministrazione studiate, e cioè per la via sottocutanea, per quella orale e per quella nasale. L'attività antivirale si rivela sia che la somministrazione dei farmaci abbia inizio prima dell'avvio dell'infezione con trattamento che si può definire di tipo chemioprofilattico, sia che abbia inizio quando già l'infezione sia avviata con trattamento che si può definire di tipo chemioterapico.
- 2) Esiste una evidente dissociazione tra tossicità ed attività antivirale dei due composti: questi dimostrano infatti una notevole attività anche a dosi molto piccole, così che si stabilisce un divario molto ampio tra dosi tossiche e dosi attive.
- 3) Viene sottolineata l'importanza che assume, specie per lo studio teorico del meccanismo d'azione dei farmaci qui considerati, la constatazione di un'elevata attività dimostrata dai farmaci attraverso la somministrazione per via nasale.
- 4) Sulla scorta dei risultati ottenuti dalle prove di emoagglutinazione eseguite sul tessuto polmonare di animali infettati che siano venuti ugualmente a morte nonostante il trattamento coi farmaci, o che siano sopravvissuti (e quindi in tempo opportuno sacrificati) dopo lo stesso trattamento, ed inoltre sulla scorta della constatata solida immunità residua al trattamento negli animali sopravvissuti, viene discusso il destino del virus a livello del tessuto elettivamente sede

del processo infettivo virale e vengono prospettati alcuni aspetti della nuova fisionomia che assume, in conseguenza del trattamento con i farmaci in studio, la dinamica del processo infettivo virale nel tessuto recettivo.

Desideriamo ricordare e ringraziare, per la valida collaborazione prestata nella esecuzione delle esperienze sopra riferite, i Dottori P. ALTUCCI, G. LORENZUTTI, C. RICCARDI, U. SAPIO dell'Istituto di Patologia Speciale Medica e Metodologia clinica dell'Università di Napoli, e il Dott. D. NARDI del Laboratorio Ricerche di Chimica Terapeutica - Vister - Casatenovo Brianza (Como).

Napoli — Istituto di Patologia Speciale Medica e Metodologia Clinica dell'Università.

Casatenovo Brianza — Laboratorio Ricerche di Chimica Terapeutica - VISTER.

18 Dicembre 1958.

BIBLIOGRAFIA

- (1) HURST E. W., *J. Pharm. and Pharmacol.* **90**, 27, (1957).
- (2) TIFFANY B. D., WRIGHT B. J., MOFFETT R. B., HEINZELMAN R. V., STRUBE R. E., ASPERGREN B., LINCOLN E. H., WHITE J. L., *J.A.C.S.*, **79**, 1682 (1957).
- (3) MOFFETT R. B., TIFFANY B. D., ASPERGREN B. D., HEINZELMAN R. V., *J.A.C.S.*, **79**, 1687 (1957).
- (4) DE BOCK C. A., BRIG J., WALOP J. N., *Nature*, **179**, 706 (1957).
- (5) LINDEMAN J., BUEKE D. C., JSAACS A., *Brit. J. Exp. Path.*, **38**, 553 (1957).
- (6) LUM G. S., SMITH P. K., *J. Pharm. Exp. Ther.*, **119**, 284 (1957).
- (7) BUU-HOI N. P., BOUFFANIS A., GLEY P., XUONG N. D., NAM N. H., *Experientia* **12**, 73, (1956).