

**SIB EX3959R**

**P067360SM:CJM/REC**

Traduzione in lingua italiana del Brevetto Europeo  
domanda n° **12835407.3**, pubblicazione n° **2760479**  
a nome di **Horizon Therapeutics, LLC**  
di **150 S. Saunders Rd.**  
**Lake Forest, Illinois 60045**  
**U.S.A.**

\* \* \* \* \*

"FARMACO PER L'ELIMINAZIONE DELL'AZOTO PER USO IN UN METODO DI TRATTAMENTO DI  
UN DISTURBO DA RITENZIONE DI AZOTO"

## DESCRIZIONE

### FONDAMENTO

I disturbi di ritenzione dell'azoto associati con elevati livelli di ammoniaca includono disturbi del ciclo dell'urea (UCD) e encefalopatia epatica (HE).

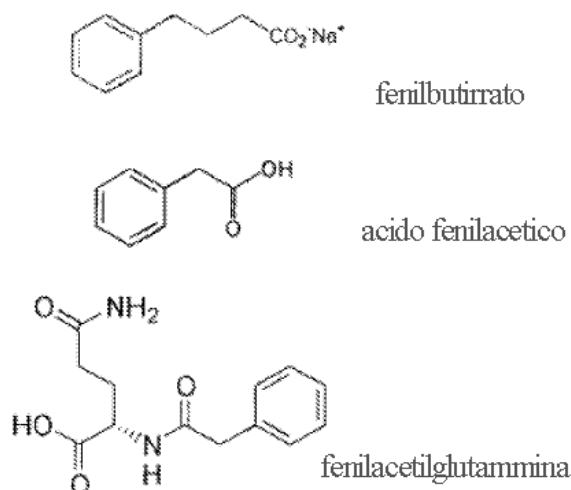
Gli UCD includono diverse deficienze ereditarie di enzimi o trasportatori necessari per la sintesi dell'urea dall'ammoniaca, inclusi gli enzimi coinvolti nel ciclo dell'urea. Il ciclo dell'urea è raffigurato in Figura 1, che illustra anche come alcuni farmaci per l'espulsione dell'ammoniaca agiscono per agevolare l'eliminazione dell'ammoniaca eccessiva. Con riferimento a Figura 1, *N*-acetilglutamato derivato da *N*-acetil glutammina sintetasi (NAGS) si lega alla carbamil fosfato sintetasi (CPS), che attiva la CPS e dà origine alla conversione di ammoniaca e bicarbonato in carbamil fosfato. A sua volta, il carbamil fosfato reagisce con l'ornitina per produrre la citrullina in una reazione mediata dall'ornitina transcarbamilasi (OTC). Una seconda molecola di azoto di scarto viene incorporata nel ciclo dell'urea nella reazione successiva, mediata dall'argininosuccinato sintetasi (ASS), in cui la citrullina è condensata con acido aspartico per formare l'acido argininosuccinico. L'acido argininosuccinico è scisso dalla liasi argininosuccinica (ASL) per produrre arginina e fumarato. Nella reazione finale del ciclo dell'urea, l'arginasi (ARG) scinde l'arginina per produrre ornitina e urea. Dei due atomi di azoto incorporati nell'urea, uno ha origine dall'ammoniaca libera ( $\text{NH}_4^+$ ) e l'altro dall'aspartato. Gli individui con UCD nati senza alcuna capacità sintetica dell'urea significativa residua generalmente si presentano nei primi giorni di vita (presentazione neonatale). Gli individui con funzione residua generalmente si presentano più tardi nell'infanzia o addirittura in età adulta, e i sintomi possono essere accelerati da un regime proteico aumentato o stress fisiologico (ad es., malattia intercorrente).

L'encefalopatia epatica (HE) si riferisce ad uno spettro di segni e sintomi neurologici che si ritiene abbiano origine dall'iperammoniemia, che si verifica frequentemente in soggetti con cirrosi o alcuni altri tipi di malattie epatiche. I soggetti con HE mostrano in genere uno stato mentale alterato che varia da sottili cambiamenti al coma, caratteristiche simili ai soggetti con UCD.

I soggetti con disturbi di ritenzione dell'azoto i cui livelli di ammoniaca e/o sintomi non sono adeguatamente

regolati mediante restrizione alimentare di proteina e/o integratori alimentari vengono generalmente trattati con agenti per l'eliminazione dell'azoto come il fenilbutirrato di sodio (NaPBA, approvato negli Stati Uniti come BUPHENYL<sup>®</sup> e in Europa come AMMONAPS<sup>®</sup>) o benzoato di sodio. Questi sono spesso definiti farmaci della via alternativa poiché forniscono al corpo un percorso alternativo per l'urea per l'escrezione dell'azoto di scarto (Brusilow 1980; Brusilow 1991). NaPBA è un profarmaco dell'acido fenilacetico (PAA). Un altro farmaco per l'eliminazione dell'azoto attualmente in sviluppo per il trattamento dei disturbi di ritenzione dell'azoto è il gliceril tri-[4-fenilbutirrato](HPN-100), che è descritto in Brevetto U.S.A. N. 5.968.979. HPN-100, che è comunemente chiamato GT4P o glicerolo PBA, è un profarmaco di PBA e un pre-profarmaco di PAA.

HPN-100 e NaPBA condividono lo stesso meccanismo di azione generale: PBA viene convertito in PAA tramite ossidazione beta, e PAA è coniugato per via enzimatica con la glutammina per formare fenilacetilglutammina (PAGN), che è escreta nell'urina. Le strutture di PBA, PAA e PAGN sono esposte di seguito.



Il beneficio clinico di NaPBA e HPN-100 per quanto riguarda i disturbi di ritenzione dell'azoto deriva dalla capacità di PAGN di sostituire in maniera efficace l'urea come veicolo per l'escrezione dell'azoto di scarto e/o di ridurre la necessità di sintesi dell'urea (Brusilow 1991; Brusilow 1993). Poiché ciascuna glutammina contiene due molecole di azoto, il corpo si libera di due atomi di azoto di scarto per ciascuna molecola di PAGN escreta nell'urina. Pertanto, vengono rimossi due equivalenti di azoto per ciascuna mole di PAA convertito in PAGN.

PAGN rappresenta il metabolita terminale predominante, e uno che è stechiometricamente correlato alla rimozione dell'azoto di scarto, una misura di efficacia nel caso di stati di ritenzione dell'azoto. La differenza tra HPN-100 e NaPBA rispetto al metabolismo è che HPN-100 è un trigliceride e richiede la digestione, presumibilmente da parte delle lipasi pancreatiche, per rilasciare PBA (McGuire 2010).

Al contrario di NaPBA o HPN-100, il benzoato di sodio agisce quando l'acido benzoico viene combinato per via enzimatica con glicina per formare l'acido ippurico. Per ciascuna molecola di acido ippurico escreta nell'urina, il corpo si libera di un atomo di azoto di scarto.

I metodi per determinare un dosaggio efficace di profarmaci di PAA come NaPBA o HPN-100 per un soggetto che necessita di trattamento per un disturbo di ritenzione dell'azoto sono descritti in WO09/134460 e WO10/025303. I livelli giornalieri di ammoniaca, tuttavia, possono variare notevolmente in un soggetto. Questo può portare ad una sovrastima da parte del medico dei livelli medi giornalieri di ammoniaca, il che può risultare in un eccesso di trattamento. Pertanto, nella tecnica vi è una necessità di metodi migliorati per la determinazione e la regolazione della dose del profarmaco di PAA basata su livelli di ammoniaca in soggetti con disturbi di ritenzione dell'azoto come UCD o HE.

#### SOMMARIO

L'invenzione è diretta solo a HPN-100 per l'uso in un metodo di trattamento di un disturbo di ritenzione dell'azoto in un soggetto secondo la rivendicazione 1. Sono descritte anche realizzazioni che non fanno parte di questa invenzione. Nella presente in alcune realizzazioni sono forniti metodi per determinare se aumentare un dosaggio di un farmaco per l'eliminazione dell'azoto in un soggetto con un disturbo di ritenzione dell'azoto mediante la misurazione di un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno e il confronto del livello di ammoniaca nel sangue a digiuno con il limite superiore della norma (ULN) per l'ammoniaca nel sangue, dove un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno maggiore della metà dell'ULN per l'ammoniaca nel sangue indica che il dosaggio deve essere aumentato. In alcune realizzazioni, il disturbo di ritenzione dell'azoto è un UCD o HE. Nelle realizzazioni secondo l'invenzione, il farmaco per l'eliminazione dell'azoto è HPN-100, mentre in altre realizzazioni, il farmaco per l'eliminazione dell'azoto può essere PBA, NaPBA, benzoato di sodio, o qualsiasi

loro combinazione (cioè, qualsiasi combinazione di due o più di HPN-100, PBA, NaPBA). Tuttavia, in tutta la descrizione, le realizzazioni o esempi senza HPN-100 come farmaco per l'eliminazione dell'azoto non fanno parte dell'invenzione. In alcune realizzazioni, l'ULN è circa 35  $\mu\text{mol/L}$  o 59  $\mu\text{g/ml}$ . In alcune realizzazioni, i metodi includono un passaggio aggiuntivo di somministrazione di un dosaggio aumentato del farmaco per l'eliminazione dell'azoto se esiste la necessità, e in alcune di queste realizzazioni la somministrazione del farmaco per l'eliminazione dell'azoto produce un livello medio giornaliero normale di ammoniaca nel soggetto. In alcune realizzazioni in cui viene effettuata una determinazione per somministrare un dosaggio aumentato di farmaco per l'eliminazione dell'azoto e in cui il farmaco per l'eliminazione dell'azoto è un profarmaco di PAA, i metodi includono un passaggio aggiuntivo di misurazione dell'escrezione di PAGN urinaria e determinazione di un dosaggio efficace del profarmaco di PAA basato su una conversione media del profarmaco di PAA in PAGN urinaria del 60-75%.

Nella presente in alcune realizzazioni sono forniti metodi per determinare se somministrare un farmaco per l'eliminazione dell'azoto a un soggetto con un disturbo di ritenzione dell'azoto mediante la misurazione di un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno e il confronto del livello di ammoniaca nel sangue a digiuno all'ULN per l'ammoniaca nel sangue, dove un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno che è maggiore della metà dell'ULN per l'ammoniaca nel sangue indica che il farmaco per l'eliminazione dell'azoto deve essere somministrato. In alcune realizzazioni, il disturbo di ritenzione dell'azoto è un UCD o HE. In alcune realizzazioni, il farmaco per l'eliminazione dell'azoto è HPN-100, PBA, NaPBA, benzoato di sodio, o qualsiasi loro combinazione (cioè, qualsiasi combinazione di due o più di HPN-100, PBA, NaPBA). In alcune realizzazioni, l'ULN è circa 35  $\mu\text{mol/L}$  o 59  $\mu\text{g/ml}$ . In alcune realizzazioni, i metodi includono un passaggio aggiuntivo di somministrazione di un farmaco per l'eliminazione dell'azoto se esiste la necessità, e in alcune di queste realizzazioni la somministrazione del farmaco per l'eliminazione dell'azoto produce un livello medio giornaliero normale di ammoniaca nel soggetto. In alcune realizzazioni in cui viene effettuata una determinazione per somministrare un farmaco per l'eliminazione dell'azoto e in cui il farmaco per l'eliminazione dell'azoto è un profarmaco di PAA, i metodi includono inoltre un passaggio di determinazione di un dosaggio

iniziale efficace del profarmaco di PAA mediante la determinazione di una produzione obiettivo di PAGN urinaria basata su una produzione obiettivo di azoto e il calcolo di un dosaggio iniziale efficace che risulta nella produzione obiettivo di PAGN urinaria sulla base di una conversione media del profarmaco di PAA in PAGN urinaria del 60-75%. In alcune realizzazioni, i metodi includono un passaggio di somministrazione del dosaggio iniziale efficace calcolato.

Nella presente in alcune realizzazioni sono forniti metodi per trattare un disturbo di ritenzione dell'azoto in un soggetto al quale è stato precedentemente somministrato un farmaco per l'eliminazione dell'azoto mediante la misurazione di un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno, confrontando il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno con l'ULN per l'ammoniaca nel sangue, e somministrando un dosaggio aumentato del farmaco per l'eliminazione dell'azoto se il livello di ammoniaca a digiuno è maggiore della metà dell'ULN per l'ammoniaca nel sangue. In alcune realizzazioni, la somministrazione di un dosaggio aumentato del farmaco per l'eliminazione dell'azoto produce un livello medio giornaliero normale di ammoniaca nel soggetto. In alcune realizzazioni, il disturbo di ritenzione dell'azoto è un UCD o HE. In alcune realizzazioni, il farmaco per l'eliminazione dell'azoto è HPN-100, PBA, NaPBA, benzoato di sodio, o qualsiasi loro combinazione (cioè, qualsiasi combinazione di due o più di HPN-100, PBA, NaPBA). In alcune realizzazioni, l'ULN è circa 35  $\mu\text{moli/L}$  o 59  $\mu\text{g/ml}$ . In alcune realizzazioni in cui il farmaco per l'eliminazione dell'azoto è un profarmaco di PAA, i metodi includono un passaggio aggiuntivo di misurazione dell'escrezione di PAGN urinaria e determinazione di un dosaggio efficace del profarmaco di PAA sulla base di una conversione media del profarmaco di PAA in PAGN urinaria del 60-75%. In alcune realizzazioni, i metodi includono un passaggio di somministrazione del dosaggio efficace calcolato.

#### BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

Figura 1: Il ciclo dell'urea e come alcuni farmaci per l'eliminazione dell'azoto possono aiutare nell'eliminazione dell'ammoniaca eccessiva.

Figura 2: Rapporto tra ammoniaca a digiuno e ammoniaca media nei pazienti con UCD.

Figura 3: Valori di ammoniaca nel sangue venoso nell'arco di 24 ore in pazienti (A) adulti e (B) pediatrici con

UCD.

#### DESCRIZIONE DETTAGLIATA

La descrizione che segue è destinata solamente ad illustrare varie realizzazioni dell'invenzione così come realizzazioni che non fanno parte dell'invenzione. Come tali, le modifiche specifiche discusse non devono essere interpretate come limitazioni al campo dell'invenzione che è definito esclusivamente dalle rivendicazioni allegate.

Nei soggetti con un disturbo di ritenzione dell'azoto, l'effetto desiderato del trattamento con un farmaco per l'eliminazione dell'azoto è la regolazione del livello di ammoniaca del sangue. La regolazione del livello di ammoniaca nel sangue si riferisce in generale ai valori di ammoniaca all'interno dell'intervallo normale e all'evitare crisi di iperammoniemia, che spesso sono definite nella tecnica come valori di ammoniaca transitori che superano 100  $\mu\text{mol/L}$  o 178  $\mu\text{g/mL}$  accompagnati da segni e sintomi clinici dell'iperammoniemia. Il dosaggio dei farmaci per l'eliminazione dell'azoto è solitamente basato sulla valutazione clinica e la misurazione dell'ammoniaca. Tuttavia, la valutazione dell'effetto del trattamento e l'interpretazione dei livelli di ammoniaca sono confuse dal fatto che i singoli valori di ammoniaca variano molte volte nel corso di un giorno e sono influenzati dalla tempistica del prelievo di sangue rispetto all'ultimo pasto e alla dose di farmaco (si vedano, ad es., Lee 2010; Lichter-Konecki 2011; Diaz 2011).

Un valore casuale di ammoniaca ottenuto durante una visita ad un paziente esterno potrebbe non essere in grado di fornire una misurazione affidabile dello stato di un soggetto e dell'effetto del farmaco. Ad esempio, basare il trattamento su un campione di sangue prelevato dopo aver consumato un pasto potrebbe sovrastimare il livello medio giornaliero di ammoniaca e risultare in un eccesso di trattamento. Al contrario, basare il trattamento su un campione di sangue prelevato dopo la somministrazione del farmaco potrebbe sottostimare il livello medio giornaliero di ammoniaca e risultare in un sotto-trattamento. Un livello di ammoniaca a digiuno di o vicino all'ULN potrebbe essere considerato come un'indicazione della regolazione soddisfacente senza considerare il fatto che il carico di ammoniaca durante il giorno (valore medio e/o massimo possibile) potrebbe essere significativamente più alto. Pertanto, un livello a digiuno di o vicino all'ULN può effettivamente riflettere un

sotto-trattamento in un soggetto che riceve già un farmaco per l'eliminazione dell'azoto o la necessità di trattamento in un soggetto a cui non è attualmente prescritto un farmaco per l'eliminazione dell'azoto. Una visione più accurata del livello giornaliero di ammoniaca potrebbe essere ottenuta da più prelievi di sangue in un contesto controllato per un periodo di tempo esteso. Anche se ciò viene attualmente compiuto negli studi clinici, non è pratico clinicamente.

Come esposto di seguito, nei soggetti con disturbi di ritenzione dell'azoto è stato valutato il rapporto tra i livelli di ammoniaca a digiuno e l'esposizione giornaliera all'ammoniaca. È stato osservato che l'ammoniaca a digiuno è fortemente correlata all'esposizione giornaliera all'ammoniaca, valutata come un'area di 24 ore sotto la curva per l'ammoniaca, la media giornaliera, o la concentrazione giornaliera massima, e che un valore obiettivo a digiuno che non supera la metà dell'ULN è clinicamente utile e un pratico predittore dei valori di ammoniaca nell'arco di 24 ore. Come tali, nella presente sono forniti metodi clinicamente pratici per valutare l'esposizione all'ammoniaca nei soggetti con disturbi di ritenzione dell'azoto sulla base dei livelli di ammoniaca a digiuno, così come metodi per l'uso delle informazioni risultanti per regolare il dosaggio di un farmaco per l'eliminazione dell'azoto, determinare se somministrare un farmaco per l'eliminazione dell'azoto, trattare un disturbo di ritenzione dell'azoto, e prevedere il carico giornaliero di ammoniaca. L'uso dei livelli di ammoniaca a digiuno per prevedere l'esposizione all'ammoniaca fornisce un vantaggio significativo rispetto ai metodi precedentemente sviluppati mediante la riduzione del numero di prelievi di sangue richiesti e l'eliminazione della confusione associata a livelli di ammoniaca in conflitto durante il corso della giornata.

Come inoltre descritto nella presente, è stato valutato il rapporto tra la regolazione dell'ammoniaca e l'esito neurocognitivo nei pazienti con UCD. La precedente ricerca ha dimostrato che i pazienti con UCD spesso presentano un QI più basso e una funzione esecutiva carente manifestata dalla difficoltà di definire obiettivi, pianificare, monitorare i progressi e risolvere in maniera decisa i problemi. Come esposto nella presente, è stato riscontrato che la regolazione dell'ammoniaca con GPB è risultata in un miglioramento significativo delle funzioni esecutive nei pazienti pediatrici. Sulla base di questi risultati, nella presente sono forniti metodi per migliorare la funzione esecutiva in un soggetto pediatrico con un UCD mediante la somministrazione di uno o

più farmaci per l'eliminazione dell'azoto.

Come inoltre descritto nella presente, è stato analizzato il rapporto tra livelli elevati di PAA ed eventi neurologici avversi (AE). Molti dei più di 30 rapporti di somministrazione di NaPBA e/o PAA di sodio ad umani descrivono gli AE, in particolare quando somministrati per via intravenosa. È stato precedentemente mostrato che la IV somministrazione di PAA a pazienti affetti da cancro risulta in AE che includevano stanchezza, stordimento, disgeusia, mal di testa, sonnolenza, vertigini, edema pedale, nausea, vomito ed eruzione cutanea (Thibault 1994; Thibault 1995). Questi AE erano correlati con livelli di PAA da 499 a 1285 µg/mL. Anche se il NaPBA è stato usato nel trattamento di UCD per oltre due decenni e gli AE che si riporta siano associati al PAA sono simili a quelli associati all'iperammoniemia, poco si conosceva in precedenza circa la relazione tra i livelli di PAA e gli AE neurologici nei pazienti con UCD. Come mostrato nella presente, livelli aumentati di PAA non erano correlati con gli AE neurologici aumentati in soggetti con UCD. Tuttavia, i livelli di PAA erano associati con un aumento degli AE neurologici in soggetti sani. Sulla base di questi risultati, nella presente sono forniti metodi per prevedere o diagnosticare gli AE in un soggetto mediante la misurazione dei livelli di PAA. Nella presente sono inoltre forniti metodi per trattare e/o prevenire gli AE in un soggetto con livelli elevati di PAA mediante la somministrazione di uno o più farmaci per l'eliminazione dell'azoto.

Nella presente vengono forniti i valori obiettivo specifici per l'ammoniaca nel sangue sui quali può essere basato uno dosaggio efficace di un farmaco per l'eliminazione dell'azoto. In alcune realizzazioni, un dosaggio efficace di un farmaco per l'eliminazione dell'azoto può essere un dosaggio iniziale, dosaggio successivo/di mantenimento, dosaggio migliorato, o un dosaggio determinato in combinazione con altri fattori. In alcune realizzazioni, il dosaggio efficace può essere uguale o diverso dal dosaggio iniziale. In altre realizzazioni, il dosaggio efficace può essere più alto o più basso del dosaggio iniziale. In alcune realizzazioni, sono forniti metodi per regolare la dose o il regime di un farmaco per l'eliminazione dell'azoto per raggiungere un livello obiettivo di ammoniaca che è predittivo del livello medio giornaliero di ammoniaca e/o del valore massimo di ammoniaca che è probabile che il soggetto sperimenti durante il giorno.

Usando i metodi della presente, il livello di ammoniaca nel sangue di un soggetto a digiuno può essere usato

come predittore del carico giornaliero di ammoniaca, livello medio giornaliero di ammoniaca, e/o valore giornaliero più alto di ammoniaca. Se un soggetto con un disturbo di ritenzione dell'azoto sta ricevendo un dosaggio ottimale del farmaco per l'eliminazione dell'azoto può essere determinato in base all'esposizione all'ammoniaca giornaliera prevista. Mediante l'ottimizzazione dell'efficacia terapeutica di un farmaco per l'eliminazione dell'azoto, il dosaggio terapeutico del farmaco per l'eliminazione dell'azoto viene regolato in modo che il soggetto sperimenti l'effetto desiderato di eliminazione dell'azoto. In particolare, la dose viene regolata in modo che il soggetto possa sperimentare un livello medio giornaliero normale di ammoniaca. In alcune realizzazioni, il dosaggio efficace del farmaco per l'eliminazione dell'azoto viene determinato mediante la regolazione (ad es., aumentando) di un dosaggio per raggiungere un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno per un soggetto che sia minore della o uguale alla metà dell'ULN per l'ammoniaca nel sangue.

Nella presente in alcune realizzazioni vengono forniti metodi per determinare se il dosaggio di un farmaco per l'eliminazione dell'azoto deve essere aumentato in un soggetto con un disturbo di ritenzione dell'azoto che comprendono il confrontare un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno per il soggetto ad un ULN per l'ammoniaca nel sangue. Se il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno ha un valore che è maggiore della metà dell'ULN, il dosaggio del farmaco per l'eliminazione dell'azoto deve essere aumentato. In alcune realizzazioni, i metodi comprendono inoltre l'aumentare il dosaggio del farmaco per l'eliminazione dell'azoto se esiste la necessità, e in alcune di queste realizzazioni i metodi comprendono inoltre il somministrare il dosaggio aumentato. In alcune di queste realizzazioni, la somministrazione del dosaggio aumentato risulta in un livello medio giornaliero normale di ammoniaca nel soggetto.

Nella presente in alcune realizzazioni vengono forniti metodi per determinare se il dosaggio di un farmaco per l'eliminazione dell'azoto deve essere aumentato in un soggetto con un disturbo di ritenzione dell'azoto che comprendono il misurare un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno per il soggetto e il confrontare il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno ad un ULN per l'ammoniaca nel sangue. Se il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno ha un valore che è maggiore della metà dell'ULN, il dosaggio del farmaco per l'eliminazione dell'azoto deve essere aumentato. In alcune realizzazioni, i metodi comprendono inoltre l'aumentare il dosaggio

del farmaco per l'eliminazione dell'azoto se esiste la necessità, e in alcune di queste realizzazioni i metodi comprendono inoltre il somministrare il dosaggio aumentato. In alcune di queste realizzazioni, la somministrazione del dosaggio aumentato risulta in un livello medio giornaliero normale di ammoniaca nel soggetto.

Nella presente in alcune realizzazioni vengono forniti metodi per regolare il dosaggio di un farmaco per l'eliminazione dell'azoto in un soggetto con un disturbo di ritenzione dell'azoto che comprendono il confrontare un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno per il soggetto ad un ULN per l'ammoniaca nel sangue. Se il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno ha un valore che è maggiore della metà dell'ULN, il dosaggio del farmaco per l'eliminazione dell'azoto viene aumentato, e se il dosaggio è minore della o uguale alla metà dell'ULN il dosaggio del farmaco per l'eliminazione dell'azoto non viene aumentato. In alcune realizzazioni, i metodi comprendono inoltre il somministrare il dosaggio aumentato. In alcune di queste realizzazioni, la somministrazione del dosaggio aumentato risulta in un livello medio giornaliero normale di ammoniaca nel soggetto.

Nella presente in alcune realizzazioni vengono forniti metodi per regolare il dosaggio di un farmaco per l'eliminazione dell'azoto in un soggetto con un disturbo di ritenzione dell'azoto che comprendono il misurare un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno per il soggetto e il confrontare il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno ad un ULN per l'ammoniaca nel sangue. Se il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno ha un valore che è maggiore della metà dell'ULN, il dosaggio del farmaco per l'eliminazione dell'azoto viene aumentato, e se il dosaggio è minore della o uguale alla metà dell'ULN il dosaggio del farmaco per l'eliminazione dell'azoto non viene aumentato. In alcune realizzazioni, i metodi comprendono inoltre il somministrare il dosaggio aumentato. In alcune di queste realizzazioni, la somministrazione del dosaggio aumentato risulta in un livello medio giornaliero normale di ammoniaca nel soggetto.

Nella presente in alcune realizzazioni vengono forniti metodi per regolare il dosaggio di un farmaco per l'eliminazione dell'azoto in un soggetto con un disturbo di ritenzione dell'azoto che comprendono il misurare un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno per il soggetto e il confrontare il livello di ammoniaca nel sangue a

digiuno ad un ULN per l'ammoniaca nel sangue. Se il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno ha un valore che è maggiore della metà dell'ULN, il dosaggio del farmaco per l'eliminazione dell'azoto viene aumentato, e se il dosaggio è significativamente inferiore alla metà dell'ULN, il dosaggio del farmaco per l'eliminazione dell'azoto può essere diminuito. In alcune realizzazioni, i metodi comprendono inoltre il somministrare il dosaggio regolato. In alcune di queste realizzazioni, la somministrazione del dosaggio regolato risulta in un livello medio giornaliero normale di ammoniaca nel soggetto.

Nella presente in alcune realizzazioni vengono forniti metodi per regolare il dosaggio di un farmaco per l'eliminazione dell'azoto in un soggetto con un disturbo di ritenzione dell'azoto che comprendono il somministrare un dosaggio iniziale del farmaco per l'eliminazione dell'azoto, il misurare il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno, e il confrontare il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno ad un ULN per l'ammoniaca nel sangue. Se il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno ha un valore che è maggiore della metà dell'ULN, i successivi dosaggi di mantenimento del farmaco per l'eliminazione dell'azoto vengono regolati per essere superiori al dosaggio iniziale. In alcune realizzazioni, i metodi comprendono inoltre il somministrare il dosaggio di mantenimento aumentato, e in alcune di queste realizzazioni, la somministrazione del dosaggio di mantenimento aumentato risulta in un livello medio giornaliero normale di ammoniaca nel soggetto.

Nella presente in alcune realizzazioni vengono forniti metodi per regolare il dosaggio di un farmaco per l'eliminazione dell'azoto in un soggetto con un disturbo di ritenzione dell'azoto per raggiungere un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno che è minore della o uguale alla metà dell'ULN per l'ammoniaca nel sangue che comprendono il misurare un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno per il soggetto e il confrontare il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno ad un ULN per l'ammoniaca del sangue. Se il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno ha un valore che è maggiore della metà dell'ULN, al soggetto viene somministrato un dosaggio aumentato del farmaco per l'eliminazione dell'azoto. Dopo un periodo di tempo sufficiente affinché il farmaco raggiunga lo stato stazionario (ad es., 48 ore, da 48 a 72 ore, da 72 ore a 1 settimana, da 1 settimana a 2 settimane, maggiore di 2 settimane), il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno viene misurato nuovamente e confrontato ad un ULN per l'ammoniaca nel sangue. Se il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno ha un

valore che è maggiore della metà dell'ULN, il dosaggio del farmaco per l'eliminazione dell'azoto viene aumentato. Questo processo viene ripetuto finché non si ottiene un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno inferiore a o uguale alla metà dell'ULN.

Nella presente in alcune realizzazioni vengono forniti metodi per valutare se un soggetto con un disturbo di ritenzione dell'azoto ha più o meno probabilità di avere bisogno di una regolazione del dosaggio di un farmaco per l'eliminazione dell'azoto che comprendono il misurare un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno per il soggetto e confrontare il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno ad un ULN per l'ammoniaca nel sangue, in cui un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno che è maggiore della metà del valore dell'ULN indica che il soggetto ha più probabilità di avere bisogno di una regolazione del dosaggio e un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno che è inferiore o pari alla metà del valore dell'ULN indica che il soggetto ha meno probabilità di avere bisogno di una regolazione del dosaggio.

Nella presente in alcune realizzazioni vengono forniti metodi per determinare se somministrare un farmaco per l'eliminazione dell'azoto a un soggetto con disturbo di ritenzione dell'azoto che comprendono il confrontare un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno per il soggetto ad un ULN per l'ammoniaca nel sangue. Se il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno ha un valore che è maggiore della metà dell'ULN, al soggetto deve essere somministrato un farmaco per l'eliminazione dell'azoto. In alcune realizzazioni, questi metodi comprendono inoltre il somministrare il farmaco per l'eliminazione dell'azoto. In alcune realizzazioni, al soggetto può non essere stato somministrato alcun farmaco per l'eliminazione dell'azoto prima della determinazione. In altre realizzazioni, al soggetto può essere stato precedentemente somministrato un farmaco per l'eliminazione dell'azoto diverso da quello che si sta valutando. In queste realizzazioni, i metodi forniti nella presente possono essere usati per determinare se somministrare ad un soggetto un nuovo farmaco per l'eliminazione dell'azoto.

Nella presente in alcune realizzazioni vengono forniti metodi per determinare se somministrare un farmaco per l'eliminazione dell'azoto ad un soggetto con disturbo di ritenzione dell'azoto che comprendono il misurare un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno per il soggetto e il confrontare il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno ad un ULN per l'ammoniaca nel sangue. Se il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno ha un valore

che è maggiore della metà dell'ULN, al soggetto deve essere somministrato un farmaco per l'eliminazione dell'azoto. In alcune realizzazioni, questi metodi comprendono inoltre il somministrare il farmaco per l'eliminazione dell'azoto. In alcune realizzazioni, al soggetto può non essere stato somministrato alcun farmaco per l'eliminazione dell'azoto prima della determinazione. In altre realizzazioni, al soggetto può essere stato precedentemente somministrato un farmaco per l'eliminazione dell'azoto diverso da quello che si sta valutando. In queste realizzazioni, i metodi forniti nella presente possono essere usati per determinare se somministrare ad un soggetto un nuovo farmaco per l'eliminazione dell'azoto.

Nella presente in alcune realizzazioni vengono forniti metodi per scegliere un dosaggio di un farmaco per l'eliminazione dell'azoto per trattare un disturbo di ritenzione dell'azoto in un soggetto in base ai livelli di ammoniaca nel sangue che comprendono la scelta di un dosaggio che risulta in un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno che è minore della o uguale alla metà dell'ULN per l'ammoniaca nel sangue. In alcune realizzazioni, la scelta del dosaggio efficace è inoltre basata sulla dieta, la capacità di escrezione dell'azoto di scarto endogeno, o qualsiasi loro combinazione. In alcune realizzazioni, i metodi comprendono inoltre il somministrare il dosaggio scelto.

Nella presente in alcune realizzazioni vengono forniti metodi per trattare un soggetto con un disturbo di ritenzione dell'azoto a cui è stato precedentemente somministrato un farmaco per l'eliminazione dell'azoto che comprendono il misurare un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno per il soggetto e il confrontare il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno ad un ULN per l'ammoniaca nel sangue. Se il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno ha un valore che è maggiore della metà dell'ULN, al soggetto viene somministrato un dosaggio aumentato del farmaco per l'eliminazione dell'azoto. Se il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno ha un valore che è minore della o uguale alla metà dell'ULN, al soggetto viene somministrato lo stesso dosaggio o un dosaggio ridotto del farmaco per l'eliminazione dell'azoto. In alcune realizzazioni, la somministrazione di un dosaggio aumentato risulta in un livello medio giornaliero normale di ammoniaca nel soggetto.

Nella presente in alcune realizzazioni vengono forniti metodi per trattare un soggetto con un disturbo di ritenzione dell'azoto a cui è stato precedentemente somministrato un dosaggio iniziale di un farmaco per

l'eliminazione dell'azoto che comprendono il misurare un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno per il soggetto e il confrontare il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno ad un ULN per l'ammoniaca nel sangue. Se il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno ha un valore che è maggiore della metà dell'ULN, al soggetto viene somministrato un dosaggio di mantenimento che è superiore al dosaggio iniziale del farmaco per l'eliminazione dell'azoto. Se il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno ha un valore che è minore della o uguale alla metà dell'ULN, al soggetto viene somministrato il dosaggio iniziale o un dosaggio più basso. In alcune realizzazioni, la somministrazione di un dosaggio di mantenimento aumentato risulta in un livello medio giornaliero normale di ammoniaca nel soggetto.

Nella presente in alcune realizzazioni vengono forniti metodi per trattare un soggetto con un disturbo di ritenzione dell'azoto che comprendono il somministrare un farmaco per l'eliminazione dell'azoto, poi il misurare un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno per il soggetto in un certo momento dopo la somministrazione del farmaco e il confrontare il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno ad un ULN per l'ammoniaca nel sangue. Se il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno ha un valore che è maggiore della metà dell'ULN, al soggetto viene somministrato un dosaggio aumentato del farmaco per l'eliminazione dell'azoto. Se il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno ha un valore che è minore della o uguale alla metà dell'ULN, al soggetto viene somministrato il dosaggio originale o uno inferiore del farmaco.

Nella presente in alcune realizzazioni vengono forniti metodi per trattare un soggetto con un disturbo di ritenzione dell'azoto che comprendono il somministrare un primo dosaggio di un farmaco per l'eliminazione dell'azoto, il misurare un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno per il soggetto, e il confrontare il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno ad un ULN per l'ammoniaca nel sangue. Se il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno ha un valore che è maggiore della metà dell'ULN, al soggetto viene somministrato un secondo dosaggio di un farmaco per l'eliminazione dell'azoto che è maggiore del primo dosaggio. Viene nuovamente misurato un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno nel soggetto e confrontato ad un ULN per l'ammoniaca nel sangue. Se il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno ha un valore che è maggiore della metà dell'ULN, al soggetto viene somministrato un terzo dosaggio di un farmaco per l'eliminazione dell'azoto che è maggiore del

secondo dosaggio. Questo processo viene ripetuto finché il soggetto non presenta un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno con un valore minore della o uguale alla metà dell'ULN.

Nella presente in alcune realizzazioni vengono forniti metodi per monitorare l'efficacia della somministrazione del farmaco per l'eliminazione dell'azoto in un soggetto con un disturbo di ritenzione dell'azoto a cui è stato precedentemente somministrato un farmaco per l'eliminazione dell'azoto che comprendono il misurare un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno per il soggetto e il confrontare il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno ad un ULN per l'ammoniaca del sangue. Se il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno ha un valore che è maggiore della metà dell'ULN, il dosaggio precedentemente somministrato del farmaco per l'eliminazione dell'azoto si considera inadeguato per trattare il disturbo di ritenzione dell'azoto. Se il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno ha un valore che è minore della o uguale alla metà dell'ULN, il dosaggio precedentemente somministrato si considera adeguato per trattare il disturbo di ritenzione dell'azoto. In alcune realizzazioni in cui il dosaggio precedentemente somministrato si considera inadeguato per trattare il disturbo di ritenzione dell'azoto, i metodi forniti nella presente comprendono inoltre il somministrare un dosaggio aumentato del farmaco per l'eliminazione dell'azoto.

Nella presente in alcune realizzazioni vengono forniti metodi per monitorare la terapia con un farmaco per l'eliminazione dell'azoto in un soggetto avente un disturbo di ritenzione dell'azoto che comprendono il misurare un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno dal soggetto e il confrontare il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno ad un ULN per l'ammoniaca nel sangue, in cui un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno che è maggiore della metà dell'ULN indica che il soggetto ha più probabilità di avere bisogno di una regolazione del dosaggio del farmaco per l'eliminazione dell'azoto, e in cui un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno minore della o uguale alla metà dell'ULN indica che il soggetto ha meno probabilità di avere bisogno di una regolazione del dosaggio.

Un disturbo di ritenzione dell'azoto come usato nella presente si riferisce a qualsiasi patologia associata con livelli elevati di azoto/ammoniaca nel sangue. In alcune realizzazioni, un disturbo di ritenzione dell'azoto può essere un UCD. In altre realizzazioni, un disturbo di ritenzione dell'azoto può essere una HE.

Un farmaco per l'eliminazione dell'azoto come usato nella presente si riferisce a qualsiasi farmaco che abbassa i livelli di azoto e/o ammoniaca nel sangue. In alcune realizzazioni, un farmaco per l'eliminazione dell'azoto può rimuovere l'azoto sotto forma di PAGN, e in alcune di queste realizzazioni il farmaco per l'eliminazione dell'azoto può essere un farmaco somministrabile per via orale che contiene o è metabolizzato in PAA. Ad esempio, un farmaco per l'eliminazione dell'azoto può essere un profarmaco di PAA come PBA o HPN-100, un sale di PBA accettabile farmaceuticamente come NaPBA, o un estere, acido, o derivato accettabile farmaceuticamente di un profarmaco di PAA. In altre realizzazioni, un farmaco per l'eliminazione dell'azoto può rimuovere l'azoto attraverso l'acido ippurico. In alcune di queste realizzazioni, un farmaco per l'eliminazione dell'azoto può essere acido benzoico, un sale dell'acido benzoico accettabile farmaceuticamente come il benzoato di sodio, o un estere, acido, o derivato dell'acido benzoico accettabile farmaceuticamente.

L'aumento del dosaggio di un farmaco per l'eliminazione dell'azoto può riferirsi all'aumento della quantità di farmaco per somministrazione (ad es., un aumento da un dosaggio di 3 mL a un dosaggio di 6 mL), l'aumento del numero di somministrazioni del farmaco (ad es., un aumento di dose da una volta al giorno a due o tre volte al giorno), o qualsiasi loro combinazione.

Ad un soggetto a cui è stato precedentemente somministrato un farmaco per l'eliminazione dell'azoto il farmaco può essere stato somministrato per qualsiasi durata di tempo sufficiente a raggiungere lo stato stazionario. Ad esempio, al soggetto può essere stato somministrato il farmaco per un periodo da 2 a 7 giorni, da 1 settimana a 2 settimane, da 2 settimane a 4 settimane, da 4 settimane a 8 settimane, da 8 settimane a 16 settimane, o più di 16 settimane.

In alcune realizzazioni dei metodi descritti nella presente, il periodo di digiuno per ottenere un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno è una notte. In alcune realizzazioni, il periodo di digiuno è di 4 ore o più, 5 ore o più, 6 ore o più, 7 ore o più, 8 ore o più, 9 ore o più, 10 ore o più, 11 ore o più, o 12 ore o più, e in alcune realizzazioni il periodo di digiuno è 4-8 ore, 6-8 ore, o 8-12 ore. Durante il periodo di digiuno, il soggetto preferibilmente non ingerisce alcun alimento. In alcune realizzazioni, il soggetto può anche astenersi dall'ingerire alcune sostanze non alimentari durante il periodo di digiuno. Ad esempio, in alcune realizzazioni il

soggetto non ingerisce alcun integratore e/o farmaco per l'eliminazione dell'azoto durante il periodo di digiuno. In alcune di queste realizzazioni, il soggetto può comunque ingerire uno o più farmaci diversi dai farmaci per l'eliminazione dell'azoto durante il periodo di digiuno. In alcune realizzazioni, il soggetto non ingerisce alcun liquido ad alto contenuto calorico durante il periodo di digiuno. In alcune di queste realizzazioni, il soggetto non ingerisce alcun liquido diverso dall'acqua durante il periodo di digiuno. In altre realizzazioni, il soggetto può ingerire piccole quantità di bevande a basso contenuto calorico, come tè, caffè, o succhi diluiti.

In alcune realizzazioni dei metodi descritti nella presente, i campioni di sangue usati per misurare i livelli di ammoniaca nel sangue a digiuno e/o ammoniaca nel sangue dell'ULN sono campioni di sangue venoso. In alcune realizzazioni, un campione di sangue è un campione di plasma sanguigno. Può essere usato qualsiasi metodo noto nella tecnica per ottenere un campione di plasma sanguigno. Ad esempio, il sangue da un soggetto può essere prelevato in una provetta contenente eparina o acido etilendiamminotetraacetico (EDTA). In alcune realizzazioni, il campione può essere posto su ghiaccio e centrifugato per ottenere il plasma entro 15 minuti dalla raccolta, conservato a 2-8°C (36-46°F) e analizzato entro 3 ore dalla raccolta. In altre realizzazioni, il campione di plasma sanguigno viene congelato rapidamente, conservato a  $\leq -18^{\circ}\text{C}$  ( $\leq 0^{\circ}\text{F}$ ) e analizzato in un momento successivo. Ad esempio, il campione può essere analizzato a 0-12 ore, 12-24 ore, 24-48, 48-96 ore dopo il congelamento, o entro qualsiasi altro arco temporale durante il quale il campione ha dimostrato stabilità. In alcune realizzazioni, i campioni di sangue vengono prelevati in un laboratorio o in un ambiente ospedaliero. In alcune realizzazioni, viene usato un singolo campione di sangue a digiuno per misurare il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno. Tuttavia, in altre realizzazioni, possono essere ottenuti molteplici campioni di sangue a digiuno. In alcune realizzazioni, il livello di ammoniaca nel sangue di un soggetto può essere monitorato durante tutto il giorno. Inoltre, in alcune realizzazioni, i metodi descritti nella presente comprendono un passaggio aggiuntivo di ottenere uno o più campioni di sangue da un soggetto prima o dopo la misurazione del livello di ammoniaca nel sangue a digiuno.

In alcune realizzazioni, un campione di sangue viene analizzato immediatamente dopo la raccolta. In altre realizzazioni, il campione di sangue viene conservato per un certo periodo tra la raccolta e l'analisi. In queste

realizzazioni, il campione può essere conservato per meno di 1 ora, da 1 ora a 6 ore, da 1 ora a 12 ore, da 1 ora a 24 ore, oppure da 1 ora a 48 ore. In alcune di queste realizzazioni, il campione di sangue viene conservato ad una temperatura tra 0-15°C, ad esempio 2-8°C. In altre realizzazioni, il campione di sangue viene conservato al di sotto di 0°C o al di sotto di -18°C.

La misurazione dei livelli di ammoniaca in un campione di sangue a digiuno viene effettuata usando tecniche note nella tecnica. Ad esempio, i livelli di ammoniaca possono essere misurati usando una reazione colorimetrica o una reazione enzimatica. In alcune realizzazioni, una reazione colorimetrica può implicare l'uso del blu di bromofenolo come indicatore dell'ammoniaca. In queste realizzazioni, l'ammoniaca può reagire con il blu di bromofenolo per produrre un colorante blu. In alcune realizzazioni, una reazione enzimatica può implicare glutammato deidrogenasi che catalizza l'amminazione riduttiva di 2-ossoglutarato con  $\text{NH}_4^+$  e NADPH per formare glutammato e  $\text{NADP}^+$ . La formazione dell' $\text{NADP}^+$  formato è direttamente proporzionale alla quantità di ammoniaca presente nel campione di sangue. Pertanto, la concentrazione di ammoniaca viene misurata in base ad una diminuzione dell'assorbanza.

In alcune realizzazioni dei metodi descritti nella presente, un soggetto che presenta un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno minore della o uguale alla metà dell'ULN per l'ammoniaca nel sangue ha una probabilità media entro un intervallo di confidenza che il suo livello medio giornaliero di ammoniaca rimarrà entro un livello medio giornaliero normale di ammoniaca. In alcune realizzazioni, la probabilità media di avere un valore giornaliero normale di ammoniaca è dell'80% fino al 90%. In alcune realizzazioni, si può prevedere con il 95% di confidenza che un livello di ammoniaca nel sangue cadrà entro un certo intervallo. In alcune realizzazioni, si può prevedere con il 95% di confidenza che una probabilità vera di predire i valori normali basati sull'ammoniaca nel sangue a digiuno è tra il 65% e il 93%. In altre realizzazioni, si può prevedere con l'80% di confidenza che una probabilità vera di predire i valori normali sulla base dell'ammoniaca nel sangue a digiuno è almeno del 70%. In alcune realizzazioni, la probabilità media di prevedere il valore normale di ammoniaca sulla base dell'ammoniaca nel sangue a digiuno è di circa l'84% con il 95% di confidenza che la probabilità vera sia tra il 65% e il 93%.

In alcune realizzazioni dei metodi descritti nella presente, un soggetto che presenta un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno minore della o uguale alla metà dell'ULN per l'ammoniaca nel sangue ha una probabilità media entro un intervallo di confidenza che il suo livello massimo di ammoniaca giornaliera nel sangue non supererà di 1,5 volte l'ULN per l'ammoniaca nel sangue. In alcune di queste realizzazioni, la probabilità media è di circa il 70% fino all'80%. In alcune realizzazioni, l'intervallo di confidenza è un intervallo di confidenza al 95%. In alcune realizzazioni, la probabilità media è di circa il 75% con il 95% di confidenza che la probabilità vera sia tra il 58% e l'86%.

In alcune realizzazioni dei metodi descritti nella presente, un soggetto che presenta un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno minore della o uguale alla metà dell'ULN per l'ammoniaca nel sangue ha una probabilità media all'interno di un intervallo di confidenza che il suo livello massimo giornaliero di ammoniaca nel sangue sarà inferiore a 100  $\mu\text{mol/L}$ . In alcune di queste realizzazioni, la probabilità media è del 90% fino al 98%. In alcune realizzazioni, l'intervallo di confidenza è al 95%. In alcune realizzazioni, la probabilità media è di circa il 93% con il 95% di confidenza che la probabilità vera sia tra il 77% e il 100%.

Il valore massimo di ammoniaca si riferisce alla quantità massima di ammoniaca che può essere rilevata in un soggetto in seguito al consumo di pasti, se è possibile istituire una misurazione ripetuta di ammoniaca nel sangue per rilevare tale valore massimo durante un periodo di tempo esteso. Sulla base di studi clinici ben controllati con campionamento del sangue ripetuto per 24 ore, è stato osservato che la massima ammoniaca nel sangue si è verificata in seguito al terzo pasto principale della giornata nelle prime ore fino a metà serata (4-8PM, assumendo che la colazione sia circa alle 8AM; si vedano, ad esempio, Lee 2010; Lichter-Konecki 2011).

L'ULN per l'ammoniaca nel sangue rappresenta generalmente il livello più alto nell'intervallo dei valori normali, che possono essere influenzati da una varietà di fattori quali il metodo di saggio, tipi di reagenti, campioni di riferimento standard usati, e specifiche e calibrazione delle apparecchiature usate per eseguire la misurazione. In alcune realizzazioni dei metodi descritti nella presente, l'ULN per l'ammoniaca nel sangue viene determinato individualmente per un soggetto. In altre realizzazioni, l'ULN per l'ammoniaca nel sangue può essere basato sulle misurazioni ottenute in un intervallo di soggetti (cioè, soggetti con UCD o con un particolare

sottotipo di UCD, soggetti con HE, soggetti sani, ecc.). In alcune realizzazioni, l'ULN per l'ammoniaca nel sangue può rappresentare un valore di riferimento standard descritto nella tecnica, come un ULN medio sviluppato in un determinato sottoinsieme di soggetti. In altre realizzazioni, l'ULN per l'ammoniaca nel sangue può rappresentare una misurazione standard che è stata sviluppata da una particolare entità che esegue prelievi di sangue e/o valutazioni del sangue, come un particolare laboratorio clinico. In alcune realizzazioni, l'ULN è un valore di riferimento standard usato dalla stessa entità che misura il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno. In queste realizzazioni, un esperto nella tecnica comprenderà che l'interpretazione dell'ammoniaca media giornaliera in un soggetto con un disturbo di ritenzione dell'azoto deve essere effettuata rispetto all'intervallo di riferimento dei valori normali nel laboratorio in cui è stata misurata l'ammoniaca. Inoltre, le unità di misurazione dell'ammoniaca possono anche variare da laboratorio a laboratorio (ad es.,  $\mu\text{g/mL}$  o  $\mu\text{mol/L}$ ), sottolineando l'importanza di interpretare i livelli di ammoniaca del soggetto rispetto all'ULN nel laboratorio in cui è stata eseguita la misurazione. In alcune realizzazioni, l'ULN per l'ammoniaca del sangue può essere nell'intervallo di 26-64  $\mu\text{mol/L}$ . In alcune di queste realizzazioni, l'ULN per l'ammoniaca nel sangue può essere nell'intervallo di 32-38  $\mu\text{mol/L}$  o 34-36  $\mu\text{mol/L}$ , e in alcune di queste realizzazioni l'ULN per l'ammoniaca nel sangue è 35  $\mu\text{mol/L}$ . In alcune realizzazioni, l'ULN per l'ammoniaca nel sangue può essere nell'intervallo di 50-65  $\mu\text{g/mL}$ . In alcune di queste realizzazioni, l'ULN per l'ammoniaca nel sangue può essere nell'intervallo di 55-63  $\mu\text{g/mL}$  o 57-61  $\mu\text{g/mL}$ , e in alcune di queste realizzazioni l'ULN per l'ammoniaca nel sangue è di 59  $\mu\text{g/mL}$ .

In alcune realizzazioni, l'ammoniaca giornaliera media è la quantità media di ammoniaca che un individuo può sperimentare durante il giorno, se per le misurazioni dell'ammoniaca venisse effettuato il campionamento di sangue in serie. In studi clinici ben controllati, è stato verificato che l'ammoniaca fluttua diverse volte durante il giorno, a seconda della tempistica del prelievo di sangue rispetto all'assunzione di alimenti e farmaci. A causa di queste fluttuazioni, la tempistica del campionamento di sangue singolo o in serie dovrebbe essere regolata rispetto alla tempistica dell'assunzione di cibo e farmaci. Anche il campionamento in serie potrebbe non essere sufficiente per catturare i picchi e le depressioni dei valori fluttuanti dell'ammoniaca, a meno che i campioni non

vengano prelevati abbastanza frequentemente. Pertanto, ottenere una semplice media di diverse misurazioni può fornire informazioni inadeguate o fuorvianti circa il carico di ammoniaca totale che un soggetto può sperimentare durante il giorno.

Nella presente sono forniti metodi per stimare meglio l'ammoniaca media giornaliera di un soggetto valutata come l'area sotto la curva per l'ammoniaca in 24 ore (ammoniaca  $AUC_{0-24hr}$ ) ottenuta da campioni adeguati e ben distanziati nell'arco di 24 ore. Questa ammoniaca  $AUC_{0-24hr}$  può essere inoltre normalizzata per l'intero periodo effettivo di campionamento, cioè, l'ammoniaca  $AUC_{0-24hr}$  è divisa per il periodo di campionamento (ad es., 24 ore). Ad esempio, se un AUC di 1440  $\mu\text{moli}\cdot\text{h}/\text{L}$  viene calcolata usando la regola trapezoidale basata su 8-11 valori di ammoniaca ottenuti nell'arco di 24 ore, allora il valore medio giornaliero di ammoniaca o  $AUC_{0-24hr}$  sarebbe pari a 1440  $\mu\text{moli}\cdot\text{h}/\text{ml}$  diviso per il tempo di campionamento di 24 ore, o 60  $\mu\text{moli}/\text{L}$ . Se l'intervallo di riferimento normale nel laboratorio che ha eseguito l'analisi dell'ammoniaca era 10-35  $\mu\text{moli}/\text{L}$ , allora il valore medio giornaliero di ammoniaca per questo soggetto sarebbe di circa 1,71 volte l'ULN di 35  $\mu\text{moli}/\text{L}$ . Analogamente, se è stato determinato che l'ammoniaca  $AUC_{0-24hr}$  era pari a 840  $\mu\text{moli}\cdot\text{h}/\text{L}$  sulla base di campioni multipli, ben distanziati nell'arco di 24 ore e analizzati nello stesso laboratorio, e il periodo di campionamento era di 24 ore, allora l' $AUC_{0-24hr}$  sarebbe di 35  $\mu\text{moli}/\text{L}$ . Questo corrisponde ad un carico medio di ammoniaca o giornaliero di ammoniaca entro l'ULN. Infine, i soggetti con disturbi di ritenzione dell'azoto come gli UCD possono sperimentare una crisi di iperammoniemia, che spesso viene definita clinicamente come un livello di sangue che supera le 100  $\mu\text{moli}/\text{L}$  e manifestazioni cliniche dell'iperammoniemia, che possono richiedere un intervento per prevenire un danno irreversibile e consentire il recupero.

Nella presente sono forniti metodi per regolare il dosaggio del farmaco per l'eliminazione dell'azoto mediante la misurazione dell'ammoniaca nel sangue a digiuno per minimizzare la probabilità che un soggetto possa sperimentare un valore di ammoniaca ( $C_{\text{max}}$ ) nell'arco di 24 ore che superi le 100  $\mu\text{moli}/\text{L}$ . È stato osservato che 100  $\mu\text{moli}/\text{L}$  corrispondono a circa 2-3 volte l'ULN nella maggior parte dei laboratori. In precedenza, se un soggetto con un disturbo di ritenzione dell'azoto come l'UCD aveva un livello di ammoniaca nel sangue entro o leggermente al di sopra dell'intervallo di riferimento normale per il laboratorio che eseguiva l'analisi, si riteneva

che il soggetto fosse in un buon controllo clinico indipendentemente dalla tempistica del prelievo di sangue in relazione ai pasti e all'ultima somministrazione della dose di farmaco. Tuttavia, è stato mostrato che un soggetto con un UCD che ha un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno tra l'ULN e 1,5 volte l'ULN (ad es., 35 fino a 52  $\mu\text{mol/L}$ ) ha una probabilità media solo del 45% (con un intervallo di confidenza al 95% del 21% fino al 70%) che l'ammoniaca media giornaliera di lui o di lei è all'interno dell'intervallo normale; una probabilità media solo del 35% (con un intervallo di confidenza al 95% del 13% fino al 60%) che il livello massimo di ammoniaca di lui o di lei durante il giorno è inferiore a 1,5 volte l'ULN (ad es., 52  $\mu\text{mol/L}$ ); e una probabilità media del 25% che il livello massimo giornaliero di ammoniaca di lui o di lei superi le 100  $\mu\text{mol/L}$  durante il giorno. Pertanto, dopo aver misurato l'ammoniaca nel sangue a digiuno di un soggetto con UCD, il dosaggio di un farmaco per l'eliminazione dell'azoto può essere progressivamente aumentato e/o l'assunzione di proteine di lui o di lei progressivamente diminuita fino a quando il valore di ammoniaca a digiuno non è minore della o uguale alla metà dell'ULN per il laboratorio locale in cui è stata eseguita l'analisi dell'ammoniaca.

In alcune realizzazioni dei metodi descritti nella presente, possono essere presi in considerazione uno o più fattori diversi dal livello di ammoniaca quando si valuta il dosaggio del farmaco per l'eliminazione dell'azoto. Ad esempio, le misurazioni dell'ammoniaca nel sangue possono essere combinate con le misurazioni di PAGN urinaria nel determinare se somministrare un farmaco per l'eliminazione dell'azoto, regolare il dosaggio di un farmaco per l'eliminazione dell'azoto, o trattare un disturbo di ritenzione dell'azoto. Pubblicazione di Brevetto U.S.A. N. 2010/0008859 descrive che i livelli di PAGN urinaria sono correlati più strettamente al dosaggio del profarmaco di PBA rispetto ai livelli di PAA, PBA, o PAGN nel plasma, e descrive inoltre che i profarmaci di PBA vengono convertiti in PAGN urinaria con un'efficienza media del 60-75%. Pertanto, alcune realizzazioni dei metodi descritti nella presente comprendono un passaggio aggiuntivo in cui vengono misurati i livelli di PAGN urinaria. In alcune di queste realizzazioni, il calcolo di un dosaggio efficace di farmaco per l'eliminazione dell'azoto è basato in parte su una conversione media del 60-75% del profarmaco di PAA in PAGN urinaria. Ad esempio, in alcune realizzazioni i metodi descritti nella presente per determinare se somministrare un farmaco per l'eliminazione dell'azoto ad un soggetto comprendono un passaggio aggiuntivo di misurazione della PAGN

urinaria e calcolo di un dosaggio iniziale efficace basato su una conversione media del 60-75% del profarmaco di PAA in PAGN urinaria. Analogamente, in alcune realizzazioni, i metodi descritti nella presente per la regolazione del dosaggio di un farmaco per l'eliminazione dell'azoto comprendono un passaggio aggiuntivo di misurazione della PAGN urinaria e calcolo di un dosaggio efficace basato su una conversione media del 60-75% del profarmaco di PAA in PAGN urinaria. In alcune di queste realizzazioni, il dosaggio efficace è calcolato in base ad una produzione obiettivo di azoto. In alcune realizzazioni, la PAGN urinaria può essere determinata come rapporto di concentrazione di PAGN urinaria a creatinina urinaria. In alcune realizzazioni, la PAGN urinaria è un fattore che viene preso in considerazione quando si determina se somministrare o aumentare il dosaggio di un farmaco per l'eliminazione dell'azoto, cioè, la PAGN urinaria è valutata in combinazione con il livello di ammoniaca per determinare se somministrare o aumentare il dosaggio del farmaco. In altre realizzazioni, viene usato solo il livello di ammoniaca per determinare se somministrare o aumentare il dosaggio di un farmaco per l'eliminazione dell'azoto, e la PAGN urinaria viene semplicemente usata per calcolare il dosaggio iniziale o regolato.

Un esperto nella tecnica riconoscerà che una varietà di altri fattori può essere presa in considerazione quando si determina il dosaggio efficace di un farmaco per l'eliminazione dell'azoto. Ad esempio, possono essere considerati fattori come la dieta (ad es., assunzione di proteina) e la capacità di azoto endogeno di scarto (ad es., capacità di sintesi dell'urea).

Nella presente in alcune realizzazione che non fanno parte dell'invenzione sono forniti kit per mettere in pratica i metodi descritti nella presente. In alcune realizzazioni, sono forniti kit per determinare se somministrare o regolare il dosaggio di un farmaco per l'eliminazione dell'azoto per un soggetto con un disturbo di ritenzione dell'azoto. I kit descritti nella presente possono includere uno o più farmaci per l'eliminazione dell'azoto e/o uno o più reagenti (ad es., blu di bromofenolo) o enzimi (ad es., glutammato deidrogenasi) per misurare i livelli di ammoniaca nel sangue in un campione. Il kit può inoltre includere altri pigmenti, leganti, surfactanti, tamponi, stabilizzanti e/o sostanze chimiche necessarie per ottenere un campione di sangue e per misurare il livello di ammoniaca nel campione. In alcune realizzazioni, i kit forniti nella presente comprendono istruzioni in un mezzo

tangibile.

Un esperto nella tecnica riconoscerà che le varie realizzazioni descritte nella presente possono essere combinate.

#### Esempi

##### Esempio 1: Analisi della prevedibilità dei valori farmacodinamici di ammoniaca dall'ammoniaca a digiuno in pazienti con UCD:

Questo esempio dimostra la relazione tra l'ammoniaca a digiuno e il profilo farmacodinamico (PD) dell'ammoniaca giornaliera in pazienti che ricevono profarmaci di PAA per gli UCD. I valori di ammoniaca variano molte volte nel corso di 24 ore nei pazienti con UCD. Come raffigurato in Figure 3a e 3b, l'ammoniaca venosa è stata misurata per 24 ore dopo una settimana di dosaggio con NaPBA o glicerolo fenilbutirrato (GPB). I grafici mostrano i valori di ammoniaca come media  $\pm$ SD per 24 ore, dove il tempo zero corrisponde ad appena prima di dosaggio e colazione (cioè, stato di digiuno). In considerazione di questa variabilità nei livelli giornalieri di ammoniaca, una singola misurazione potrebbe non essere molto informativa nel determinare se un paziente con UCD ha avuto un dosaggio ottimale. La capacità di prevedere l'ammoniaca massima potenziale che un paziente con UCD può sperimentare durante il giorno e l'ammoniaca media di 24 ore da una singola misurazione come i livelli a digiuno ha implicazioni pratiche importanti per le linee guida per il dosaggio del farmaco per l'eliminazione dell'azoto e la gestione del paziente.

Per l'analisi sono stati usati i dati di due studi di Fase 2 e uno studio di Fase 3 che confrontano il controllo dell'ammoniaca valutato mediante campionamento di 24 ore durante il trattamento in stato stazionario con HPN-100 contro NaPBA in 65 pazienti con UCD. I due studi di Fase 2 includono i protocolli UP 1204-003 e HPN-100-005 (Lee 2010; Lichter-Konecki 2011). Lo studio di Fase 3 include i protocolli da HPN-100-006 (Diaz 2011).

I valori di ammoniaca ottenuti da diversi laboratori ospedalieri con diversi intervalli normali sono stati normalizzati ad un intervallo di laboratorio standard di 9-35  $\mu$ mol/L. La popolazione di pazienti comprendeva un ampio intervallo di età, sottotipi di UCD, e dosi di farmaco, ed è riassunta in Tabella 1 di seguito.

Tabella 1: Demografia degli UCD negli studi UP 1204-003, HPN-100-005, e HPN-100-006:

<b>N. per genere (%)</b>	Maschio	18 (27,7)
	Femmina	47 (72,3)
<b>Età al momento dello <i>screening</i> (anni)</b>	N.	65
	Media (SD)	29,46 (15,764)
	Mediana	24,00
	Intervallo	6,0-75,0
<b>N. diagnosi di UCD (%)</b>	Carenza di OTC	57 (87,7)
	Carenza di CPS1	1 (1,5)
	Carenza di ASS	5 (7,7)
	Carenza di ASL	1 (1,5)
	Mancante	1 (1,5)
<b>Durata del trattamento con NapBA (mesi)</b>	N.	63
	Media (SD)	114,14 (90,147)
	Mediana	101,00
	Intervallo	0,2-300,0
<b>Dose giornaliera di NapBA</b>	N.	64
	Media (SD)	14,10 (6,255)
	Mediana	13,50
	Intervallo	1,5-36,0

### Analisi esplorativa:

Sono stati esplorati diversi parametri PD per l'ammoniaca in stato stazionario:  $AUC_{0-24hr}$ , AUC in tempo normalizzato, AUC di log, valore massimo di ammoniaca nell'arco di 24 ore ( $C_{max}$ ), e ammoniaca media. Sono stati usati i dati da 65 soggetti da tutti e tre gli studi con ammoniaca in stato stazionario e ammoniaca a digiuno. I dati mancanti sono stati imputati alle procedure specificate nel protocollo e piano di analisi statistica, tranne per il fatto che non sono state effettuate imputazioni per soggetti che non avevano campionamenti di PK condotti mentre assumevano un dato farmaco dello studio.

I tempi di raccolta del campione dell'h-0 (prima della prima dose giornaliera) e 24 ore dopo la dose (prima della prima dose giornaliera del giorno successivo) sono stati entrambi valutati come rappresentativi dell'ammoniaca a digiuno. Non è stata osservata alcuna differenza evidente nella forma o qualità del rapporto dovuta alla scelta del punto temporale.

Il rapporto tra l'ammoniaca a digiuno e il profilo farmacocinetico è stato valutato separatamente per HPN-100 e NaPBA, senza alcuna differenza apparente nella forza o grandezza della relazione. Pertanto, sono stati usati tutti i dati da entrambi i trattamenti con HPN-100 e NaPBA e le conclusioni riguardanti l'ammoniaca a digiuno si riferiscono sia a HPN-100 che a NaPBA.

I rapporti tra (1) ammoniaca a digiuno e  $AUC_{0-24hr}$  e (2) ammoniaca a digiuno e ammoniaca massima osservata ( $C_{max}$ ) sono stati esplorati visivamente per l'intera popolazione. Sono stati osservati anche gli effetti delle seguenti covariate: età, peso, sesso, e assunzione di proteine alimentari. È stato osservato un rapporto positivo e forte tra l'ammoniaca a digiuno e l' $AUC_{0-24hr}$ , con l'ammoniaca a digiuno crescente che è associata ad  $AUC_{0-24hr}$  e ammoniaca massima osservata più alte (Figura 2).

### Previsione di $AUC_{0-24hr}$ attraverso la realizzazione di modelli di GEE:

Lo scopo di questa realizzazione di modelli era di prevedere l'ammoniaca media giornaliera o massima raggiunta in base all'ammoniaca a digiuno del soggetto. Al fine di tener conto delle differenze negli intervalli normali in diversi laboratori, tutti i valori di ammoniaca sono stati normalizzati ad un intervallo di riferimento di 9-35  $\mu\text{mol/L}$ , e le previsioni sono state riferite all'ULN piuttosto che a un valore fisso.

Le Equazioni di Stima Generalizzate (GEE) sono state usate per modellare la capacità predittiva dell'ammoniaca a digiuno contro varie proprietà PD dell'ammoniaca. La metodologia delle GEE può essere usata per analizzare misure ripetute di dati categorici, nei quali si assume che le misure ripetute sono correlate (Liang 1986). Il modello permette la specificazione della struttura presunta della correlazione senza la conoscenza della grandezza della correlazione.

Il profilo di ammoniaca in 24 ore è stato suddiviso in categorie ordinate usando una varietà di parametri di esito e punti di soglia come segue:

- 1) AUC [0-1,0\*ULN, >1,0\*ULN];
- 2) AUC [0-1,5\*ULN, >1,5\*ULN];
- 3) Cmax [0-1,0\*ULN, >1,0\*ULN];
- 4) Cmax [0-1,5\*ULN, >1,5\*ULN]; e
- 5) Cmax [0-100]  $\mu\text{mol/L}$ .

Sono stati considerati tre livelli di ammoniaca a digiuno in modelli separati come dati di ingresso:

- 1) [0-0,5\*ULN];
- 2) [ $> 0,5*ULN$ - $<1,0ULN$ ]; e
- 3) [ $>1,0*ULN$ - $1,5*ULN$ ].

Usando il Software di Analisi Statistica (SAS) Proc Genmod, i modelli lineari generalizzati sono stati adattati con una funzione di collegamento *logit*. L'ammoniaca a digiuno prima della dose era l'unica variabile predittiva nel modello. La natura ripetuta dei dati (due periodi di studio per soggetto) è stata modellata usando GEE con matrice di correlazione scambiabile. L'ULN per l'ammoniaca a digiuno è stato impostato a 35  $\mu\text{mol/L}$ . L'ULN per AUC in 24 ore è stato assunto come 840 (35  $\mu\text{mol/L}$  \* 24 ore); cioè, l'AUC che corrisponde ad un'ammoniaca media giornaliera minore di o uguale a 35  $\mu\text{mol/L}$ , che era l'ULN normalizzato tra i siti di studio partecipanti ed è derivata mediante la divisione dell'area di 24 ore sotto la curva per il tempo di campionamento di 24 ore. Il modello di GEE è stato ricampionato mediante *bootstrap* 1.000 volte secondo il metodo delineato da Davison, A.C. & Hinkley, D.V., *Bootstrap Methods and their Application*, Cambridge University Press, London

(1997), pp. 358-362. I risultati di questi modelli sono mostrati in Tabella 2 di seguito.

**Tabella 2:** Sommario dei risultati dal modello di GEE per prevedere la capacità dell'ammoniaca a digiuno contro varie proprietà PD dell'ammoniaca:

<b>Modello #</b>	<b>Livello di ammoniaca a digiuno</b>	<b>Esito PK dell'ammoniaca</b>	<b>Probabilità dell'esito nella categoria</b>	<b>Bootstrap i.c. 95%</b>	<b>Bootstrap i.c. 80%</b>	<b>Tasso di errore prev.* di Bootstrap (%)</b>
1	[0-0,5 ULN]	AUC in 24 ore [0-1,0 ULN]	0,84	0,67, 0,93	0,71, 0,89	11,5
2		AUC in 24 ore [0-1,5 ULN]	Non convergono			
3		Cmax osservato [0-1,0 ULN]	0,53	0,38, 0,65	0,42, 0,61	45,8
4		Cmax osservato [0-1,5 ULN]	0,76	0,61, 0,86	0,66, 0,82	23,3
5		Cmax osservato [0-100]	0,93	0,78, 1,00	0,85, 0,97	5,7
6	[0-<1,0 ULN]	AUC in 24 ore [0-1,0 ULN]	0,58	0,42, 0,73	0,48, 0,68	42,8
7		AUC in 24 ore [0-1,5 ULN]	0,88	0,78, 0,97	0,82, 0,94	11,1
8		AUC in 24 ore [0-2 ULN]	0,97	0,90, 1,00	0,93, 1,00	2,2
9		Cmax osservato [0-1,0 ULN]	0,21	0,11, 0,38	0,14, 0,33	20,0
10		Cmax osservato [0-1,5 ULN]	0,52	0,35, 0,66	0,42, 0,61	46,0
11		Cmax osservato [0-2,0 ULN]	0,74	0,62, 0,85	0,91, 1,00	27,2
12		Cmax osservato [0-100]	0,95	0,88, 1,00	0,66, 0,81	4,3
13	[>1,0-1,5 ULN]	AUC in 24 ore [0-1,0 ULN]	0,45	0,24, 0,71	0,30, 0,63	43
14		AUC in 24 ore [0-1,5 ULN]	Non convergono			
15		AUC in 24 ore	0,80	0,49, 0,99	0,63, 0,92	27

		[0-2 ULN]				
16		Cmax osservato [0-1,0 ULN]	Non convergevano			
17		Cmax osservato [0-1,5 ULN]	0,35	0,16, 0,58	0,23, 0,51	33
18		Cmax osservato [0-2,0 ULN]	Non convergevano			
19		Cmax osservato [0-100]	Non convergevano			

Da Tabella 2 di cui sopra, possiamo concludere che nella popolazione dei pazienti con UCD descritti in Tabella 1, possiamo essere confidenti al 95% che, data un'ammoniaca a digiuno minore della o uguale alla metà dell'ULN, la probabilità vera di avere un AUC nell'intervallo [0-840] è in media dell'84%, almeno del 67%, e al massimo del 93%.

Riga 1 di Tabella 2 di cui sopra suggerisce che un paziente con UCD con un'ammoniaca a digiuno di 17  $\mu\text{mol/L}$  come determinato da un laboratorio con un intervallo normale di riferimento di 9-35  $\mu\text{mol/L}$  (cioè, un'ammoniaca a digiuno nell'intervallo [0-0,5 ULN]) ha una probabilità dell'84% (con un intervallo di confidenza al 95% del 67% fino al 93%) di avere  $AUC_{0-24hr}$  normalizzato nel tempo nell'intervallo normale [ $AUC_{0-24hr}$  di 0-840 o un'ammoniaca media giornaliera di 35  $\mu\text{mol/L}$ ], una probabilità del 76% (con un intervallo di confidenza al 95% del 61% fino all'86%) di avere una Cmax di meno di 1,5 ULN, e una probabilità del 93% (con un intervallo di confidenza al 95% del 78% fino al 100%) di non avere mai un'ammoniaca superiore a 100  $\mu\text{mol/L}$ . Pertanto, questo paziente sarebbe regolato in maniera ottimale ed è improbabile che soffra di ammoniaca alta durante il giorno.

Questo Esempio mostra che l'ammoniaca a digiuno è fortemente correlata con l'esposizione giornaliera all'ammoniaca, valutata come concentrazione media giornaliera o massima giornaliera, e che un valore obiettivo a digiuno che non superi la metà del livello superiore della norma per il laboratorio locale sembra essere clinicamente utile così come un pratico predittore dei valori di ammoniaca anche nell'arco di 24 ore. Inoltre, questo Esempio mostra che un soggetto con un'ammoniaca a digiuno nell'intervallo 0-0,5 ULN ha una probabilità dell'84% di avere un  $AUC_{0-24hr}$  nell'intervallo normale (0-840 o un'ammoniaca media giornaliera di

35  $\mu\text{mol/L}$ ).

Esempio 2: Scelta e regolazione del dosaggio di HPN-100 in base ai livelli di ammoniaca nel sangue a digiuno in un paziente con UCD:

Paziente A è un adulto con UCD che viene gestito solo con integratori di amminoacidi e restrizione alimentare di proteina. Paziente A non consuma né i suoi integratori né cibo per circa 8 ore prima di un prelievo di sangue a digiuno al mattino. Viene eseguito un prelievo di sangue venoso, e si determina che il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno è 52  $\mu\text{mol/L}$ . Questo livello di ammoniaca nel sangue a digiuno viene confrontato con l'ULN per l'ammoniaca nel sangue nel laboratorio che ha eseguito il prelievo di sangue, che è 35  $\mu\text{mol/L}$ . Sulla base della correlazione del livello di ammoniaca a digiuno al livello medio di ammoniaca, si determina che il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno di Paziente A di circa 1,5 volte l'ULN rappresenta una probabilità solo del 45% in media di avere un'ammoniaca media durante il giorno all'interno dell'intervallo normale. Pertanto, il rapporto del livello di ammoniaca nel sangue a digiuno a ULN per l'ammoniaca nel sangue indica che Paziente A beneficerà del trattamento con un farmaco per l'eliminazione dell'azoto.

Il medico sceglie di trattare Paziente A con HPN-100. Il dosaggio iniziale viene determinato in base alla superficie corporea o come altrimenti dettato secondo l'etichetta del farmaco HPN-100. La superficie corporea di Paziente A è di 1,4 m<sup>2</sup>, e pertanto viene determinato che il dosaggio iniziale è 9 mL al giorno o 3 mL TID, che è circa il 60% del dosaggio massimo consentito dall'etichetta di HPN-100. Paziente A viene trattato con 9mL/giorno di HPN-100 per almeno 7 giorni, e ritorna per un prelievo di sangue aggiuntivo. Il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno in questo momento è 33  $\mu\text{mol/L}$ , che è leggermente al di sotto dell'ULN e cade nell'intervallo di 0,5 fino a 1,0 volte il valore normale. Il livello di ammoniaca nel sangue di Paziente A viene monitorato durante tutto il giorno dopo la somministrazione di una dose di 3 mL di HPN-100 con ciascun pasto. Si osserva che l'ammoniaca massima di Paziente A raggiunge 95  $\mu\text{mol/L}$  dopo cena con un'ammoniaca media giornaliera di 66  $\mu\text{mol/L}$ , che è quasi due volte l'intervallo normale superiore. Pertanto, il dosaggio di HPN-100 di Paziente A viene aumentato di circa un terzo a 12 mL totali o 4 mL TID. Paziente A ritorna dopo almeno 7 giorni di trattamento con HPN-100. Il livello di ammoniaca a digiuno di Paziente A è di 15  $\mu\text{mol/L}$ ,

che è meno della metà dell'intervallo dell'ULN. Si determina che Paziente A ha raggiunto una regolazione dell'ammoniaca soddisfacente.

Ci si aspetta che se Paziente A aderisce alla sua dieta prescritta, non è previsto che la sua ammoniaca giornaliera massima superi le 52  $\mu\text{mol/L}$  circa, cioè, circa 1,5 volte l'ULN, con una probabilità media del 75% con una confidenza al 95%. Ci si aspetta che il livello medio di ammoniaca durante il giorno rimanga all'interno dell'intervallo normale con una probabilità maggiore dell'84% e una confidenza al 95%. Inoltre, è altamente improbabile che l'ammoniaca giornaliera massima di Paziente A raggiunga le 100  $\mu\text{mol/L}$  durante il giorno.

Esempio 3: Regolazione del dosaggio di HPN-100 in base ai livelli di ammoniaca nel sangue a digiuno in un paziente con UCD:

Paziente B è una paziente di 11 anni con UCD che riceve 24 pillole di BUPHENYL<sup>®</sup> al giorno, integratori di aminoacidi, e limitata assunzione alimentare di proteina. Paziente B non consuma BUPHENYL<sup>®</sup>, integratori, o alimenti per circa 6 ore prima di un prelievo di sangue a digiuno al mattino. Viene effettuato un prelievo di sangue venoso, e si determina che il livello di ammoniaca a digiuno è di 40  $\mu\text{mol/L}$ . Questo livello di ammoniaca nel sangue a digiuno viene confrontato con l'ULN per l'ammoniaca nel sangue per il laboratorio che ha eseguito il prelievo di sangue, che è 35  $\mu\text{mol/L}$ . Sulla base della correlazione del livello di ammoniaca a digiuno al livello medio di ammoniaca, si determina che il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno di Paziente B che cade tra 1 e 1,5 volte l'ULN rappresenta una probabilità del 55% di avere un'ammoniaca media durante il giorno che è maggiore dell'intervallo normale, e al massimo una probabilità del 65% che la sua ammoniaca supererà 52  $\mu\text{mol/L}$  o 1,5 volte l'ULN durante il giorno.

Sulla base della discussione con la paziente e sua madre, il medico sospetta che Paziente B non osservi la sua cura, e decide di convertirla a HPN-100. Il dosaggio iniziale viene determinato sulla base della quantità di BUPHENYL<sup>®</sup> che Paziente B stava ricevendo, ed si determina che Paziente B deve prendere 10,5 mL di HPN-100 al giorno. Paziente B viene trattata con 3,5mL di HPN-100 3 volte al giorno per almeno 7 giorni, e ritorna per prelievi di sangue aggiuntivi. Il suo livello di ammoniaca nel sangue a digiuno in questo momento è di 17  $\mu\text{mol/L}$ , che è al di sotto dell'ULN e cade nell'intervallo da 0 a 0,5 volte il valore normale. Si determina che

Paziente B ha raggiunto una regolazione dell'ammoniaca soddisfacente.

Ci si aspetta che se Paziente B aderisce alla sua dieta prescritta, la sua ammoniaca giornaliera massima non supererà le 50  $\mu\text{mol/L}$ , che è inferiore a 1,5 volte l'ULN. Ci si aspetta che il suo livello medio di ammoniaca durante il giorno con una probabilità media maggiore dell'84% rimanga all'interno dell'intervallo normale. Inoltre, c'è solo una piccola probabilità (7%) che l'ammoniaca massima giornaliera di Paziente B supererà le 100  $\mu\text{mol/L}$  durante il giorno.

Esempio 4: Scelta e regolazione del dosaggio di benzoato di sodio in base ai livelli di ammoniaca nel sangue a digiuno in un paziente con UCD (non secondo l'invenzione):

Paziente C è un paziente adulto con UCD che è allergico al PBA ed è pertanto gestito solo con integratori di amminoacidi e restrizione alimentari di proteina. Paziente C lamenta mal di testa cronico e nausea frequente. Paziente C non consuma né i suoi integratori né cibo per circa 8 ore prima di un prelievo di sangue a digiuno al mattino. Viene eseguito un prelievo di sangue venoso, e si determina che il livello di ammoniaca a digiuno è di 77  $\mu\text{mol/L}$ . Questo livello di ammoniaca nel sangue a digiuno viene confrontato con l'ULN per l'ammoniaca nel sangue per il laboratorio che ha eseguito il prelievo di sangue, che è 35  $\mu\text{mol/L}$ . Sulla base della correlazione del livello di ammoniaca a digiuno al livello medio di ammoniaca, si determina che il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno di Paziente C di circa 2 volte l'ULN rappresenta un'alta probabilità che i livelli di ammoniaca superino le 100  $\mu\text{mol/L}$  durante il giorno. Pertanto, il rapporto di livello di ammoniaca nel sangue a digiuno a ULN per l'ammoniaca nel sangue indica che Paziente C beneficerà del trattamento con un farmaco per l'eliminazione dell'azoto.

Il medico decide di trattare Paziente C con 15 g di benzoato di sodio al giorno poiché il paziente è allergico al PBA. Paziente C viene trattato con 15 g/giorno di benzoato di sodio per almeno 7 giorni, e ritorna per prelievi di sangue aggiuntivi. Il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno in questo momento è di 35  $\mu\text{mol/L}$ , che è uguale all'ULN. Il dosaggio di benzoato di sodio di Paziente C viene aumentato di circa il 30% a 18 grammi al giorno. Dopo almeno 7 giorni di trattamento, il livello di ammoniaca a digiuno di Paziente C è di 15  $\mu\text{mol/L}$ , che è meno della metà dell'ULN. Si determina che Paziente C ha raggiunto una regolazione dell'ammoniaca

soddisfacente.

Ci si aspetta che se Paziente C aderisce alla sua dieta e farmaci prescritti, la sua ammoniaca giornaliera massima non supererà circa 52  $\mu\text{mol/L}$ , che è circa 1,5 volte l'ULN. Ci si aspetta che il suo livello medio di ammoniaca durante il giorno con una probabilità maggiore dell'80% rimanga all'interno dell'intervallo normale. Inoltre, è altamente improbabile che l'ammoniaca giornaliera massima di Paziente C raggiunga le 100  $\mu\text{mol/L}$  durante il giorno.

Esempio 5: Valutazione dell'effetto della regolazione dell'ammoniaca sull'esito neurocognitivo:

È stato mostrato che i pazienti con UCD possono soffrire di una ridotta intelligenza e funzioni neurocognitive compromesse (Kirvitsky 2009). Questi danni neuropsicologici sono stati attribuiti a ripetuti episodi di iperammoniemia acuta intervallati nell'ammoniaca cronica elevata. Sono state rilevate anomalie nella funzione neuropsicologica e/o nelle immagini cerebrali anche in pazienti con UCD con disturbi lievi che presentano QI normale e/o appaiono normali clinicamente (Gropman 2008a; Gropman 2008b). Pertanto, è stato ipotizzato che mantenere l'ammoniaca media giornaliera entro i limiti normali e ridurre così il carico di ammoniaca a lungo termine potrebbe risultare in una cognizione migliorata.

Il rapporto tra la riduzione del carico di ammoniaca mediante il mantenimento dell'ammoniaca a digiuno alla o vicino alla metà dell'ULN e gli esiti neuropsicologici nei pazienti pediatrici con UCD è stata esplorata in studi clinici. Undici pazienti pediatrici di età 6-17 sono stati iscritti ad un confronto del passaggio a breve termine di NapBA e HPN-100 nella regolazione dell'ammoniaca. Questi pazienti sono stati sottoposti a 24 h di raccolta di campioni in serie in un ambiente limitato in cui l'ultimo campione a 24 h è stato considerato a digiuno e sotto la supervisione del personale dello studio. Al termine del trattamento con HPN-100 l'ammoniaca media a digiuno al punto temporale di 24 h era di 15,5  $\mu\text{mol/L}$  o meno della metà dell'ULN, che indicava un buon controllo clinico. Questi 11 pazienti insieme ad altri 15 pazienti pediatrici sono stati iscritti in due studi a lungo termine e hanno ricevuto HPN-100 per 12 mesi, durante i quali è stata raccolta mensilmente l'ammoniaca a digiuno. Al momento dell'iscrizione e al termine dello studio, tutti i pazienti sono stati sottoposti a valutazione per gli esiti neuropsicologici che includeva i seguenti: BRIEF (Behavior Rating Inventory of Executive Function) per

valutare il funzionamento esecutivo quotidiano, CBCL (Child Behavior Checklist) per valutare i comportamenti di internalizzazione (ad es. umore/ansia) ed esternalizzazione, e WASI (Wechsler Abbreviated Scale of Intelligence) per stimare l'abilità intellettiva.

Durante il trattamento di 12 mesi con HPN-100, i pazienti pediatrici con UCD hanno sperimentato meno episodi di iperammoniemia acuta rispetto ai 12 mesi precedenti l'iscrizione (5 episodi durante lo studio contro i 9 prima dell'iscrizione), con l'ammoniaca di picco che è scesa da una media di 233  $\mu\text{mol/L}$  prima dell'iscrizione a 166  $\mu\text{mol/L}$  durante lo studio. L'ammoniaca a digiuno è rimasta controllata e le medie mensili sono state alla o vicine alla metà dell'ULN, oscillando da 17 a 22  $\mu\text{mol/L}$ . Anche se i pazienti erano stati istruiti a rimanere a digiuno prima delle visite mensili dello studio, alcuni campioni di ammoniaca sono stati presi in uno stato non a digiuno, risultando in un'ammoniaca media mensile poco al di sopra della metà dell'ULN.

Nei pazienti pediatrici, i punteggi di WASI e CBCL erano stabili rispetto al riferimento. La maggior parte dei sotto-punteggi di BRIEF nel riferimento era di o vicino a 65, in linea con la disfunzione di confine e/o clinicamente significativa. Tra i 22 soggetti pediatrici che hanno completato i test neuropsicologici a 12 mesi, tutti i domini di BRIEF sono stati migliorati (punteggi T più bassi) con medie (SD) alla fine dello studio rispetto al valore di riferimento per l'Indice di Regolazione Comportamentale di 53,7 (9,79) vs 60,4 (14,03) ( $p < 0,05$ ); Indice di Metacognizione 57,5 (9,84) vs 67,5 (13,72) ( $p < 0,001$ ), e Punteggio Esecutivo Globale 56,5 (9,71) vs 66,2 (14,02) ( $p < 0,001$ ).

Il miglioramento significativo nelle funzioni esecutive in questo gruppo di pazienti pediatrici con UCD indica l'importanza del controllo dell'ammoniaca a lungo termine e il raggiungimento dei livelli obiettivo di ammoniaca a digiuno.

#### Esempio 6: Correlazione dei livelli elevati di PAA agli AE neurologici in soggetti con UCD e sani:

Livelli elevati di PAA nel plasma possono causare sintomi che imitano quelli associati all'iperammoniemia, che includono mal di testa, nausea, sonnolenza, ecc. Poiché tali sintomi sono comuni e non specifici, un livello di ammoniaca inferiore alla metà del limite superiore della norma in un soggetto con un disturbo di ritenzione dell'azoto che presenta tali sintomi e sta ricevendo un profarmaco di PAA potrebbe indurre un medico a

controllare i livelli di PAA nel plasma.

Il rapporto tra livelli elevati di PAA ed AE neurologici è stato valutato in tre popolazioni: (1) 130 adulti sani con un dosaggio da 4 a 12 mL TID di GPB in uno studio QTc approfondito, (2) 54 pazienti adulti e 11 pazienti pediatrici (età 6-17) con UCD iscritti in uno dei 3 protocolli che implicano confronti del passaggio a breve termine (2-4 settimane) di NaPBA vs GPB, e (3) 77 pazienti iscritti in due protocolli quasi identici di trattamento di 12 mesi con GPB. In popolazioni 1 e 2, sono stati analizzati i livelli massimi di PAA (cioè,  $C_{max}$ ) in relazione agli AE neurologici come definiti da MEDDRA usando un test esatto non parametrico di Mann-Whitney e le Equazioni di Stima Generalizzate (GEE) con una funzione di collegamento *logit* e gli effetti per dose e livello di PAA. In popolazione 3 è stato anche esplorato il rapporto tra i livelli di PAA e il verificarsi degli AE riportati da Thiebault.

Non è stato osservato alcun rapporto statisticamente significativo tra gli AE neurologici e i livelli di PAA né per GPB né per NaPBA. Il rapporto di probabilità di un AE neurologico che si è verificato per ciascun aumento di 20  $\mu\text{g/mL}$  nei livelli di PAA per i due farmaci combinati era di 0,95, molto vicino a 1. Pertanto, tra pazienti con UCD con un dosaggio di HPN-100 o NaPBA negli intervalli usati in questi studi, i livelli aumentati di PAA (che si estendevano fino a 244  $\mu\text{g/mL}$ ) non sono stati associati ad un aumento degli AE neurologici. Analogamente, in popolazione 3, i livelli di PAA non sono aumentati nel tempo e non hanno mostrato alcun rapporto apparente con gli AE neurologici, che pure non sono aumentati in frequenza nel tempo. Il paziente pediatrico con il livello di PAA più alto (410  $\mu\text{g/mL}$ ) non ha riportato AE neurologici vicini alla tempistica del prelievo di sangue.

A differenza dei soggetti con UCD, i volontari adulti sani che hanno riportato un AE del sistema nervoso avevano statisticamente livelli di  $C_{max}$  di PAA significativamente più alti rispetto a quelli che non lo hanno avuto. Mentre questa analisi in adulti sani è compromessa dal fatto che i livelli di PAA non erano sempre disponibili al momento del verificarsi degli AE, così come dalla piccola dimensione del campione nei gruppi a dosaggio più alto, il rapporto di probabilità di 1,75 ( $p=0,006$ ) suggerisce che i livelli di PAA in aumento sono associati con una probabilità aumentata di sperimentare un AE del sistema nervoso tra gli adulti sani. Gli AE riportati dagli adulti sani generalmente sono iniziati entro le 36 ore di dosaggio e, tra queglii adulti che sono

rimasti nello studio, la maggior parte ha risolto con dosaggio continuato.

Un rapporto significativo tra i livelli di PAA e il verificarsi di AE neurologici, che generalmente si risolvevano con dosaggio continuato, è stato rilevato nei volontari sani. A differenza degli adulti sani, il  $C_{max}$  di PAA non era correlato con gli AE del sistema nervoso nei pazienti con UCD in un intervallo simile di dosi e livelli di PAA. Questi risultati possono riflettere le differenze metaboliche tra le popolazioni (ad es., i pazienti con UCD presentano alti livelli di glutammina rispetto agli umani sani) e/o l'adattamento metabolico con il dosaggio continuato.

La costruzione del modello PK della popolazione è stata eseguita su 65 pazienti con UCD che hanno partecipato agli studi di Hyperion del passaggio a breve termine usando NONMEM (versione 7.2) basato su 2981 ([PBA], [PAA], [PAGN] e PAGN dell'urina [UPAGN]) punti di dati da 53 pazienti adulti e 11 pazienti pediatriche (6-17 anni) con UCD che hanno partecipato a 3 studi di passaggio di NaPBA e GPB. La dose mediana di GPB, espressa in grammi di PBA per  $m^2$ , era di 8,85 e 7,01 per i soggetti pediatriche e adulti, rispettivamente. I tracciati diagnostici e i confronti statistici sono stati usati per scegliere tra i modelli candidati, e le covariate sono state valutate mediante analisi grafiche e modellamento delle covariate. Usando il modello popPK finale e le stime dei parametri, sono state eseguite simulazioni Monte Carlo in ~1000 pazienti virtuali per un intervallo di dosi di NaPBA e GPB per prevedere l'esposizione sistemica al metabolita e il prodotto di UPAGN.

Il modello finale che meglio si adattava ai dati era caratterizzato da (a) conversione parziale di PBA in PAGN prima di raggiungere la circolazione sistemica, (b) conversione saturabile di PAA in PAGN ( $K_m \sim 161 \mu g/ml$ ), e (c) assorbimento di PBA più lento di ~60% quando rilasciato come GPB vs NaPBA. La superficie corporea (BSA) era una covariata significativa tale che la rimozione del metabolita era proporzionalmente correlata alla BSA. Il metabolismo pre-sistemico frazionale del PBA era più alto per gli adulti che per i pazienti pediatriche che ricevevano GPB (43% vs 14%), mentre il contrario era vero per NaPBA (23% vs 43%). L'esposizione mediana a PAA prevista sulla base del dosaggio simulato di GPB all'equivalente di PBA di  $13 g/m^2$  di NaPBA era inferiore di ~13%-22% negli adulti rispetto a NaPBA ( $C_{max} = 82$  vs  $106 \mu g/mL$ ;  $AUC_{0-24} = 649$  vs  $829 \mu g \cdot h/m$ ) e di ~13% più alta nei soggetti pediatriche di età 6-17 rispetto a NaPBA ( $C_{max} = 154$  vs  $138 \mu g/mL$ ;  $AUC_{0-24} = 1286$  vs  $1154$

µg.h/ml); l'esposizione a PAA del punto superiore del 95esimo percentile prevista è stata inferiore a 500 µg/mL e più bassa del 25%-40% per i soggetti adulti che assumevano GPB contro NaPBA e simile per i soggetti pediatrici. Il dosaggio simulato all'equivalente di PBA di ~5g/m<sup>2</sup> di NaPBA ha reso esposizione variabile a PAA simile e inferiore per entrambi i farmaci e per i pazienti pediatrici e adulti. Il recupero di PBA come UPAGN era molto simile se rilasciato oralmente come GPB o NaPBA.

Questi risultati basati sulla realizzazione di modelli di PopPK e sulle simulazioni di dosaggio suggeriscono che mentre la maggior parte dei pazienti trattati con profarmaci di PAA che includono NaPBA o HPN-100 avranno livelli di PAA al di sotto di quelli che si riferisce siano associati alla tossicità e mentre non è stata trovata alcuna relazione tra livelli di PAA e gli AE neurologici sulla base della popolazione, i singoli pazienti che presentavano sintomi come mal di testa o nausea potevano soffrire di iperammoniemia o alti livelli di PAA e che un livello di ammoniaca a digiuno uguale alla o al di sotto della metà del limite superiore della norma potrebbe indurre il medico a controllare i livelli di PAA al plasma.

#### RIFERIMENTI

1. Brusilow Science 207:659 (1980)
2. Brusilow Pediatr Res 29:147 (1991)
3. Diaz Mol Genet Metab 102:276 (2011)
4. Gropman Mol Genet Metab 94:52 (2008a)
5. Gropman Mol Genet Metab 95:21 (2008b)
6. Lee Mol Genet Metab 100: 221 (2010)
7. Liang Biometrika 73:13 (1986)
8. Lichter-Konecki Mol Genet Metab 103:323 (2011)
9. McGuire Hepatology 51:2077 (2010)
10. Thibault Cancer Res 54:1690 (1994)
11. Thibault Cancer 75:2932 (1995)

### RIVENDICAZIONI

1. Glicerile tri-[4-fenilbutirrato] (HPN-100) per uso in un metodo per trattare un disturbo da ritenzione dell'azoto in un soggetto,

in cui il metodo comprende il regolare il dosaggio di glicerile tri-[4-fenilbutirrato] (HPN-100) per ottenere un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno che sia minore o uguale alla metà del limite superiore della norma (ULN) per l'ammoniaca nel sangue,

in cui la regolazione del dosaggio comprende:

- a) il misurare un livello di ammoniaca nel sangue a digiuno per il soggetto;
- b) il confrontare il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno all'ULN per l'ammoniaca nel sangue; e
- c) il somministrare al soggetto un dosaggio aumentato di glicerile tri-[4-fenilbutirrato] (HPN-100) se il livello di ammoniaca nel sangue a digiuno ha un valore che è maggiore della metà dell'ULN.

2. Glicerile tri-[4-fenilbutirrato] (HPN-100) per uso secondo la rivendicazione 1, in cui la regolazione del dosaggio comprende inoltre il passaggio di determinare il limite superiore della norma per il livello di ammoniaca nel sangue per il soggetto prima del passaggio (b).

3. Glicerile tri-[4-fenilbutirrato] (HPN-100) per uso secondo la rivendicazione 1, in cui il limite superiore della norma per il livello di ammoniaca nel sangue è di 35  $\mu\text{mol/L}$ .

4. Glicerile tri-[4-fenilbutirrato] (HPN-100) per l'uso secondo la rivendicazione 1, in cui la regolazione del dosaggio comprende inoltre:

- d) il misurare l'escrezione urinaria di fenilacetilglutamina (PAGN); e
- e) il determinare un dosaggio efficace di glicerile tri-[4-fenilbutirrato] (HPN-100) basato su una conversione media di glicerile tri-[4-fenilbutirrato] (HPN-100) in PAGN urinaria del 60-75%.

Figura 1

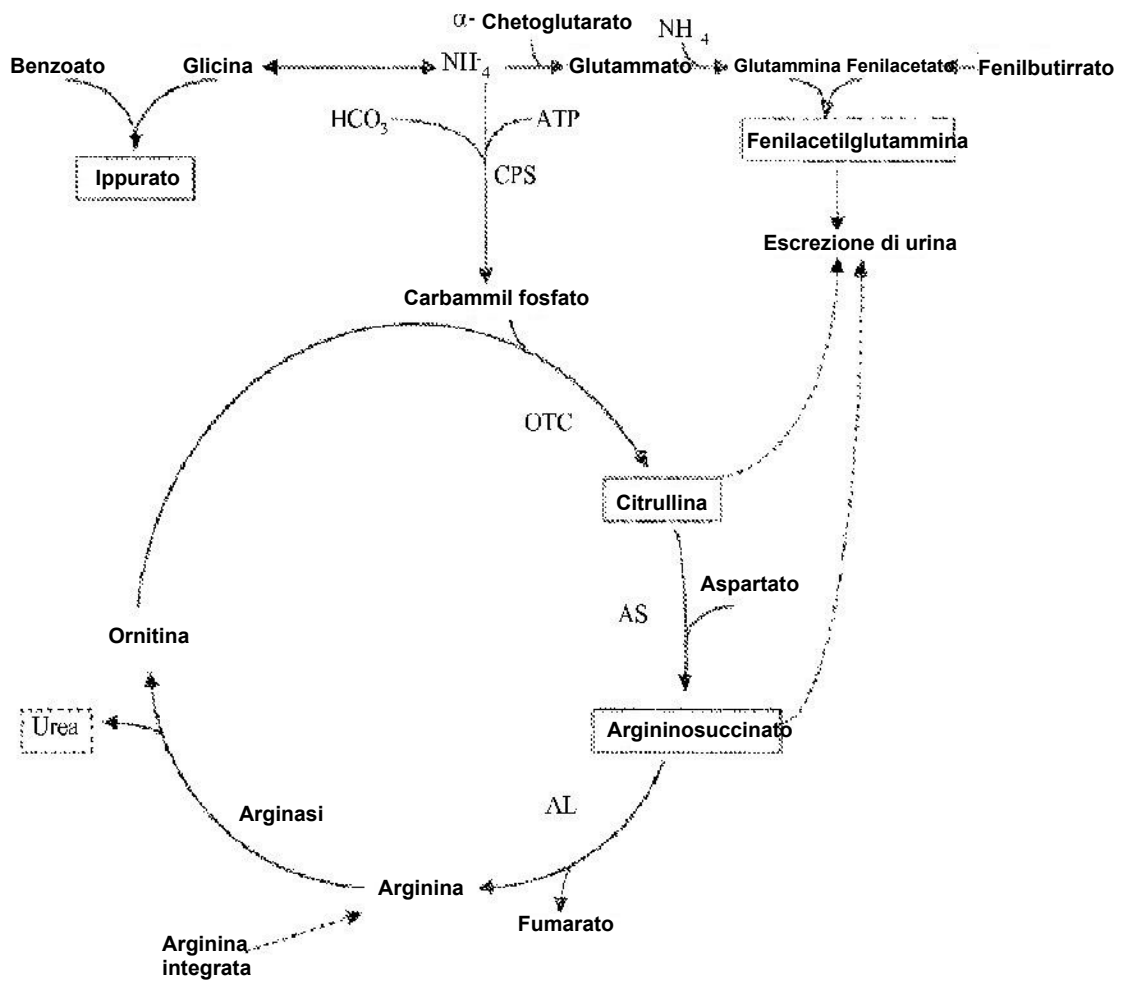


Figura 2

**Rapporto tra Ammoniaca a digiuno e AUC dell'ammoniaca in 0-24 ore**  
**Regressione lineare e i.c. al 95% della previsione**  
**Tutti gli studi combinati - 65 soggetti unici**

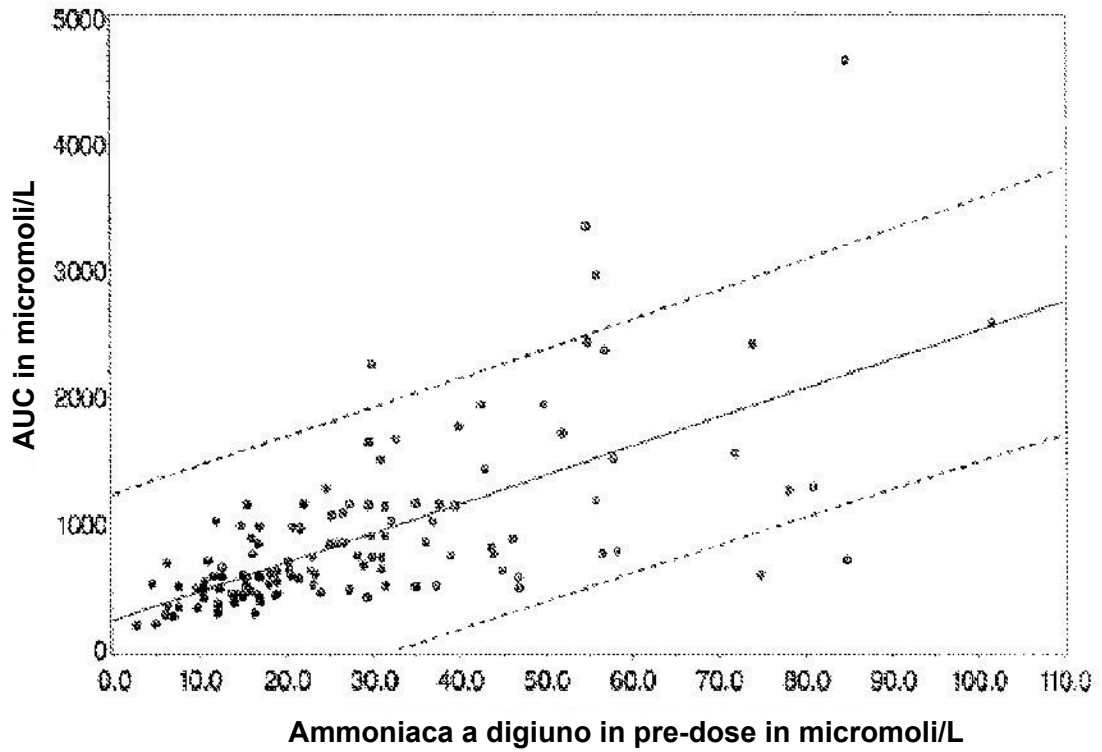
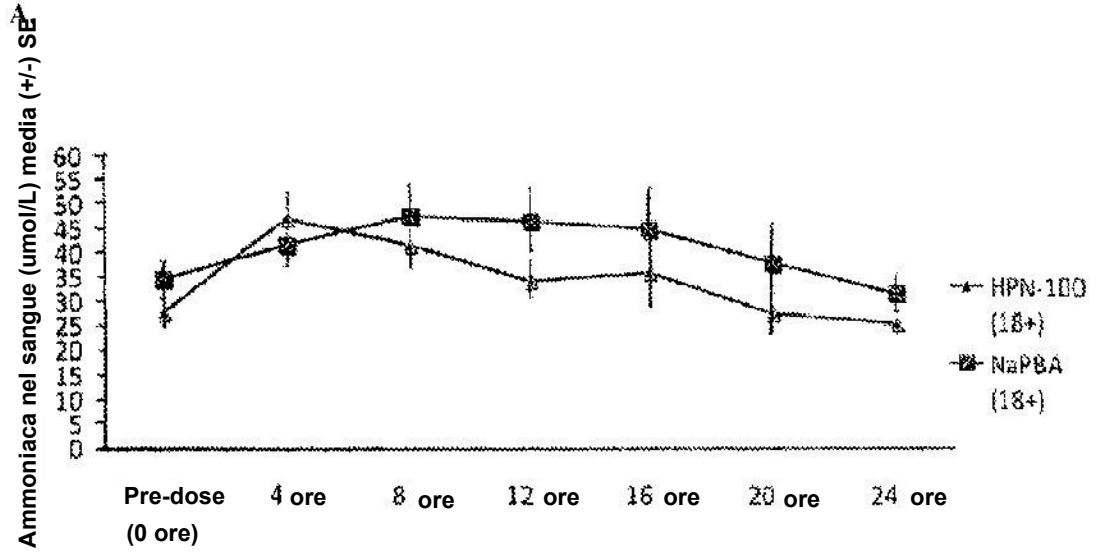


Figura 3



B.

