

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102021000024464
Data Deposito	23/09/2021
Data Pubblicazione	23/03/2023

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	31	164

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	31	202

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	P	25	24

Titolo

N-PALMITOIL-ETANOLAMIDE E ACIDO DOCOSAESAENOICO PER L'USO NEL TRATTAMENTO DEL DISTURBO DELLO SPETTRO AUTISTICO E DI ALTRE SINDROMI DEPRESSIVE

Richiedente: EPITECH GROUP S.p.A.

Titolo: "N-PALMITOIL-ETANOLAMIDE E ACIDO
DOCOSAESAENOICO PER L'USO NEL TRATTAMENTO DEL DISTURBO
DELLO SPETTRO AUTISTICO E DI ALTRE SINDROMI DEPRESSIVE"

5

Descrizione

Campo della tecnica dell'invenzione

Forma oggetto della presente invenzione l'uso di N-palmitoiletanolamide (PEA) in associazione con acido docosaesaenoico (DHA) nell'ambito del trattamento del disturbo dello spettro autistico e di altre sindromi depressive.

Stato dell'arte

Il disturbo dello spettro autistico (ASD) è un disturbo del neurosviluppo ad eziologia multifattoriale
10 che si manifesta attraverso la compromissione dell'interazione sociale, della comunicazione verbale e non verbale, delle attività e dell'interesse (definizione dell'*American Psychiatric Association*). La sintomatologia esordisce entro i primi tre anni di vita
15 a seguito di un evento specifico e la diagnosi tempestiva risulta essere molto importante per poter intervenire in maniera adeguata sulle diverse aree compromesse.

Le stereotipie sono una delle principali
20 caratteristiche diagnostiche dell'ASD e possono comprendere comportamenti autostimolatori e

autolesionistici, eccitazione, stimolazione, stress, ansia, noia, affaticamento ed isolamento sociale.

Sebbene non sia nota la causa, la comparsa dell'ASD è dovuta anche ad uno squilibrio tra le sinapsi
5 inibitorie ed eccitatorie, nonché alla neuroinfiammazione responsabile dell'attivazione e della proliferazione patologica delle cellule non neuronali che, rilasciando citochine (IL-1 α , l'IL-1 β , l'IL-6 ed il TNF- α) e chemochine (MCP-1 e RANTES) pro-infiammatorie
10 nel cervello e nel fluido cerebrospinale dei pazienti autistici, esacerbano il processo neuroinfiammatorio.

È noto inoltre che una classe di ormoni endogeni, conosciuti come neurosteroidi, risultano coinvolti nell'ASD: il più importante è l'allopregnanolone (ALLO),
15 un potente metabolita del progesterone e modulatore dei recettori GABA_A sintetizzato dagli enzimi 5 α -reduttasi di tipo 1 e dalla 3 α -idrossisteroide deidrogenasi. ALLO possiede proprietà antidepressive, ansiolitiche, antistress, sedative, antiaggressive e analgesiche e
20 previene la formazione ed il rilascio di citochine pro-infiammatorie, come NF κ B, HMGB1, MCP-1 e TNF- α coinvolte in molteplici condizioni neuroinfiammatorie.

La riduzione dei livelli plasmatici e cerebrali di ALLO, riscontrata nei pazienti con ASD, è fortemente
25 correlata alla gravità della sintomatologia autistica.

I farmaci autorizzati e somministrati ai pazienti con ASD sono il *risperidone* ed il *metilfenidato*, che tuttavia, pur essendo utili per il trattamento dei sintomi autistici, non agiscono sulla modulazione della
5 neuroinfiammazione e sull'innalzamento dei livelli endogeni di ALLO.

Una drastica riduzione dei livelli endogeni di ALLO è stata riscontrata anche in patologie psichiatriche come il disturbo depressivo maggiore (DDM), lo stress
10 post traumatico (PTSD) e soprattutto nella depressione post-partum.

Solo nel 2019, l'ALLO, noto come Brexanolone, è stato introdotto in commercio negli Stati Uniti con il nome di Zulresso™ sotto forma di infusione endovenosa
15 da somministrare nell'arco di 2,5 giorni. Zulresso™ è il primo farmaco approvato dalla FDA (Federal Drug Administration) per il suo utilizzo esclusivo nel trattamento della depressione post-partum. Nel 2016, l'EMA ha inserito il Brexanolone in un programma di
20 studio prima della sua commercializzazione in Europa.

Sebbene venga dichiarato un farmaco efficace e sicuro, Zulresso™ deve essere somministrato solo presso strutture sanitarie certificate a causa del rischio di una sedazione eccessiva, perdita improvvisa di coscienza
25 o vertigini durante le 60 ore di somministrazione.

Ad oggi, non esistono studi clinici in cui l'ALLO viene somministrato come terapia per i pazienti autistici: risulta quindi di notevole importanza individuare un trattamento anti-neuroinfiammatorio facile da somministrare per via orale, sicuro e privo di effetti collaterali di rilievo nel lungo periodo capace di normalizzare anche i livelli endogeni di ALLO.

Un naturale meccanismo di modulazione della neuroinfiammazione è la molecola endogena Palmitoiletanolamide (PEA). In pre-clinica e in clinica, la somministrazione di PEA, soprattutto se in forma ultramicronizzata (PEA-um), è in grado di determinare attività di normalizzazione della neuroinfiammazione; in particolare è stato dimostrato come PEA-um sia in grado di sotto-modulare significativamente lo stato neuroinfiammatorio generale dei topi con fenotipo simil-autistico riducendo l'espressione delle citochine pro-infiammatorie IL-6, IL-1b e TNF-a ippocampali e sieriche e modulando lo stato comportamentale alterato. A livello clinico, il trattamento per 3 mesi di bambini autistici con PEA-um 600 mg/die migliora l'aggressività, le capacità cognitive e comportamentali e la comunicazione senza presentare effetti avversi.

Il DHA (C22:6 n-3) è uno degli acidi grassi polinsaturi a lunga catena (PUFA) più abbondanti nell'organismo. È un componente fondamentale di tutte le

membrane cellulari, comprese le cellule del sistema nervoso. La sua diminuzione può scatenare un malfunzionamento del tessuto nervoso influenzando negativamente i processi di apprendimento e di
5 comportamento nonché aggravare la patologia autistica.

Sono stati condotti studi clinici in pazienti affetti da ASD mediante somministrazione di PUFA, tipicamente una miscela di EPA e DHA, a dosi elevate (generalmente superiori ad 1 g al giorno), ma i
10 risultati sono stati scarsi e poco significativi.

Esiste quindi l'esigenza di mettere a disposizione una terapia per l'ASD che risulti efficace, non invasiva e sicura e che, possibilmente, non preveda la somministrazione di dosi elevate di principi attivi.
15 Infatti, tenendo conto che tale terapia sarebbe in primo luogo dedicata ad una popolazione infantile, una somministrazione ripetuta e/o in forme di dosaggio di grandi dimensioni (ad esempio, compresse di grandi dimensioni per la somministrazione orale di elevate dosi
20 di principi attivi) sarebbe difficilmente accettata dal paziente.

Sommario dell'invenzione

La presente invenzione deriva dalla sorprendente scoperta che la palmitoiletanolamide (PEA),
25 preferibilmente se utilizzata in forma ultra-micronizzata, quando somministrata in associazione con

acido docosaesaenoico (DHA), esibisce un effetto sinergicamente rilevante nel migliorare i parametri comportamentali di soggetti autistici e nell'elevare i livelli endogeni di allopregnanolone (ALLO).

5 Un oggetto della presente invenzione è quindi la palmitoiletanolamide per l'uso nel trattamento dei disturbi dello spettro autistico (ASD), in cui la palmitoiletanolammide è somministrata in associazione ad acido docosaesaenoico, in cui detta somministrazione è
10 separata, congiunta o simultanea.

Un ulteriore oggetto dell'invenzione è una composizione contenente palmitoiletanolammide e acido docosaesaenoico, in particolare quando utilizzabile per l'uso nel trattamento dei disturbi dello spettro
15 autistico (ASD).

Ancora un altro oggetto dell'invenzione è la palmitoiletanolamide per l'uso nel trattamento di patologie caratterizzate da diminuzione dei livelli endogeni di allopregnanolone, in cui la
20 palmitoiletanolammide è somministrata in associazione ad acido docosaesaenoico, in cui detta somministrazione è separata, congiunta o simultanea.

Questi ed ulteriori oggetti, come delineati nelle annesse rivendicazioni, verranno descritti nel seguito
25 della descrizione. Il testo delle rivendicazioni deve

considerarsi incluso nella descrizione ai fini della valutazione di sufficienza di descrizione.

Ulteriori caratteristiche e vantaggi dell'invenzione risulteranno dalla descrizione di seguito riportata di
5 esempi preferiti di realizzazione, dati a titolo indicativo e non limitativo.

Breve descrizione delle figure

Figura 1 mostra un grafico di distribuzione granulometrica di palmitoiletanolamide in forma ultra-
10 micronizzata (PEA-um);

Figura 2 mostra l'effetto della sinergia della PEA-um associata al DHA sul comportamento ripetitivo/ossessivo dei topi BTBR. (A) Numero delle biglie sepolte in 15 min; (B) tempo di auto-pulizia
15 speso dai topi C57 e BTBR. Tutti i valori sono riportati come media $\pm$ SEM di 8 animali per ogni gruppo. ****p <0.0001 vs C57 CTR; #p <0.05 vs BTBR CTR; ##p <0.01 vs BTBR CTR;

Figura 3 mostra l'effetto di tutti i trattamenti
20 sulla sociabilità dei topi. (A) Tempo trascorso dai topi C57 nella stanza vuota o occupata da un topo; (B) stessa valutazione per i topi BTBR: solo il trattamento con PEA+DHA è in grado di migliorare la sociabilità dei topi. Tutti i valori sono riportati come media $\pm$ SEM di
25 8 animali per ogni gruppo. *p <0.05 vs C57 CTR; **p

<0.01 vs C57 CTR; ***p <0.001 vs C57 CTR; ****p <0.0001 vs C57 CTR;

Figura 4 mostra l'effetto neurosteroidogeno della sinergia tra PEA-um e DHA. PEA-um associata al DHA
5 aumenta i livelli di ALLO nel plasma dei topi BTBR. PEA+DHA non aumenta i livelli plasmatici di ALLO nei topi C57. Tutti i valori sono riportati come media $\pm$ SEM di 8 animali per ogni gruppo. **p <0.01 vs C57 CTR; (#)p <0.05 vs BTBR CTR.

10 Descrizione dettagliata dell'invenzione

La presente invenzione riguarda in un primo
aspetto la palmitoiletanolamide (PEA) per l'uso nel
trattamento dei disturbi dello spettro autistico (ASD),
in cui la palmitoiletanolammide è somministrata in
15 associazione ad acido docosaesaenoico (DHA), in cui
detta somministrazione è separata, congiunta o
simultanea.

Con il termine "in associazione" si intende sia una
terapia di combinazione che una terapia in cui PEA e DHA
20 sono contenute in un'unica forma di dosaggio.

Con somministrazione "separata" si intende una
somministrazione di PEA e DHA in forme di dosaggio
separate, somministrate in tempi differenti che possono
andare da 1 minuto a svariate ore, ad esempio ad 8, 12 o
25 14 ore di distanza una dall'altra.

Con somministrazione "congiunta" si intende una somministrazione di PEA e DHA contenute in un'unica forma di dosaggio, cioè una composizione o una formulazione farmaceutica o veterinaria, un integratore,
5 una composizione dietetica o un alimento a fini medici speciali.

Con somministrazione "simultanea" si intende una somministrazione di PEA e DHA in forme di dosaggio separate, ma somministrate simultaneamente, ovvero entro
10 un tempo di separazione tra la somministrazione di PEA e quella di DHA, o viceversa, non superiore a 1 minuto.

La palmitoiletanolammide può essere somministrata sotto qualsiasi forma, ad esempio in forma non-micronizzata, in forma micronizzata o in forma ultra-
15 micronizzata.

Con il termine "palmitoiletanolamide (o PEA) in forma non micronizzata" si intende PEA avente una distribuzione granulometrica delle particelle, definita come percentuale in volume e misurata con il metodo
20 della diffusione ("scattering") della luce laser, rappresentata da una curva di distribuzione avente la moda al di sopra di 10 micron, preferibilmente al di sopra di 20 micron.

Con il termine "palmitoiletanolamide (o PEA) in
25 forma micronizzata" si intende PEA avente una distribuzione granulometrica delle particelle, definita

come percentuale in volume e misurata con il metodo della diffusione ("scattering") della luce laser, rappresentata da una curva di distribuzione avente la moda compresa tra 6 micron e 10 micron.

5 Con il termine "palmitoiletanolamide (o PEA) in forma ultra-micronizzata" si intende PEA avente una distribuzione granulometrica delle particelle, definita come percentuale in volume e misurata con il metodo della diffusione ("scattering") della luce laser,
10 rappresentata da una curva di distribuzione avente la moda al di sotto dei 6 micron e al di sopra di 0,5 micron.

Preferibilmente, la PEA è in forma ultra-micronizzata.

15 In una forma di realizzazione, la PEA in forma ultra-micronizzata ha una distribuzione granulometrica come sopra definita, misurata con uno strumento Malvern Mastersizer 3000 con algoritmo di calcolo Fraunhofer, in cui almeno il 95% in volume, più preferibilmente almeno
20 il 99% in volume, di particelle ha una granulometria inferiore a 6 micron.

In una forma di realizzazione particolarmente preferita, la PEA in forma ultra-micronizzata ha una distribuzione granulometrica come sopra definita,
25 misurata con uno strumento Malvern Mastersizer 3000 con algoritmo di calcolo Fraunhofer, avente una moda tra 2 e

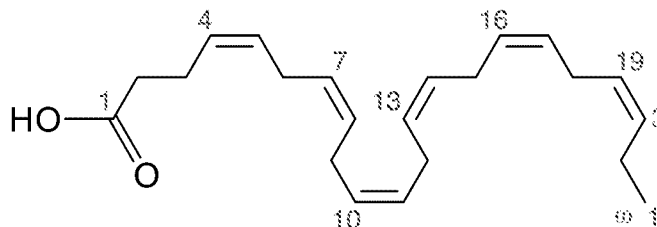
4 micron ed avente il 100% in volume di particelle minori di 10 micron e almeno 60% in volume di particelle minori di 3 micron.

La micronizzazione può essere effettuata in un
 5 impianto a getto fluido (ad esempio, impianto modello Jetmill®) che opera con tecnologia "spiral technology" a getto di aria compressa o di azoto in grado di sfruttare energia cinetica - in luogo della energia meccanica - per frantumare le particelle. Tali apparecchiature sono
 10 convenzionali e non verranno pertanto ulteriormente descritte, se non relativamente alle seguenti caratteristiche:

- Diametro interno della camera di micronizzazione circa 300 mm;
- 15 - Pressione del getto fluido 10-12 bar;
- Alimentazione del prodotto 9-12 kg/hr.

L'acido docosaesaenoico (DHA) appartiene ai cosiddetti PUFA o acidi grassi polinsaturi a lunga catena ed ha la seguente formula di struttura:

20



L'acido docosaesaenoico (DHA), detto anche acido cervonico, è un acido grasso omega-3 o PUFA n-3. Sono ricchi di DHA i pesci oceanici di acque fredde. La maggior parte del DHA presente nei pesci e negli organismi complessi, che vivono nelle fredde acque oceaniche, proviene dalle alghe fotosintetiche. Il DHA è anche prodotto commercialmente da microalghe, *Crypthecodinium cohnii* che è un microrganismo del genere *Schizochytrium*. Il DHA prodotto utilizzando microalghe è di origine vegetale.

Un ulteriore oggetto della presente invenzione è una composizione comprendente palmitoiletanolammide e acido docosaesanoico. Preferibilmente, la composizione dell'invenzione è consistente in una miscela di palmitoiletanolammide e acido docosaesanoico e eccipienti farmaceuticamente accettabili. Più preferibilmente, la palmitoiletanolamide è in forma ultra-micronizzata (PEA-um).

Sia che siano somministrati separatamente o congiuntamente in un'unica formulazione, la PEA e il DHA sono somministrati in rapporto ponderale compreso tra 1:7 e 7:1.

Più in particolare, quando la PEA è in forma ultra-micronizzata, il rapporto ponderale PEA/DHA sarà preferibilmente compreso tra 1:7 e 1:1, più preferibilmente tra 1:5 e 1:2.

Quando la PEA è in forma micronizzata o non micronizzata, il rapporto ponderale PEA/DHA sarà preferibilmente compreso tra 1:1 e 7:1, più preferibilmente tra 2:1 e 5:1.

5 Per gli scopi dell'invenzione, la PEA da sola, il DHA da solo o la composizione contenente PEA e DHA possono essere incluse in formulazioni farmaceutiche o veterinarie e possono essere formulate in forme di dosaggio per una somministrazione orale, buccale,
10 parenterale, rettale o transdermica.

Per la somministrazione orale, i composti dell'invenzione si possono trovare, per esempio, sotto forma di compresse o capsule, dure o molli, preparate nel modo convenzionale con gli eccipienti
15 farmaceuticamente accettabili quali agenti leganti (ad esempio amido di mais pregelatinizzato, polivinilpirrolidone o metilcellulosa idrossipropil); agenti di riempimento (ad esempio lattosio, cellulosa microcristallina o idrogeno fosfato di calcio);
20 lubrificanti (ad esempio stearato di magnesio, talco o silice); disintegranti (ad esempio amido di patata o glicolato amido di sodio); o agenti inibenti (ad esempio lauril-solfato di sodio). Le compresse possono essere ricoperte con i metodi ben noti nell'arte. Le
25 preparazioni liquide per la somministrazione orale

possono presentarsi, per esempio, sotto forma di soluzioni, sciroppi o sospensioni oppure si possono presentare come prodotti liofilizzati o granulati da ricostituire, prima dell'uso, con acqua o altri
5 opportuni veicoli. Tali preparazioni liquide possono essere preparate attraverso i metodi convenzionali con gli additivi farmaceuticamente accettabili quali agenti di sospensione (ad esempio sciroppo di sorbitolo, derivati della cellulosa o grassi idrogenati
10 commestibili); agenti emulsionanti (ad esempio lecitina o acacia); veicoli non acquosi (ad esempio olio di mandorle, esteri oleosi, alcool etilico o oli vegetali frazionati); e conservanti (ad esempio metil- o propil-p-idrossibenzoati o acido sorbico). La preparazione può
15 anche opportunamente contenere aromi, coloranti e agenti dolcificanti.

Le preparazioni per la somministrazione orale possono essere formulate in modo opportuno per permettere il rilascio controllato del principio attivo.

20 Per la somministrazione buccale, i composti dell'invenzione possono trovarsi sotto forma di compresse o pastiglie formulate nel modo convenzionale, adatte ad un assorbimento a livello della mucosa buccale. Formulazioni buccali tipiche sono le compresse
25 per somministrazione sub-linguale.

I composti dell'invenzione possono essere formulati per una somministrazione parenterale mediante iniezione. Le formulazioni per le iniezioni possono essere presentate in forma di un'unica dose, ad esempio in
5 fiale, con un conservante aggiunto. Le composizioni possono presentarsi sotto tale forma come sospensioni, soluzioni o emulsioni in veicoli oleosi o acquosi e possono contenere agenti del formulario quali agenti di sospensione, stabilizzanti e/o disperdenti. In
10 alternativa, il principio attivo o la miscela di principi attivi si può trovare sotto forma di polvere per essere ricostituito, prima dell'uso, con un opportuno veicolo, ad esempio con acqua sterile.

I composti dell'invenzione possono anche essere
15 formulati secondo formulazioni rettali quali supposte o clistere da ritenzione, ad esempio contenenti i componenti base delle comuni supposte come burro di cacao o altri gliceridi.

In aggiunta alle formulazioni descritte
20 precedentemente, i composti dell'invenzione possono anche essere formulati come preparazione di deposito. Tali formulazioni a lunga azione possono essere somministrate per impianto (ad esempio in modo sottocutaneo, transcutaneo o intramuscolare) o per
25 iniezione intramuscolare. Quindi, per esempio, la

composizione può essere formulata con appropriati materiali polimerici o idrofobici (per esempio sotto forma di un'emulsione in un olio adatto) o resine a scambio ionico o come derivati minimamente solubili.

5 Secondo la presente invenzione la dose giornaliera di PEA proposta per la somministrazione ad un uomo (con peso corporeo di circa 70 Kg) va da 10 mg a 1500 mg oppure, se si usa PEA in forma ultra-micronizzata, da 10 mg a 500 mg di PEA. Tale dose giornaliera può essere
 10 suddivisa in unità di dose per una somministrazione, per esempio, da 1 a 4 volte al giorno. La dose dipenderà dalla forma in cui viene somministrata la PEA, cioè se viene somministrata PEA non micronizzata, PEA micronizzata o PEA ultra-micronizzata. La dose dipenderà
 15 anche dalla via prescelta per la somministrazione. Si dovrà considerare che potrebbe essere necessario fare continue variazioni del dosaggio a seconda dell'età e del peso del paziente ed anche della gravità della condizione clinica da trattare. L'esatta dose e la via
 20 di somministrazione saranno infine a discrezione del medico curante o del veterinario.

Un ulteriore oggetto dell'invenzione sono anche composizioni dietetiche, integratori alimentari e alimenti a fini medici speciali (AFMS) comprendenti PEA,

preferibilmente PEA ultra-micronizzata, e DHA per l'uso nel trattamento di ASD.

Con il termine "alimenti a fini medici speciali" si intendono i prodotti autorizzati secondo il regolamento (UE) 2016/128. Tale termine si riferisce ad un prodotto da somministrare sotto controllo medico, assimilando quindi tale AFMS ad un farmaco.

Le formulazioni secondo l'invenzione possono essere preparate secondo metodiche convenzionali, quali quelle descritte in Remington's Pharmaceutical Sciences Handbook, Mack Pub. Co., N.Y., USA, 17th edition, 1985 o in Remington, The Science and Practice of Pharmacy, Edited by Allen, Loyd V., Jr, 22nd edition, 2012.

PARTE SPERIMENTALE

Procedimento di micronizzazione

La PEA è stata micronizzata come descritto in precedenza.

La ultra-micronizzazione è stata effettuata in un impianto a getto fluido (in particolare, impianto modello Jetmill®) che opera con tecnologia "spiral technology" a getto di aria compressa.

Condizioni ottimali di micronizzazione:

- diametro interno camera di micronizzazione
300 mm;
- pressione getto fluido 8 bar;
- alimentazione prodotto 9-12 kg/h.

5 Determinazione della distribuzione
granulometrica

La determinazione della distribuzione granulometrica è stata condotta su un campione ad umido, dopo sonicazione di 1 minuto.

10 E' stato utilizzato uno strumento Malvern Mastersizer 3000 operante con la tecnica LALLS (Low Angle Laser Light Scattering) ed un algoritmo di calcolo Fraunhofer.

Il grafico di distribuzione granulometrica è
15 riportato in figura 1.

Sperimentazione biologica

Nella sperimentazione *in vivo* sono stati utilizzati topi maschi C57BL/6J (C57) sani e topi BTBR T+tf/J (BTBR) (The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) di
20 90 giorni nutriti *ad libitum* e alloggiati in gabbie con ciclo sonno/veglia controllato. Prima dell'inizio della sperimentazione, gli animali sono stati sottoposti ad un periodo di acclimatazione di 1 settimana considerando tutte le procedure ed i protocolli sperimentali conformi
25 ai principi della cura e del benessere degli animali da

laboratorio approvati dal Ministero della Salute Italiano (D.Lgs 2014/26) e dalle direttive europee (EU Directive 2010/63).

I topi BTBR presentano un fenotipo simil-autistico
 5 in grado di riprodurre i principali sintomi dell'ASD con
 comparsa di deficit comportamentali in un periodo
 paragonabile alla prima infanzia del bambino. Grazie ai
 numerosi polimorfismi dovuti alle mutazioni di singoli
 nucleotidi implicati nello sviluppo del sistema nervoso
 10 e delle sinapsi, i topi BTBR sono completamente privi
 del corpo calloso e soggetti ad una commissura
 ippocampale gravemente ridotta (Wahlsten D. et al.,
Survey of 21 inbred mouse strains in two laboratories
reveals that BTBR T/+ tf/tf has severely reduced
 15 *hippocampal commissure and absent corpus callosum*, Brain
 Res. 2003, 971: 47-54). Questo ceppo presenta diversi
 sintomi di autismo tra cui ridotte interazioni sociali,
 espressioni di gioco alterate, ridotto comportamento
 esplorativo, vocalizzazioni inusuali ed ansia (McFarlane
 20 HG et al., *Autism-like behavioral phenotypes in BTBR*
T+tf/J mice, Genes Brain Behav. 2008, 7: 152-63;
 Scattoni ML et al., *Unusual repertoire of vocalizations*
in the BTBR T+tf/J mouse model of autism, PLoS One 2008,
 3: e3067); presenta inoltre livelli di ALLO
 25 particolarmente ridotti (Ebihara K. et al., *Decrease in*
endogenous brain allopregnanolone induces autism

spectrum disorder (ASD)-like behavior in mice: A novel animal model of ASD, Behav Brain Res. 2017, 334: 6-15; Chew L. et al., *Association of serum allopregnanolone with restricted and repetitive behaviors in adult males with autism Psychoneuroendocrinology*, 2021, 123: 105039).

Metodiche sperimentali e risultati

Gli animali sani C57 e gli animali BTBR sono stati randomizzati in 8 gruppi da 8 topi ciascuno e trattati per os, a partire dal quarto mese di vita, con carbossimetilcellulosa (CMC) 1.5% (veicolo usato per sospendere le molecole), con PEA ultramicronizzata (PEA-um) 1 mg/kg da sola, con DHA 5 mg/kg da solo (30 mg/kg di DHA a titolo 17%) e con PEA-um 1 mg/kg associata a DHA 5 mg/kg (30 mg/kg di DHA a titolo 17%), ogni giorno per 10 giorni:

- Gruppo 1: topi C57 trattati con CMC 1.5% come controllo (CTR);
- Gruppo 2: topi C57 trattati con PEA-um 1 mg/kg sospesa in CMC 1.5% (PEA);
- Gruppo 3: topi C57 trattati con DHA 5 mg/kg (30 mg/kg di DHA a titolo 17%) sospeso in CMC 1.5% (DHA);
- Gruppo 4: topi C57 trattati con PEA-um 1 mg/kg e DHA 5 mg/Kg (30 mg/kg di DHA a titolo 17%) sospesi in CMC 1.5% (composizione PEA+DHA);

- Gruppo 5: topi BTBR trattati con CMC 1.5% (CTR);
- Gruppo 6: topi BTBR trattati con PEA-um 1 mg/kg sospesa in CMC 1.5% (PEA);
- Gruppo 7: topi BTBR trattati con DHA 5 mg/Kg (30 mg/kg di DHA a titolo 17%) sospeso in CMC 1.5% (DHA);
- Gruppo 8: topi BTBR trattati con PEA-um 1 mg/kg e DHA 5 mg/Kg (30 mg/kg di DHA a titolo 17%) sospesi in CMC 1.5% (composizione PEA+DHA).

10 Gli animali sono stati sottoposti ad eutanasia dopo
10 giorni dall'inizio della somministrazione dei
trattamenti. Il plasma è stato raccolto per il dosaggio
con la metodica HPLC (Agilent) del neurosteroido ALLO.
Gli animali, prima di essere sacrificati, sono stati
15 sottoposti a test comportamentali per studiare il
fenotipo ripetitivo/ossessivo (Marble Burying test e
Self Grooming test) e la sociabilità.

Tutti i test comportamentali sono stati condotti
dagli stessi topi con un intervallo di tempo sufficiente
20 tra un test e l'altro e partendo da quello meno
stressante (Paylor R. et al., *The use of behavioral test
batteries, II: effect of test interval*, Physiol. Behav.
2006, 87: 95-102).

Analisi statistica

25 Tutti i valori riportati nei risultati sono espressi
come media $\pm$ errore standard della media (SEM) di N

osservazioni (N = numero di animali). Le differenze statistiche nel dosaggio dell'ALLO e nello score comportamentale sono state analizzate con ANOVA one-way, seguito da Sidak's multiple comparisons. Il p-value
 5 <0,05 è considerato significativo.

Rilevazione del comportamento ossessivo e ripetitivo

Nel Marble Burying test, 20 biglie sono state disposte in una griglia all'interno di una gabbia di plexiglas riempita con 5 cm di lettiera pulita. Ogni
 10 topo è stato posizionato nella gabbietta e, dopo 15 minuti di sessione, rimosso delicatamente per contare il numero di biglie sepolte. I topi BTBR trattati con solo veicolo (CTR), sola PEA-um 1 mg/kg (PEA) e solo DHA 30 mg/kg (DHA), sotterrano in maniera ossessiva le biglie.
 15 Viceversa, il trattamento con PEA-um 1 mg/kg somministrata in associazione al DHA 30 mg/kg riduce significativamente l'atteggiamento ossessivo dei topi nel nascondere le biglie. A riprova di quanto sopra, tutti gli animali C57 (animali sani) sottoposti ai
 20 trattamenti, non hanno mostrato significative variazioni nel numero di biglie sotterrate (Fig. 2A).

Nel Self Grooming test, i topi sono stati collocati in una gabbia di plexiglas vuota (30x40 cm) e lasciati liberamente esplorare l'arena. Dopo 10 minuti di
 25 ambientamento, l'attività di *self grooming* è stata monitorata per 20 minuti. Sono stati presi in

considerazione l'atteggiamento ripetitivo nel lavare la testa, il corpo, la zona genitale e la coda e nel leccare le zampe e le gambe.

Solo il trattamento con PEA+DHA somministrati in
 5 associazione è in grado di ridurre i secondi spesi dai
 topi BTBR nel *self-grooming*. Gli animali con ASD dei
 gruppi CTR, PEA e DHA, non hanno dimostrato alcuna
 riduzione del tempo (s) speso nell'auto-pulizia (Fig.
 2B). Anche in questo caso, nei topi C57 (animali sani)
 10 non si notano differenze tra controlli ed animali
 trattati.

Sociabilità degli animali

L'interazione sociale è stata esaminata utilizzando
 uno strumento a tre camere. Questo test consiste in 3
 15 fasi: nella prima fase l'animale viene acclimatato per 5
 minuti nell'arena vuota (centro). Nella sessione
 successiva, di 10 minuti, l'animale viene esposto ad una
 camera vuota posta nel lato sinistro dello strumento o
 ad un topo sconosciuto posto nella camera di destra.

20 Nell'ultima fase di 10 minuti, è stata valutata la
 preferenza del topo nello stare nella stanza vuota o in
 presenza del topo (Crawley JN, *Designing mouse
 behavioral tasks relevant to autistic-like behaviors*,
 Ment. Retard Dev. Disabil. Res. Rev. 2004, 10: 248-258).
 25 Il tempo trascorso in ciascuna camera, è stato rilevato

da una videocamera accoppiata ad un software di tracciamento del video.

I topi sani C57 presentano un potenziamento della sociabilità nei confronti di un altro topo anche a seguito dei trattamenti con sola PEA-um o con solo DHA alle concentrazioni non attive di 1 mg/kg e 30 mg/kg (Fig. 3A). Viceversa, nei topi BTBR, la cui sociabilità è ridotta, solo la sinergia tra PEA-um associata al DHA migliora la sociabilità degli animali autistici portando i topi a trascorrere più tempo in compagnia di un loro simile. Gli animali BTBR trattati con veicolo, PEA-um 1 mg/kg da sola e DHA 30 mg/kg da solo non hanno dimostrato miglioramenti sociali continuando a trascorrere il loro tempo nel lato vuoto dello strumento (Fig. 3B).

La sinergia tra PEA-um associata al DHA incrementa i livelli endogeni del neurosteroido ALLO nei topi con ASD

I topi BTBR presentano una significativa riduzione dei livelli plasmatici di ALLO; questo andamento è riscontrabile anche negli animali BTBR trattati con PEA-um 1 mg/kg e DHA 30 mg/kg. Solo il gruppo di animali BTBR trattati con l'associazione PEA-um 1 mg/kg + DHA 30 mg/kg presenta un significativo aumento dei livelli plasmatici del neurosteroido ALLO. Tutti i trattamenti effettuati nei topi sani C57 non hanno indotto alcun incremento plasmatico di ALLO (Fig. 4).

Da quanto qui sopra dimostrato, l'effetto sinergico derivante dall'associazione tra PEA e DHA permette di utilizzare dosaggi di entrambi i principi attivi più bassi di quelli normalmente utilizzati quando tali
5 principi attivi sono somministrati da soli o, nel caso di DHA, con altri PUFA, quale ad esempio EPA.

La presente invenzione mette quindi a disposizione un metodo di trattamento di disturbi dello spettro autistico (ASD) che comprende o consiste nella
10 somministrazione, ad un soggetto affetto da ASD, di PEA, preferibilmente in forma ultra-micronizzata, e DHA, in cui detta somministrazione è separata, congiunta (cioè in un'unica forma di dosaggio) o simultanea ed in cui PEA e DHA sono somministrati ad un dosaggio a cui,
15 quando somministrati da soli, PEA e DHA sono inattivi.

Preferibilmente, i dosaggi di PEA-um e di DHA somministrati ad una paziente in età infantile o adolescenziale sono, rispettivamente, uguali o inferiori a 500 mg/die ed a 700 mg/die, o più preferibilmente
20 uguali o inferiori a 300 mg/die ed a 500 mg/die.

Inoltre, la presente invenzione mette a disposizione un metodo per aumentare i livelli endogeni di allopregnanolone in un soggetto in cui detti livelli endogeni sono inferiori ai livelli normali (cioè
25 preferibilmente inferiori a 0,7 nmol/L), che comprende o consiste nella somministrazione, a detto soggetto, di

PEA, preferibilmente in forma ultra-micronizzata, e DHA, in cui detta somministrazione è separata, congiunta (cioè in un'unica forma di dosaggio) o simultanea ed in cui PEA e DHA sono somministrati ad un dosaggio a cui, quando somministrati da soli, PEA e DHA sono inattivi.

Tale metodo permette quindi il trattamento non solo di soggetti affetti da ASD, ma anche di soggetti affetti da sindromi depressive, in particolare da depressione post-partum.

10

L'invenzione sarà ora ulteriormente descritta per mezzo dei seguenti esempi di formulazioni.

Esempi di formulazione

PEA-um = Palmitoiletanolamide ultra-micronizzata

15

Esempio 1 - Capsule di gelatina molle

Contenuto della capsula 12-Twist-off:

PEA-um	mg 150,00
DHA (titolo55%)	mg 435,00
Olio di arachidi	mg 40,00
Lecitina di soja	mg 20,00
Alfa-tocoferolo	mg 10,00
Glicerile monostearato	mg 10,00
Composizione della capsula:	
Gelatina bovina	mg 237,00
glicerolo	mg 130,00

20

25

Acqua	mg 19,00
-------	----------

Pigmenti	mg 0,07
----------	---------

Esempio 2 - Sciroppo

Composizione per 100 ml:

5	Saccarosio	g 25,0
	Palmitoiletanolamide-m	g 12,0
	DHA con titolo 55%	g 5,0
	Cellulosa microcristallina	g 1,35
	Tocoferolo naturale (1000UI/g)	g 1,0
10	Sodio Carbossimetilcellulosa	g 0,65
	Sorbitano monooleato	g 0,40
	Polisorbato 80	g 0,10
	Aroma naturale	g 0,10
	Potassio sorbato	g 0,09
15	Acido benzoico	g 0,07
	Acido citrico	g 0,05
	Acqua	q.b. a 100ml

Esempio 3 - Granulato dispersibile

Contenuto della bustina monodose:

20	Palmitoiletanolamide	mg 250
	DHA polvere con titolo 17%	mg 1400
	Maltodestrine	mg 500
	Fruttosio	mg 300
	Destrosio	mg 200
25	Tocoferolo acetato 50%	mg 200
	(polvere su silice)	

	Acido citrico	mg	50
	Pluronic F-68	mg	50
	Aroma naturale	mg	50
	Magnesio Stearato	mg	10
5	Polisorbato 80	mg	10

RIVENDICAZIONI

1. Palmitoiletanolamide per l'uso nel trattamento dei disturbi dello spettro autistico (ASD), in cui la palmitoiletanolammide è somministrata in associazione ad acido docosaesaenoico (DHA), in cui detta somministrazione è separata, congiunta o simultanea.

2. Palmitoiletanolamide per l'uso secondo la rivendicazione 1, in cui la palmitoiletanolammide è in forma non micronizzata, avente una distribuzione granulometrica delle particelle, definita come percentuale in volume e misurata con il metodo della diffusione della luce laser, rappresentata da una curva di distribuzione avente la moda al di sopra di 10 micron, preferibilmente al di sopra di 20 micron.

3. Palmitoiletanolamide per l'uso secondo la rivendicazione 1, in cui la palmitoiletanolammide è in forma micronizzata, avente una distribuzione granulometrica delle particelle, definita come percentuale in volume e misurata con il metodo della diffusione della luce laser, rappresentata da una curva di distribuzione avente la moda compresa tra 6 micron e 10 micron.

4. Palmitoiletanolamide per l'uso secondo la rivendicazione 1, in cui la palmitoiletanolamide è in forma ultra-micronizzata, avente una distribuzione granulometrica delle particelle, definita come

percentuale in volume e misurata con il metodo della diffusione della luce laser, rappresentata da una curva di distribuzione avente la moda al di sotto dei 6 micron e al di sopra di 0,5 micron.

5. Palmitoiletanolamide per l'uso secondo la rivendicazione 4, avente una distribuzione granulometrica delle particelle, definita come percentuale in volume e misurata con il metodo della diffusione della luce laser, misurata con uno strumento Malvern Mastersizer 3000 con algoritmo di calcolo Fraunhofer, in cui almeno il 95% in volume, preferibilmente almeno il 99% in volume, di particelle ha una granulometria inferiore a 6 micron.

6. Palmitoiletanolamide per l'uso secondo la rivendicazione 4, in cui la palmitoiletanolamide ha una distribuzione granulometrica delle particelle, definita come percentuale in volume e misurata con il metodo della diffusione della luce laser, misurata con uno strumento Malvern Mastersizer 3000 con algoritmo di calcolo Fraunhofer, avente una moda tra 2 e 4 micron ed avente il 100% in volume di particelle minori di 10 micron e almeno 60% in volume di particelle minori di 3 micron.

7. Palmitoiletanolammide per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6, in cui la PEA e il DHA sono somministrati in rapporto ponderale compreso

tra 1:7 e 7:1.

8. Palmitoiletanolammide per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 4 a 6, in cui il rapporto ponderale PEA/DHA è compreso tra 1:7 e 1:1, preferibilmente tra 1:5 e 1:2.

9. Palmitoiletanolamide per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 8, in cui la dose giornaliera di PEA per la somministrazione ad un soggetto va da 10 mg a 1500 mg oppure, se si usa PEA in forma ultra-micronizzata, da 10 mg a 500 mg di PEA, oppure i dosaggi di PEA e DHA per un soggetto in età infantile o adolescenziale sono uguali o inferiori rispettivamente a 500 mg/die ed a 700 mg/die, o preferibilmente uguali o inferiori a 300 mg/die ed a 500 mg/die.

10. Palmitoiletanolamide per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 9, in cui la palmitoiletanolamide ed il DHA sono contenuti in formulazioni farmaceutiche o veterinarie e sono formulati in forme di dosaggio per una somministrazione orale, buccale, parenterale, rettale o transdermica.

11. Palmitoiletanolamide per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 9, in cui la palmitoiletanolamide ed il DHA sono contenuti in composizioni dietetiche, integratori alimentari o alimenti a fini medici speciali (AFMS).

12. Palmitoiletanolammide per l'uso nel trattamento di soggetti aventi livelli endogeni di allopregnanolone inferiori ai livelli normali, preferibilmente inferiori a 0,7 nmol/L, che comprende o consiste nella somministrazione, a detti soggetti, di PEA, preferibilmente in forma ultra-micronizzata, e DHA, in cui detta somministrazione è separata, congiunta o simultanea.

13. Palmitoiletanolammide secondo la rivendicazione 12, per l'uso nel trattamento di sindromi depressive, preferibilmente di depressione post-partum.

14. Composizione comprendente o consistente in una miscela di palmitoiletanolammide, preferibilmente palmitoiletanolammide ultra-micronizzata, e acido docosaesanoico e eccipienti farmaceuticamente accettabili, in cui la palmitoiletanolammide e l'acido docosaesanoico sono contenuti in rapporto ponderale compreso tra 1:7 e 7:1 oppure, quando la palmitoiletaolammide è in forma ultra-micronizzata, in rapporto ponderale compreso tra 1:7 e 1:1, preferibilmente tra 1:5 e 1:2.

15. Formulazione farmaceutica o veterinaria, composizioni dietetiche, integratori alimentari o alimenti a fini medici speciali comprendenti la composizione secondo la rivendicazione 14.

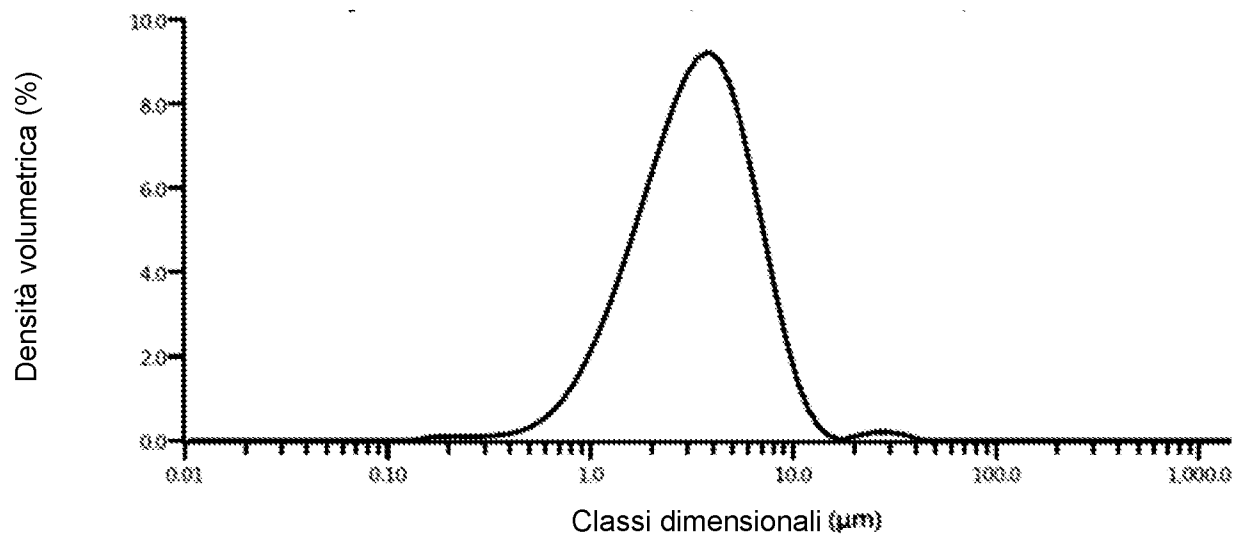


FIG. 1

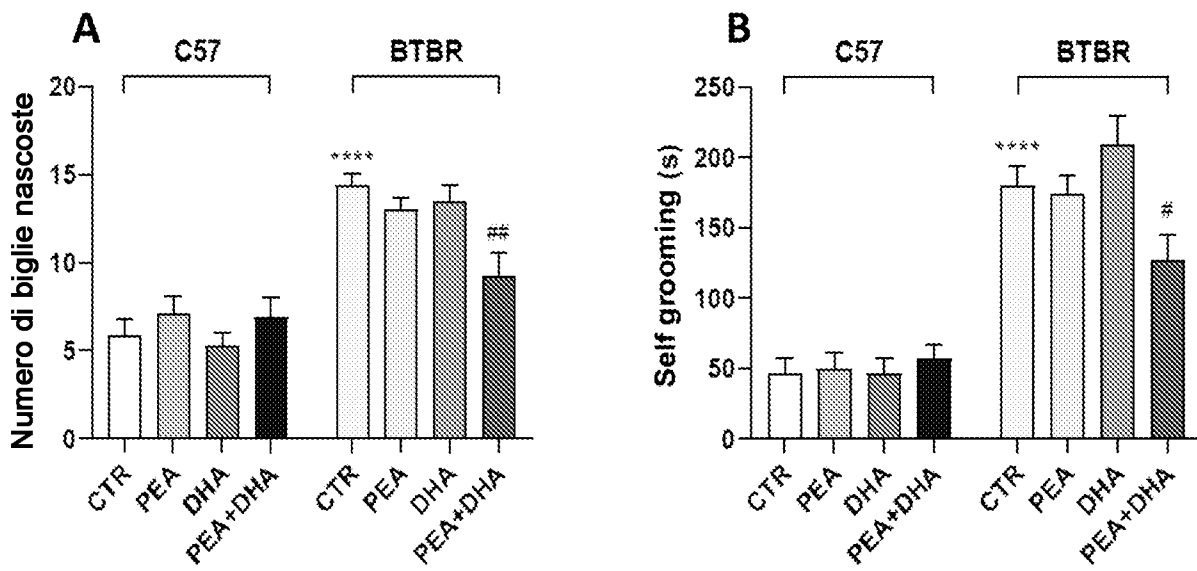


FIG. 2

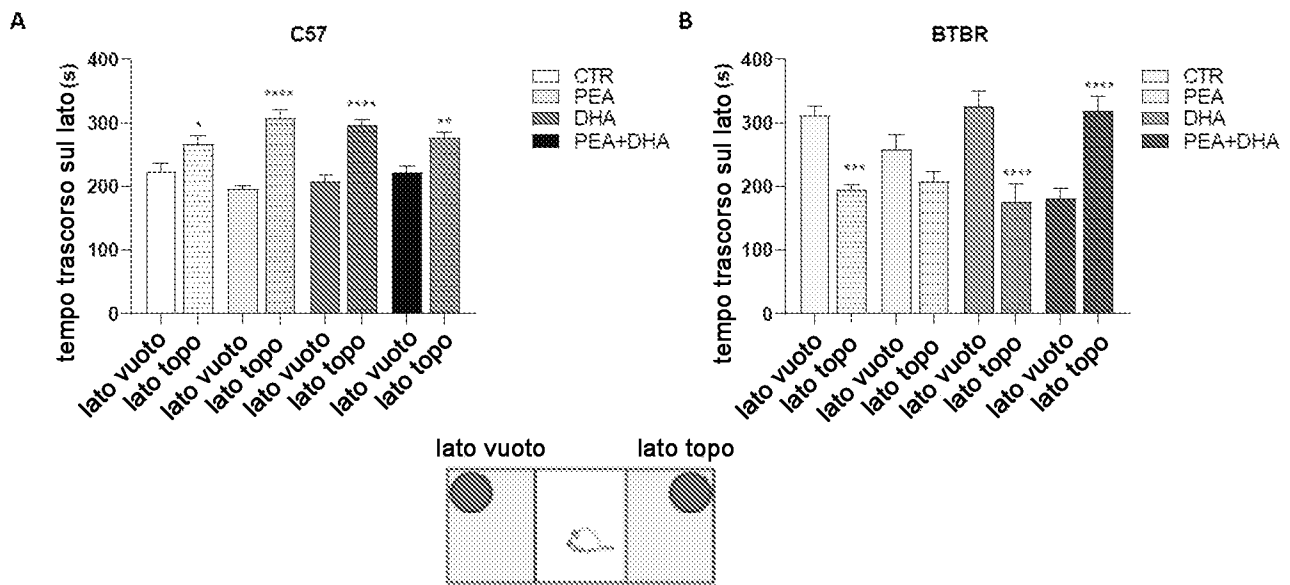


FIG. 3

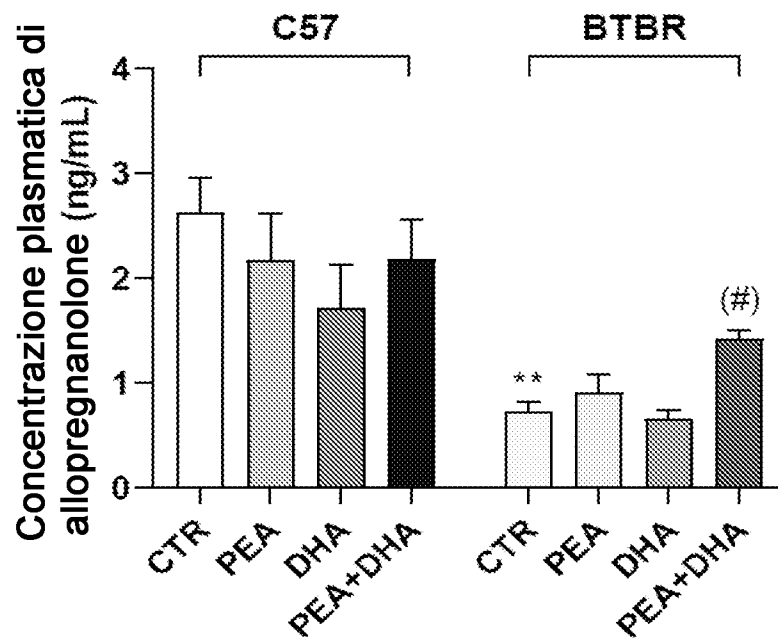


FIG. 4