

1

Traduzione del testo del Brevetto Europeo N° 3 099 306 avente per titolo: "COMPOSTO STEROIDEO PER L'USO NEL TRATTAMENTO DELL'ENCEFALOPATIA EPATICA"

### DESCRIZIONE

#### Campo dell'invenzione

5 La presente invenzione si riferisce a un composto steroideo per l'uso nel trattamento dell'encefalopatia epatica.

#### Fondamento dell'invenzione

L'encefalopatia epatica (HE, hepatic encephalopathy) è una grave complicanza neuropsichiatrica e neurocognitiva in una epatopatia acuta e cronica. La HE è un problema di salute significativo e crescente  
10 per via della grande e crescente prevalenza dell'epatopatia cronica. La HE è caratterizzata da alterazioni del ciclo sonno-veglia, delle funzioni cognitive, della memoria, dell'apprendimento, della coordinazione motoria, della coscienza, minori livelli di energia e cambio di personalità, che varia da HE (MHE) minima a HE (OHE) manifesta. La MHE si manifesta con un deterioramento cognitivo e ha effetti dannosi sulla salute e sulla relativa qualità della vita e sulla capacità di eseguire attività complesse come guidare. Inoltre, l'OHE  
15 si manifesta clinicamente con disturbi mentali e motori e i sintomi variano da disorientamento tramite sedazione e coma.

Steroidi presenti in natura sono soggetti a metabolismo intenso e sono tipicamente non adatti per somministrazione orale. I metaboliti degli ormoni steroidei endogeni pregnenolone, progesterone, deossicorticosterone, cortisone e cortisolo, noti come pregnanoli, nonché i metaboliti di testosterone, androstenedione e deidroepiandrosterone, sono stati tutti oggetto di vari studi, elucidanti almeno  
20 parzialmente il loro ruolo nel sistema di segnali neurologici nei mammiferi. I metaboliti steroidei inducono sintomi e disturbi del CNS e steroidi fungono da modulatori positivi sul complesso del recettore di cloruro ionoforo per acido gamma-amminobutirrico (GABA<sub>A</sub>-R) e sono quindi denominati steroidi modulatori del recettore GABA<sub>A</sub> (GAMS).

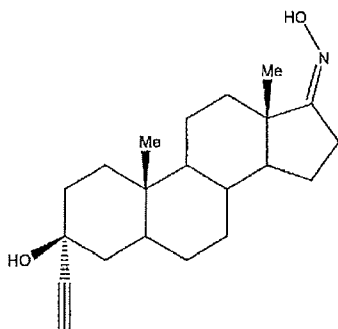
25 È stato dimostrato che alcuni steroidi sono specifici potenziatori del recettore GABA<sub>A</sub>. Esempi di questi

2

steroidi possono essere riscontrati, tra l'altro, in WO 2008/063128. Alcuni di questi steroidi sono potenti e, per esempio, è stato dimostrato che hanno una capacità di indurre amnesia, sedazione e anestesia in una dose farmacologica. WO 99/45931 e WO 03/059357 descrivono effetti antagonisti di steroidi. Wang et al. 2000 (Acta Physiol Scand 169, 333-341) e Wang et al. 2002 (J Neurosci 22(9):3366-75) descrivono effetti antagonisti di  $3\beta$ -OH- $5\alpha$ -pregnano-20-one e altri steroidi di  $3\beta$ -OH- $5\alpha/\beta$  pregnano. WO2006/056794 e WO2010/144498 descrivono l'uso di composti per il trattamento dello scompenso epatico, dell'encefalopatia epatica e dell'ipertensione portale. È necessario fornire trattamenti terapeutici nuovi ed efficaci per l'encefalopatia epatica e disturbi correlati.

#### Descrizione dell'invenzione

10 La presente invenzione fornisce il composto  $3\alpha$ -etinil- $3\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima



o un suo sale farmaceuticamente accettabile, per l'uso nel trattamento dell'encefalopatia epatica.

$3\alpha$ -etinil- $3\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima appartiene a una classe di composti noti come antagonisti degli steroidi modulanti il recettore  $GABA_A$  (GAMSA).

15 Abbiamo riscontrato che  $3\alpha$ -etinil- $3\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima è in grado di inibire selettivamente la modulazione positiva del recettore  $GABA_A$  mediante steroidi endogeni quali allopregnanolone e tetraidrodeossicorticosterone (THDOC). Questi steroidi sono noti per indurre sedazione, deterioramento cognitivo e disturbi motori e la loro concentrazione nel cervello è maggiore in pazienti con iperammoniemia indotta da epatopatia e HE.

20 Tuttavia, è stato anche riscontrato che  $3\alpha$ -etinil- $3\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima non ha un effetto antagonista verso l'azione dell'acido gamma-amminobutirrico (GABA) nei recettori  $GABA_A$ . Questa

3

sorprendente selettività è vantaggiosa dal punto di vista della sicurezza in quanto un'inibizione del legame di GABA nei recettori GABA<sub>A</sub> può causare effetti collaterali, tra cui convulsioni.

Inoltre, 3 $\alpha$ -etinil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima agisce su entrambi i sottotipi del recettore GABA<sub>A</sub>  $\alpha$ 1 e  $\alpha$ 5 ed è quindi in grado di esercitare un effetto positivo sul deterioramento motorio e cognitivo, e gli effetti sedativi che sono il risultato della sovra-attivazione dei recettori GABA<sub>A</sub>. L'effetto positivo di 3 $\alpha$ -etinil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima sul deterioramento motorio e cognitivo è stato illustrato in due modelli animali di HE (iperammoniemia e anastomosi porta-cava in ratti, si veda nel seguito).

A differenza dei trattamenti esistenti per HE, 3 $\alpha$ -etinil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima non influisce sui livelli di ammoniaca in vivo. Di conseguenza, esiste chiaramente anche un potenziale per il suo uso complementare in terapia.

Di conseguenza, vi è una buona base per credere che 3 $\alpha$ -etinil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima sia particolarmente ben adatta per il trattamento di HE e disturbi correlati.

Breve descrizione dei disegni

La Fig. 1 mostra che 3 $\alpha$ -etinil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima non influenza i livelli di ammoniaca nel sangue. I valori sono la media  $\pm$  SEM di 12 ratti per gruppo, valori significativamente diversi dai controlli sono indicati da asterischi; \*\*\*,  $p < 0,001$ . CV = ratti di controllo trattati con un veicolo; HAV = ratti iperammoniemici trattati con un veicolo; HA+GAM = ratti iperammoniemici trattati con 3 $\alpha$ -etinil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima.

La Fig. 2 mostra che 3 $\alpha$ -etinil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima ripristina l'apprendimento spaziale di ratti iperammoniemici nel labirinto radiale. La figura mostra errori operativi nella prova radiale. Errori operativi nel blocco 1. I valori sono la media  $\pm$  SEM di 8 ratti per gruppo. #  $p < 0,05$  versus HAV. CV = ratti di controllo trattati con un veicolo; HAV = ratti iperammoniemici trattati con un veicolo; HA+GAM = ratti iperammoniemici trattati con 3 $\alpha$ -etinil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima.

La Fig. 3 mostra che 3 $\alpha$ -etinil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima, nella prova del labirinto acquatico di Morris, ripristina la memoria spaziale di ratti iperammoniemici. La figura mostra il tempo per trovare la

4

piattaforma sulla prima prova del giorno 3. I valori sono la media  $\pm$  SEM di 8 ratti per gruppo. HAV versus CV  $p = 0,052$ . CV = ratti di controllo trattati con un veicolo; HAV = ratti iperammoniemici trattati con un veicolo; HA+GAM = ratti iperammoniemici trattati con 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima.

La Fig. 4 mostra che 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima ripristina la coordinazione motoria di ratti iperammoniemici. I valori sono la media  $\pm$  SEM di 15 ratti per gruppo. Valori significativamente diversi da CV sono indicati con \*,  $p < 0,05$ , valori significativamente diversi da HAV sono indicati con ###,  $p < 0,001$ . CV = ratti di controllo trattati con un veicolo; HAV = ratti iperammoniemici trattati con un veicolo; HA+GAM = ratti iperammoniemici trattati con 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima.

La Fig. 5 mostra concentrazioni totali di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima nel plasma. Concentrazioni totali di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima nel plasma in ratti di controllo e iperammoniemici 4 e 23 ore dopo l'iniezione sottocutanea di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima al giorno cinque e durante l'ultima settimana di trattamento con iniezioni giornaliere. HA= Animali con iperammoniemia.

La Fig. 6 fornisce concentrazioni non legate\* di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima nel cervello in ratti di controllo e iperammoniemici 1-2 ore dopo l'iniezione s.c. di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima dopo sette settimane con iniezioni giornaliere di 20 mg/kg.

\*Concentrazione non legata nel cervello = frazione di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima nel cervello che non è legata a una proteina trasportatrice o al tessuto cerebrale.

La Fig. 7 fornisce misure elettrofisiologiche rappresentative che mostrano un'attivazione potenziata da tetraidrodeossicorticosterone (THDOC) di recettori  $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$  GABA<sub>A</sub>. Cellule HEK-293 esprimenti i recettori  $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$  GABA<sub>A</sub> negli esseri umani sono state esposte a 30  $\mu$ M di GABA o 30  $\mu$ M di GABA più 100 nM di THDOC per 40 ms. Con THDOC vi erano 20 s di pre-incubazione prima dell'applicazione di THDOC + GABA.

La Fig. 8 fornisce misure elettrofisiologiche rappresentative che mostrano un antagonismo di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima (GAMSA) dell'attivazione potenziata da THDOC dei recettori  $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$  e



5

$\alpha 5\beta 3\gamma 2L$  GABA<sub>A</sub> e nessuna inibizione di GABA. A) antagonismo con 1  $\mu M$  di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima dell'attivazione potenziata da 100 nM di THDOC di 30  $\mu M$  di GABA con il recettore  $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$  GABA<sub>A</sub>, B) 1  $\mu M$  di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima non antagonizza l'attivazione di 30  $\mu M$  di GABA del recettore  $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$  GABA<sub>A</sub> C) antagonismo con 1  $\mu M$  di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima dell'attivazione potenziata da 200 nm di THDOC di 0,3  $\mu M$  di GABA con il recettore  $\alpha 5\beta 3\gamma 2L$  GABA<sub>A</sub>; indicando un antagonismo di un effetto di THDOC D) 1  $\mu M$  di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima non antagonizza l'attivazione di 0,3  $\mu M$  di GABA del recettore  $\alpha 5\beta 3\gamma 2L$  GABA<sub>A</sub>.

La Fig. 9 mostra la capacit  di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima di ripristinare la coordinazione motoria in ratti iperammoniemici e PCS. La coordinazione motoria   stata valutata usando la prova di cammino su trave. (A) mostra i dati per ratti di controllo (CV) o iperammoniemici (HAV) trattati con un veicolo e per ratti iperammoniemici trattati con 3 (HA3), 10 (HA10) o 20 (HA20) mg/kg di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima. (B) mostra i dati per controlli sham-operated (SM) o ratti PCS trattati con un veicolo e per ratti PCS trattati con 0,7 (PCS0,7) o 2,5 (PCS2,5) mg/kg di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima. I valori sono la media  $\pm$  SEM del numero di ratti indicato sotto ogni barra. Valori significativamente diversi da ratti di controllo o sham sono indicati da asterischi. Valori significativamente diversi da ratti iperammoniemici o PCS trattati con un veicolo sono indicate con "a". \* p < 0,05; a p < 0,05; aa p < 0,01; aaa p < 0,001.

La Fig. 10 mostra la capacit  di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima di ripristinare la memoria spaziale nel labirinto acquatico di Morris in ratti iperammoniemici e PCS. La memoria di apprendimento spaziale nel labirinto acquatico di Morris   stata valutata in ratti di controllo (CV) o iperammoniemici (HAV) trattati con un veicolo e per ratti iperammoniemici trattati con 3 (HA3), 10 (HA10) o 20 (HA20) mg/kg di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima (A, B) e in controlli sham-operated (SM) o ratti PCS trattati con un veicolo e per ratti PCS trattati con 0,7 (PCS0,7) o 2,5 (PCS2,5) mg/kg di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima (C,D). (A,C) Latenze di fuga (in secondi) per raggiungere la piattaforma durante le diverse

6

sessioni. (B,D) Tempo speso (%) nel quadrante corretto durante la prova di memoria. I valori sono la media  $\pm$  SEM del numero di ratti indicato sotto ogni barra. Valori significativamente diversi da ratti di controllo o sham sono indicati da asterischi. Valori significativamente diversi da ratti iperammoniemici o PCS trattati con un veicolo sono indicate con "a". \*  $p < 0,05$ ; a  $p < 0,05$ .

5 La Fig. 11 mostra la capacità di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima di ripristinare l'apprendimento spaziale nel labirinto radiale in ratti iperammoniemici e PCS. L'apprendimento spaziale nel labirinto radiale è stato valutato in ratti di controllo (CV) o iperammoniemici (HAV) trattati con un veicolo e per ratti iperammoniemici trattati con 3 (HA3), 10 (HA10) o 20 (HA20) mg/kg di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima (A, B) e in controlli sham-operated (SM) o ratti PCS trattati con un veicolo e per ratti PCS trattati  
10 con 0,7 (PCS0,7) o 2,5 (PCS2,5) mg/kg di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima (C,D). (A,C) Errori operativi durante le diverse sessioni. (B,D) Errori operativi durante i giorni 1-2. I valori sono la media  $\pm$  SEM del numero di ratti indicato sotto ogni barra. Valori significativamente diversi da ratti di controllo o sham sono indicati da asterischi. Valori significativamente diversi da ratti iperammoniemici o PCS trattati con un veicolo sono indicate con "a". \*  $p < 0,05$ ; a  $p < 0,05$ ; aa  $p < 0,01$ .

15 La Fig. 12 mostra la capacità di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima di aumentare l'attività motoria spontanea durante la notte e di ripristinare parzialmente il ritmo circadiano di ratti PCS. L'attività motoria è stata valutata in controlli sham-operated (SM) o ratti PCS trattati con un veicolo o con 0,7 (PCS0,7) o 2,5 (PCS2,5) mg/kg di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima. L'attività motoria durante ciascuna ora è mostrata in A; il rapporto di attività durante la notte e durante il giorno in B e l'attività totale durante il giorno  
20 o la notte in C. Le luci sono spente alle ore 19:00. I valori sono la media  $\pm$  SEM di 8 ratti per gruppo. Valori significativamente diversi da ratti SM sono indicati da asterischi; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Valori significativamente diversi da ratti PCS sono indicati con a; a  $p < 0,05$ .

La Fig. 13 mostra la capacità di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima di normalizzare l'attività verticale durante il giorno e di ripristinare parzialmente il ritmo circadiano di ratti PCS. L'esperimento è stato  
25 eseguito come descritto per la figura 12 ma sono mostrati conteggi verticali. I valori sono la media  $\pm$  SEM

7

di 8 ratti per gruppo. Valori significativamente diversi da ratti SM sono indicati da asterischi; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Valori significativamente diversi da ratti PCS sono indicati con a; a  $p < 0,05$ ; aa  $p < 0,01$ .

La Fig. 14 mostra un'esposizione a  $3\alpha$ -etnil- $3\beta$ -idrossi androstan-17-one ossima nel plasma e nel cervello a tempo in prova comportamentale, in ratti iperammoniemici e PCS. In A) ratti iperammoniemici e B) ratti PCS, le concentrazioni totali nel plasma di  $3\alpha$ -etnil- $3\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima sono mostrate in  $\mu\text{M}$ . In C) ratti iperammoniemici e D) ratti PCS, le concentrazioni non legate nel cervello di  $3\alpha$ -etnil- $3\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima sono mostrate in  $\text{nmol/kg}$ . Si notino le esposizioni simili nei diversi modelli di ratto con le dosi usate, in ratti iperammoniemici 3, 10 e 20  $\text{mg/kg/giorno}$  in ratti con PCS 0,7 e 2,5  $\text{mg/kg/giorno}$ . I dati sono dal termine dello studio, vale a dire dopo nove settimane di trattamenti giornalieri con  $3\alpha$ -etnil- $3\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima in olio di sesamo dato s.c. una volta al giorno.

Prima che la presente invenzione venga descritta in dettaglio, resta inteso che la terminologia impiegata nella presente è usata allo scopo di descrivere unicamente forme di realizzazione particolari e non è destinata a essere limitativa.

Va osservato che, come usato in questa descrizione e nelle rivendicazioni unite, le forme singolari "un/uno/una", "un" e "il/lo/la" includono anche riferimenti plurali, salvo che il contesto indichi chiaramente altrimenti.

Il termine "composizione farmaceutica" è usato nel suo senso più ampio, che comprende tutte le composizioni farmaceuticamente applicabili contenenti almeno una sostanza attiva e trasportatori, adiuvanti, diluenti, costituenti, ecc., facoltativi.

I termini "somministrazione" e "modalità di somministrazione" nonché "via di somministrazione" sono usati anch'essi nel loro senso più ampio.

Il composto  $3\alpha$ -etnil- $3\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima come usato secondo l'invenzione può essere somministrato in vari modi in larga misura a seconda del fatto se una modalità di somministrazione locale, topica o sistemica sia più appropriata per la condizione dell'encefalopatia epatica da trattare. Queste diverse modalità di somministrazione sono, per esempio, topica (per esempio, sulla pelle), locale (tra cui

oftalmica e a varie membrane mucose, per esempio, rilascio vaginale e rettale), orale, parenterale o polmonare, incluse le vie aeree superiori e inferiori. La preparazione di tali composizioni e formulazioni è generalmente nota agli esperti nelle tecniche farmaceutiche e delle formulazioni e può essere applicata alla formulazione della composizione della presente invenzione.

5 Con il termine "antagonista" si intende una sostanza che ostacola un'altra sostanza, un agonista, per indurre il suo effetto. In questa domanda i termini antagonista e bloccante sono usati in modo intercambiabile.

Con il termine "encefalopatia epatica di tipo A" si intende tipicamente encefalopatia epatica associata a insufficienza epatica acuta, tipicamente associata a edema cerebrale.

10 Con il termine "encefalopatia epatica di tipo B" si intende tipicamente encefalopatia epatica (bypass) causata da shunt portale-sistemico senza epatopatia intrinseca associata.

Con il termine "encefalopatia epatica di tipo C" si intende tipicamente encefalopatia epatica che si presenta in pazienti con cirrosi - questo tipo è suddiviso in encefalopatia episodica, persistente e minima.

15 Con il termine "encefalopatia epatica minima" si intende tipicamente encefalopatia epatica che non comporta una disfunzione cognitiva clinicamente manifesta, ma può essere dimostrata con studi neuropsicologici.

20 Con il termine "encefalopatia epatica manifesta" si intende tipicamente encefalopatia epatica clinicamente evidente che si manifesta come sindrome neuropsichiatrica con un ampio spettro di disturbi mentali e motori. L'encefalopatia epatica manifesta può comparire episodicamente, in un periodo di ore o giorni in pazienti precedentemente stabili o pazienti possono presentare anomalie neuropsichiatriche persistenti.

Con il termine "iperammoniemia" si intende tipicamente un disturbo metabolico caratterizzato da un eccesso di ammoniaca nel sangue.

25 Con il termine "trapianto di fegato" si intende tipicamente una procedura chirurgica per rimuovere un fegato malato in conseguenza, per esempio, a insufficienza epatica acuta o cirrosi, e per sostituirlo con un fegato sano da un donatore. La maggior parte delle operazioni di trapianto usano fegati da donatori deceduti ma



un fegato può anche provenire da un donatore vivente (una porzione del fegato di una persona vivente).  
Pazienti, per esempio, con cirrosi sono comunemente colpiti da encefalopatia epatica e l'encefalopatia epatica preoperatoria è un importante predittore di complicanze neurologiche post-trapianto.

Con il termine "insufficienza epatica acuto su cronica" si intende tipicamente uno scompenso acuto di  
5 cirrosi, almeno un'insufficienza di un organo, o appartiene a un sottogruppo con un elevato tasso di mortalità a breve termine.

Con il termine "cirrosi compensata" si intende tipicamente cirrosi epatica senza alcuna evidenza clinica ma può includere varici esofagee o gastriche asintomatiche e primi sintomi quali stanchezza e astenia, perdita dell'appetito e perdita di peso, nausea o dolore addominale.

10 Con il termine "cirrosi scompensata" si intende tipicamente avanzata cirrosi epatica con una gamma di prove cliniche quali ittero, ascite, edema, encefalopatia epatica, emorragia gastrointestinale, ipertensione portale, infezioni batteriche, o una qualsiasi combinazione.

Con il termine "ipertensione portale" si intende tipicamente un gradiente di pressione venoso epatico in seguito a cirrosi epatica, con o senza shunt portosistemico intraepatico transgiugulare (TIPS) associato.

15 Con il termine "prevenzione" all'interno di questa descrizione, si intende tipicamente prevenzione dalla comparsa della malattia o del disturbo di encefalopatia epatica.

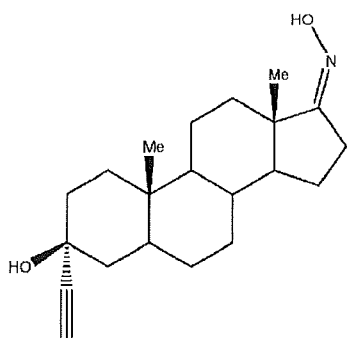
Con il termine "attenuazione" all'interno di questa descrizione, si intende tipicamente riduzione o liberazione della/dalla malattia o del/dal disturbo di encefalopatia epatica.

20 Pazienti affetti da encefalopatia epatica possono mostrare sintomi inclusi, in via non limitativa, alterazioni del ciclo sonno-veglia, delle funzioni cognitive, della memoria, dell'apprendimento, della coordinazione motoria, della coscienza, minori livelli di energia e cambiamento della personalità, deterioramento cognitivo, disorientamento e coma.

I presenti inventori hanno sorprendentemente dimostrato che 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima può essere utile per il trattamento dell'encefalopatia epatica.

25 In un primo aspetto dell'invenzione, è fornito il composto 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima

10



o un suo sale farmaceuticamente accettabile, per l'uso nel trattamento dell'encefalopatia epatica.

In una forma di realizzazione dell'invenzione, detta encefalopatia epatica è encefalopatia epatica di tipo A.

In un'altra forma di realizzazione dell'invenzione, detta encefalopatia epatica è encefalopatia epatica di tipo

5 B.

In un'altra forma di realizzazione dell'invenzione, detta encefalopatia epatica è encefalopatia epatica di tipo

C.

In un'altra forma di realizzazione dell'invenzione, detta encefalopatia epatica è encefalopatia epatica minima.

10 In un'altra forma di realizzazione dell'invenzione, detta encefalopatia epatica è encefalopatia epatica manifesta.

In un'altra forma di realizzazione dell'invenzione, detto composto per l'uso avviene quando detta encefalopatia epatica è trattata in un paziente con insufficienza epatica acuta.

15 In un'altra forma di realizzazione dell'invenzione, detto composto per l'uso avviene quando detta encefalopatia epatica è trattata in un paziente con insufficienza epatica cronica con o senza insufficienza epatica acuta su cronica.

In un'altra forma di realizzazione dell'invenzione, detto composto per l'uso è per la prevenzione o l'attenuazione dell'encefalopatia epatica, come l'encefalopatia epatica di tipo A, l'encefalopatia epatica di tipo B, l'encefalopatia epatica di tipo C, l'encefalopatia epatica minima, l'encefalopatia epatica manifesta, in  
20 pazienti con insufficienza epatica acuta o in un paziente con epatopatia cronica con o senza insufficienza epatica acuta su cronica.

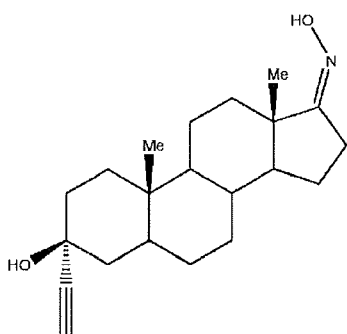


11

In un'altra forma di realizzazione dell'invenzione, detto composto per l'uso è fornito prima di, durante o dopo un trapianto di fegato.

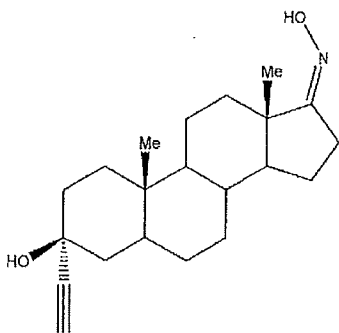
In un'altra forma di realizzazione dell'invenzione, è fornita una composizione farmaceutica comprendente 3 $\alpha$ -etinil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima o un suo sale farmaceuticamente accettabile, per l'uso nel  
5 trattamento dell'encefalopatia epatica, unitamente a uno o più trasportatori, eccipienti e/o diluenti farmaceuticamente accettabili.

È descritto anche il composto 3 $\alpha$ -etinil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima



o un suo sale farmaceuticamente accettabile, per l'uso nel trattamento dell'ipertensione portale. Detto uso  
10 può anche essere la prevenzione o l'attenuazione dell'ipertensione portale. Il paziente con ipertensione portale tipicamente soffre di un'epatopatia, come un'epatopatia cronica, cirrosi o insufficienza epatica acuta.

Viene anche descritto un metodo per trattare l'ipertensione portale, comprendente somministrare una quantità farmaceuticamente efficace di 3 $\alpha$ -etinil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima



15

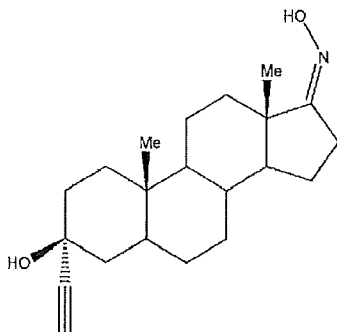
O un suo sale farmaceuticamente accettabile, a un paziente che ne necessita. Detto metodo può anche essere nella prevenzione o nell'attenuazione dell'ipertensione portale. Il paziente con ipertensione portale



12

tipicamente soffre di un'epatopatia, come un'epatopatia cronica, cirrosi o insufficienza epatica acuta.

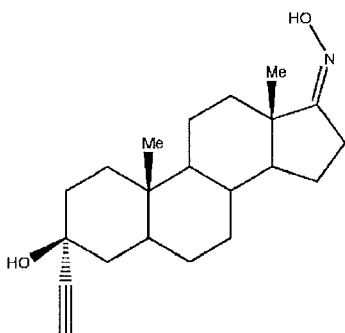
In un altro aspetto dell'invenzione, è fornito il composto 3 $\alpha$ -etinil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima



o un suo sale farmaceuticamente accettabile, per l'uso nel trattamento di uno scompenso epatico. Detto

5 uso può anche essere la prevenzione o l'attenuazione di uno scompenso epatico. Il paziente con scompenso epatico tipicamente soffre di un'epatopatia, come un'epatopatia cronica o può essere sospettato di avere un evento precipitante, come sanguinamento gastrointestinale, infezione, trombosi della vena portale o disidratazione.

In un altro aspetto dell'invenzione, è fornito l'uso del composto 3 $\alpha$ -etinil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima



10

o un suo sale farmaceuticamente accettabile, nella produzione di un farmaco per il trattamento dell'encefalopatia epatica.

In una forma di realizzazione dell'invenzione, detta encefalopatia epatica è encefalopatia epatica di tipo A.

In un'altra forma di realizzazione dell'invenzione, detta encefalopatia epatica è encefalopatia epatica di tipo

15 B.

In un'altra forma di realizzazione dell'invenzione, detta encefalopatia epatica è encefalopatia epatica di tipo

C.



In un'altra forma di realizzazione dell'invenzione, detta encefalopatia epatica è encefalopatia epatica minima.

In un'altra forma di realizzazione dell'invenzione, detta encefalopatia epatica è encefalopatia epatica manifesta.

5 In un'altra forma di realizzazione dell'invenzione, detto uso avviene quando detta encefalopatia epatica è trattata in un paziente con insufficienza epatica acuta.

In un'altra forma di realizzazione dell'invenzione, detto uso avviene quando detta encefalopatia epatica è trattata in un paziente con insufficienza epatica cronica con o senza insufficienza epatica acuta su cronica.

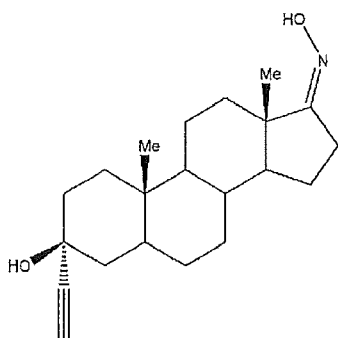
10 In un'altra forma di realizzazione dell'invenzione, detto uso è fornito prima di, durante o dopo un trapianto di fegato.

In un'altra forma di realizzazione dell'invenzione, detto uso del composto 3 $\alpha$ -etnil-3- $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima, o di un suo sale farmaceuticamente accettabile, nella produzione di un farmaco, può essere per la prevenzione o l'attenuazione dell'encefalopatia epatica, come l'encefalopatia epatica di tipo A, l'encefalopatia epatica di tipo B, l'encefalopatia epatica di tipo C, l'encefalopatia epatica minima,  
15 l'encefalopatia epatica manifesta, in un paziente con insufficienza epatica acuta o in un paziente con epatopatia cronica con o senza insufficienza epatica acuta su cronica.

In un'altra forma di realizzazione di questo aspetto, è fornita una composizione farmaceutica comprendente 3 $\alpha$ -etnil-3- $\beta$ -idrossiandrostan-17- o un suo sale farmaceuticamente accettabile, per l'uso nel trattamento dell'encefalopatia epatica, unitamente a trasportatori, eccipienti e/o diluenti farmaceuticamente accettabili.

20 Detto uso può anche essere nella prevenzione o nell'attenuazione dell'encefalopatia epatica.

È descritto anche il composto 3 $\alpha$ -etnil-3- $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima



o un suo sale farmaceuticamente accettabile per l'uso nell'inibire o nel trattare sintomi causati da iperammoniemia.

Un'ulteriore forma di realizzazione dell'invenzione è il composto 3α-etinil-3β-idrossiandrostan-17-one ossima per l'uso nel trattamento o nella prevenzione dell'encefalopatia epatica, come l'encefalopatia epatica di tipo A, l'encefalopatia epatica di tipo B, l'encefalopatia epatica di tipo C, l'encefalopatia epatica minima, l'encefalopatia epatica manifesta, in pazienti con insufficienza epatica acuta o in un paziente con epatopatia cronica con o senza insufficienza epatica acuta su cronica; in cui detto trattamento o detta prevenzione comprende la co-somministrazione di 3α-etinil-3β-idrossiandrostan-17-one ossima, o un suo sale farmaceuticamente accettabile, con composto riduttore di ammoniaca, come rifaximina, lattulosio, fenilacetato di ornitina e fenilbutirrato di glicerolo, preferibilmente il composto riduttore di ammoniaca è rifaximina o lattulosio, e più preferibilmente il composto riduttore di ammoniaca è rifaximina.

Un'ulteriore forma di realizzazione dell'invenzione è l'uso del composto 3α-etinil-3β-idrossiandrostan-17-one ossima nella produzione di un farmaco per il trattamento o la prevenzione dell'encefalopatia epatica, come l'encefalopatia epatica di tipo A, l'encefalopatia epatica di tipo B, l'encefalopatia epatica di tipo C, l'encefalopatia epatica minima, l'encefalopatia epatica manifesta, in un paziente con insufficienza epatica acuta o in un paziente con epatopatia cronica con o senza insufficienza epatica acuta su cronica; in cui detto trattamento o detta prevenzione comprende la co-somministrazione di 3α-etinil-3β-idrossiandrostan-17-one ossima, o un suo sale farmaceuticamente accettabile, con un composto riduttore di ammoniaca, come rifaximina, lattulosio, fenilacetato di ornitina e fenilbutirrato di glicerolo, preferibilmente il composto riduttore di ammoniaca è rifaximina o lattulosio, e più preferibilmente il composto riduttore di ammoniaca è

rifaximina.

Un ulteriore aspetto dell'invenzione è il composto 3 $\alpha$ -etinil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima, in cui uno o più atomi di idrogeno in ogni possibile posizione sostituyente possono essere sostituiti con deuterio o trizio, per l'uso nel trattamento dell'encefalopatia epatica come encefalopatia epatica minima o encefalopatia epatica manifesta.

Un ulteriore aspetto dell'invenzione è il composto 3 $\alpha$ -etinil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima, in cui uno o più atomi di idrogeno in ogni possibile posizione sostituyente possono essere sostituiti con deuterio o trizio, per l'uso in saggi che prevedono la determinazione della concentrazione del composto in un tessuto o fluidi.

Secondo la presente invenzione, 3 $\alpha$ -etinil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima può essere somministrata tramite una delle seguenti vie di somministrazione: endovenosa, nasale, per il retto, buccale, intravaginale, percutanea intramuscolare e orale. Secondo una forma di realizzazione, 3 $\alpha$ -etinil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima è somministrata per via endovenosa. Secondo un'altra forma di realizzazione, 3 $\alpha$ -etinil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima è somministrata per via nasale. La somministrazione percutanea, usando 3 $\alpha$ -etinil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima formulata come una crema, un gel, e un unguento oppure sotto forma di cerotti medici adesivi a lento rilascio, è un'altra possibile forma di somministrazione, analogamente adatta per l'auto-medicazione.

La composizione farmaceutica può essere adattata o regolata secondo normali procedure farmacologiche, comprendenti la sostanza farmaceutica efficace sotto forma chimica, adatta per la via scelta, unitamente ad adiuvanti, trasportatori, diluenti e veicoli adatti, convenzionalmente usati e ben noti a un tecnico del ramo. Adiuvanti e veicoli convenzionalmente usati per la somministrazione orale sono, per esempio, riempitivi o agenti di sospensione come biossido di titanio, anidride di lattosio, silice, silice colloidale, metilcellulosa, stearato di magnesio, cellulosa microcristallina e simili. Adiuvanti e veicoli convenzionalmente usati per la somministrazione endovenosa sono, per esempio, acqua sterile per preparazioni iniettabili (WFI), tamponi sterili (per esempio, tamponare la soluzione a pH 7,4), soluzione di

16

albumina, soluzioni lipidiche, ciclodestrine e simili. Ajuvanti e veicoli convenzionalmente usati per la somministrazione transdermica sono, per esempio, vaselina, paraffina liquida, glicerolo, acqua, olio MCT, olio di sesamo, oli vegetali e simili. La dose varia naturalmente a seconda della modalit  di somministrazione, della particolare condizione da trattare o dell'effetto desiderato, del sesso, dell'et , del peso e della salute del paziente, nonch  eventualmente di altri fattori, valutati dal medico curante.

L'invenzione sar  ora descritta da vari esempi illustrativi e non limitativi.

Esempio 1.

Sintesi di 3 -etinil-3 -idrossiandrostan-17-one ossima

Fase 1: Sintesi di 3 -etinil-3 -idrossiandrostan-97-one

3,17-androstandione (5,0 mmol)   stato disciolto in 50 mL di THF anidro a temperatura ambiente (rt, room temperature) sotto azoto. Etilene magnesio bromuro (1,1 equiv)   stato aggiunto goccia a goccia a rt sotto agitazione e la soluzione   stata lasciata agitare per una notte a rt sotto un flusso di azoto. La soluzione   stata in seguito estinta con  $\text{NH}_4\text{Cl}_{(\text{acq})}$  saturo e la fase acquosa estratta con diclorometano (3 x 30 mL). Le fasi organiche raccolte sono state fatte evaporare a pressione ridotta, l'olio giallo risultante disciolto in diclorometano, lavato con salamoia ed essiccato su  $\text{MGS}_4$ . La soluzione   stata ridotta sottovuoto e il residuo purificato mediante cromatografia flash su colonna di silice (1:4 dietilere:diclorometano), rese tipiche del 65%. Eventuali tracce di sottoprodotti possono essere eliminate mediante ulteriore ricristallizzazione da dietilere.  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3\text{-d}_6$ ):  $\delta$  2,43 (s, 1H); 2,42 (m, 1H); 2,10-2,04 (m, 2H); 1,02 (m, 1H); 0,86 (s, 3H); 0,83 (s, 3H).

Fase 2: Sintesi di 3 -etinil-3 -idrossiandrostan-17-one ossima

3 -etinil-3 -idrossiandrostan-17-one (10 mmol)   stato disciolto in 5 mL di diclorometano e in 50 mL di etanolo a temperatura ambiente e in atmosfera di aria, in un pallone a fondo tondo da 250 mL. 4 equiv. di  $\text{NH}_2\text{OH}$  cloridrato e 4 equiv. di acetato di sodio sono stati disciolti in 5 mL di  $\text{H}_2\text{O}$  e in seguito aggiunti alla soluzione di steroide. 20 mL di etanolo sono stati aggiunti e la miscela posta a riflusso per una notte. La miscela   stata in seguito raffreddata e il solvente rimosso sotto pressione ridotta. Il residuo bianco   stato



trattato con 50 mL di H<sub>2</sub>O e 50 mL di diclorometano, la fase acquosa estratta con 3 x 30 mL di diclorometano. Le fasi organiche raccolte sono state in seguito essiccate su MgSO<sub>4</sub>, filtrate e il solvente è stato rimosso sotto pressione ridotta. Il residuo finale è stato purificato mediante cromatografia flash su colonna di silice diclorometano: dietilere 4:1, rese tipiche del 95-100% (quantitative).

5 <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>-d<sub>6</sub>): δ 2,51-2,47 (m, 2H); 2,43 (s, 1H); 1,00 (m, 1H); 0,80 (m, 1H); 0,90 (s, 3H), 0,83 (s, 3H).

Esempio 2.

Effetto terapeutico di 3α-etinil-3β-idrossiandrostan-17-one ossima in un modello animale di encefalopatia epatica

10 Piano di trattamento e prova

In questo studio è stato usato un modello animale di iperammoniemia cronica che riproduce molte alterazioni cognitive e motorie presenti nell'encefalopatia epatica. Ratti sono stati alimentati con ammoniaca nel loro cibo e dopo due settimane con cibo arricchito di ammoniaca hanno sviluppato sintomi di encefalopatia epatica. La prova di cammino su trave è stata effettuata durante la 3° e la 4° settimana di  
15 trattamento con 3α-etinil-3β-idrossiandrostan-17-one ossima mentre la prova del labirinto acquatico di Morris è stata eseguita durante la 4°-5° settimana di trattamento con 3α-etinil-3β-idrossiandrostan-17-one ossima e la prova del labirinto radiale è stata eseguita durante la 6°-7° settimana di trattamento con 3α-etinil-3β-idrossiandrostan-17-one ossima.

Lo studio è stato diviso in due serie di animali (ratti maschi Wistar), ciascuna serie includeva i seguenti  
20 gruppi; Controlli trattati con un veicolo (CV, n=8 per serie), controlli trattati con 3α-etinil-3β-idrossiandrostan-17-one ossima (C+GAM, n=8 per serie), ratti iperammoniemici trattati con un veicolo (HAV, n=8 per serie), ratti iperammoniemici trattati con 3α-etinil-3β-idrossiandrostan-17-one ossima (HA+GAM, n=8 per serie). Una volta che il trattamento giornaliero con 3α-etinil-3β-idrossiandrostan-17-one ossima a 20 mg/kg o con un veicolo è stato eseguito con iniezioni sottocutanee di 1 ml/kg circa alle ore 9. Il  
25 trattamento è iniziato una settimana dopo aver iniziato con l'ammonio contenente la dieta e continuato per



tutto il periodo sperimentale.

Un articolo di prova di  $3\alpha$ -etininil- $3\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima è stato preparato come una sospensione in olio di sesamo a 20 mg/kg.

Apprendimento spaziale nel labirinto radiale

- 5 Il labirinto radiale è stato progettato come metodo per valutare l'apprendimento spaziale. L'apparecchio è composto da un'area centrale che dà accesso a otto bracci di pari dimensioni. I bracci erano di 70 cm di lunghezza e 10 cm di larghezza e l'area centrale era di 30 cm di diametro. Il labirinto era costituito da Perspex nero ed è stato innalzato a 80 cm al di sopra del pavimento. Ciascun braccio aveva pareti laterali con un'altezza maggiore sul lato prossimale alla zona centrale (30 cm) rispetto al lato distale (5 cm).
- 10 Nell'estremo distale di ciascun braccio, una coppetta incavata è stata installata per posizionare le ricompense in cibo (Hernandez-Rabaza V. et al 2010).

Per abituare i ratti al labirinto, i ratti sono stati lasciati esplorare il labirinto per 10 minuti per due giorni consecutivi in presenza di indizi distali (poster e oggetti di diverse dimensioni), che sono rimasti in posizione per tutto l'addestramento.

- 15 L'addestramento nel labirinto radiale era composto da cinque blocchi di tre prove ciascuno, eseguite per dieci giorni consecutivi. Il compito consisteva nell'individuare quattro pellet, ciascuno posto alla fine di un braccio diverso secondo una configurazione casuale. Le configurazioni erano specifiche per ciascun ratto e sono state mantenute invariate per tutto l'addestramento. Il numero di errori di riferimento spaziale e memoria operativa è stato calcolato ed espresso come numero di errori di riferimento ed operativi per
- 20 blocco. Inoltre, un indice di apprendimento è stato usato per valutare l'apprendimento del compito ed è stato definito come il numero di scelte giuste-errori di riferimento (Hernandez-Rabaza et al.2010).

Risultati

- $3\alpha$ -etininil- $3\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima ha ripristinato l'apprendimento spaziale di ratti iperammoniemici nel labirinto radiale. Ratti iperammoniemici mostrano un minore apprendimento spaziale
- 25 ed effettuano più errori operativi nel compito del labirinto radiale. La memoria spaziale è stata

completamente ripristinata con 3 $\alpha$ -etinil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima (figura 2).

Esempio 3.

Effetto terapeutico di 3 $\alpha$ -etinil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima in un modello animale di encefalopatia epatica

5 Piano di trattamento e prova

Il piano di trattamento e prova era così come esposto nell'esempio 2.

Memoria spaziale nel labirinto acquatico di Morris

Il labirinto è stato progettato come metodo per valutare l'apprendimento spaziale (Morris R. 1984). La prova è stata effettuata usando una piscina circolare nera (160 cm di diametro, 40 cm di altezza) arbitrariamente divisa in quattro quadranti. L'opacità dell'acqua è stata ottenuta aggiungendo vernice nera. Una piattaforma di Plexiglas trasparente, 10 cm di diametro, è stata immersa per 2 cm sotto la superficie dell'acqua al centro di un quadrante durante le sessioni di addestramento (Monfort et al., European Journal of Neuroscience, 2007, 25, 2103-2111).

La prova è stata eseguita come segue; il primo giorno è stato il giorno di pre-addestramento, ratti sono stati posti in acqua due volte per 30 s solo per adattarli all'acqua. In seguito, i ratti sono stati addestrati per apprendere la posizione fissa della piattaforma invisibile per 3 giorni. Ogni prova di addestramento consisteva nel porre il ratto nella piscina rivolto verso la parete in uno dei tre quadranti senza piattaforma. Un diverso punto di partenza è stato usato in modo casuale in ciascuna prova. L'addestramento consisteva in cinque nuotate al giorno. Ciascun animale è stato lasciato per un massimo di 120 s trovare la piattaforma ed è stato lasciato per 15 s sulla piattaforma, se un ratto non riusciva a individuare la piattaforma entro 120 s, veniva guidato manualmente alla piattaforma dallo sperimentatore. Lo scopo di questa prova era quello di far sì che i ratti imparassero dove fosse collocata la piattaforma invisibile e la raggiungessero nel più breve tempo possibile. Il tempo, la velocità e il percorso necessari per trovare la piattaforma nascosta sono stati registrati mediante un sistema di tracciamento video fornito da Viewpoint Company (Viewpoint 2.5, Champagne au Mont D' Or, Francia) e usato come misura di apprendimento del

20

compito. Dopo 15 prove di addestramento, la piattaforma è stata rimossa dalla piscina, i ratti sono stati lasciati nuotare per 90 s nella piscina ed è stato registrato il tempo trascorso nel quadrante dove la piattaforma era stata posizionata durante l'addestramento.

#### Risultati

- 5 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima ha ripristinato completamente la memoria spaziale di ratti iperammoniemici nel labirinto acquatico di Morris. Ratti iperammoniemici hanno mostrato una riduzione della memoria e hanno avuto bisogno di più tempo rispetto a controlli per individuare la piattaforma (figura 3).

#### Esempio 4.

- 10 Effetto terapeutico di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima in un modello animale di encefalopatia epatica

#### Piano di trattamento e prova

Il piano di trattamento e prova era così come esposto nell'esempio 2.

#### Coordinazione motoria nel cammino su trave

- 15 Nella prova di cammino su trave ratti sono addestrati ad attraversare una trave stretta e sopraelevata per raggiungere una piattaforma di fuga circoscritta. La trave è costituita da legno tondo liscio (20 mm di diametro). La trave è sopraelevata di 1 m dal pavimento. I parametri di coordinazione motoria misurati sono: scivolate con le zampe (o errori delle zampe) e latenza per attraversare la trave (Jover et al., 2006; Carter et al., 2010). Per abituare il ratto, lo sperimentatore pone il ratto all'inizio della trave e aiuta il ratto ad  
20 attraversare la trave tre volte. Dopodiché, la prova consiste in tre prove consecutive. Per ciascuna prova è stato registrato il numero di volte in cui la zampa posteriore sinistra o destra è scivolata dalla trave.

#### Risultati

- 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima ha annullato completamente la coordinazione motoria di ratti iperammoniemici nella prova di cammino su trave. Ratti iperammoniemici hanno mostrato coordinazione  
25 motoria (maggiore numero di scivolate = errori delle zampe) (figura 4).



### Esempio 5.

Concentrazioni di  $3\alpha$ -etinil- $3\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima nel plasma e nel tessuto cerebrale dopo somministrazione esogena

#### Ottenimento del plasma

- 5 Il sangue è stato ottenuto dalla coda dei ratti (dall'esempio 2) alla fine della seconda settimana di trattamento con ammoniaca e della prima settimana di trattamento con  $3\alpha$ -etinil- $3\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima e anche dal collo durante il sacrificio degli animali. Per ottenere il plasma sono stati aggiunti 7,5 nM di EDTA e centrifugato a 1500 giri/min per 5 minuti.

#### Determinazione dell'ammoniaca

- 10 La concentrazione di ammoniaca nei campioni di sangue è stata misurata usando il Pocket chem BA (Woodley Equipment Company Ltd, Regno Unito), un analizzatore di ammoniaca. Il dispositivo consente una verifica immediata e fornisce risultati in 3 minuti e 20 s. Elimina anche la necessità di pre-processi quali separazione centrifuga.

#### Sacrificio

- 15 I ratti sono stati sacrificati mediante decapitazione. Una metà del cervello incluso il cervelletto è stato raccolto e conservato a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  per la determinazione di  $3\alpha$ -etinil- $3\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima. Differenti aree del cervello (cervelletto, corteccia, ippocampo e striato) sono state dissezionate e conservate a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  per una possibile determinazione di GAMS.

#### Analisi della concentrazione di $3\alpha$ -etinil- $3\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima

- 20 Campioni di cervello e plasma raccolti sono stati analizzati per concentrazioni di  $3\alpha$ -etinil- $3\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima. Campioni di cervello e plasma sono stati scongelati a temperatura ambiente. Le proteine del plasma sono state fatte precipitare con un volume di 3 volte con acetonitrile e tessuto cerebrale è stato omogeneizzato con un rapporto 1:4 di tessuto:PBS (pH 7,4) e in seguito estratto con un volume di 2 volte di metanolo:acetonitrile (1:1) per 20 min durante una sonicazione. In seguito, i  
25 campioni sono stati agitati e centrifugati per 10 min a  $10.000 \times g$  (centrifuga Heraeus Pico 17). Il



supernatante è stato in seguito diluito con un volume uguale di PBS e analizzato. Alcuni campioni sono stati rianalizzati come diluizioni di 10 volte per via di un'eccessiva concentrazione di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima. Le diluizioni sono state effettuate con una soluzione di acetonitrile al 37,5% in tampone PBS.

5 Standard sono stati preparati correggendo un omogenato di cervello/plasma grezzo nelle concentrazioni 0,5 - 5.000 ng/ml e altrimenti trattati come campioni. La determinazione è stata effettuata con LC-MS.

### Risultati

Determinazione dell'ammoniaca: 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima non influenza i livelli di ammoniaca nel sangue. I livelli di ammoniaca nel sangue sono aumentati in ratti alimentati con la dieta di ammonio (167 $\pm$ 17  $\mu$ M) rispetto a ratti di controllo (47 $\pm$ 3  $\mu$ M). 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima non ha influenzato i livelli di ammoniaca nel sangue in ratti di controllo (55 $\pm$ 7  $\mu$ M) o in ratti iperammoniemici (139 $\pm$ 15  $\mu$ M) (figura 1). Questi risultati sono sorprendenti in quanto tutti i precedenti studi che mostrano un effetto sui sintomi di encefalopatia epatica hanno livelli minori di ammoniaca.

### Determinazione dell'esposizione a 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima

15 Nel presente studio la concentrazione totale di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima nel plasma è stata analizzata il giorno di trattamento cinque e nell'ultima settimana di trattamento con 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima, quattro ore e 23 ore dopo l'iniezione, rispettivamente. Le concentrazioni di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima nel plasma sono mostrate in figura 5 e le concentrazioni nel cervello in figura 6. Al giorno di trattamento cinque le concentrazioni di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima erano inferiori 23 ore dopo l'iniezione rispetto a 4 ore dopo l'iniezione, mentre nell'ultima settimana di trattamento concentrazioni simili di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima sono state riscontrate sia 4 ore, sia 23 ore in entrambi i gruppi, rispettivamente. Nel cervello, concentrazioni simili di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima sono state riscontrate in ratti di controllo (91  $\pm$  4,1 nmol/kg di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima non legata\*) e HA (106  $\pm$  15,4 nmol/kg di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima non legata\*), 1-2 ore dopo l'ultimo trattamento (figura 6). Le

25



concentrazioni hanno mostrato livelli sorprendentemente alti e concentrazioni stabili per tutte le 24 ore.

\*Concentrazione non legata nel cervello = frazione di 3 $\alpha$ -etnil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima nel cervello che non è legata a una proteina trasportatrice o al tessuto cerebrale.

Esempio 6.

5 La capacità di 3 $\alpha$ -etnil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima di antagonizzare l'effetto di THDOC ma non di GABA nel recettore GABA<sub>A</sub>.

Elettrofisiologia voltage-clamp di cellule intere con recettori  $\alpha$ 1 $\beta$ 2 $\gamma$ 2L e  $\alpha$ 5 $\beta$ 3 $\gamma$ 2L GABA<sub>A</sub>

Per misurazioni elettrofisiologiche è stato usato il sistema Dynaflo® con il chip Resolve (Celletricon, Göteborg, Svezia). Cellule HEK-293 sono state trasfettate in modo permanente con vettori incluso il promotore CMV umano per un'espressione costitutiva delle sottounità del recettore GABA<sub>A</sub>  $\alpha$ 5,  $\beta$ 3 e  $\gamma$ 2L degli esseri umani ( $\alpha$ 5 $\beta$ 3 $\gamma$ 2L) o delle sottounità del recettore GABA<sub>A</sub>  $\alpha$ 1,  $\beta$ 2 e  $\gamma$ 2L degli esseri umani ( $\alpha$ 1 $\beta$ 2 $\gamma$ 2L). Le linee cellulari usate sono state selezionate per buona reattività a GABA e a THDOC. Prima delle misurazioni, cellule sono state incubate per 15 min a 37 °C in aria al 95% + CO<sub>2</sub> al 5% in una soluzione extracellulare (EC) contenente quanto segue: 137 mM di NaCl, 5,0 mM di KCl, 1,0 mM di CaCl<sub>2</sub>, 10 mM di MgCl<sub>2</sub>, 10 mM di HEPES e 10 mM di glucosio, 0,1% di DMSO a pH 7,4. Successivamente, cellule staccate sono state aggiunte alla soluzione EC nel bagno di chip Dynaflo.

Registrazioni di voltage-clamp di cellule intere sono state effettuate a temperatura ambiente (21-23°C, -17 mV con compensazione per potenziale di giunzione liquida come in Haage et al., 2002; Neher, 1992). Impulsi di comando sono stati generati e dati raccolti mediante il software PClamp 9.0, il convertitore DigiData 1322A e AxonPatch 200B (Axon Instruments, Foster City, CA). Elettrodi patch (2-6 M $\Omega$ ) sono stati riempiti con una soluzione intracellulare (IC) includente: 140 mM di Cs-gluconato, 3,0 mM di NaCl, 1,2 di mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM di HEPES, 1,0 mM di EGTA, 2 mM di Mg-ATP, 0,1% di DMSO, a pH 7,2.

THDOC e 3 $\alpha$ -etnil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima sono stati disciolti in dimetil solfossido (DMSO) e successivamente diluiti con una soluzione EC in modo da includere lo 0,1% di DMSO.

25 Protocolli diversi sono stati usati per diverse misurazioni elettrofisiologiche. Dal momento che recettori



$\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ -GABA<sub>A</sub> in vivo sono presenti nella sinapsi, è stata usata una condizione che assomiglia a questa situazione, una breve applicazione (40 ms) di una concentrazione elevata di GABA (30  $\mu$ M). Al contrario, recettori  $\alpha 5\beta 3\gamma 2L$ - GABA<sub>A</sub> sono presenti extrasinapticamente, pertanto, le condizioni usate erano lunghe esposizioni (6 s) a una bassa concentrazione di GABA (0,3  $\mu$ M). È stata usata la concentrazione EC<sub>75</sub> di THDOC, vale a dire 100 nM con studi di  $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$  e 200 nM, quando sono state valutate cellule esprimenti  $\alpha 5\beta 3\gamma 2L$ . Con entrambi i tipi di cellule, una pre-esposizione con THDOC o THDOC più 3 $\alpha$ -etnil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima è stata usata prima dell'applicazione di GABA.

Effetti steroidei in presenza di GABA sono stati normalizzati rispetto ai controlli al fine di evitare gli effetti di variazione inter e intracellulare nei parametri di misurazione, ciascuna cellula è stata usata come il suo stesso controllo ed è stata analizzata l'area sotto la curva (AUC, area under the curve).

#### Risultati

Gli effetti di 3 $\alpha$ -etnil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima nel recettore GABA<sub>A</sub> sono stati studiati con misurazioni elettrofisiologiche su varianti umane esprimenti cellule HEK293 ricombinanti del recettore. L'attivazione potenziata da 100 nM di THDOC del recettore  $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$  GABA<sub>A</sub> in presenza di GABA è mostrata in figura 7.

3 $\alpha$ -etnil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima (1  $\mu$ M) antagonizza parzialmente l'effetto di THDOC in entrambe le varianti di sottounità  $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$  e  $\alpha 5\beta 3\gamma 2L$  del recettore GABA<sub>A</sub> (figura 8A e C). Con recettori  $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$  3 $\alpha$ -etnil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima inibisce  $29 \pm 4,7\%$  del potenziamento con THDOC di GABA ( $P < 0,001$ ) e con il recettore  $\alpha 5\beta 3\gamma 2L$  l'inibizione è  $49 \pm 4,7\%$  ( $P < 0,001$ , Tabella 1).

Al contrario, 3 $\alpha$ -etnil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima (1  $\mu$ M) non antagonizza l'attivazione GABA del recettore GABA<sub>A</sub> (figure 8B e D). Non vi è alcun effetto significativo di 3 $\alpha$ -etnil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima nel recettore  $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$  GABA<sub>A</sub> ( $-3,1 \pm 1,7\%$ , NS) o nel recettore  $\alpha 5\beta 3\gamma 2L$  GABA<sub>A</sub> ( $-3,8 \pm 1,5\%$ , NS) quando GABA è l'unico attivatore del recettore (Tabella 1).

Tabella 1. Capacità di 3 $\alpha$ -etnil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima (GAMSA) di antagonizzare THDOC ma non GABA nel recettore GABA<sub>A</sub>.



25

Recettore GABA <sub>A</sub>	[GAMSA] μM	[GABA] μM	[THDOC] nM	Effetto di GAMSA	Valore p
α1β2γ2L	1	30	100	-29 ± 4,7%	< 0,001
	1	30	-	-3,1 ± 1,7%	> 0,05, NS
α5β3γ2L	1	0,3	200	-49 ± 4,7%	< 0,001
	1	0,3	-	-3,8 ± 1,5%	> 0,05, NS

Esempio 7.

Selettività di 3α-etinil-3β-idrossiandrostan-17-one ossima su altri bersagli e recettori.

Il legame di 3α-etinil-3β-idrossiandrostan-17-one ossima è stato determinato per recettori, canali ionici ed enzimi, incluse tutte le classi principali di recettori di neurotrasmettitori. Complessivamente, sono stati testati 113 bersagli in duplicato con 3α-etinil-3β-idrossiandrostan-17-one ossima a 10 μM (Perkin Elmer, Customized screen). L'attività di legame è stata definita superiore o pari al 50% di inibizione di legame di ligando.

Risultati

A 10 μM 3α-etinil-3β-idrossiandrostan-17-one ossima non ha mostrato attività di legame in uno qualsiasi dei relativi recettori dei neurotrasmettitori studiati, recettori di steroidi o recettori di peptidi.

Esempio 8.

Effetto terapeutico di 3α-etinil-3β-idrossiandrostan-17-one ossima sulla coordinazione motoria di ratti con HE e anastomosi porta-cava.

Piano di trattamento e prova

Iperammonemia cronica in ratti. Ratti maschi Wistar (140-160 g) sono stati resi iperammonemici alimentandoli con una dieta contenente acetato di ammonio (30% in peso) (Felipo et al, European Journal of Biochemistry, 1988, 176, 567-571).

Anastomosi porta-cava. Ratti maschi Wistar (220-240 g) sono stati anestetizzati con isoflurano e



un'anastomosi porta-cava end-to-side (fine a lato) come descritto da Lee e Fisher (Surgery, 1961, 50, 668-672). Ratti di controlli sono stati sham-operated; la vena portale e la vena cava inferiore sono state serrate per 10 min.

Nella presente, i ratti che sono stati sottoposti alla procedura di anastomosi porta-cava sono denominati "ratti PCS".

Sono state adottate misure adeguate per minimizzare il dolore e la sofferenza negli animali. Gli esperimenti sono stati approvati dalla Comite de Experimentación y Bienestar Animal (CEBA) del nostro centro e sono stati eseguiti secondo le linee guida della direttiva della Commissione europea (2010/63/EU) e la legislazione spagnola (R.D. 1201/2005) per la cura e la gestione di animali sperimentali.

Trattamento con 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima. 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima in olio di sesamo è stata somministrata mediante iniezioni sottocutanee nella schiena dei rati, una volta al giorno. Due diverse serie di esperimenti sono state effettuate in ratti iperammoniemici. Nella prima serie sono stati usati quattro gruppi di ratti: 1) ratti di controllo iniettati con un veicolo; 2) ratti iperammoniemici iniettati con un veicolo; 3) ratti di controllo iniettati con 20 mg/Kg di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima e 4) ratti iperammoniemici iniettati con 20 mg/Kg di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima.

Ratti di controllo iniettati con 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima non sono stati inclusi successivamente poiché non è stato riscontrato alcun effetto rilevante in questi ratti.

Nella seconda serie sono stati usati cinque gruppi di ratti: 1) ratti di controllo iniettati con un veicolo; 2) ratti iperammoniemici iniettati con un veicolo e 3-5) ratti iperammoniemici iniettati con 3, 10 o 20 mg/Kg di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima. In ciascun esperimento sono stati usati 6-8 ratti per gruppo.

Per gli esperimenti che usano ratti PCS, sono stati usati i seguenti gruppi di ratti: 1) ratti sham iniettati con un veicolo; 2) ratti PCS iniettati con un veicolo; 3-4) ratti PCS iniettati con 0,7 o 2,5 mg/Kg di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima. Il numero di ratti usato in ciascun esperimento è mostrato nella figura corrispondente o fornito nella descrizione della figura corrispondente.

Analisi statistica.

I dati mostrati sono la media  $\pm$  SEM del numero di ratti indicato in ciascuna figura. La significatività statistica è stata stimata con due post-test ANOVA a due vie e di Bonferroni e un test t di Student quando è stato confrontato solo un parametro. Le analisi sono state effettuate usando il GraphPad PRISM per Windows (GraphPad software Inc., La Jolla, CA, USA).

5 Coordinazione motoria. Prova di cammino su trave.

La coordinazione motoria è stata testata come descritto da Gonzalez-Usano et al (ACS Chemical Neuroscience, 2014, 19, 5(2), 100-105) usando una trave di legno (20 mm di diametro). A dei ratti è stato fatto attraversare una trave di legno di un metro di lunghezza collocata approssimativamente a un metro da terra e il numero di errori delle zampe (scivolate) è stato registrato da due osservatori. I ratti sono stati addestrati per la prova facendoli attraversare la trave fino a cinque volte prima che fossero registrate le misurazioni. Il numero di errori delle zampe (scivolate) è una misura della coordinazione motoria.

Risultati

È stato dimostrato che 3 $\alpha$ -etinil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima ripristina la coordinazione motoria per ratti sia iperammoniemici, sia PCS.

15 Ratti iperammoniemici mostrano coordinazione motoria nella prova di cammino su trave, con un numero superiore ( $p < 0,05$ ) di scivolate ( $1,4 \pm 0,1$ ) rispetto a ratti di controllo ( $1,0 \pm 0,1$ ). Il trattamento con 3 $\alpha$ -etinil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima ripristina la coordinazione motoria in ratti iperammoniemici (figura 9A). Gli effetti erano statisticamente significativi per le dosi di 3 mg/kg ( $0,8 \pm 0,1$  scivolate,  $p < 0,05$ ) e 20 mg/kg ( $0,78 \pm 0,07$  scivolate,  $p < 0,05$ ).

20 Ratti PCS mostrano anche coordinazione motoria nella prova di cammino su trave, con un numero superiore ( $p < 0,01$ ) di scivolate ( $1,2 \pm 0,1$ ) rispetto a ratti di controllo sham-operated ( $0,71 \pm 0,07$ ). Trattamento con 3 $\alpha$ -etinil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima ripristina anche la coordinazione motoria in ratti PCS (figura 9B). Il numero di scivolate per la dose di 0,7 mg/kg era  $0,75 \pm 0,10$  ( $p < 0,05$  vs ratti PCS). A 2,5 mg/Kg 3 $\alpha$ -etinil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima ha migliorato anche la coordinazione motoria, ritornando a valori simili a ratti sham ( $0,8 \pm 0,1$  scivolate;  $p$  vs ratti PCS = 0,058) (figura 9B).

25



Esempio 9.

Effetto terapeutico di  $3\alpha$ -etinil- $3\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima sulla memoria spaziale e sull'apprendimento spaziale di ratti con HE e anastomosi porta-cava.

Piano di trattamento e prova

5 Il piano di trattamento e prova era così come esposto nell'esempio 8.

Memoria e apprendimento spaziali nella prova del labirinto acquatico di Morris.

La prova è stata eseguita così come descritto da Monfort et al. (European Journal of Neuroscience, 2007, 25, 2103-2111) usando una piscina circolare (160 cm di diametro, 40 cm di altezza) arbitrariamente divisa in quattro quadranti. Dopo il pre-addestramento, i ratti sono stati addestrati per apprendere la posizione  
10 fissa della piattaforma invisibile per 3 giorni. L'addestramento consisteva nel porre il ratto nella piscina rivolto verso la parete in uno dei tre quadranti senza piattaforma. Un diverso punto di partenza è stato usato in modo casuale in ciascuna prova. L'addestramento consisteva in tre nuotate al giorno. A ciascun animale è stato lasciato un massimo di 120 secondi per trovare la piattaforma ed è stato lasciato per 20 secondi sulla piattaforma. Se un ratto non riusciva a individuare la piattaforma entro 120 secondi, veniva  
15 guidato manualmente alla piattaforma dallo sperimentatore. Il tempo necessario per trovare la piattaforma nascosta è stato registrato manualmente e usato come una misura di apprendimento dell'attività.

La memoria spaziale è stata valutata 24 ore più tardi rimuovendo la piattaforma e misurando il tempo impiegato dal ratto nel quadrante dove era la piattaforma.

Risultati.

20 È stato dimostrato che  $3\alpha$ -etinil- $3\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima ripristina la memoria spaziale nella prova del labirinto acquatico di Morris in ratti iperammoniemici e PCS.

Ratti iperammoniemici hanno mostrato una ridotta memoria spaziale nel labirinto acquatico di Morris. Tutti i gruppi di ratti hanno imparato a trovare la piattaforma e la latenza per raggiungerla è stata ridotta in tre giorni di addestramento (figura 10A). La capacità di apprendimento era lievemente ridotta in ratti  
25 iperammoniemici, che hanno avuto bisogno di più tempo rispetto a quelli di controllo per raggiungere la

piattaforma.

La memoria spaziale è stata significativamente ridotta ( $p < 0,05$ ) in ratti iperammoniemici. Nella prova di memoria ratti iperammoniemici sono rimasti per meno tempo ( $30 \pm 2\%$  del tempo) nel quadrante destro rispetto a ratti di controllo ( $39 \pm 2\%$  del tempo). Trattamento con  $3\alpha$ -etininil- $3\beta$ -idrossiandrostan-17-one

5 ossima ripristina la memoria spaziale nel labirinto acquatico di Morris in ratti iperammoniemici. Le percentuali di tempo trascorso nel quadrante corretto erano  $41 \pm 4$ ,  $42 \pm 5$  e  $38 \pm 3$ , rispettivamente, per dosi di 3, 10 e 20 mg/kg (figura 10B).

Ratti PCS hanno mostrato anche una ridotta memoria spaziale nel labirinto acquatico di Morris. Tutti i gruppi di ratti hanno imparato a trovare la piattaforma e la latenza per raggiungerla è stata ridotta in tre

10 giorni di addestramento (figura 10C). La memoria spaziale è stata significativamente ridotta ( $p < 0,05$ ) in ratti PCS. Nella prova di memoria ratti PCS sono rimasti per meno tempo ( $31 \pm 3\%$  del tempo) nel quadrante destro rispetto a ratti di controllo ( $41 \pm 2\%$  del tempo). Trattamento con  $3\alpha$ -etininil- $3\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima ripristina la memoria spaziale nel labirinto acquatico di Morris in ratti PCS. Le percentuali di tempo trascorso nel quadrante corretto erano  $34 \pm 4$  e  $39 \pm 3$ , rispettivamente, per dosi di 0,7 e 2,5 mg/kg (figura

15 10D).

Esempio 10.

Effetto terapeutico di  $3\alpha$ -etininil- $3\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima sull'apprendimento spaziale di ratti con HE e anastomosi porta-cava.

Piano di trattamento e prova

20 Il piano di trattamento e prova era così come esposto nell'esempio 8.

Apprendimento spaziale nella prova del labirinto radiale.

L'apparecchio era composto da un'area centrale che dava accesso a otto bracci di pari dimensioni. I bracci erano di 70 cm di lunghezza e 10 cm di larghezza e l'area centrale era di 30 cm di diametro. L'estremo distale di ciascun braccio aveva una coppetta contenente ricompense in cibo. Ratti sono stati lasciati

25 esplorare il labirinto per 10 minuti in due giorni consecutivi in presenza di indizi distali per adattarsi al



labirinto. L'addestramento nel labirinto radiale era composto da tre prove al giorno in sei giorni consecutivi.

Il compito consisteva nell'individuare quattro pellet, ciascuno posto alla fine di un braccio diverso secondo una configurazione casuale, come descritto da Hernandez-Rabaza et al. (Addiction Biology, 2010, 15, 413-423). Il numero di errori operativi di memoria (viste a bracci già visitati nella stessa prova) è stato registrato

5 ed espresso come errori operativi.

### Risultati

È stato riscontrato che 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima ripristina l'apprendimento spaziale nella prova del labirinto radiale.

Ratti iperammoniemici mostrano un ridotto apprendimento spaziale nel labirinto radiale. Come mostrato in  
10 figura 11A, il numero di errori operativi era superiore in ratti iperammoniemici rispetto a ratti di controllo nei giorni 1-3. Tutti i gruppi di ratti hanno imparato nel corso dei giorni di addestramento e la differenza tra ratti di controllo e iperammoniemici non era significativa dopo il giorno 3. (figura 11A). Il numero di errori operativi nei giorni 1-2 era superiore ( $p < 0,05$ ) in ratti iperammoniemici ( $18 \pm 3$  errori) rispetto a ratti di controllo ( $11 \pm 1,5$  errori). Ratti iperammoniemici trattati con 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima si  
15 sono comportati come i controlli. Il numero di errori (non significativamente diversi dai controlli) era  $6,5 \pm 2,8$ ,  $8,8 \pm 1,9$  e  $12 \pm 2$ , rispettivamente, per dosi di 3, 10 e 20 mg/kg (figura 11B-C).

Ratti PCS mostrano anche un ridotto apprendimento spaziale nel labirinto radiale. Come mostrato in figura 11C, il numero di errori operativi era superiore in ratti PCS rispetto a ratti sham nei giorni 1 e 2. Tutti i gruppi di ratti hanno imparato nel corso dei giorni di addestramento e la differenza tra ratti sham e PCS non  
20 era significativa dopo il giorno 3. (figura 11C). Il numero di errori operativi nei giorni 1-2 (figura 11D) era superiore ( $p < 0,01$ ) in ratti PCS ( $22 \pm 2$  errori) rispetto a ratti sham ( $10 \pm 2$  errori). Un trattamento di ratti PCS con 0,7 mg/Kg di 3 $\alpha$ -etininil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima non è stato sufficiente per migliorare le prestazioni nel labirinto radiale ( $23 \pm 2$  errori). Il trattamento con 2,5 mg/Kg ha normalizzato completamente le prestazioni di ratti PCS nel labirinto radiale ( $11 \pm 1$  errori,  $p < 0,05$  vs PCS).

25 Esempio 11.



Effetto terapeutico di 3 $\alpha$ -etinil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima sui ritmi circadiani e sull'attività motoria notturna in ratti PCS.

Piano di trattamento e prova

Il piano di trattamento e prova era così come esposto nell'esempio 8.

5 Ritmi circadiani di attività locomotoria spontanea.

L'attività motoria è stata misurata usando un actimetro (Med Associates, S t. Albans, VT). Ratti sono stati posti individualmente in una camera di attività a campo aperto (43 x 43 x 31 cm), e l'attività motoria è stata registrata continuamente per 14 giorni in condizioni di luce-buio (L:D), 12 ore:12 ore. I dati sono stati registrati a intervalli di 5 minuti. L'attività motoria è stata rilevata mediante schiere di rilevatori di movimento di infrarossi, posti in tre direzioni, x, y e z. Un conteggio di ambulatorio è registrato dall'apparecchio quando il ratto interrompe tra rilevatori di infrarossi consecutivi, in una posizione x o y. Un conteggio verticale è registrato quando un ratto interrompe i rilevatori di infrarossi in posizione z. Il software consente di misurare un parametro diverso di attività motoria, come conteggi di ambulatorio o conteggi verticali (Ahabrach et al. Journal of Neuroscience Research, 2010, 88, 1605-14).

15 Risultati.

È stato riscontrato che 3 $\alpha$ -etinil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima aumenta l'attività motoria spontanea durante la notte e ripristina parzialmente il ritmo circadiano di ratti PCS.

Ratti PCS mostrano una ridotta attività motoria (conteggi di ambulatorio) durante la notte (la fase attiva dei ratti) mostrando 1849 $\pm$ 176 conteggi, che è significativamente inferiore ( $p < 0,05$ ) rispetto a in ratti di controllo (4546 $\pm$ 584 conteggi). 3 $\alpha$ -etinil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima a 0,7 mg/kg ha aumentato leggermente ( $p < 0,05$ ) l'attività in ratti PCS a 2652 $\pm$ 275 conteggi. 3 $\alpha$ -etinil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima a 2,5 mg/kg non ha influenzato conteggi di ambulatorio (2235 $\pm$ 170 conteggi di 3 $\alpha$ -etinil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima) (figure 12A e 12C).

Il rapporto tra attività di ambulatorio durante la notte e attività durante il giorno è ridotto in ratti PCS, il che indica un ritmo circadiano alterato (figura 12B). Per i ratti di controlli questo rapporto era 3,3 $\pm$ 0.4 ed è stato



ridotto ( $p < 0,001$ ) in ratti PCS a  $0,8 \pm 0,16$ . Ratti PCS trattati con  $3\alpha$ -etinil- $3\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima hanno mostrato un miglioramento parziale ma significativo ( $p < 0,05$ ) nel rapporto notte/giorno di attività, raggiungendo, rispettivamente,  $1,7 \pm 0,2$  e  $1,6 \pm 0,3$  per 0,7 e 2,5 mg/kg (figura 12B). Questo indica un ripristino parziale di un ritmo circadiano di attività.

5 È stato riscontrato anche che  $3\alpha$ -etinil- $3\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima normalizza l'attività verticale durante il giorno e ripristina parzialmente il ritmo circadiano di ratti PCS.

Ratti PCS hanno mostrato una ridotta attività verticale durante la notte (la fase attiva dei ratti) mostrando  $561 \pm 108$  conteggi, che è significativamente inferiore ( $p < 0,05$ ) rispetto a in ratti di controllo ( $1228 \pm 138$  conteggi).  $3\alpha$ -etinil- $3\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima a 0,7 mg/kg o 2,5 mg/kg non ha influenzato l'attività  
10 verticale durante la notte (rispettivamente,  $664 \pm 121$  e  $695 \pm 185$  conteggi) (figure 12A e 12C).

Al contrario, ratti PCS hanno mostrato una maggiore attività verticale durante il giorno mostrando  $682 \pm 114$  conteggi, che è significativamente ( $p < 0,05$ ) superiore in ratti di controllo ( $391 \pm 64$  conteggi).  $3\alpha$ -etinil- $3\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima a 0,7 mg/kg o 2,5 mg/kg ha normalizzato completamente l'attività verticale durante il giorno, raggiungendo, rispettivamente,  $339 \pm 47$  e  $424 \pm 44$  conteggi. (figure 12A e 12C).

15 Il rapporto tra attività verticale durante la notte e attività durante il giorno era anch'esso ridotto in ratti PCS, il che indica un ritmo circadiano alterato (figura 12B). Per controlli questo rapporto è  $3,7 \pm 0,6$  ed è ridotto ( $p < 0,001$ ) in ratti PCS a  $0,8 \pm 0,01$ . Ratti PCS trattati con  $3\alpha$ -etinil- $3\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima hanno mostrato un miglioramento parziale ma significativo ( $p < 0,01$ ) nel rapporto notte/giorno di attività, raggiungendo, rispettivamente,  $2,1 \pm 0,4$  e  $1,9 \pm 0,6$  per 0,7 e 2,5 mg/kg (figura 12B). Questo indica un  
20 ripristino parziale di un ritmo circadiano di attività verticale.

Esempio 12.

Effetto di un trattamento con  $3\alpha$ -etinil- $3\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima su una concentrazione di ammoniaca nel sangue in ratti iperammoniemici e PCS.

Piano di trattamento e prova

25 Il piano di trattamento e prova era così come esposto nell'esempio 8.



### Determinazione dell'ammoniaca.

L'ammoniaca nel sangue è stata misurata usando il kit di prova Il Ammonia Arkray (PocketChem BA, Arkray) usando 20 µL di sangue fresco seguendo le specificazioni del produttore.

### Risultati

5 È stato dimostrato che 3α-etinil-3β-idrossiandrostan-17-one ossima non influenza i livelli di ammoniaca in ratti iperammoniemici e PCS.

I livelli di ammoniaca nel sangue erano aumentati ( $p < 0,001$ ) in ratti iperammoniemici  $167 \pm 16$  µM rispetto ai controlli ( $47 \pm 3$  µM). Un trattamento con 20 mg/Kg di 3α-etinil-3β-idrossiandrostan-17-one ossima non ha influenzato i livelli di ammoniaca in ratti iperammoniemici ( $139 \pm 14$  µM).

10 Risultati simili sono stati ottenuti in ratti PCS. I livelli di ammoniaca nel sangue erano aumentati ( $p < 0,001$ ) in ratti PCS ( $348 \pm 27$  µM) rispetto a ratti sham ( $125 \pm 31$  µM). Un trattamento con 3α-etinil-3β-idrossiandrostan-17-one ossima non ha influenzato l'ammoniaca nel sangue, che è rimasta a  $302 \pm 30$  e  $294 \pm 37$  µM in ratti PCS trattati, rispettivamente, con 0,7 e 2,5 mg/Kg di 3α-etinil-3β-idrossiandrostan-17-one ossima.

15 Esempio 13.

Concentrazione di 3α-etinil-3β-idrossiandrostan-17-one ossima nel plasma e nel tessuto cerebrale in ratti iperammoniemici e PCS dopo il periodo di trattamento.

### Piano di trattamento e prova

Il piano di trattamento e prova era così come esposto nell'esempio 8.

20 Analisi di 3α-etinil-3β-idrossiandrostan-17-one ossima.

Al termine del periodo di trattamento il plasma è stato raccolto dalla vena della coda e dopo il sacrificio per decapitazione i cervelli sono stati raccolti e immediatamente congelati su ghiaccio secco. Per un'analisi di un'esposizione a 3α-etinil-3β-idrossiandrostan-17-one ossima, il tessuto cerebrale è stato omogenizzato con un rapporto 1:4 di tessuto: PBS (pH 7,4) e in seguito estratto con un volume di 2 volte di metanolo:acetonitrile (1:1), mentre le proteine del plasma sono state fatte precipitare con un volume di 3

25



volte con acetonitrile. Analisi sono state effettuate mediante uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo Waters ACQUITY UPLC + Waters XEVO-TQS (Admescope Oy, Oulu, Finlandia). Per calcoli della quantità di esposizione a 3 $\alpha$ -etnil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima libera nel cervello, la frazione non legata ( $F_{ub}$ ) in omogenati di cervello è stata determinata mediante dialisi,  $F_{ub}$  in HA = 0,70 e  $F_{ub}$  in PCS = 1,43% (Admescope Oy, Oulu, Finlandia).

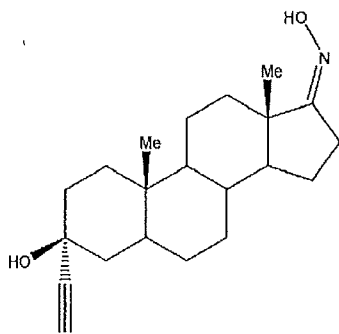
#### Risultati

In ratti iperammoniemici la somministrazione una volta al giorno di 3 $\alpha$ -etnil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima a 3, 10 e 20 mg/Kg ha indotto un'esposizione dose-dipendente sia nel plasma, sia nel tessuto cerebrale. Al momento della prova comportamentale le concentrazioni totali di 3 $\alpha$ -etnil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima nel plasma erano, rispettivamente,  $0,34 \pm 0,03$ ,  $1,08 \pm 0,11$ ,  $1,95 \pm 0,61$   $\mu$ M, e nel tessuto cerebrale le concentrazioni non legate di 3 $\alpha$ -etnil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima erano, rispettivamente,  $6,1 \pm 1,4$ ,  $11,6 \pm 1,4$ ,  $23 \pm 5$  nmol/kg (figura 14A).

Anche in ratti PCS le esposizioni erano dose-dipendenti e con le dosi minori usate in questi ratti, 0,7 e 2,5 mg/Kg, le esposizioni erano molto simili a quelle nei ratti iperammoniemici. Concentrazioni totali nel plasma erano, rispettivamente,  $0,48 \pm 0,09$ , e  $1,64 \pm 0,30$   $\mu$ M, a 0,7 e 2,5 mg/kg/giorno, e concentrazioni non legate nel cervello erano, rispettivamente,  $6,18 \pm 0,97$  e  $17 \pm 2$  nmol/kg, al momento della prova comportamentale.

#### RIVENDICAZIONI

##### 1. Composto 3 $\alpha$ -etnil-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima



o un suo sale farmaceuticamente accettabile, per l'uso nel trattamento dell'encefalopatia epatica.

2. Composto per l'uso secondo la rivendicazione 1, in cui il trattamento comprende la prevenzione dell'encefalopatia epatica.
3. Composto per l'uso secondo la rivendicazione 1 o la rivendicazione 2, in cui detta encefalopatia epatica è l'encefalopatia epatica minima.
- 5 4. Composto per l'uso secondo la rivendicazione 1 o la rivendicazione 2, in cui detta encefalopatia epatica è l'encefalopatia epatica manifesta.
5. Composto per l'uso secondo la rivendicazione 1 o la rivendicazione 2, in cui detta encefalopatia epatica è l'encefalopatia epatica di tipo A.
6. Composto per l'uso secondo la rivendicazione 1 o la rivendicazione 2, in cui detta encefalopatia epatica  
10 è l'encefalopatia epatica di tipo B.
7. Composto per l'uso secondo la rivendicazione 1 o la rivendicazione 2, in cui detta encefalopatia epatica è l'encefalopatia epatica di tipo C.
8. Composto per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7, in cui detto composto è somministrato a un paziente con insufficienza epatica acuta.
- 15 9. Composto per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7, in cui detto composto è somministrato a un paziente con epatopatia cronica con o senza insufficienza epatica acuta su cronica.
10. Composto per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 9, in cui detto composto è fornito prima di, durante o dopo un trapianto di fegato.
11. Composto per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 10, in cui il trattamento  
20 comprende la co-somministrazione di 3 $\alpha$ -etiril-3 $\beta$ -idrossiandrostan-17-one ossima con un composto riduttore dell'ammoniaca.
12. Composto per l'uso secondo la rivendicazione 11, in cui il composto riduttore dell'ammoniaca è selezionato dal gruppo costituito da rifaximina, lattulosio, fenilacetato di ornitina e fenilbutirrato di glicerolo.
13. Composto per l'uso secondo la rivendicazione 11 o la rivendicazione 12, in cui detto composto riduttore  
25 dell'ammoniaca è selezionato dal gruppo costituito da rifaximina e lattulosio.



14. Composto per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 11 a 13, in cui il composto riduttore dell'ammoniaca è rifaximina.

15. Composizione farmaceutica comprendente un composto come definito nella rivendicazione 1, unitamente a trasportatori, eccipienti e/o diluenti farmaceuticamente accettabili, per l'uso come definito in una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 14.

5

#### TRADUZIONE DELLE FIGURE

1/9

Figure 1

Ammonia

Figure 2

% Working errors

Figure 3

Latency

First trial of day 3

2/9

Figure 4

MOTOR IN-COORDINATION

(number of slips)

Figure 5

total [ $3\alpha$ -ethynyl, $3\beta$ -hydroxy,androstan-17-one

oxime]plasma

Control

Day 5

Last week

Day 5

Figura 1

Ammoniaca

Figura 2

% Errori operativi

Figura 3

Latenza

Prima prova del giorno 3

Figura 4

COORDINAZIONE MOTORIA

(numero di scivoloni)

Figura 5

[ $3\alpha$ -etnil,  $3\beta$ -idrossi, androstan-17-one ossima]

totale nel plasma

Controllo

Giorno 5

Ultima settimana

Giorno 5



Last week	Ultima settimana
Figure 6	Figura 6
unbound [3 $\alpha$ -ethynyl,3 $\beta$ -hydroxy,androstan-17-one oxime]brain	[3 $\alpha$ -etinil, 3 $\beta$ -idrossi, androstan-17-one ossima] non legata nel cervello
control	controllo
1-2 h after injection	1-2 ore dopo l'iniezione
3/9	
Figure 7	Figura 7
4/9	
Figure 8	Figura 8
HEK-293 expressing $\alpha$ 1 $\beta$ 2 $\gamma$ 2L	HEK-293 esprimenti $\alpha$ 1 $\beta$ 2 $\gamma$ 2L
HEK-293 expressing $\alpha$ 5 $\beta$ 3 $\gamma$ 2L	HEK-293 esprimenti $\alpha$ 5 $\beta$ 3 $\gamma$ 2L
5/9	
Figure 9	Figura 9
Motor In-coordination	Coordinazione motoria
Figure 10	Figura 10
Latencie	Latenze
Days	Giorni
Memory (percentage of time spent in the correct quadrant)	Memoria (percentuale di tempo trascorso nel quadrante corretto)
6/9	
Figure 11	Figura 11
Working errors	Errori operativi
Days	Giorni
7/9	



## Figure 12

AMB. COUNTS 24 H

Ambulatory counts

Clock hour

Amb. Counts

Ratio Night/Day

Ambulatory counts in 12 hours

Night

Day

8/9

## Figure 13

VERTICAL COUNTS 24 H

Vertical counts

Clock hour

Ratio Night/Day

Vertical counts in 12 hours

Night

Day

9/9

## Figure 14

Hyperammonemia plasma

daily dose

PCS plasma

Hyperammonemia brain

PCS brain

## Figura 12

CONTEGGI AMB. IN 24 ORE

Conteggi di ambulatorio

Ora di orologio

Conteggi di amb.

Rapporto Notte/Giorno

Conteggi di ambulatorio in 12 ore

Notte

Giorno

## Figura 13

CONTEGGI VERTICALI IN 24 ORE

Conteggi verticali

Ora di orologio

Rapporto Notte/Giorno

Conteggi verticali in 12 ore

Notte

Giorno

## Figura 14

Iperammonemia nel plasma

Dose giornaliera

Plasma PCS

Iperammonemia nel cervello

Cervello PCS

Per traduzione conforme.

Ing. Simona INCHINGALO

iscrizione albo USBM-066R

5

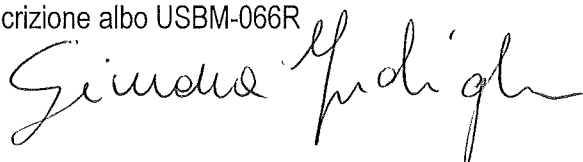
A handwritten signature in black ink, appearing to read "Simona Inchingalo". The signature is written in a cursive style with a large initial "S" and a long, sweeping underline.

Figure 1.

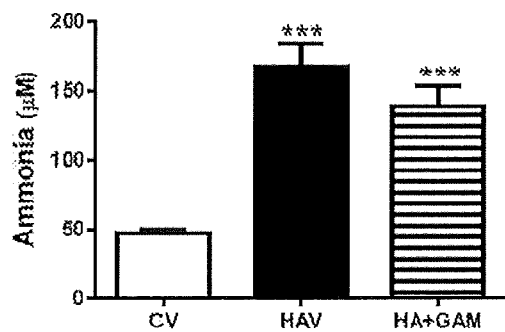


Figure 2.

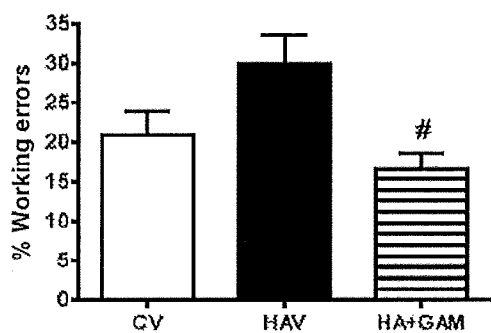
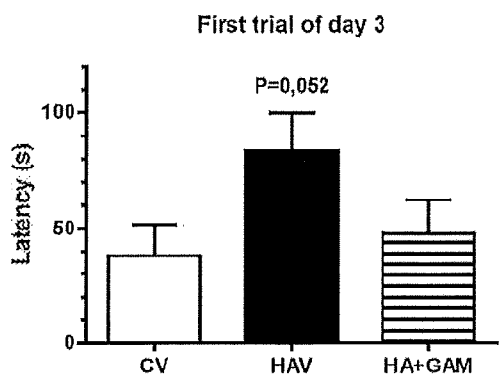


Figure 3.



Simona INCHINGALO

Mandatario abilitato

iscr. al N.USBM CPI 066R

Figure 4.

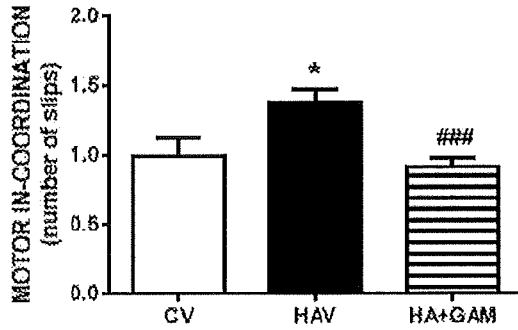


Figure 5.

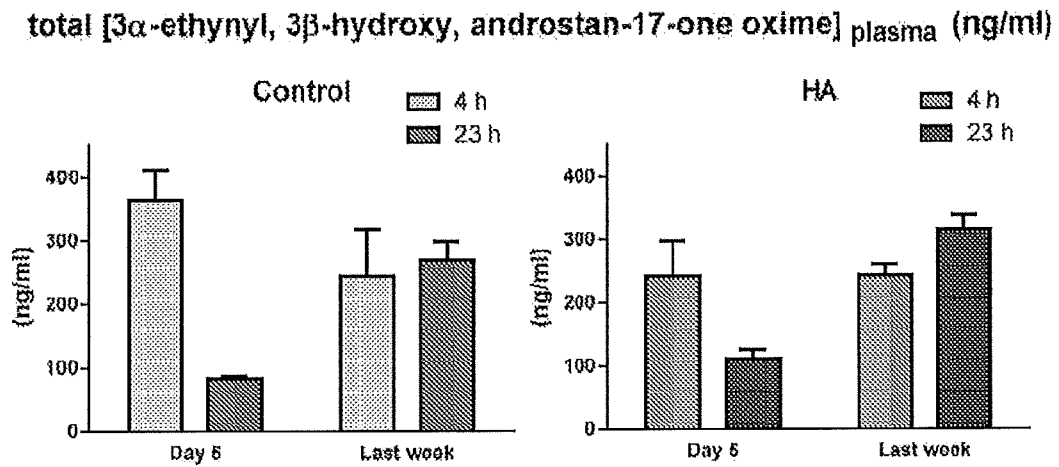
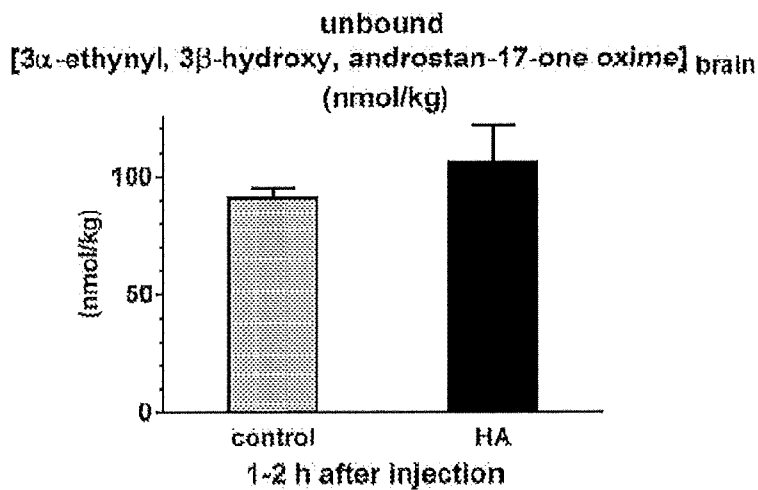
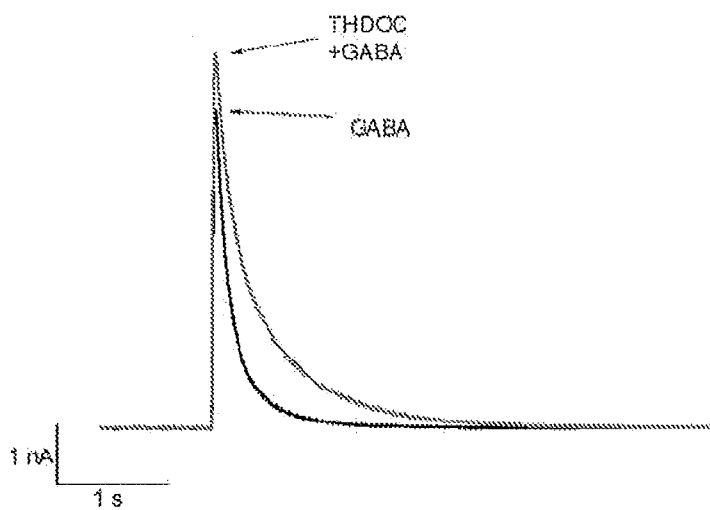


Figure 6.



Simona INCHINGALO  
 Mandataro abilitato  
 iscr. al N.USBM CP 066R  
*Simona Inchingalo*

Figure 7.

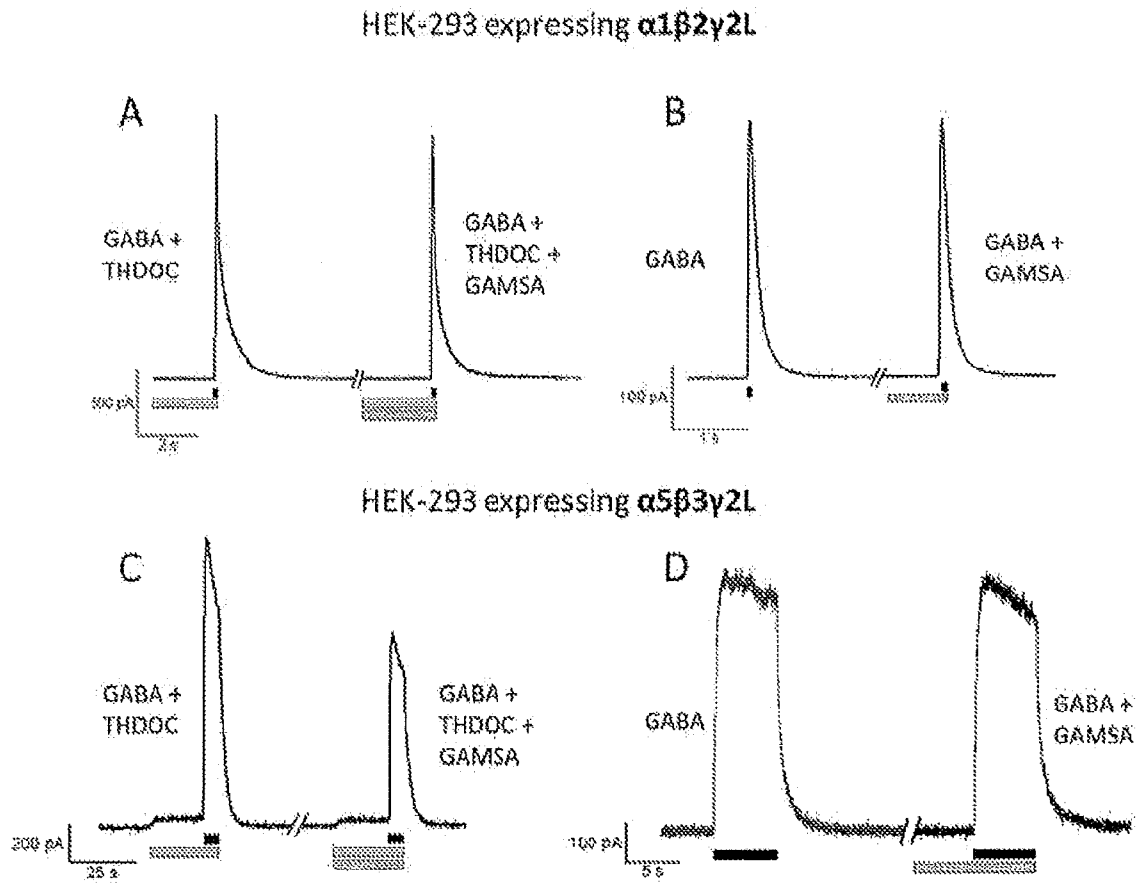


Simona INCHINGALO

Mandatario abilitato

iscr. al N.USBM CPI 056R

Figure 8.



Simona INCHINGALO

Mandatario abilitato

iscr. al N. USBM CPI 0658

Figure 9.

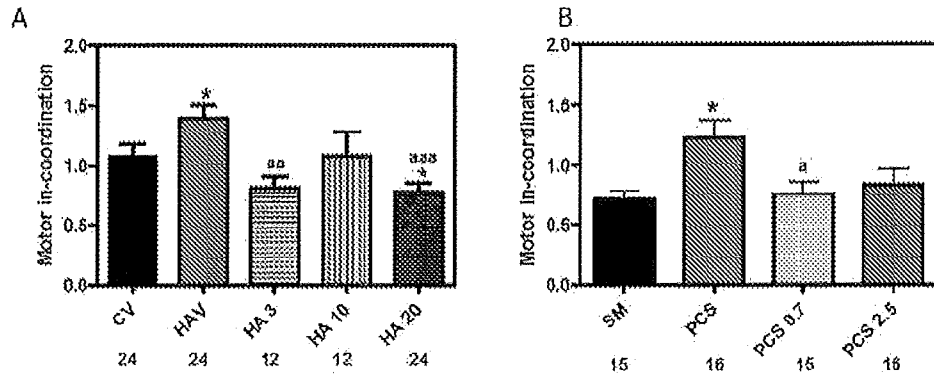
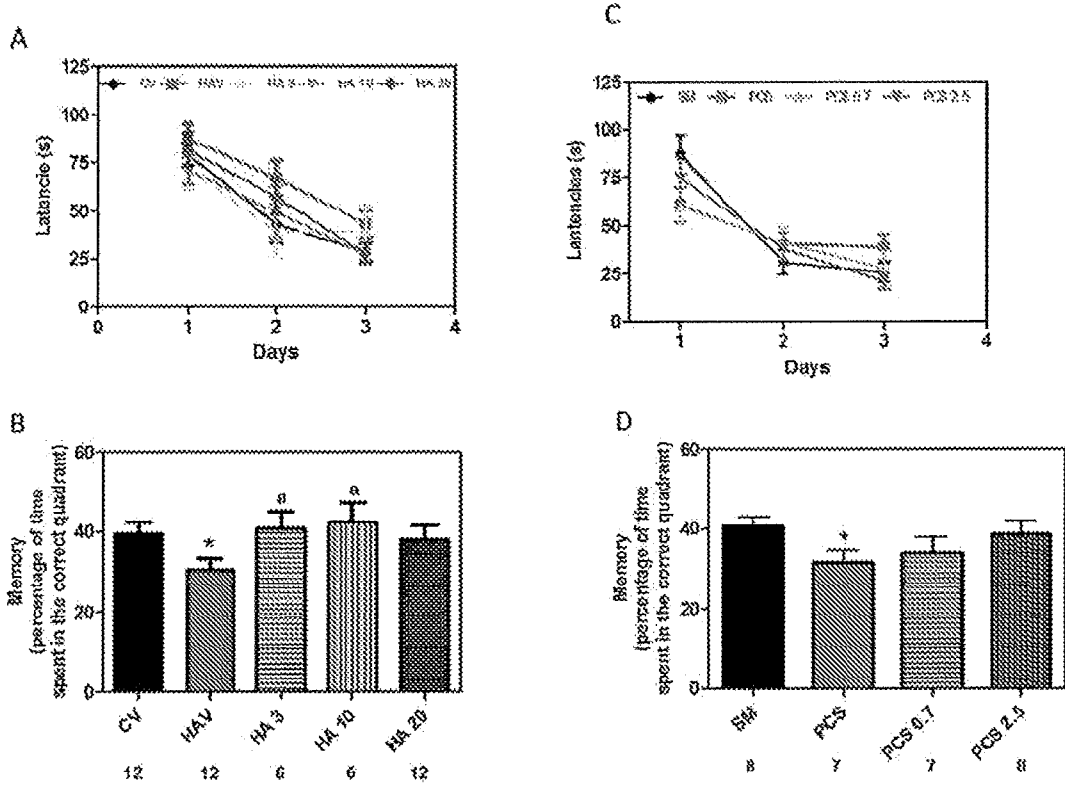


Figure 10.



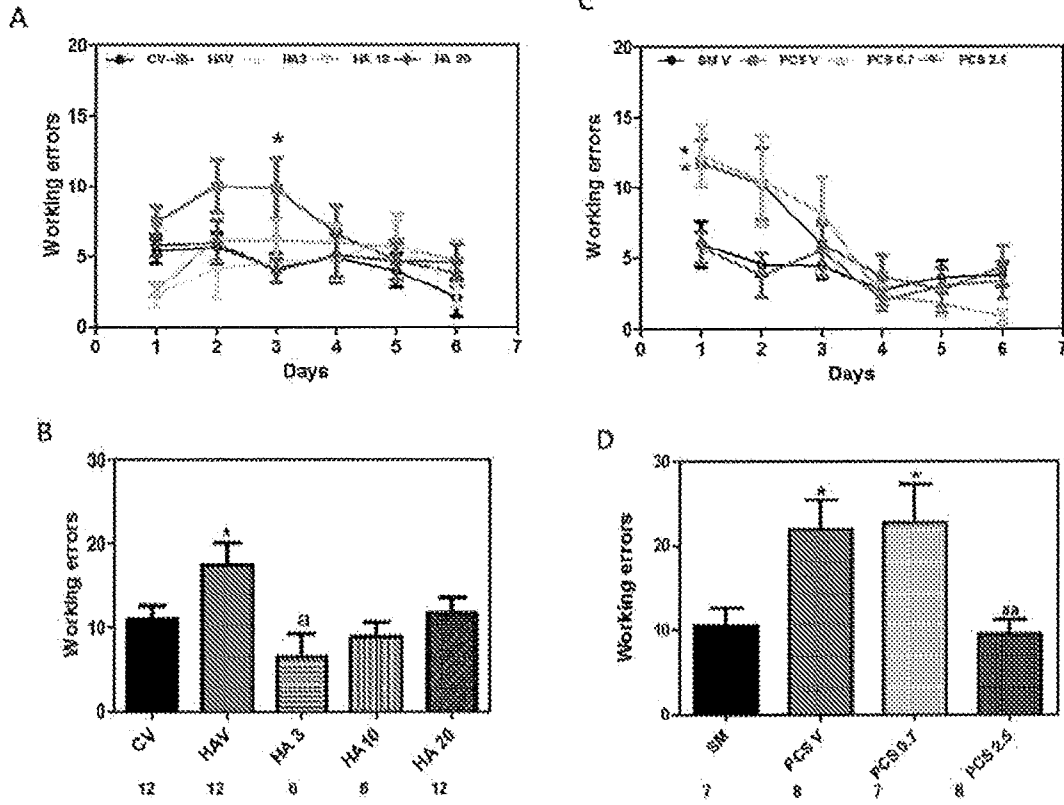
Simona INCHINGALO

Mandatario abilitato

iscr. al N.USBM CPI 066R

*Simona Inchingalo*

Figure 11.

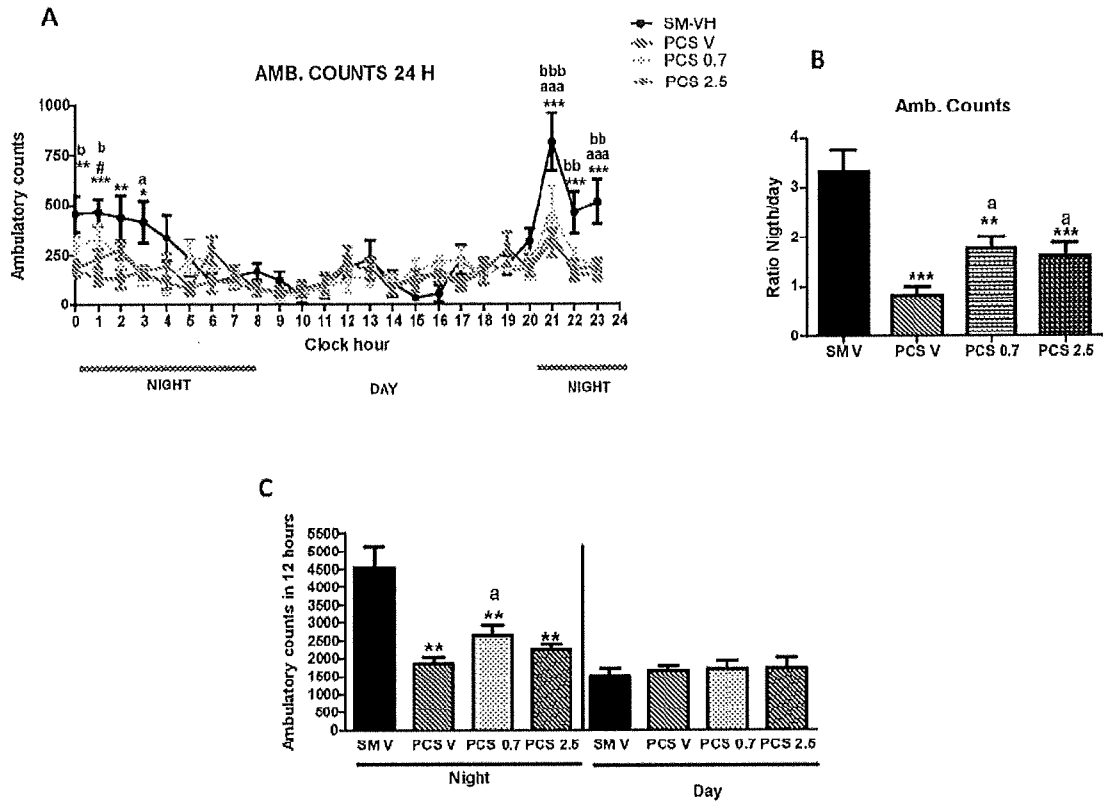


Simona INCHINGALO

Mandatario abilitato

iscr. al N.USBM CPI 066R

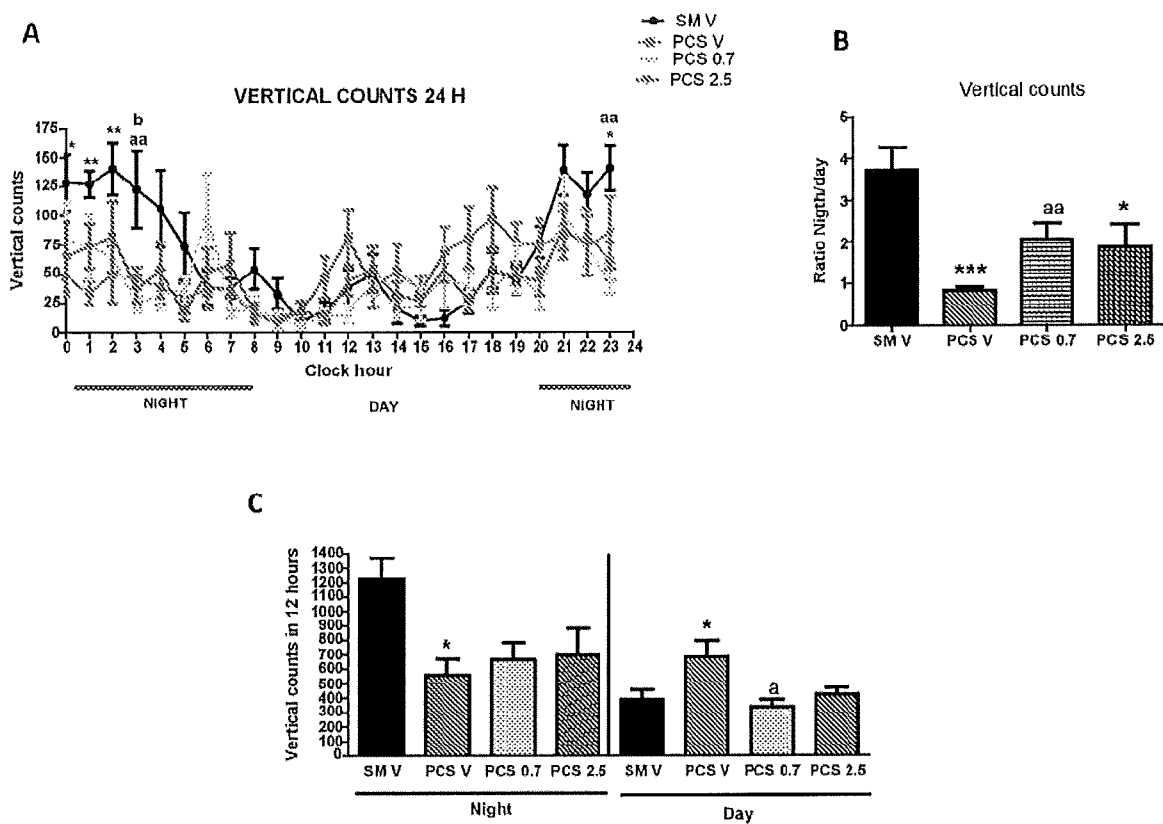
Figure 12.



Simona INCHINGALO

Mandatario abilitato  
 iscr. al N.USBM CPT 066R

Figure 13.



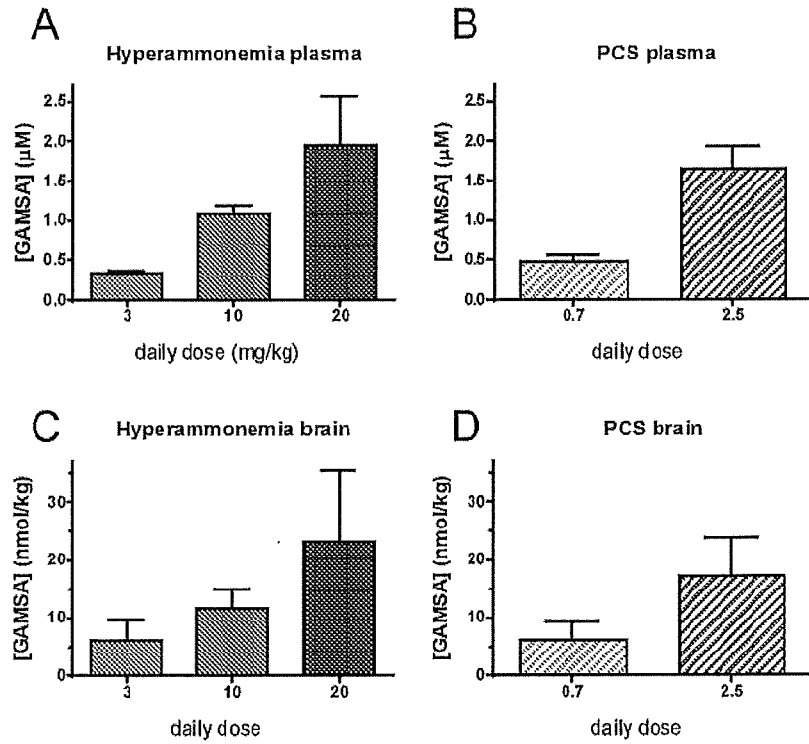
Simona INCHINGALO

Mandatario abilitato

iscr. al N.USBM CPI 066F

*Simone p ch opt*

Figure 14.



Simona INCHINGALO

Mandatario abilitato

iscr. al N.USBM CPI 066R