

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 3319601

DAL TITOLO:

“METODO PER TRATTARE L'ENCEFALOPATIA EPATICA”

*** **

Descrizione

L'encefalopatia epatica (EE), nota anche come encefalopatia portosistemica, è una grave complicazione di insufficienza epatica acuta o cronica.

I pazienti soffrono di varie anomalie neurologiche e neuropsichiatriche (asterissi, confusione, livello alterato di coscienza, coma come risultato di insufficienza epatica).

Durante la cirrosi, l'encefalopatia epatica influenza negativamente la sopravvivenza del paziente. Circa il 30% dei pazienti che muoiono di malattia epatica allo stadio terminale ha una significativa encefalopatia, avvicinandosi al coma.

Di conseguenza, il carico economico dell'encefalopatia epatica è sostanziale, poiché è la seconda ragione più comune per l'ospedalizzazione di pazienti cirrotici negli Stati Uniti.

Le encefalopatie epatiche possono essere suddivise in tipo A, B e C in base alla causa sottostante.

Tipo A (= acuta) descrive l'encefalopatia epatica associata a insufficienza epatica acuta, tipicamente associata a edema cerebrale. L'insufficienza epatica acuta è un rapido deterioramento (entro giorni e settimane) della funzionalità epatica in una persona che non aveva una

malattia epatica preesistente. L'insufficienza epatica acuta è comunemente causata da overdose di paracetamolo (acetamminofene), reazione idiosincratca a terapia (ad esempio tetraciclina, troglitazone), cause autoimmuni, epatite virale (epatite A o B), fegato grasso acuto della gravidanza, o può essere idiopatica.

Tipo B (= bypass) è causato da shunt portale-sistemico senza malattia epatica intrinseca associata. Il sangue quindi bypassa il fegato, che non può metabolizzare e pulire sostanze sanguigne che possono essere tossiche come ammonio. Di tipo B si verifica solitamente come risultato di anomalie congenite e/o come risultato di una procedura o trauma invasivo.

Il tipo C (= cirrosi) si verifica in pazienti con cirrosi. La cirrosi è uno stadio tardivo di malattia epatica cronica quando si sviluppa cicatrizzazione (fibrosi). Le principali cause di cirrosi sono:

- alcolismo cronico
- infezioni virali causate da epatite virale cronica (tipi B, C e D)
- malattie metaboliche come NASH (steatosi epatica non alcolica)
- carenza di alfa-1-antitripsina, disturbi da accumulo di galattosemia e glicogeno
- malattie ereditarie come malattia di Wilson ed emocromatosi
- cirrosi biliare risultante da malattie come colangite biliare

primaria (PBC) e colangite sclerosante primaria (PSC)

- epatite tossica causata da gravi reazioni a farmaci prescritti o esposizione prolungata a tossine ambientali
- ripetuti attacchi di insufficienza cardiaca con congestione epatica.

La EE di Tipo C può essere suddivisa in encefalopatia episodica (ritorno allo stato neurale normale tra episodi), persistente (nessun ritorno allo stato neurale normale) e minima (Bajaj, Alomen Pharmacol Ther. 2010, marzo; 31(5):537-47).

L'encefalopatia minima è un'encefalopatia che non porta a disfunzione cognitiva clinicamente evidente, ma può essere evidenziata usando test neuropsicologici, ed è stato dimostrato che compromette la qualità della vita e che aumenta il rischio di coinvolgimento negli incidenti stradali nel traffico.

L'EE minima può influenzare il 30-70 % di pazienti con cirrosi; l'EE evidente (episodica o persistente) è osservata nel 30-45 % dei pazienti con cirrosi durante la loro vita.

Va notato che EE, anche minima, è un rischio indipendente di mortalità.

La fisiopatologia dell'encefalopatia epatica viene ancora discussa ma vengono studiate molte ipotesi. L'ammoniaca può avere un ruolo chiave centrale, insieme ad infiammazione sistemica e cambiamenti in specifici trasportatori sulla barriera ematoencefalica. L'encefalopatia epatica potrebbe essere una conseguenza

dell'accumulo nel flusso sanguigno di sostanze tossiche, in particolare ammoniacca, che sono normalmente pulite dal fegato. L'ammoniemia non è sufficiente per indurre EE. Si ipotizza che una combinazione sia di ammoniacca nel sangue che infiammazione aumentata sia necessaria affinché l'EE avvenga, in particolare mediante una modifica della barriera ematoencefalica che porta all'accumulo intracerebrale di sostanze tossiche e alla modulazione della neurotrasmissione.

Trattamenti di encefalopatia epatica

Le terapie attuali più specifiche sono progettate per diminuire la produzione di ammoniacca intestinale e l'iperammoniemia risultante.

Durante l'encefalopatia epatica acuta, il lattulosio (beta-galattosidofruztosio) o lattilolo (beta-galattosidosorbitolo) sono forniti ai pazienti per accelerare il transito e inibire la produzione di ammoniacca intestinale. Questi sono disaccaridi non assorbibili che sono degradati da batteri intestinali ad acido lattico e altri acidi organici. Lattulosio è somministrato a pazienti a una dose di 30 ml per via orale, una o due volte al giorno, e la dose può essere aumentata, o ridotta, a seconda della tolleranza o dell'effetto avverso osservato nei pazienti.

Dosi più elevate di lattulosio (60 mL ogni otto ore) possono essere somministrate a pazienti con grave encefalopatia epatica. Lattulosio è dato dopo il primo episodio di encefalopatia epatica per prevenire recidiva.

Vengono usati anche vari antibiotici, al fine di diminuire il carico batterico ammoniagenico. Gli antibiotici sono generalmente usati se il

trattamento con lattulosio non è sufficientemente efficace e nella prevenzione secondaria.

Si può usare neomicina, metronidazolo, rifaximina, vancomicina orale, paromomicina, e chinoloni orali. Rifaximina un derivato non assorbibile di rifampina con un'attività antibatterica ad ampio spettro. Può ridurre l'endotossemia, inclusa l'iperammoniemia, riducendo la traslocazione intestinale dei batteri. Usata in numerose studi clinici, l'effetto di rifaximina era equivalente o superiore agli agenti confrontati con buona tollerabilità. La posologia raccomandata è 550 mg due volte al giorno. Recentemente, le terapie usate per il trattamento di errori congeniti di metabolismo dell'urea iniziano ad essere usate in pazienti con encefalopatia epatica, ma non sono ancora formalmente raccomandate. Queste includono:

- Un sale stabile di 2 amminoacidi costituenti, L-ornitina e L-aspartato (LOLA), può anche essere usato per aumentare la clearance di ammoniaca. Può essere combinato con lattulosio e/o rifaximina.
- Benzoato di sodio, fenilbutirrato di sodio, fenilacetato di sodio e glicerolo fenilbutirrato possono anche essere usati per il trattamento dell'encefalopatia epatica. Le dosi orali di benzoato di sodio sono circa 5 g due volte al giorno, sebbene dosi inferiori (2,5 g tre volte a settimana) possano anche aiutare i pazienti a recuperare dai sintomi dell'encefalopatia epatica. Glicerolo fenilbutirrato può essere usato a una dose orale di 6 ml due volte al giorno.

L'intervento nutrizionale è necessario in caso di malnutrizione o

assunzione alimentare insufficiente. Mangiare proteine vegetali piuttosto che proteine derivate da carne rossa, e proteine di pollo e pesce può essere favorevole. Si consiglia anche di integrare la dieta con amminoacidi a catena ramificata. Può essere usata anche la somministrazione dello zinco, con il potenziale di migliorare l'iperammoniemia, con solfato di zinco e acetato di zinco che può essere somministrato a una dose di 600 mg per via orale ogni giorno. L-carnitina è usata anche per migliorare sintomi dell'encefalopatia epatica, in particolare nei pazienti con cirrosi.

WO 2011/124571 descrive l'uso di biotina a una dose elevata (nell'intervallo da 100 a 600 mg/giorno) per il trattamento di compromissioni visive, in particolare correlate all'atrofia ottica. Occorre notare che le compromissioni visive effettivamente descritte in questa domanda sono sintomi correlati a una particolare leucoencefalopatia, cioè un coinvolgimento della materia bianca del cervello. Questo documento non descrive né suggerisce che la biotina possa essere usata per il trattamento di EE.

WO 2014/016003 descrive l'uso di biotina a una dose elevata (dell'ordine da 100 a 600 mg/giorno) per il trattamento di sclerosi multipla (SM), ictus e adrenoleucodistrofia (X-ALD), in particolare adrenomieloneuropatia (AMN). WO 2014/177286 fornisce la prova che la biotina è utile per il trattamento di AMN.

WO2016151132 fornisce la prova che la biotina è utile per trattare la sclerosi laterale amiotrofica (SLA).

Nagamine et al (J Gastroenterol. giugno 1995;30(3):351-5; e Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi. luglio 1989; 86(7): 1519-24) e in JPH01226814A hanno indotto iperammonemia acuta nei ratti somministrando ureasi o acetato di ammonio. In un altro modello, insufficienza epatica acuta è stata indotta iniettando una singola dose elevata di CCl₄. Gli autori hanno osservato una capacità della biotina di diminuire il livello di ammonio sierico in questo modello di insufficienza epatica acuta negli animali. La quantità di biotina quando somministrata non è stata controllata quando somministrata per via orale ed era di 0,5 mg/kg BW (peso corporeo) quando un singolo dosaggio è stato iniettato per via intraperitoneale (Nagamine, 1989). In Nagamine (1995), la dose di biotina (fornita come singola iniezione intraperitoneale) è anch'essa molto bassa.

In JPH01226814A, la biotina è fornita come una singola iniezione intraperitoneale di 1 mg di biotina. I risultati sono riportati per l'essere umano, con dosi usate al suo interno nell'intervallo di pochi mg (circa 5-10 mg) al giorno. I risultati riportati per i pazienti non sono tuttavia conclusivi. Infatti, vi è un'elevata variabilità naturale dello stato generale e del livello di ammoniaca nel siero di pazienti con EE. Le Tabelle 7 e 8 segnalano solamente i dati ottenuti per 10 giorni, senza alcun controllo o informazione su altri trattamenti che i pazienti hanno ricevuto. Dal paziente 2 si può osservare che vi è un'elevata variabilità nel livello di ammoniaca (aumento e diminuzione) per i primi 5 giorni, anche se questo paziente non ha ricevuto alcuna biotina durante

questo periodo di tempo. È vero anche per il paziente 3, dove il livello di ammoniaca era ben diminuito tra i giorni 48 e 96 benché non fosse stata somministrata biotina al paziente in questo periodo di tempo. Non vi è quindi alcuna possibilità di raggiungere una conclusione sul ruolo effettivo della biotina sui livelli di ammoniaca e per il controllo di EE in questi pazienti.

Va inoltre notato che nonostante i risultati riportati al loro interno più di 20 anni fa, nessun farmaco basato sulla biotina è stato sviluppato o proposto sul mercato per trattare o prevenire l'encefalopatia epatica.

In particolare, una rassegna di Bajaj (2010, Aliment Pharmacol Ther 31, 537-547) non menziona biotina come prodotto che è o può essere usato per il trattamento dell'encefalopatia epatica di tipo C.

Nel contesto della presente invenzione, si propone di usare biotina, a una dose molto più elevata (quantità giornaliera di almeno 200 mg), al fine di migliorare la condizione di pazienti affetti da encefalopatia epatica di tipo C.

Il fatto che biotina a una dose elevata (una dose più elevata rispetto a quella presentata nell'arte antecedente) possa essere utile per il trattamento dell'encefalopatia epatica di tipo C e potrebbe infine limitare l'evoluzione della malattia, e anche invertire alcuni dei suoi sintomi è particolarmente nuovo e sorprendente.

L'invenzione riguarda pertanto biotina per il suo uso nel trattamento o nella prevenzione dell'encefalopatia epatica di tipo C, in cui la biotina viene usata con una dose elevata, vale a dire almeno 200

mg al giorno.

Anche i soggetti dell'invenzione sono composizioni contenenti biotina per il loro uso nel trattamento dell'encefalopatia epatica di tipo C, e anche l'uso di biotina per la produzione o la produzione di un farmaco destinato al trattamento dell'encefalopatia epatica di tipo C. In particolare, il farmaco deve contenere più di 20 mg, più preferibilmente più di 40 mg, più preferibilmente più di 50 mg, più preferibilmente più di 70 mg, più preferibilmente circa o esattamente 100 mg di biotina, in particolare quando usato mediante somministrazione orale.

Gli insegnamenti dell'invenzione rendono quindi possibile implementare metodi di trattamento comprendenti la somministrazione di biotina a pazienti affetti da encefalopatia epatica di tipo C. La presente descrizione divulga un metodo per trattare un paziente affetto da encefalopatia epatica di tipo C, comprendente la fase di somministrazione di biotina a detto paziente. Esempi di dosaggio di biotina e regime di trattamento sono divulgati di seguito.

La biotina può essere usata da sola o in combinazione con un altro composto usato per trattare l'encefalopatia epatica di tipo C (o suoi sintomi).

L'invenzione copre pertanto una composizione contenente biotina e anche un altro medicinale, come elencato sopra, contro l'encefalopatia epatica di tipo C, per l'uso simultaneo, separato o sequenziale (ripartito nel tempo) nel trattamento di un'encefalopatia epatica di tipo C.

La descrizione descrive anche un metodo di trattamento di un paziente affetto da encefalopatia epatica di tipo C, comprendente le fasi di fornitura di biotina a detto paziente, e facoltativamente (ma preferibilmente) un altro farmaco utile per fornire sollievo a detti pazienti per quanto riguarda i sintomi dell'encefalopatia epatica di tipo C.

La biotina può, in particolare, essere usata per migliorare la velocità di elaborazione cognitiva e psicomotoria, la memoria e il controllo motorio e la coordinazione.

Il trattamento con biotina può anche portare ad aumentare il peso del paziente.

La biotina è quindi usata per trattare l'encefalopatia epatica di tipo C, sia persistente, episodica o minima. Tuttavia, la domanda divulga anche, ma non rivendica l'uso di biotina in paziente con l'encefalopatia epatica di tipo A o di tipo B per diminuire i sintomi prima che la situazione torni a normalizzarsi. La somministrazione di biotina a pazienti di tipo A permetterebbe a questi pazienti di attendere un tempo più lungo prima di ricevere un trapianto di fegato e/o di essere in condizione migliore quando lo si riceve.

La biotina può anche essere usata per prevenire episodi di encefalopatia epatica di tipo C. In particolare tale prevenzione è utile in pazienti con cirrosi diagnosticata, sia che abbiano già presentato un episodio di EE (vale a dire che abbiano un EE episodica o persistente) o sia che non abbiano ricevuto diagnosi di EE (essi non hanno presentato alcun episodio di sintomi di EE, o nessun segno clinico di

EE), e quindi hanno una EE minima o non hanno EE.

La biotina a una dose elevata è particolarmente interessante per prevenire episodi secondari di EE, in pazienti che hanno già presentato un episodio di EE.

Per il trattamento dell'encefalopatia epatica di tipo C, o la preparazione di un farmaco destinato al trattamento dell'encefalopatia epatica di tipo C, la biotina può essere usata come segue. La biotina è preferibilmente somministrata a una quantità terapeuticamente efficace, che è generalmente una dose elevata, vale a dire a una dose di almeno o circa o esattamente 200 mg al giorno. Anche se una dose massima non è realmente prevista, quest'ultima non dovrebbe generalmente superare 500 mg, 600 mg o 700 mg al giorno. Ciò rende possibile osservare un miglioramento nella condizione del paziente, e/o arrestare o diminuire il peggioramento della condizione del paziente.

In tal modo, il medico può determinare la dose secondo il peso del paziente. In particolare, una dose almeno pari a 3 mg/kg/giorno, preferibilmente 5 mg/kg/giorno, o almeno pari a 7,5 mg/kg/giorno, o anche circa 10 mg/kg/giorno, è somministrata al paziente.

Tra 200 e 700 mg di biotina al giorno sono quindi preferibilmente somministrati ai pazienti, generalmente tra 200 e 500 mg al giorno, o tra 200 e 600 mg al giorno, più preferibilmente tra 200 e 300 mg al giorno, generalmente attorno o esattamente 300 mg al giorno. Si può quindi somministrare almeno o circa o esattamente 200 mg al giorno, o almeno o circa o esattamente 250 mg al giorno, o

almeno o circa o esattamente 300 mg al giorno.

In una particolare forma di realizzazione che è preferita (in particolare per problemi di facilità d'uso da parte del paziente), la biotina è in una forma adatta per la somministrazione orale. Questo comporta pertanto una composizione per somministrazione orale, che conterrà almeno o circa 20 mg, preferibilmente almeno o circa o esattamente 40 mg di biotina, o anche almeno o circa o esattamente 50 mg, almeno o circa o esattamente 75 mg, almeno o circa o esattamente 100 mg, almeno o circa o esattamente 150 mg o almeno o circa o esattamente 250 di biotina, o almeno o circa o esattamente 300 mg di biotina. Questa composizione è preferibilmente per uso farmaceutico ed è pertanto una medicina. Resta inteso che ciascuna dose unitaria di questa composizione contiene almeno o circa 20 mg, preferibilmente almeno o circa o esattamente 40 mg, o anche almeno o circa o esattamente 50 mg, almeno o circa o esattamente 100 mg, almeno o circa o esattamente 150 mg o almeno o circa o esattamente 250 mg di biotina o circa o esattamente 300 mg di biotina, come principio attivo.

La dose totale di biotina può essere somministrata una volta al giorno, o attraverso molteplici assunzioni. In particolare, la biotina può essere assunta attraverso due o tre assunzioni al giorno. È preferito quando la biotina è assunta attorno ai tempi dei pasti, e quando la quantità di biotina è sostanzialmente uguale per ciascuna assunzione.

Va notato che la malattia descritta nel presente documento è una malattia cronica, con peggioramento nel tempo. È quindi preferibile

che il trattamento con biotina sia eseguito nel lungo periodo, al fine di essere il più efficace possibile, per prevenire l'insorgenza di nuovi episodi EE e stabilizzare qualsiasi miglioramento che porterà. Di conseguenza, si preferisce quando detto trattamento con biotina ha una durata di almeno 3 mesi. È addirittura preferito quando detto trattamento con biotina ha una durata di almeno 6 mesi. Come indicato, tale trattamento può essere esteso il più a lungo possibile al fine di prevenire l'insorgenza di nuovi episodi EE, aumentare il miglioramento che potrebbe portare la biotina e stabilizzare gli effetti terapeutici. In particolare, detto trattamento con biotina ha una durata di almeno un anno. Non vi è alcun termine previsto per il trattamento e ci si attende che il paziente prenda biotina fintantoché è necessario e stabilizzerà o migliorerà la condizione del paziente.

In una particolare forma di realizzazione, questa composizione per somministrazione orale contiene biotina come unico principio attivo, e anche eccipienti, senza alcun altro principio attivo.

Un eccipiente deve essere inteso significare qualsiasi composto che fa parte della formulazione che è destinata ad agire come semplice supporto, vale a dire che non intende avere un'attività biologica.

Questa composizione può essere in qualsiasi forma nota nell'arte. In particolare, è sotto forma di capsule di gel, compresse (facoltativamente rivestite con film), pillole o pastiglie da sciogliere in bocca. In un'altra forma di realizzazione, è sotto forma di uno sciroppo. Detto sciroppo contiene una quantità tale da contenere almeno o circa

o esattamente 20 mg, preferibilmente almeno o circa o esattamente 40 mg, o anche almeno o circa o esattamente 50 mg, almeno o circa o esattamente 75 mg o almeno o circa 100 mg di biotina per dose unitaria. La concentrazione di biotina in questo sciroppo dipende dalla dose unitaria che si desidera dare al paziente.

Eccipienti che possono essere usati dai tecnici del ramo sono ben noti nell'arte. Talco (E553b), cellulosa microcristallina, lattosio, mannosio, amido (in particolare amido di mais), stearato di magnesio (E572) e acido stearico (E570) possono quindi essere scelti. Questo elenco non è esaustivo.

Quando questa composizione è preparata sotto forma di capsule di gel, un eccipiente preferito è cellulosa microcristallina.

Quando la composizione è sotto forma di una compressa rivestita con film, detto rivestimento con film può essere formato da qualsiasi sostanza nota nell'arte, come ipromellosa (E464), etilcellulosa, macrogol, talco (E553b), biossido di titanio (E171) o ossido di ferro (E172).

Il principio attivo può anche essere colorato (mediante qualsiasi colorazione accettabile, come cocciniglia), rendendo così possibile verificare che la biotina sia ben dispersa nell'eccipiente.

Una forma a rilascio lento (o lenta prolungata) può anche essere prevista dato che l'emivita plasmatica della biotina è breve (circa 2 ore).

Dette composizioni a lento rilascio sono note nell'arte e

descritte in particolare in WO 2011/077239. In particolare, dette composizioni a lento rilascio possono comprendere una matrice a lento rilascio comprendente biotina da sola o con uno o più principi attivi.

In una forma di realizzazione specifica, la composizione a rilascio lento comprende una matrice che permette il rilascio immediato, in cui detta matrice comprende biotina da sola o con uno o più altri principi attivi e il rilascio lento è ottenuto mediante una matrice o rivestimento di modifica del rilascio.

Pertanto, la composizione a rilascio lento può fornire rilascio immediato e rilascio differito (lento) di biotina.

In una forma di realizzazione specifica, il rilascio lento può essere ottenuto attraverso un sistema di rilascio azionato osmoticamente.

In un'altra forma di realizzazione, la composizione a rilascio lento comprende un nucleo comprendente biotina, facoltativamente uno o più principi attivi, e facoltativamente uno più eccipienti farmaceutici e uno o più strati esterni, in cui gli strati esterni comprendono uno o più agenti a rilascio lento.

In un altro aspetto, la biotina può essere nella forma che consente la somministrazione mediante iniezione: questo comporta quindi una composizione iniettabile contenente almeno o circa o esattamente 20 mg, preferibilmente almeno o circa o esattamente 40 mg, o anche almeno o circa o esattamente 50 mg, almeno o circa o esattamente 75 mg, almeno o circa o esattamente 100 mg, almeno o

circa o esattamente 150 mg o almeno circa o esattamente 250 mg di biotina per dose unitaria.

Questa composizione iniettabile può essere sotto forma di una fiala contenente la biotina, e anche eccipienti accettabili. La concentrazione di biotina è regolata secondo il volume previsto della fiala. Alcuni eccipienti che migliorano la solubilità della biotina possono essere usati.

Gli eccipienti che possono essere usati per la produzione di composizioni iniettabili sono ben noti nell'arte. Si possono menzionare in particolare diidrogenofosfato di sodio, bicarbonato di sodio (E550i), metil para-idrossibenzoato (E218) e propil para-idrossibenzoato (E216), che possono essere usati insieme in proporzioni che i tecnici del ramo sono in grado di determinare. L'acqua usata è acqua per iniezione. L'iniezione è preferibilmente eseguita per via intramuscolare. Può anche essere eseguita per via endovenosa.

Descrizione delle figure

Figura 1: livelli di ASAT (A), ALAT (B), bilirubina (C) e albumina (D) nel siero di ratti di controllo (sham) o con legatura dei dotti biliari (BDL).

Figura 2: analisi comportamentale di 6 minuti di ratti di controllo e con BDL senza o con un'acqua arricchita di NH₃. A. Distanza totale; B. velocità media; C. durata dell'attività (tempo durante il quale l'animale è attivo anziché passivo); D. numero di variazioni della zona; E. numero di sollevamenti sulle zampe posteriori; F. durata totale di

sollevamenti sulle zampe posteriori.

Figura 3: ammoniemia ematica in ratti di controllo (sham) o con BDL (A) o in ratti iniettati con olio (ratti di controllo) o CCl₄ (B).

Figura 4: livelli di ASAT (A), ALAT (B), bilirubina (C) e albumina (D) nel siero di ratti di controllo (olio) o ratti iniettati con CCl₄.

Figura 5: analisi comportamentale di 6 minuti di ratti di controllo (olio) e ratti iniettati con CCl₄. A. Distanza totale; B. velocità media; C. durata dell'attività (tempo durante il quale l'animale è attivo anziché passivo); D. numero di variazioni della zona; E. numero di sollevamenti sulle zampe posteriori; F. durata totale di sollevamenti sulle zampe posteriori.

Figura 6: ammoniemia ematica in ratti di controllo o con BDL alimentati con placebo o con biotina alimentati con biotina (300 mg/kg in alimenti, corrispondenti a una dose giornaliera di 30 mg/kg BW/giorno in ratti o 300 mg/giorno negli esseri umani).

Figura 7: analisi comportamentale di 6 minuti di ratti di controllo (sham) o con BDL, con una dieta senza o con biotina (dose corrispondente a 300 mg in un essere umano). A. Distanza totale; B. velocità media; C. durata dell'attività (tempo durante il quale l'animale è attivo anziché passivo); D. numero di variazioni della zona; E. numero di sollevamenti sulle zampe posteriori.

Figura 8: analisi comportamentale di 6 minuti di ratti di controllo e con BDL senza o con una biotina arricchita di mangime (2 dosaggi corrispondenti alla dose giornaliera di 50 mg o 300 mg in uomo). A.

Distanza totale; B. velocità media; C. durata dell'attività (tempo durante il quale l'animale è attivo anziché passivo); D. numero di variazioni della zona; E. numero di sollevamenti sulle zampe posteriori.

Figura 9: permeabilità di barriera ematoencefalica osservata mediante penetrazione nel SNC di todestrano accoppiato a Texas Red. A. ratti di controllo e con BDL senza o con acqua arricchita di NH₃. B. ratti di controllo (olio) e ratti iniettati con CCl₄ senza o con una dieta arricchita di NH₃.

Figura 10: permeabilità di barriera ematoencefalica osservata mediante penetrazione nel SNC di Texas Red accoppiato a destrano. A. ratti di controllo e con BDL senza o con una dieta arricchita di biotina (300 mg/kg di alimento). B. ratti di controllo (olio) e ratti iniettati con CCl₄ senza o con una dieta arricchita di biotina (50 mg/kg di alimento).

Figura 11: Misurazione di IFN gamma (A) o TNF alfa (B) sierico in animali di controllo, animali con BDL e animali con CCl₄ con o senza acqua arricchita con NH₃. EE+: animali che mostrano segni comportamentali di encefalopatia epatica; EE-: animali che non mostrano segni di encefalopatia epatica.

Figura 12: Misurazione di IFN gamma (A), TNF alfa (B) o IL 6 (C) sierico in animali di controllo, animali con BDL con o senza acqua arricchita di NH₃ e/o dieta arricchita con biotina (300 mg/kg alimentare).

Esempi

Esempio 1 - Studio nel modello di legatura dei dotti biliari di ratto più acqua iperammoniemica (NH₃-arricchita)

- I ratti con legatura dei dotti biliari (BDL) sono un modello di lesione epatica colestatica con stress ossidativo e fibrogenesi associati.

- Questi ratti sviluppano lesione epatica progressiva con l'insorgenza di fibrosi entro 2 settimane e lo sviluppo della cirrosi biliare entro 4-6 settimane.

- Quando dati integratori iperammonemici, più ratti con legatura dei dotti biliari sviluppano encefalopatia.

L'effetto della biotina è valutato in ratti con legatura dei dotti biliari trattati con acqua iperammonemica riguardo l'efficacia clinica in termini di orientamento in campo aperto e aumento di peso corporeo.

Valutazione "clinica":

- 4 gruppi di 5 ratti: ratti sham-operati trattati con 1) dieta di controllo e acqua di controllo; 2) dieta di controllo e acqua iperammoniemica (NH₃-arricchita); 3) dieta integrata con biotina e acqua di controllo; e 4) dieta integrata con biotina e acqua iperammoniemica.

- 4 gruppi di 10 ratti: ratti con legatura dei dotti biliari trattati con 1) dieta di controllo e acqua; 2) dieta di controllo e acqua iperammonemica; 3) dieta integrata con biotina e acqua di controllo; e 4) dieta integrata con biotina e acqua iperammoniemica.

- La dose di biotina usata è 30 mg/kg BW/giorno che è equivalente a una dose umana di 300 mg/giorno.

- Biotina è erogata miscelata in alimenti secchi

- Esame "clinico":

- Peso
- Campo aperto (orientamento)
- Il trattamento inizia: al giorno 3 post-intervento
- Il trattamento viene continuato per 6 settimane, quando i ratti sono cirrotici.
- La permeabilità ematoencefalica è valutata al termine dello studio.

Questo esperimento rende possibile valutare l'effetto del trattamento con biotina ad alta dose in termini di miglioramento clinico, riduzione di barriera ematoencefalica e normalizzazione metabolica, in un modello di EE cronica.

Esempio 2 - Un altro modello di encefalopatia epatica nei ratti è il modello di CCl₄ indotto da fibrosi epatica più acqua iperammonemica

- I ratti somministrati con CCl₄ hanno epatotossicità mediata dalla produzione di radicali liberi.
- Questi ratti sviluppano lesione epatica progressiva con lo sviluppo di cirrosi entro 8 settimane.
- Quando dati integratori iperammonemici, più ratti trattati con CCl₄ sviluppano encefalopatia.

Lo stesso protocollo clinico descritto nell'Esempio 1 è applicato a questi animali.

Esempio 3 - Materiale e metodi dettagliati

Animali

Ratti Wistar maschi adulti (peso 175-200 g all'inizio della

procedura chirurgica) sono stati ottenuti dai laboratori Janvier (Le Gesnest-Saint-Isle) e sono stati usati per gli esperimenti completi.

Legatura dei dotti biliari

La legatura dei dotti biliari (BDL) è stata utilizzata come modello di cirrosi biliare. Tutti i ratti di questo gruppo sono stati azionati. Sono stati separati casualmente in due gruppi: BDL o semplice laparotomia (SHAM, gruppo di controllo). La procedura BDL è stata condotta come descritto in precedenza (Kountouras J, Prolonged bile duct obstruction : a new experimental model for cirrhosis in the rat ; Br J Exp Pathol 1984) e come controllato nel nostro laboratorio.

L'intervento chirurgico è stato effettuato sotto anestesia totale con isoflurano inalato (Aerrane, Baxter Maurepas) al 3% miscelato con aria. L'analgesia è stata effettuata mediante iniezione sottocutanea di buprenorfina al 2% (Buprécare 0,3 mg/ml, Axience) immediatamente prima e dopo l'intervento chirurgico.

Gli animali sono stati esaminati due volte a settimana e pesati settimanalmente. Tutti gli animali sono stati mantenuti per 6 settimane dopo l'intervento chirurgico.

CCl₄

Al fine di ottenere un controllo dei risultati, è stato usato un altro modello di cirrosi, costituito da un'intossicazione cronica mediante tetracloruro di carbonio (CCl₄); I ratti Wistar hanno ricevuto CCl₄ 1 ml/kg di peso corporeo due volte alla settimana per 8 settimane in olio minerale. I controlli hanno ricevuto olio minerale senza CCl₄. I

trattamenti sono stati somministrati intragastricamente mediante sonda gastrica usando un catetere di polietilene, senza sedazione.

La dose di CCl₄ usata in questo esperimento è inferiore alla dose usata nella Nagamine, che è più un modello di lesione epatica acuta (EE tipo A).

Nel presente modello, l'uso di una dose inferiore per un tempo più lungo rende possibile mimare meglio la lesione epatica progressiva e quindi EE di tipo C.

Encefalopatia epatica

È stato usato un intervento (Wright et al, Hepatology giugno 2007; 45(6):1517-26) allo scopo di aumentare l'incidenza dell'encefalopatia epatica e consisteva nell'aggiunta di integratori alimentari di altamente proteici/ammoniogenici (integratori arricchiti con NH₃) per 6 o 8 settimane (a seconda del modello di cirrosi). Il trattamento con NH₃ è iniziato 3 giorni dopo l'intervento chirurgico o la procedura con CCl₄. Consisteva in una miscela su misura che mimava la composizione amminoacidica della molecola di emoglobina (4 g/kg/g; proteina grezza di miscela AA di iperammonemia di ratto EF all'88,9%, SSNIFF) miscelata con acqua. Ai ratti sono state date 2 bottiglie, una con solo acqua e una con il trattamento.

Lo scopo di questo regime era produrre iperammonemia cronica.

Quattro gruppi di ratti hanno ricevuto questo trattamento arricchito con NH₃ tra BDL, SHAM, CCl₄ e olio.

Trattamento contro l'encefalopatia epatica

La rifaximina è un antibiotico non assorbibile orale convalidato nell'uomo per prevenire recidiva di EE in associazione con lattulosio. L'esatto meccanismo di azione non è ben noto ma dovrebbe diminuire l'iperammoniemia e la traslocazione batterica a causa del suo ruolo sul microbiota intestinale.

Pertanto, potrebbe svolgere un ruolo sui due principali attori di EE, iperammoniemia e infiammazione sistemica.

La rifaximina (Sigma Aldrich) è stata miscelata con acqua alla dose di 50 mg/kg/d ed è iniziata 3 giorni dopo l'intervento chirurgico.

Quattro gruppi di ratti hanno ricevuto rifaximina (RFX): BDL, SHAM, BDL + RFX, SHAM + RFX.

Benzoato di sodio, convalidato nel disturbo genetico del ciclo di urea, è stato anche miscelato con acqua alla dose di 200 mg/kg/d ed è iniziato 3 giorni dopo l'intervento chirurgico.

La biotina è stata somministrata in alimenti per animali a una dose di 50 mg/kg o 300 mg/kg di alimento, corrispondente a una dose ingerita di 5 mg/kg di animale/giorno o 30 mg/kg di animale/giorno e una dose giornaliera di 50 mg o 300 mg nell'essere umano.

Va notato che la biotina è fornita agli animali prima dell'induzione di EE, poiché gli animali hanno solamente un episodio EE e muoiono rapidamente dopo lo sviluppo di EE dopo la legatura di dotti biliari. Pertanto, in questo modello animale, la biotina non può essere fornita dopo intervento chirurgico per studiare la capacità della biotina di

prevenire un secondo episodio EE. La sopravvivenza degli animali non è stata studiata poiché gli animali sono stati sacrificati per studiare la permeabilità di barriera ematoencefalica.

Test del comportamento

Per valutare l'encefalopatia epatica, è stato usato il test in campo aperto (BioSeb), un test comportamentale convalidato in ratti con BDL per esplorare compromissioni neurologiche (Leke, Plos One 2012;7(5)). Il test è stato effettuato il giorno del sacrificio, in condizioni sperimentali standardizzate (ora, luogo, luce, rumore). Ciascun ratto è stato posto in una scatola quadrata 1 m² ed era libero di esplorare l'arena per 6 minuti. Due aree sono state definite nel quadrato, centro e periferia. I parametri di mobilità sono stati registrati da una fotocamera tridimensionale. I dati analizzati dopo 6 minuti di esperimenti erano: distanza totale percorsa (cm), tempo di mobilità (i), velocità (cm/s), numero di cambi di zona, distanza percorsa nella zona centrale e periferica, tempo trascorso nella zona centrale e periferica, numero di sollevamenti sulle zampe posteriori, durata totale di sollevamenti sulle zampe posteriori.

Determinazione della permeabilità di BEE con l'uso di Texas

Red con destrano

L'integrità di BEE è stata studiata misurando lo stravasamento dal compartimento intravascolare di Texas Red coniugato con destrano (Life Technologies).

Sei settimane dopo l'intervento chirurgico, tutti i ratti sono stati

sottoposti a inalazione con isoflurano inalato al 3%. 0,75 ml di fluorocromo sono stati iniettati nella vena femorale (Texas Red 10 kDa 10 mg/ml) e fatti circolare per 6 minuti. Quindi abbiamo prelevato un campione di sangue (2 ml) nella vena cava inferiore mediante una laparotomia mediana. Per rimuovere il colorante localizzato intravascolare, abbiamo fatto una grande toracotomia per perfondere 300 ml di PBS freddo (40 ml/min con una pompa peristaltica) attraverso il ventricolo cardiaco sinistro.

Dopo la decapitazione, il cervello è stato rimosso rapidamente e i bulbi olfattivi e il tronco cerebrale sono stati eliminati con il cervelletto.

Dopo la macinazione dell'emisfero destro mediante agitazione e centrifugazione vigorosa, la quantità di destrano fluorescente ($\mu\text{g/g}$) nei surnatanti è stata misurata mediante fluorimetria (Tecan Infinite M200) a 620 nm dopo eccitazione a 588 nm. Il contenuto di colorante è stato valutato mediante interpolazione nella curva standard.

Analisi biochimica e istologica

Il campione di sangue prelevato durante il sacrificio è stato centrifugato e il plasma è stato usato per determinare i livelli di transaminasi epatiche, bilirubina totale e coniugata e ammoniaca. Citochine plasmatiche (IL6, TNF α , IFN γ) sono state determinate mediante un kit commerciale multiplex.

Dopo il sacrificio, i fegati sono stati estratti e pesati; poi abbiamo fatto una biopsia dell'organo per determinare lo stato della

fibrosi, confermare la cirrosi mediante una colorazione rosso Sirius dopo il fissaggio in formalina al 10%.

Se il punteggio METAVIR non era F4 per i ratti con BDL, questi animali erano esclusi dall'analisi.

Analisi statistica

Tutti i dati sono stati presentati come derivazione media +/- standard e analizzati con Prism (Graphpad, v5,0c). Differenze tra gruppi sono state confrontate usando un'analisi di varianza a una via (ANOVA). Quando l'ANOVA ha identificato significative differenze tra gruppi, il test di Dunnett è stato usato per confronti di gruppi interi.

La differenza è stata considerata statisticamente significativa se p era inferiore a 0,05.

Esempio 4 - Risultati

- I modelli di ratto con BDL e con CCl_4 hanno entrambi cirrosi. Si può osservare la fibrosi estesa e un'architettura distrutta del parenchima epatico, classificato F4 con il punteggio METAVIR. In modo coerente, i marcatori epatici plasmatici sono cambiati nei due modelli e le differenze tra i due modelli riflettono l'origine della malattia epatica. In BDL, l'alterazione preponderante è iperbilirubinemia, mentre in CCl_4 si tratta di elevazione di transaminasi (ASAT e ALAT) (Figura 1 e 4). Entrambi i modelli di ratto con BDL e con CCl_4 sviluppano iperammoniemia (Figura 3).

- Il test in campo aperto mostra che ratti con BDL sviluppano compromissioni neurologiche: è stata osservata una

distanza totale percorsa significativa più breve, una durata di attività più breve, una velocità più lenta e sollevamenti sulle zampe posteriori minori e più corti, rispetto ai ratti Sham. Queste anomalie non si sono trovate nei ratti con CCl₄. Ciò suggerisce che i ratti con BDL mostravano EE nel test in campo aperto ma non nei ratti con CCl₄ (Figure 2 e 5).

- Il trattamento con biotina (300 mg/kg di alimento) è stato in grado di ridurre l'iperammoniemia in ratti con BDL (Figura 6; ANOVA, $p = 0,01$).

- Quando la biotina è somministrata a una dose elevata (300 mg/kg di alimento) a ratti con BDL, le compromissioni neurologiche osservate nel test in campo aperto sono ridotte rispetto ai ratti con BDL senza biotina. Alcuni dei parametri analizzati (distanza totale percorsa, velocità media e durata dell'attività) sono quasi normalizzati nei ratti con BDL trattati con biotina rispetto ai ratti Sham. La biotina impedirebbe pertanto l'insorgenza di EE se somministrata a ratti con BDL a una dose elevata (Figure 7 e 8 mostrano che una dose di 50 mg/kg di alimento non è sufficientemente elevata da avere un effetto). I risultati sono simili a quelli osservati con rifaximina o benzoato di sodio (non mostrati).

- I ratti con BDL hanno un aumento significativo della quantità intra-cerebrale di destrano-Texas Red rispetto a Sham anche quando non alimentati con un'acqua arricchita di NH₃; questo risultato non è stato confermato nei ratti con CCl₄ rispetto a quelli che hanno

ricevuto solo olio minerale (Figura 9 e 10). Ciò suggerisce che i ratti con BDL avrebbero una permeabilità di barriera ematoencefalica aumentata nei soluti.

- Il trattamento con biotina (300 mg/kg di alimento) è stato in grado di normalizzare la quantità intra-cerebrale di destrano rispetto ai ratti con BDL trattati con dieta di controllo (Figura 11), mentre la dose di 50 mg/kg di alimento non ha raggiunto la normalizzazione. Ciò suggerisce che la biotina ad alto dosaggio è in grado di impedire alterazioni della permeabilità di BEE durante l'EE nella cirrosi

- I nostri risultati mostrano che sia i ratti con BDL che i ratti con CCl₄ sviluppano cirrosi, ed entrambi sviluppano iperammoniemia. Tuttavia, ratti con BDL mostravano EE e avevano una permeabilità aumentata di BEE nei soluti, mentre ratti con CCl₄ non la avevano. Differenze osservate tra gruppi BDL e CCl₄ potrebbero essere dovute a citochine infiammatorie (Figure 12 e 13). Un tasso superiore di IFN γ e TNF α è stato osservato in ratti con BDL con EE rispetto a tutti gli altri gruppi di ratti (BDL senza EE, Sham, CCl₄ e olio). Nei ratti con BDL trattati con biotina, i livelli di IFN γ nel plasma erano diminuiti. Questi risultati sembrano confermare che l'iperammoniemia da sola non è sufficiente per sviluppare EE durante la cirrosi e che l'infiammazione insieme all'iperammoniemia sarebbe necessaria per innescare EE. La biotina impedirebbe l'EE sia riducendo l'iperammoniemia sia riducendo direttamente o indirettamente la produzione di citochine infiammatorie.

Per riassumere, in ratti con BDL si può osservare un piccolo

aumento di transaminasi (ALAT e ASAT), un grande aumento della bilirubina e una bassa diminuzione dell'albumina (Figura 1).

Il modello di CCl₄ qui divulgato è differente dal modello CCl₄ divulgato in Nagamine et al o JPH01226814A che è un modello di iperammonemia acuta con una singola iniezione di dose elevata. Nel presente modello, piccole dosi di CCl₄ sono somministrate agli animali per alcuni giorni per mimare più strettamente una malattia cronica. Si può osservare un aumento molto elevato di transaminasi, un basso aumento della bilirubina e nessuna modifica dell'albumina (Figura 4).

Entrambi gli animali nei modelli hanno un'aumentata ammoniemia, ma solo gli animali con BDL mostravano EE, in considerazione delle alterazioni comportamentali, mentre tali alterazioni non erano state osservate in animali con CCl₄.

Si può inoltre osservare che i ratti con BDL hanno aumentata permeabilità a BEE, ma non ratti con CCl₄.

Biotina, fornita a 30 mg/kg di animale/giorno (corrispondente a un dosaggio giornaliero di 300 mg negli esseri umani), ma non biotina fornita a 5 mg/kg di animale/giorno (corrispondente a un dosaggio giornaliero di 50 mg negli esseri umani) migliora la condizione dell'animale in termini di miglioramento comportamentale e normalizzazione della permeabilità di BEE e impedirebbe quindi lo sviluppo di EE.

Dalla data riportata nella presente e dalle figure, si ipotizza che la biotina agisca diminuendo l'ammoniemia e modulando il profilo

infiammatorio.

RIVENDICAZIONI

1. Biotina per il suo uso nel trattamento o nella prevenzione dell'encefalopatia epatica in cui la quantità giornaliera di biotina somministrata al paziente è almeno 200 mg, e in cui l'encefalopatia epatica è un'encefalopatia epatica di tipo C.

2. Biotina per uso secondo la rivendicazione 1, in cui l'encefalopatia epatica è un'encefalopatia epatica di tipo C persistente.

3. Biotina per uso secondo la rivendicazione 1, in cui l'encefalopatia epatica è un'encefalopatia epatica di tipo C episodica.

4. Biotina per uso secondo la rivendicazione 1, in cui l'encefalopatia epatica è un'encefalopatia epatica di tipo C minima.

5. Biotina per il suo uso per la prevenzione dell'encefalopatia epatica in un paziente con cirrosi, in cui la quantità giornaliera di biotina somministrata al paziente è almeno 200 mg, in cui l'encefalopatia epatica è un'encefalopatia epatica di tipo C.

6. Biotina per uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5, in cui la quantità giornaliera di biotina somministrata al paziente è almeno 250 mg.

7. Biotina per uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 5, in cui la quantità giornaliera di biotina somministrata al paziente è almeno 300 mg.

8. Biotina per uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7, caratterizzata dal fatto che è una forma adatta per la somministrazione orale.

9. Biotina per uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 8, caratterizzata dal fatto di essere sotto forma di capsule di gel, compresse (facoltativamente rivestite con film), pastiglie da sciogliere in bocca o pillole.

10. Biotina per uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 9, caratterizzata dal fatto di essere sotto forma di una composizione contenente biotina ed eccipienti, senza alcun altro principio attivo.

11. Biotina per uso secondo la rivendicazione 10, caratterizzata dal fatto che gli eccipienti sono scelti dal gruppo costituito da talco, cellulosa microcristallina, lattosio e mannosio.

12. Biotina per uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 7, caratterizzata dal fatto di essere una forma adatta per la somministrazione iniettabile.

13. Biotina per uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 12, caratterizzata dal fatto di essere sotto forma di una composizione a rilascio lento.

14. Biotina per uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 13, in cui detto trattamento con biotina ha una durata di almeno 3 mesi.

15. Biotina per uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 14, in cui detto trattamento con biotina ha una durata di almeno 6 mesi.

16. Biotina per uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni

da 1 a 15, in cui detto trattamento con biotina ha una durata di almeno un anno.

17. Composizione di biotina e almeno un altro farmaco contro l'encefalopatia epatica per l'uso simultaneo, separato o sequenziale (ripartito nel tempo) nel trattamento dell'encefalopatia epatica di tipo C, in cui la quantità giornaliera di biotina somministrata al paziente è almeno 200 mg.

18. Composizione per uso secondo la rivendicazione 17, in cui detto altro farmaco è scelto nel gruppo costituito da lattulosio, lattitolo, neomicina, metronidazolo, rifaximina, e una combinazione di L-ornitina e L-aspartato (LOLA).

*** **

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

LEGENDA DELLE TAVOLE DEI DISEGNI

TAVOLE 1-14/14

Figure 1-12

"Figure" = Figura

TAVOLA 1/14

Figura 1C

"Total Bilirubin" = Bilirubina Totale

Figura 1D

"Albumin" = Albumina

TAVOLA 2/14

Figura 2A

"Total distance" = Distanza totale

Figura 2B

"Mean speed" = Velocità media

Figura 2C

"Activity duration" = Durata dell'attività

Figura 2D

"Nb zone change" = N. di variazioni di zona

Figura 2E

"Nb rearing" = N. di sollevamenti sulle zampe posteriori

Figura 2F

"Total duration rearing" = Durata totale sollevamenti sulle zampe posteriori

TAVOLA 3/14

Figura 3A

"Ammoniemia" = Ammoniemia

Figura 3B

"Ammoniemia" = Ammoniemia

"OIL" = OLIO

TAVOLA 4/14

Figure 4A-B

"OIL" = OLIO

Figura 4C

"Total Bilirubin" = Bilirubina Totale

"OIL" = OLIO

Figura 4D

"Albumin" = Albumina

"OIL" = OLIO

TAVOLA 5/14

Figura 5A

"Total distance" = Distanza totale

"Distance tot" = Distanza totale

"Oil" = Olio

Figura 5B

"Mean speed" = Velocità media

"Oil" = Olio

Figura 5C

"Activity duration" = Durata dell'attività

"Oil" = Olio

Figura 5D

"Zone change" = Variazione di zona

"Nb of zone change" = N. di variazioni di zona

"Oil" = Olio

Figura 5E

"Nb rearing" = N. di sollevamenti sulle zampe posteriori

"Oil" = Olio

Figura 5F

"Duration rearing" = Durata di sollevamenti sulle zampe posteriori

"Rearing duration" = Durata di sollevamenti sulle zampe posteriori

"Oil" = Olio

TAVOLA 6/14

Figura 6

"Ammoniemia" = Ammoniemia

"biotin" = biotina

TAVOLA 7/14

Figura 7A

"Total Distance Travelled" = Distanza percorsa totale

"Biotin" = Biotina

Figura 7B

"Mean Speed" = Velocità media

"Biotin" = Biotina

Figura 7C

"Duration of activity" = Durata dell'attività

"Biotin" = Biotina

TAVOLA 8/14

“continued” = continua

Figura 7D

"Nb of rearing" = N. di sollevamenti sulle zampe posteriori

"Biotin" = Biotina

Figura 7E

"Nb of zone change" = N. di variazioni di zona

"Biotin" = Biotina

TAVOLA 9/14

Figura 8A

"Total Distance Travelled" = Distanza percorsa totale

"Biotin" = Biotina

Figura 8B

"Mean Speed" = Velocità media

"Biotin" = Biotina

Figura 8C

"Duration of activity" = Durata dell'attività

"Biotin" = Biotina

TAVOLA 10/14

“continued” = continua

Figura 8D

"Nb of zone change" = N. di variazioni di zona

"Biotin" = Biotina

Figura 8E

"Nb of rearing" = N. di sollevamenti sulle zampe posteriori

"Biotin" = Biotina

TAVOLA 11/14

Figura 9A

" $\mu\text{g dextran/g brain}$ " = cervello $\mu\text{g destrano/g}$

Figura 9B

" $\mu\text{g dextran/g brain}$ " = cervello $\mu\text{g destrano/g}$

"OIL" = OLIO

TAVOLA 12/14

Figure 10A-B

" $\mu\text{g dextran/g brain}$ " = cervello $\mu\text{g destrano/g}$

TAVOLA 13/14

Figura 11A

"OIL" = OLIO

Figura 11B

"TNFalpha" = TNFalfa

"OIL" = OLIO

TAVOLA 14/14

Figura 12A

"Biotin" = Biotina

Figura 12B

"TNF alpha" = TNF alfa

"Biotin" = Biotina

Figura 12C

"Biotin" = Biotina

*** **

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

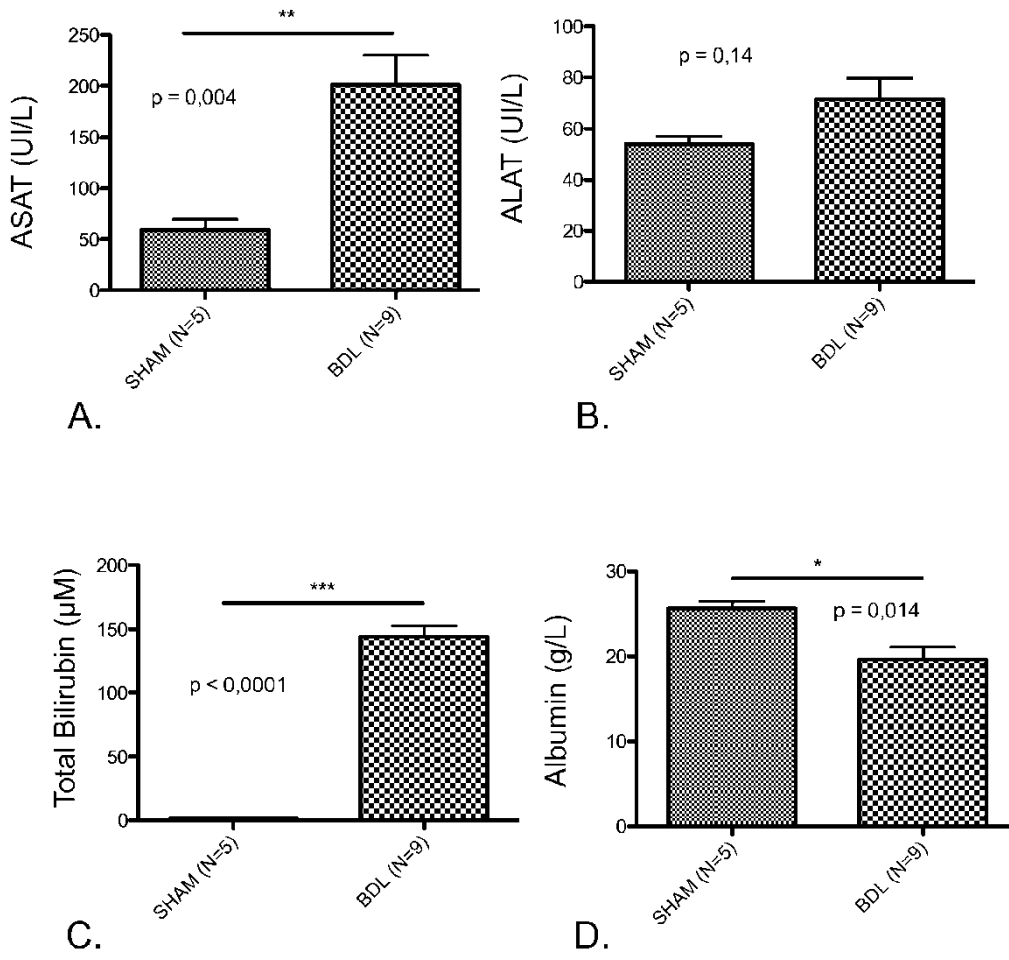


Figure 1

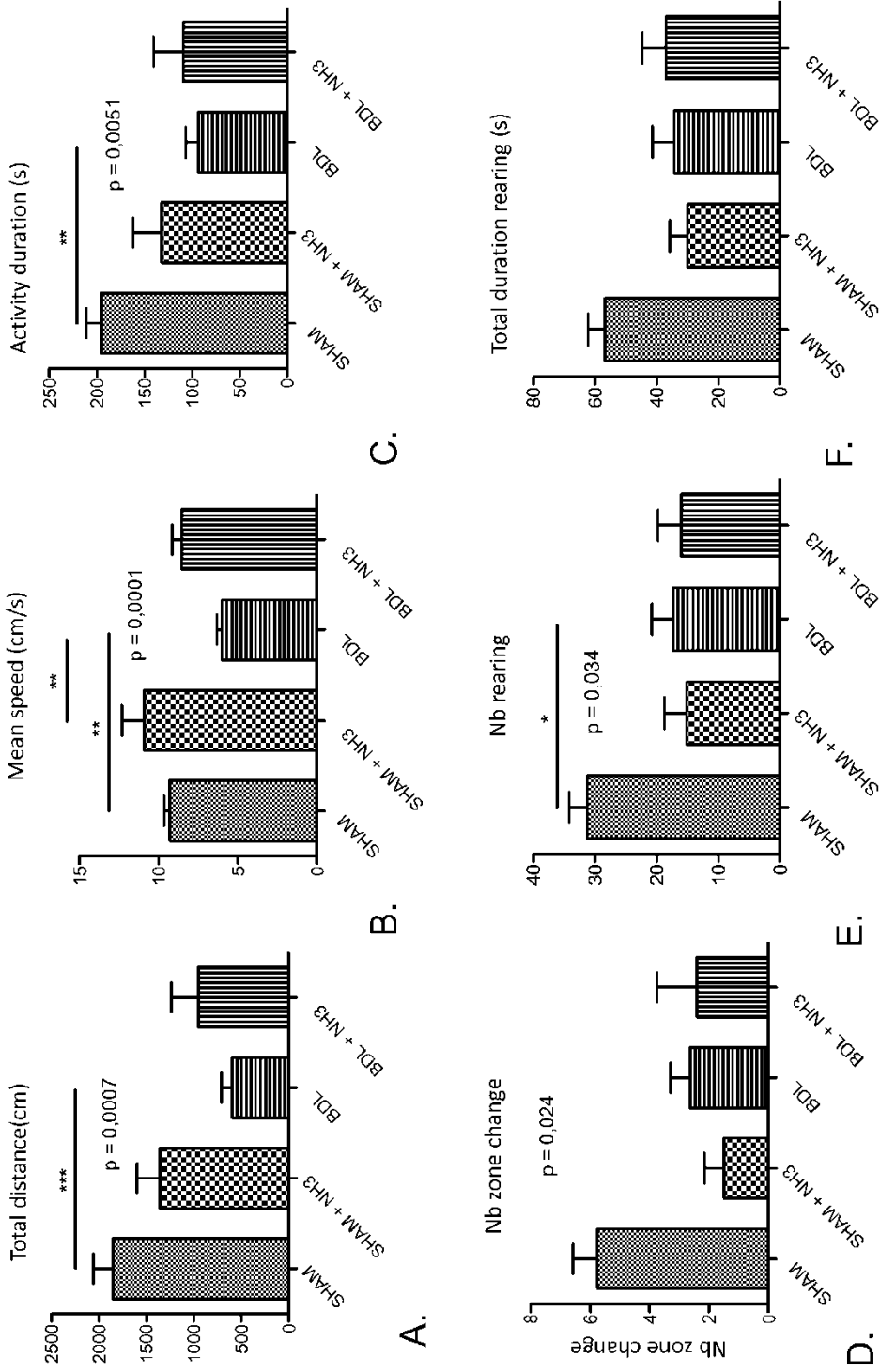


Figure 2

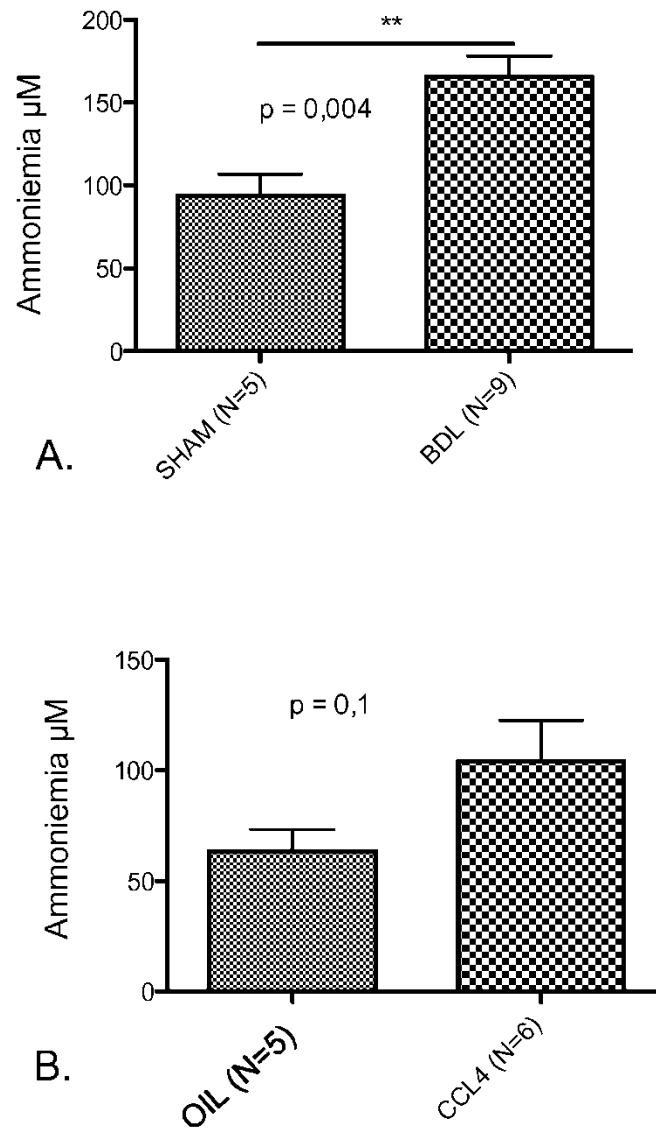


Figure 3

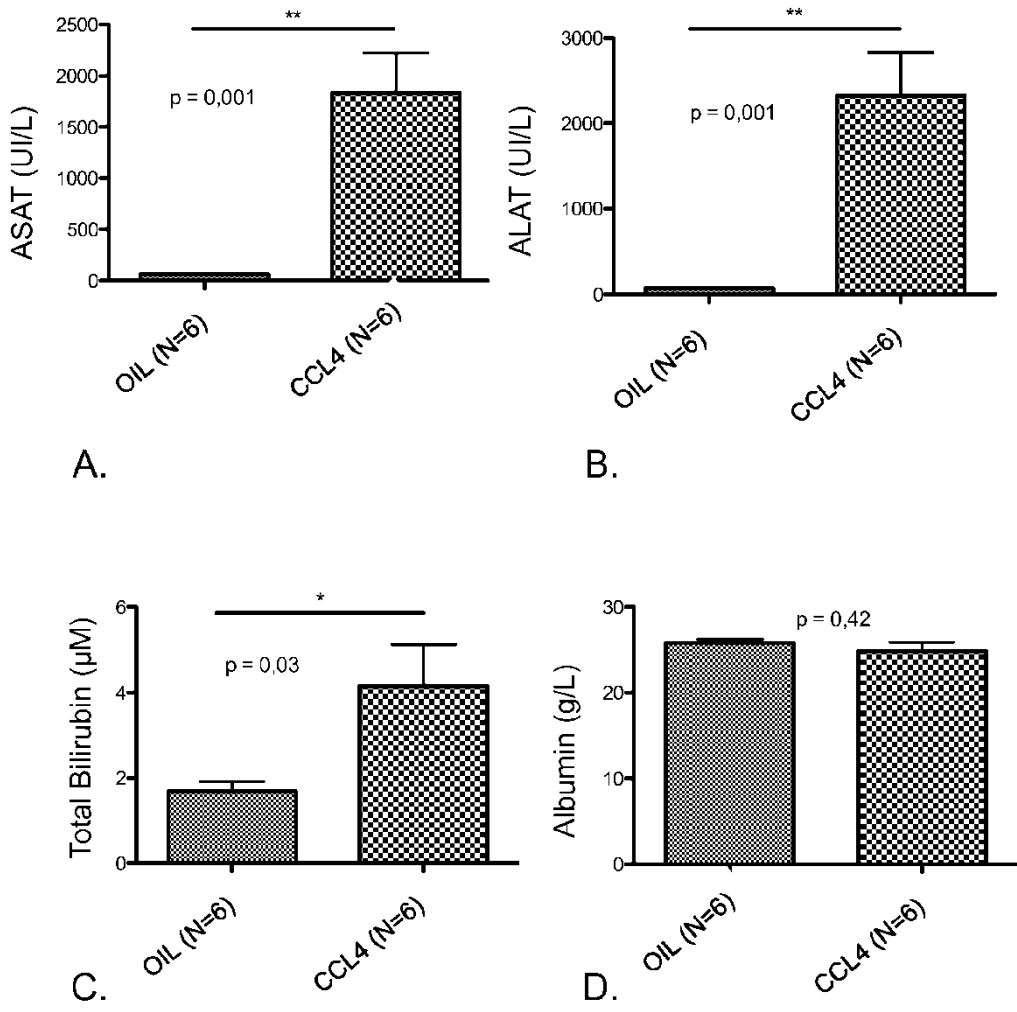


Figure 4

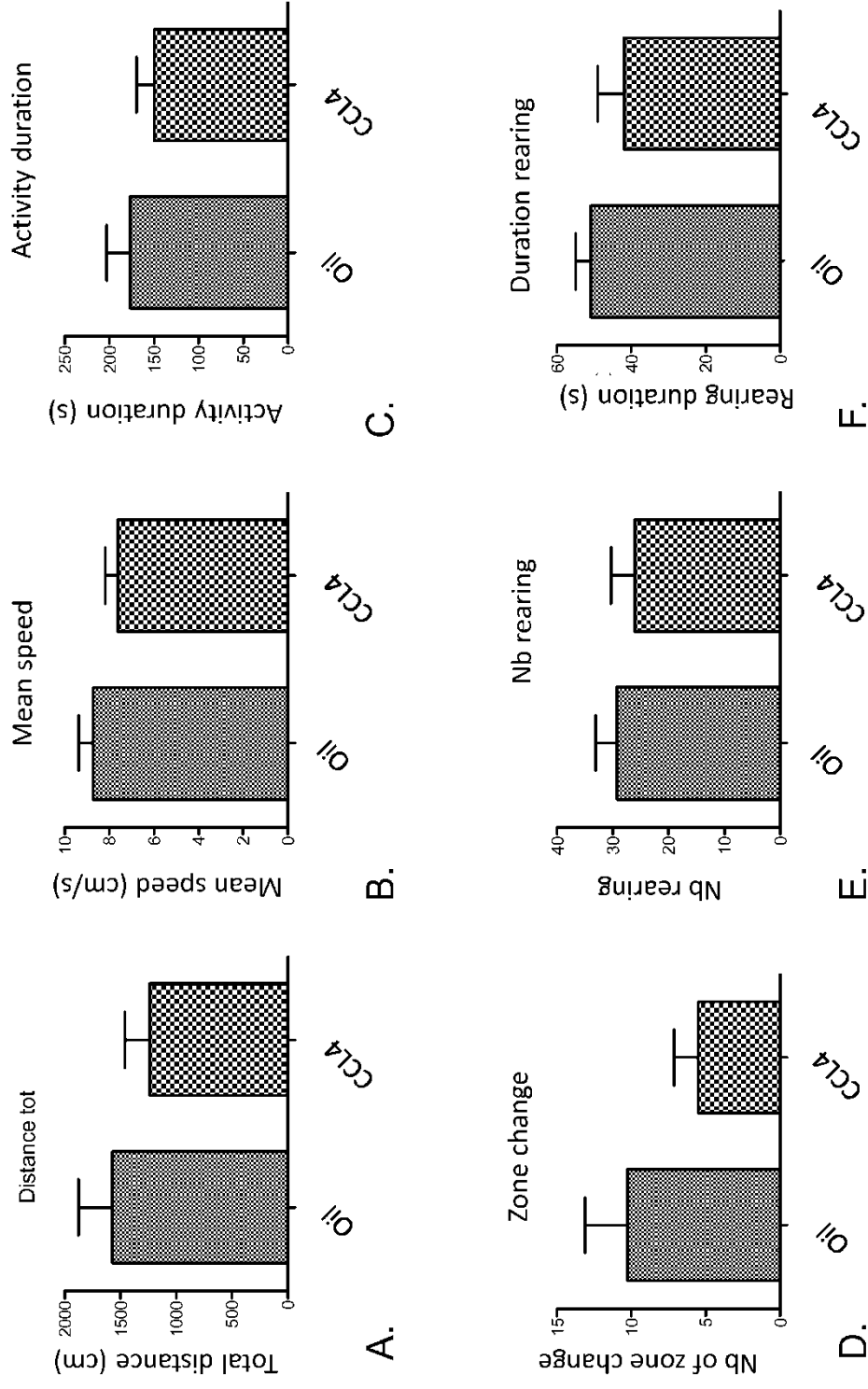


Figure 5

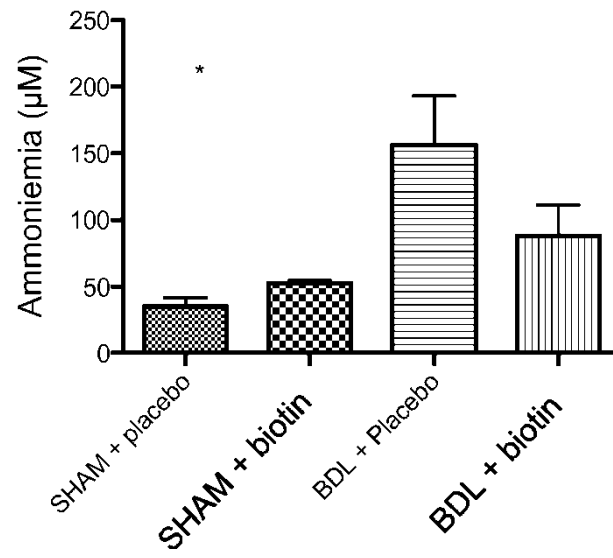


Figure 6

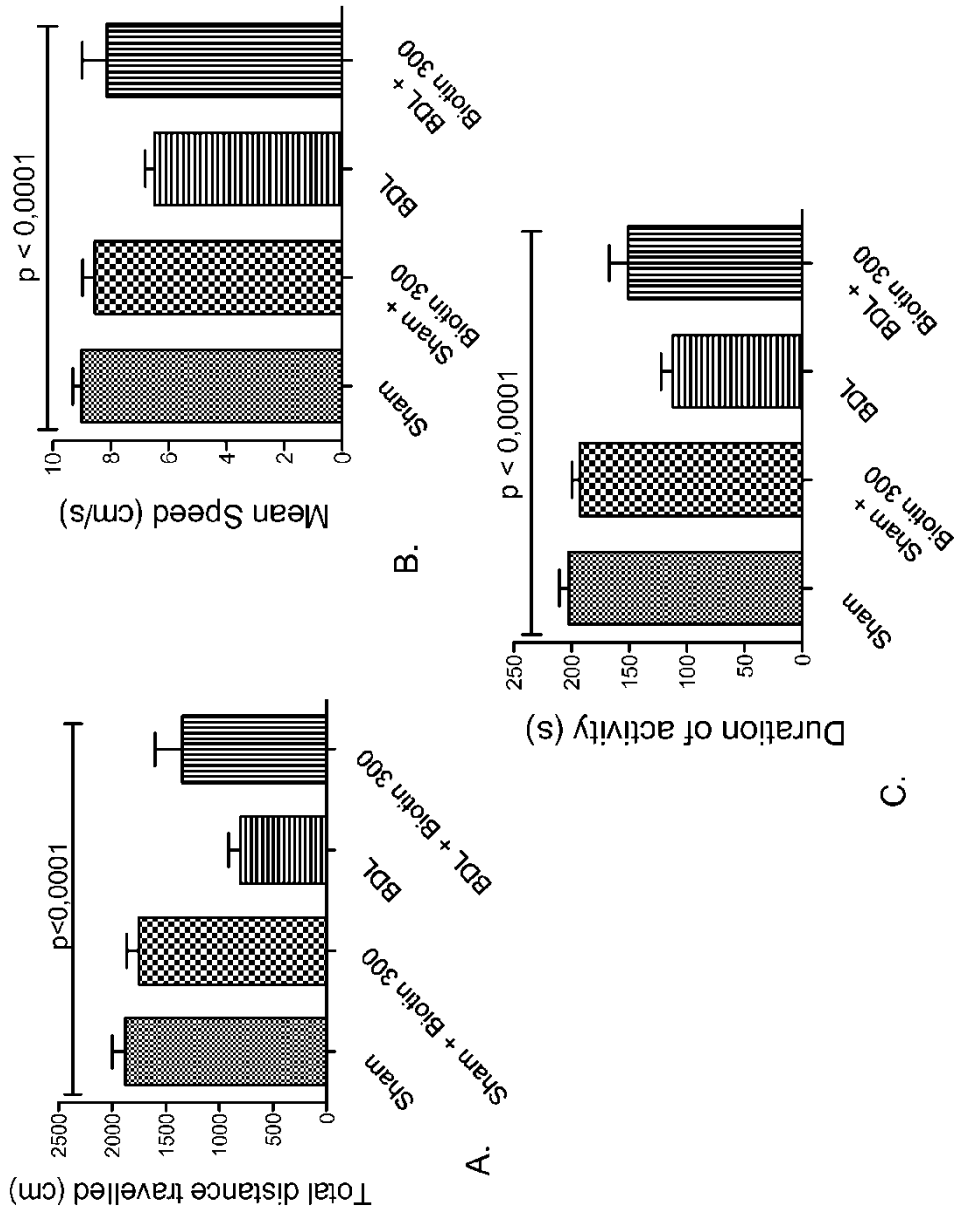


Figure 7

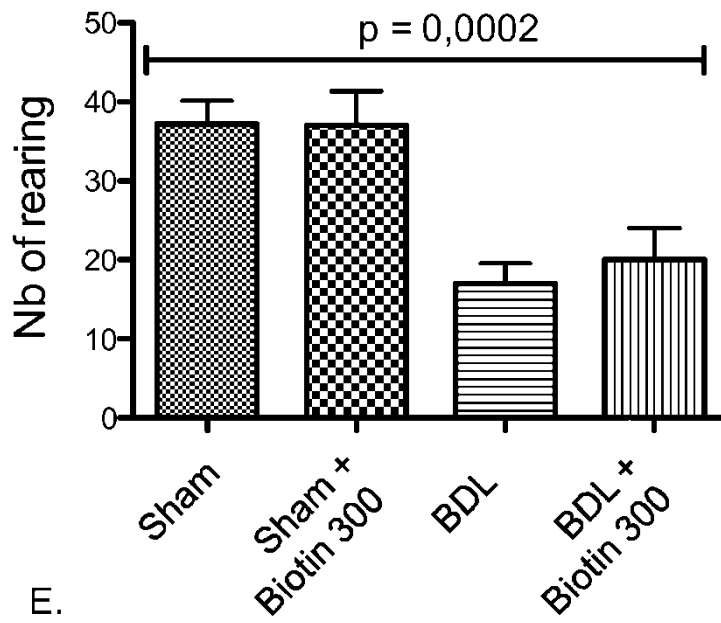
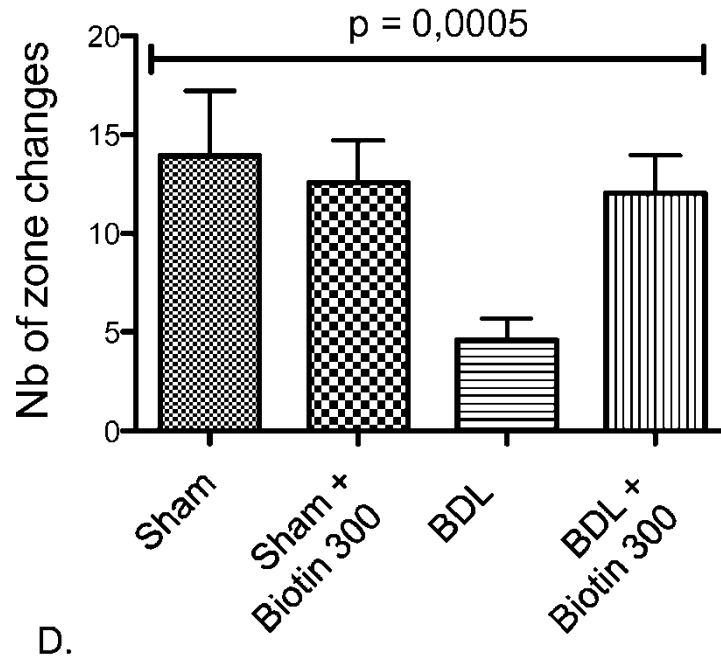
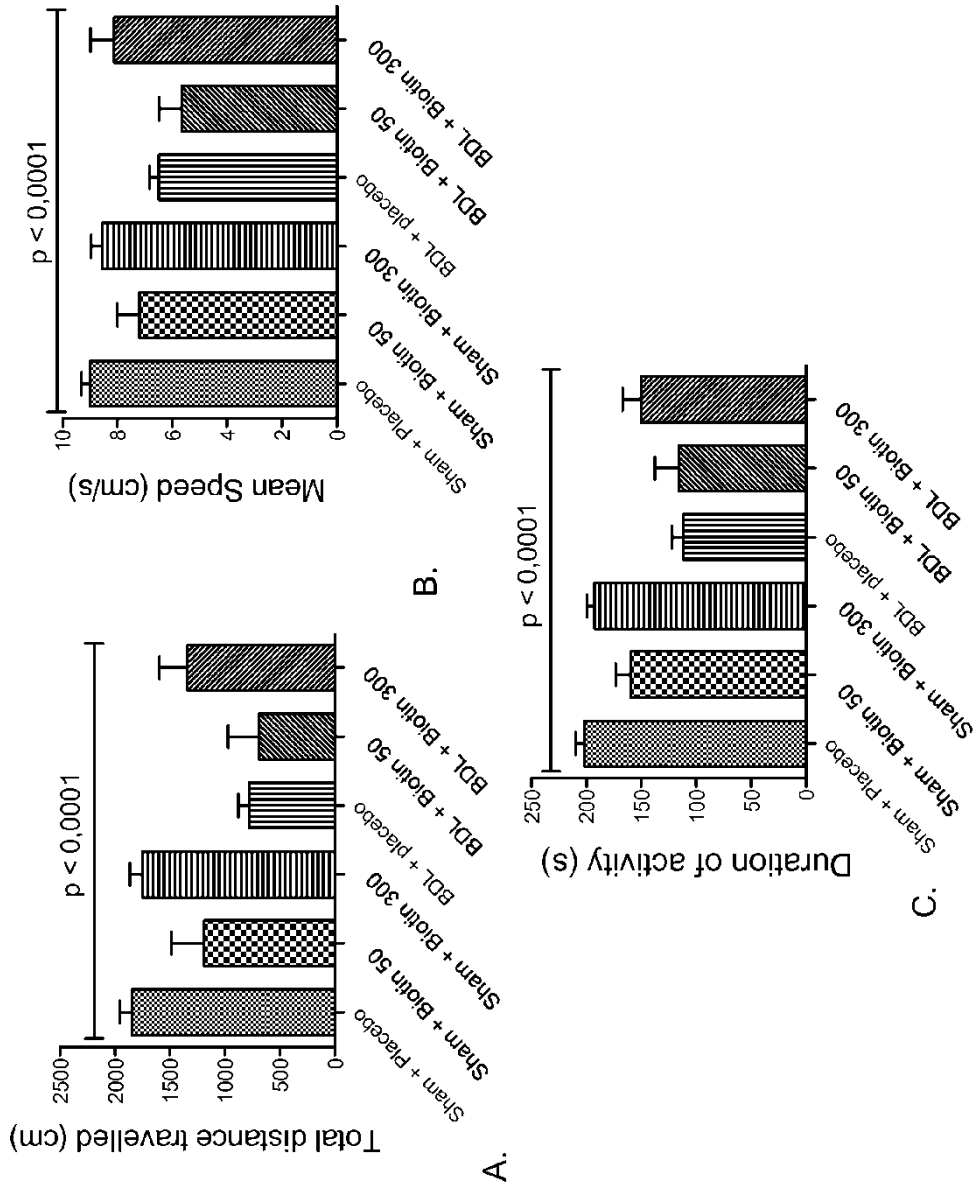


Figure 7 (continued)



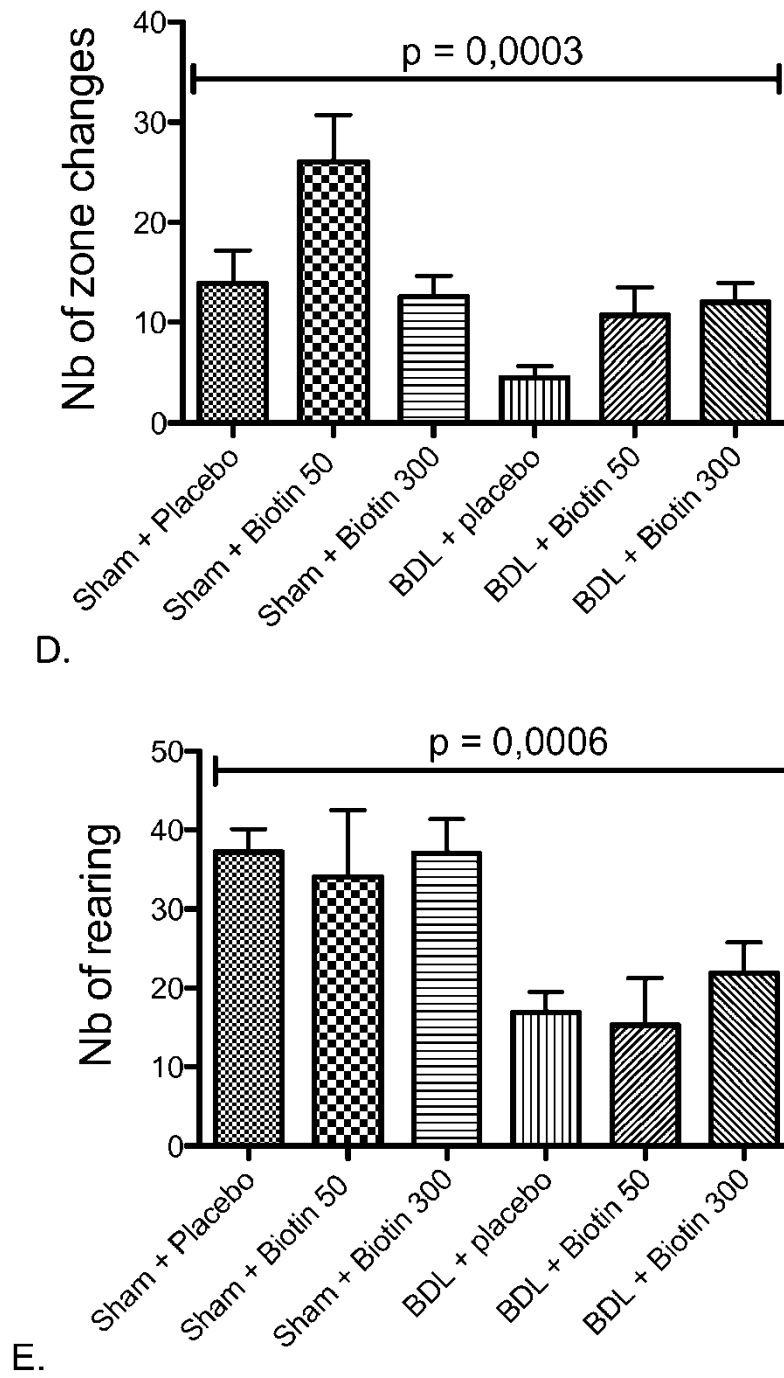
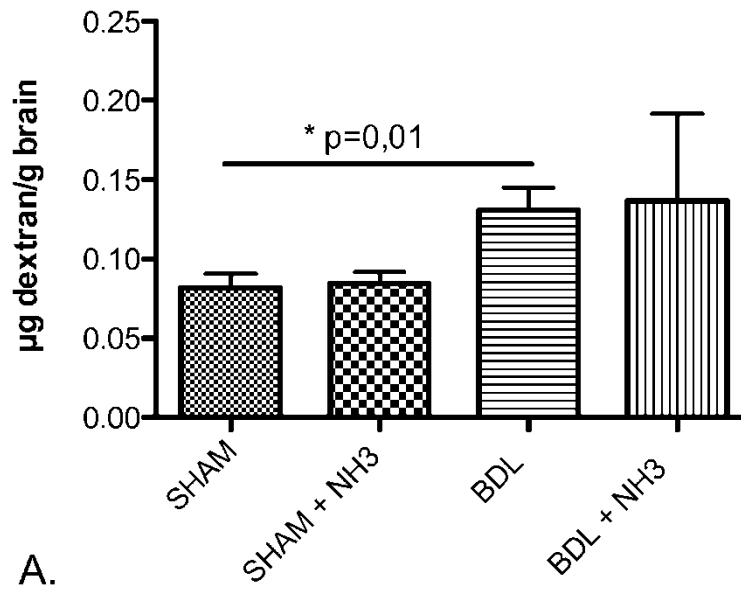
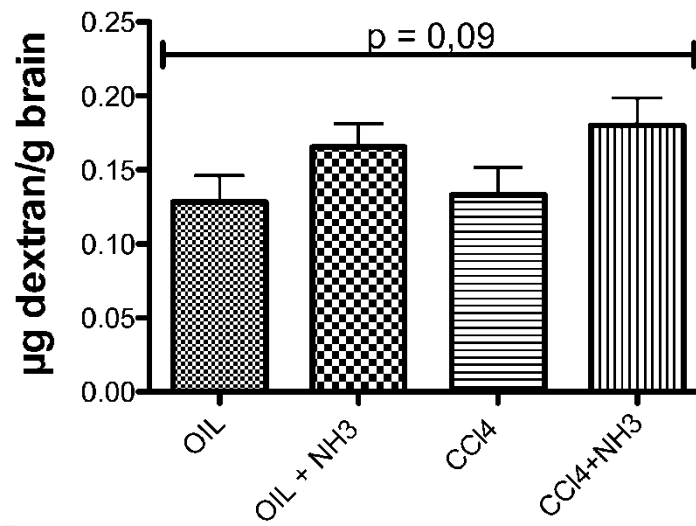


Figure 8 (continued)



A.



B.

Figure 9

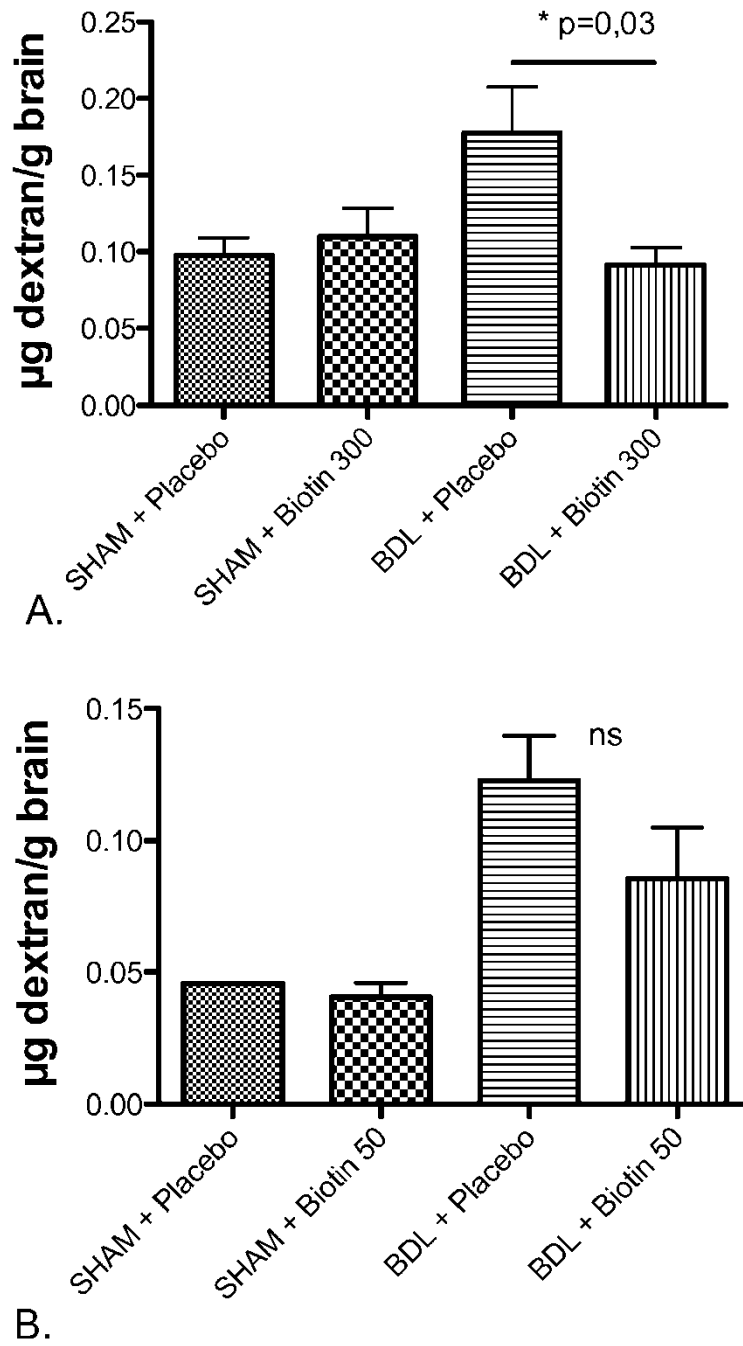
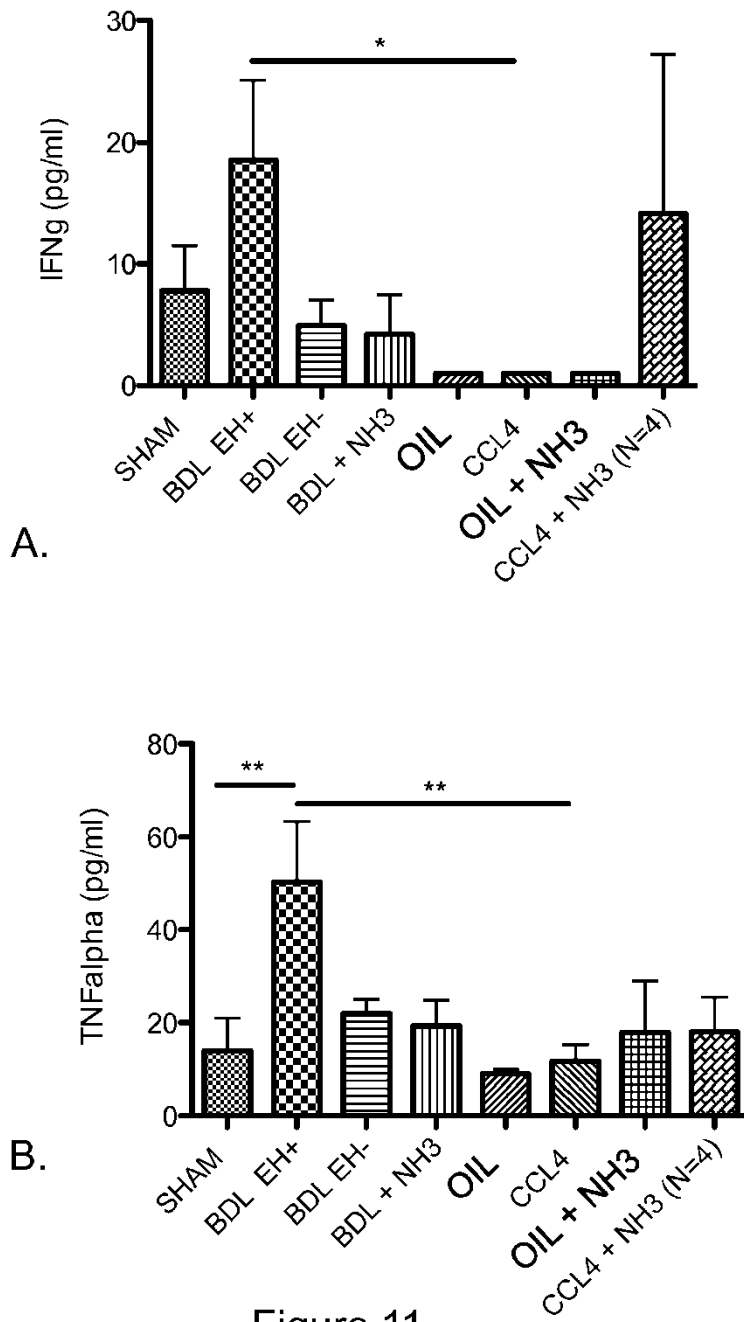


Figure 10



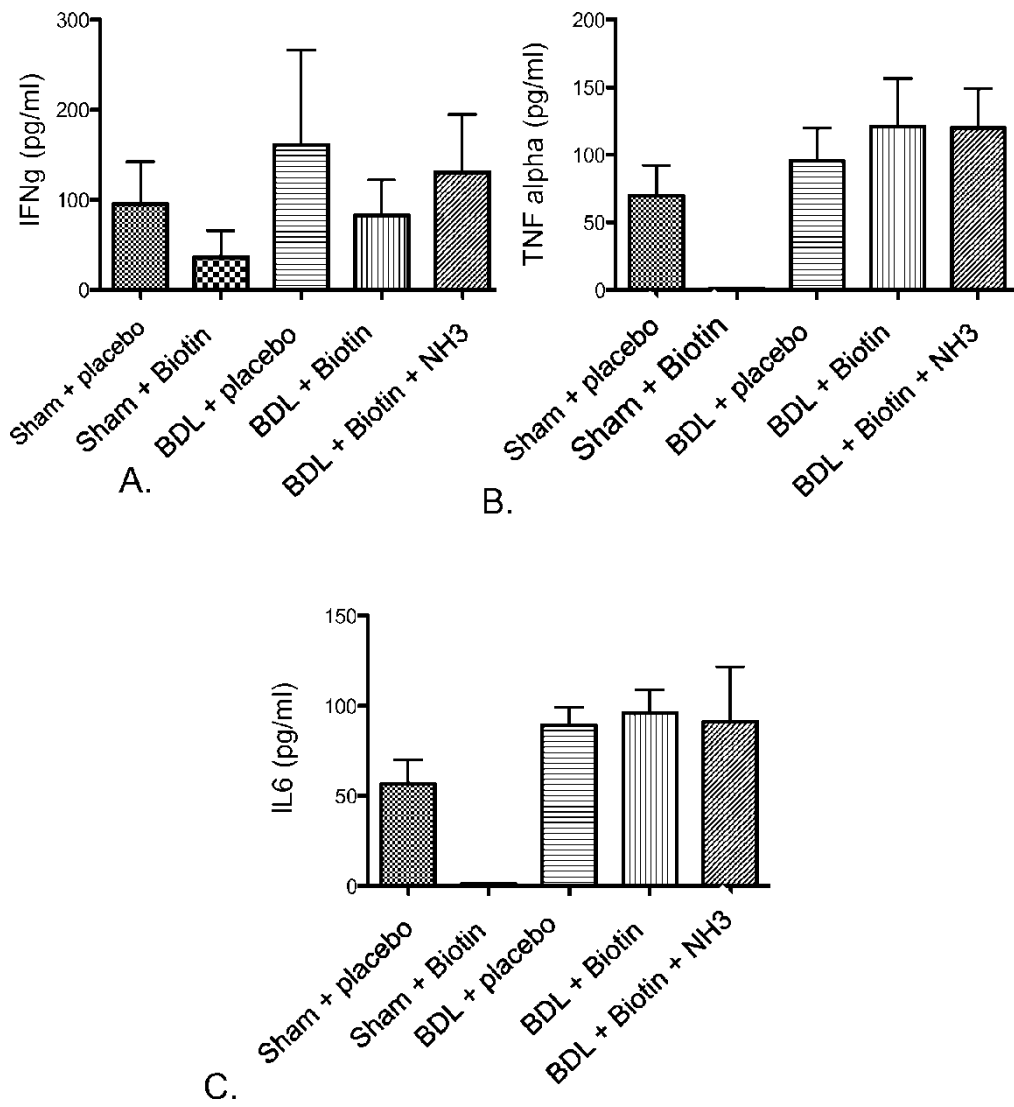


Figure 12