

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040818**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.07.29

(51) Int. Cl. *A61K 31/4184* (2006.01)
A61K 31/19 (2006.01)

(21) Номер заявки
201791882

(22) Дата подачи заявки
2016.02.24

(54) **СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ЭПИЛЕПТИЧЕСКОГО РАССТРОЙСТВА С ПОМОЩЬЮ АГОНИСТА РЕЦЕПТОРА 5HT**

(31) **62/120,726**

(32) **2015.02.25**

(33) **US**

(43) **2018.02.28**

(86) **PCT/US2016/019368**

(87) **WO 2016/138138 2016.09.01**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ДЗЕ РИДЖЕНТС ОФ ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ КАЛИФОРНИЯ
(US)**

(56) US-A1-20050215589
WO-A2-2008133884
WO-A2-2009105507
US-A1-20080064671
WO-A1-2014123909
US-A1-20140329893
WO-A2-2007093880
US-B1-6780869
US-A1-20030166581
US-A1-20110052536

(72) Изобретатель:
Барабан Скотт К. (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к способу лечения эпилептического расстройства с помощью агониста рецептора 5HT или его фармацевтически приемлемой соли, где указанный агонист рецептора 5HT представляет собой тразодон или лоркасерин, где указанное эпилептическое расстройство представляет собой синдром Драве или синдром Леннокса-Гасто.

040818

B1

040818
B1

По настоящей заявке испрашивается приоритет заявке США № 62/120726, поданной 25 февраля 2015 г., содержание которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

Утверждение о правах на изобретение, осуществленное в рамках спонсируемого правительством исследования и разработки

Настоящее изобретение было осуществлено при поддержке правительства под номером гранта R01 NS 07921403, выданного National Institutes of Health. Правительство имеет определенные права на изобретение.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к способам лечения эпилептического расстройства с использованием агониста рецептора 5HT или его фармацевтически приемлемой соли.

Уровень техники, к которому относится изобретение

Синдром Драве (DS) представляет собой катастрофическую педиатрическую эпилепсию с тяжелой умственной отсталостью, ухудшенным социальным развитием и длительными резистентными к лекарственным средствам припадками. Одной из его основных причин являются мутации в Nav1.1 (SCN1A), потенциалзависимом натриевом канале. Припадки, которые испытывают индивиды с DS и другими эпилептическими расстройствами, контролируются с использованием доступных противоэпилептических лекарственных средств (AED) в недостаточной степени, и дети с DS являются кандидатами для нейрохирургической резекции. Таким образом, в данной области существует потребность в возможностях лечения эпилепсии, особенно DS и родственных катастрофических педиатрических эпилепсии. В настоящем описании предоставлены решения этих проблем и других проблем уровня техники.

Краткое описание сущности изобретения

В настоящем описании предоставлены способы лечения эпилептических расстройств с использованием агониста 5HT или его фармацевтически приемлемой соли. В одном аспекте способ включает введение индивидууму, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества агониста 5HT, аналога агониста 5HT или их фармацевтически приемлемой соли.

Согласно аспекту изобретения способ лечения эпилептического расстройства может включать введение пациенту, имеющему эпилептическое расстройство, терапевтически эффективного количества агониста рецептора 5HT или его фармацевтически приемлемой соли.

В иллюстративном варианте осуществления агонист 5HT может представлять собой агонист рецептора 5HT_{2A} или агонист рецептора 5HT_{2B}. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления предусматривается, что агонист 5HT может представлять собой один или несколько из ACP-104, ACP-106, AR-116081, AR-116082, ATHX-105, белладонны в комбинации с эрготамин тартратом, BW 723C86, цизаприда, циза-MPS, цизапа, цизап-Mps, CSC-500 Series, DOI или его соли (например, HCl), эрготамин тартрата и кофеина, эзолида MPS, флибансерина, икарана L.P., манотака плюс, мигрилла, миртазапина римафар, миртазапина, наратриптана, нелотансерина, норфенфлурамина, нормагута таб., нефадозона гидрохлорида, OSU-6162, придофина, сенсифлу, PRX-00933, RP-5063, низкомолекулярного агониста 5-HT_{2A} против воспалительных заболеваний, низкомолекулярного агониста 5-HT_{2C} против шизофрении и ожирения, низкомолекулярного агониста рецептора 5-HT_{2C} против ожирения, низкомолекулярных соединений для нацеливания на рецептор 5-HT_{2C} и 5-HT₆ против шизофрении, низкомолекулярных соединений для модулирования 5HT₂ против нарушений ЦНС и метаболических нарушений, TGBA-01AD, тразодона гидрохлорида, теманогрела гидрохлорида, вабикасерина гидрохлорида, вирдекса, VR-1065, зипразидона гидрохлорида и/или зипразидона-сигиллаты.

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления предусматривается, что агонистом рецептора 5HT не является клемизол или фенфлурамин. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления, кроме того, предусматривается, что агонист рецептора 5HT не является ацетазоламидом, бензодиазепином (дiazepam; клобазам), каннабидиолом, карбамазепином, клемизолом, этосуксимидом, фелбаматом, фенфлурамином, флуоксетином, габапентином, ганаксолоном, лакозамидом, ламотригином, леветирацетамом, нитразепамом, окскарбазепином, перампенелом, фенитоином, фенобарбиталом, пирарцетамом, бромидом калия, прегабалином, примидоном, ретигабином, руфинамидом, стирипентолом, тиагабином, топираматом, вальпроевой кислотой, верапамиллом, вигабатрином и/или зонисамидом.

В иллюстративном варианте осуществления агонист рецептора 5HT связывается прямо с рецептором 5HT. В иллюстративном варианте осуществления агонист рецептора 5HT специфически активирует рецептор 5HT.

В иллюстративном варианте осуществления агонист рецептора 5HT обеспечивает повышенную активность, опосредуемую рецептором 5HT_{2A} или рецептором 5HT_{2B}, с эквивалентной или сниженной активностью, опосредуемой рецептором 5HT_{2C}.

В иллюстративном варианте осуществления агонист рецептора 5HT представляет собой двойной агонист рецептора 5HT_{2A} и рецептора 5HT_{2B}.

В иллюстративном варианте осуществления агонист рецептора 5HT не является ингибитором обратного захвата серотонина.

В иллюстративном варианте осуществления агонист рецептора 5HT не связывает или не модулирует в значительной степени активность по меньшей мере одного из рецептора 5HT_{1A}, 5HT_{1B}, 5HT_{1D}, 5HT_{2C},

5HT₃, 5HT₄ (например, 5HT_{4c}), 5HT₆, 5HT₇, NPY Y1, Ca-канала L-типа, Ca-канала N-типа, SK-Ca-канала, GABA-зависимого Cl-канала, переносчика GABA, рецептора GABA-A1, рецептора GABA-B1b, Na-канала, переносчика 5HT, рецептора CB1, рецептора CB2, BZD или ER эстрогена альфа.

В иллюстративном варианте осуществления агонист рецептора 5HT представляет собой любой один или несколько из флибансерина, 2,5-диметокси-4-йодамфетамина моногидрохлорида (DOI HCl), норфенфлурамина или BW 723C86.

В иллюстративном варианте осуществления эпилептическое расстройство представляет собой синдром Драве, синдром Леннокса-Гасто, младенческие судороги или синдром Отахара. В иллюстративном варианте осуществления эпилептическое расстройство представляет собой синдром Драве. В иллюстративном варианте осуществления эпилептическое расстройство представляет собой педиатрическое эпилептическое расстройство.

В иллюстративном варианте осуществления индивидуум имеет сердечно-сосудистое заболевание.

В иллюстративном варианте осуществления индивидуум является резистентным к лечению ингибитором обратного захвата серотонина.

В иллюстративном варианте осуществления индивидуум подвержен побочным эффектам при введении ингибитора обратного захвата серотонина. В иллюстративном варианте осуществления ингибитором обратного захвата серотонина является фенфлурамин.

В иллюстративном варианте осуществления индивидуум имеет кетогенную диету.

В иллюстративном варианте осуществления агонист рецептора 5HT ингибирует компульсивное поведение или электрографические припадки у индивидуума с эпилепсией, индивидуума с болезнью Альцгеймера, индивидуума с аутизмом или индивидуума с болезнью Паркинсона.

В иллюстративном варианте осуществления агонист рецептора 5HT снижает встречаемость неспровоцированных припадков у указанного индивидуума по сравнению с отсутствием указанного агониста рецептора 5HT.

В иллюстративном варианте осуществления введение указанного агониста рецептора 5HT снижает или предупреждает миоклонические судороги или эпилептический статус у указанного индивидуума по сравнению с отсутствием агониста рецептора 5HT.

В иллюстративном варианте осуществления агонист рецептора 5HT вводят указанному индивидууму в количестве от приблизительно 0,1 до приблизительно 1000 мг на кг массы тела.

В иллюстративном варианте осуществления агонист рецептора 5HT вводят указанному индивидууму в суточной дозе от приблизительно 0,1 до приблизительно 1000 мг на кг массы тела указанного индивидуума.

В иллюстративном варианте осуществления агонист рецептора 5HT вводят совместно с противоэпилептическим лекарственным средством (AED). В иллюстративном варианте осуществления агонист рецептора 5HT представляет собой вспомогательную терапию для противоэпилептического лекарственного средства (AED). В иллюстративном варианте осуществления агонист рецептора 5HT представляет собой ацетазоламид, бензодиазепин, каннабадиолы, карбамазепин, клобазам, клонезепам, эсикарбазепина ацетат, этосуксимид, этотолон, фелбамат, фенфлурамин, фосфенитоин, габапентин, ганаколлон, гуперзин А, лакозамид, ламотригин, леветирацетам, нитразепам, окскарбазепин, перампанел, пирацетам, фенобарбитал, фенитоин, бромид калия, прегабалин, примидон, ретигабин, руфинамид, вальпроевую кислоту, вальпроат натрия, стирипентол, тиагабин, топирамат, вигабатрин или зонисамид. В иллюстративном варианте осуществления AED представляет собой вальпроевую кислоту, вальпроат натрия, клонезепам, этосуксимид, фелбамат, габапентин, карбамазепин, окскарбазепин, ламотригин, леветирацетам, бензодиазепин, фенобарбитал, прегабалин, примидон, тиагабин, топирамат, бромид калия, фенитоин, стирипентол, вигабатрин или зонисамид. В иллюстративном варианте осуществления AED представляет собой вальпроевую кислоту, вальпроат натрия, габапентин, топирамат, карбамазепин, окскарбазепин или вигабатрин.

В иллюстративном варианте осуществления AED не является топираматом.

В иллюстративном варианте осуществления AED не является фенфлурамином.

В иллюстративном варианте осуществления AED вводят одновременно или последовательно с указанным агонистом рецептора 5HT.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения эпилептического расстройства, причем указанный способ включает введение индивидууму, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективно количества агониста рецептора 5HT или его фармацевтически приемлемой соли, где указанный индивидуум имеет сердечно-сосудистое заболевание, является резистентным к лечению ингибитором обратного захвата серотонина или подвержен побочным эффектам при введении ингибитора обратного захвата серотонина.

В иллюстративном варианте осуществления агонист рецептора 5HT представляет собой агонист рецептора 5HT_{2A} или агонист рецептора 5HT₂. В иллюстративном варианте осуществления агонист рецептора 5HT представляет собой клемизол, аналог клемизола или их фармацевтически приемлемую соль. В иллюстративном варианте осуществления фармацевтически приемлемая соль представляет собой клемизол HCl.

В вариантах осуществления агонист рецептора 5HT представляет собой суматриптан, наратриптан,

ризатриптан, золмитриптан, урапидил, BRL-54443 (3-(1-метилпиперидин-4-ил)-1Н-индол-5-ол), лоркасерин, буспирон, зипразидон, ТСВ-2 ((4-бром-3,6-диметоксибензоциклобутен-1-ил)метиламин гидробромид), BRL-15572 (3-(4-(4-хлорфенил)пиперазин-1-ил)-1,1-дифенил-2-пропанол), тразодон, ВМУ 7378 (8-(2-[4-(2-метоксифенил)-1-пиперазинил]этил)-8-азаспиро[4.5]декан-7,9-дион), атомоксетин и венлафаксин. В вариантах осуществления агонист рецептора 5HT представляет собой суматриптан. В вариантах осуществления агонист рецептора 5HT представляет собой наратриптап. В вариантах осуществления агонист рецептора 5HT представляет собой ризатриптан. В вариантах осуществления агонист рецептора 5HT представляет собой золмитриптан. В вариантах осуществления агонист рецептора 5HT представляет собой урапидил. В вариантах осуществления агонист рецептора 5HT представляет собой BRL-54443 (3-(1-метилпиперидин-4-ил)-1Н-индол-5-ол). В вариантах осуществления агонист рецептора 5HT представляет собой лоркасерин. В вариантах осуществления агонист рецептора 5HT представляет собой буспирон. В вариантах осуществления агонист рецептора 5HT представляет собой зипразидон. В вариантах осуществления агонист рецептора 5HT представляет собой ТСВ-2 ((4-бром-3,6-диметоксибензоциклобутен-1-ил)метиламин гидробромид). В вариантах осуществления агонист рецептора 5HT представляет собой BRL-15572 (3-(4-(4-хлорфенил)пиперазин-1-ил)-1,1-дифенил-2-пропанол). В вариантах осуществления агонист рецептора 5HT представляет собой тразодон. В вариантах осуществления агонист рецептора 5HT представляет собой ВМУ 7378 (8-(2-[4-(2-метоксифенил)-1-пиперазинил]этил)-8-азаспиро[4.5]декан-7,9-дион). В вариантах осуществления агонист рецептора 5HT представляет собой атомоксетин. В вариантах осуществления агонист рецептора 5HT представляет собой венлафаксин.

В вариантах осуществления агонист рецептора 5HT представляет собой тразодон или его фармацевтически приемлемую соль.

В иллюстративном варианте осуществления клемизол, указанный аналог клемизола или указанные их фармацевтически приемлемые соли составляют часть фармацевтической композиции. В иллюстративном варианте осуществления фармацевтическая композиция, кроме того, содержит фармацевтически приемлемый эксципиент. В иллюстративном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество клемизола, указанного аналога клемизола или указанной их фармацевтически приемлемой соли.

В иллюстративном варианте осуществления фармацевтическую композицию вводят совместно с противоэпилептическим лекарственным средством (AED). В иллюстративном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит клемизол, указанный аналог клемизола или указанную их фармацевтически приемлемую соль и AED. В иллюстративном варианте осуществления агонист рецептора 5HT не является фенфлураминем. В иллюстративном варианте осуществления агонист рецептора 5HT связывается прямо с рецептором 5HT.

В иллюстративном варианте осуществления агонист рецептора 5HT специфически активирует рецептор 5HT. В иллюстративном варианте осуществления агонист рецептора 5HT обеспечивает повышенную активность, опосредуемую рецептором 5HT_{2A} или рецептором 5HT_{2B}, с эквивалентной или сниженной активностью, опосредуемой через рецептор 5HT_{2C}. В иллюстративном варианте осуществления агонист рецептора 5HT представляет собой двойной агонист рецептора 5HT_{2A} и рецептора 5HT_{2B}.

В иллюстративном варианте осуществления агонист рецептора 5HT не является ингибитором обратного захвата серотонина.

В иллюстративном варианте осуществления агонист рецептора 5HT не связывается в значительной степени по меньшей мере с одним из рецептора 5HT_{1A}, 5HT_{1B}, 5HT_{1D}, 5HT_{2C}, 5HT₃, 5HT₄ (например, 5HT_{4c}), 5HT₆, 5HT₇, NPY Y1, Са-канала L-типа, Са-канала N-типа, SK-Са-канала, GABA-зависимого Cl-канала, переносчика GABA, рецептора GABA-A1, рецептора GABA-B1b, Na-канала, переносчика 5HT, рецептора CB1, рецептора CB2, BZD или ER эстрогена альфа.

В другом аспекте изобретение относится к способу модулирования активности рецептора 5HT, включающему приведение в контакт рецептора 5HT с клемизолом, аналогом клемизола или их фармацевтически приемлемой солью.

В иллюстративном варианте осуществления модулирование представляет собой активацию.

В иллюстративном варианте осуществления рецептор 5HT представляет собой рецептор 5HT_{2A} или рецептор 5HT_{2B}.

В другом аспекте изобретение относится к способу лечения заболевания или нарушения, обусловленного дефицитом серотонина в головном мозге или активностью одного или нескольких рецепторов 5HT, включающему введение индивидууму, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества клемизола, аналога клемизола или их фармацевтически приемлемой соли.

В иллюстративном варианте осуществления заболевание или нарушение не является эпилепсией.

В иллюстративном варианте осуществления заболевание или нарушение не является синдромом Драве.

В иллюстративном варианте осуществления заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из мигрени, синдрома ломкой X-хромосомы, синдрома Прадера-Вилли, шизофрении, депрессии, болезни Альцгеймера, аутизма, нейропатической боли, болезни Паркинсона, синдрома раздраженной

кишки и деменции.

В одном аспекте предусматривается фармацевтическая композиция, которая включает клемизол, аналог клемизола или их фармацевтически приемлемую соль, для применения для лечения заболевания или нарушения, вызванного дефицитом серотонина в головном мозге или активностью одного или нескольких рецепторов 5HT.

В вариантах осуществления аспекта, описанного выше, агонист рецептора 5HT не связывается или не модулирует (например, ингибирует) в значительной степени активность по меньшей мере одного из 5HT1A, 5HT1B, 5HT1D, 5HT3, 5HT4e, GABAA1, GABAB_(1b), BZD, CB₁, CB₂, GABA-зависимого Cl-канала, SK-Ca-канала или переносчика GABA. В вариантах осуществления агонист рецептора 5HT не связывает или не модулирует (например, ингибирует) в значительной степени активность 5HT1A, 5HT1B, 5HT1D, 5HT3, 5HT4e, GABAA1, GABAB_(1b), BZD, CB₁, CB₂, GABA-зависимого Cl-канала, SK-Ca-канала и переносчика GABA.

В вариантах осуществления описанного выше аспекта агонист рецептора 5HT модулирует мишень менее чем приблизительно на 50% относительно эталонного модулятора (например, природного или известного модулятора, широко используемого в данной области). В вариантах осуществления агонист рецептора 5HT модулирует мишень менее чем приблизительно на 40% относительно эталонного модулятора (например, природного или известного модулятора, широко используемого в данной области). В вариантах осуществления агонист рецептора 5HT модулирует мишень менее чем приблизительно на 30% относительно эталонного модулятора (например, природного или известного модулятора, широко используемого в данной области). В вариантах осуществления агонист рецептора 5HT модулирует мишень менее чем приблизительно на 20% относительно эталонного модулятора (например, природного или известного модулятора, широко используемого в данной области). В вариантах осуществления агонист рецептора 5HT модулирует мишень менее чем приблизительно на 10% относительно эталонного модулятора (например, природного или известного модулятора, широко используемого в данной области).

В вариантах осуществления описанного выше аспекта агонист рецептора 5HT не модулирует активность в значительной степени, когда агонист рецептора 5HT не модулирует (например, ингибирует) мишень менее чем приблизительно на 50% относительно эталонного ингибитора (например, природного или известного модулятора, широко используемого в данной области). В вариантах осуществления агонист рецептора 5HT не модулирует активность в значительной степени, когда агонист рецептора 5HT не модулирует (например, ингибирует) мишень менее чем приблизительно на 40% относительно эталонного ингибитора (например, природного или известного модулятора, широко используемого в данной области). В вариантах осуществления агонист рецептора 5HT не модулирует активность в значительной степени, когда агонист рецептора 5HT не модулирует (например, ингибирует) мишень менее чем приблизительно на 30% относительно эталонного ингибитора (например, природного или известного модулятора, широко используемого в данной области). В вариантах осуществления агонист рецептора 5HT не модулирует активность в значительной степени, когда агонист рецептора 5HT не модулирует (например, ингибирует) мишень менее чем приблизительно на 20% относительно эталонного ингибитора (например, природного или известного модулятора, широко используемого в данной области). В вариантах осуществления агонист рецептора 5HT не модулирует активность в значительной степени, когда агонист рецептора 5HT не модулирует (например, ингибирует) мишень менее чем приблизительно на 10% относительно эталонного ингибитора (например, природного или известного модулятора, широко используемого в данной области). В вариантах осуществления агонист рецептора 5HT не модулирует активность в значительной степени, когда агонист рецептора 5HT не модулирует (например, ингибирует) мишень менее чем приблизительно на 5% относительно эталонного ингибитора (например, природного или известного модулятора, широко используемого в данной области).

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Молекулярная охарактеризация мутантов данио-рерио *scn1Lab*. (A) Секвенирование подтвердило мутацию T на G в кДНК мутанта *scn1Lab*. (B) Подтверждение сниженной экспрессии у мутантов *scn1Lab* по сравнению с сибсовыми контролями через 3, 5 и 7 dpf с использованием кПЦР. Данные представлены в качестве среднего значения \pm S.E.M; *значимость определяют с помощью t-критерия Стьюдента как $p < 0,05$. Данные нормализовывали к внутреннему эталонному гену β -актина. Величины представляют собой средние значения для пяти независимых биологических образцов (1 образец=10 объединенных личинок) для каждой из 3 стадий развития. Данные представлены в качестве среднего значения \pm S.E.M; * значимость определяют с помощью t-критерия Стьюдента как $p < 0,05$. (C) Относительная экспрессия *scn8aa* и *scn8ab* у мутантов *Nav1.1* (n=5) и сибсовых контролей (n=5) через 5 dpf. Данные представлены как в B. (D) Гибридизация тотального препарата *in situ* в отношении *scn1Lab* у личинок данио-рерио через 3, 5 и 7 dpf. Личинки дикого типа представлены на боковых изображениях; экспрессия показана темно-фиолетовым. Для сравнения показана экспрессия *Scn1Laa* через 3 dpf. Сердце указано стрелкой на панелях 5 и 7 dpf. (E) Вид сзади экспрессии *scb1Laa* через 3 dpf; следует отметить выраженную экспрессию в областях, соответствующих ЦНС личинок данио-рерио. Сокращенные обо-

значения: TeI, мозговой пузырь; TeO, оптический тектум; Cb, мозжечок. Масштабные метки=0,35 мм на D, 0,2 мм на E.

Фиг. 2. Анализ на микрочипах мутантов данио-рерио *scn1Lab*. (A) Тепловые карты, изображающие экспрессию генов, дифференциально экспрессируемых между мутантными личинками *scn1Lab* и сибсовыми контрольными личинками через 5 dpf. Ряды соответствуют индивидуальным генам. Столбцы соответствуют различным личинкам. Гены, которые на высоком уровне экспрессируются в мутантах *scn1Lab* относительно контролей, являются такими, как показано. (B) График MA нормализованных данных микрочипов для всех 44000 генов. Логарифмическое отношение M и среднюю интенсивность флуоресценции A вычисляли в качестве средних значений для всех реплик. (C) Перечень 30 генов, демонстрирующих наибольшие отличия в экспрессии между мутантами *scn1Lab* и сибсовыми контролями.

Фиг. 3. Количественный анализ ОТ-ПЦР мутантов данио-рерио *scn1Lab*. (A) Сравнение кратности изменений экспрессии генов, полученных посредством анализа на микрочипах (матрицах) и анализа кПЦР в реальном времени. Ось y соответствует среднему кратному изменению экспрессии каждого гена данио-рерио через 5 dpf. Ось x соответствует различным генам. (B) Анализ посредством кПЦР трех генов, вовлеченных в эпилептогенез. Относительная экспрессия генов представлена в качестве соотношений \log_2 к наименее распространенному транскрипту ($\log_2\Delta\Delta ct$). Данные нормализовывали к внутреннему эталонному гену β -актина. Величины соответствуют средним значениям для пяти независимых биологических образцов (1 образец - 10 объединенных личинок). Планки указывают на S.E.M; * $p < 0,05$, t-критерий. (C) Классификация генов онтологии для дифференциально экспрессируемых генов, обнаруженных в мутантах *scn1Lab* через 5 dpf ($p < 0,05$, односторонний ANOVA и кратность изменений $> 1,5$). Показаны биологические процессы, соответствующие аннотациям по меньшей мере 5 генов по меньшей мере в одной категории.

Фиг. 4. Спонтанные припадки у мутантов *scn1Lab* данио-рерио. (A) Показаны иммобилизованные и залитые агаром личинки. Изображения получали с использованием объектива 4x и увеличителя 2x на прямом микроскопе Olympus в ходе электрофизиологической регистрации переднего мозга у сибсовых контрольных личинок (A, слева) и мутантных личинок *scn1Lab* (A, в середине) через 5 dpf. Следует отметить темную пигментацию у мутантов. Регистрирующие электроды можно видеть на панелях A1-2, и приблизительная область конца регистрирующего электрода в переднем мозге (красный круг) показана с использованием репрезентативных меченных HuC:GFP личинок на A, справа. Масштабная метка: 100 мкм. (B) График, отслеживающий передвижение в образце, для сибсовых контрольных личинок (B, слева) и мутантных личинок *scn1Lab* (B, справа) через 5 dpf. (C) Репрезентативные 10-мин интервалы регистрации, полученные в переднем мозге парализованных, иммобилизованных и залитых агаром мутантных личинок *scn1Lab* между 3 и 7 dpf. Следует отметить присутствие спонтанного импульсного разряда маленькой и большой амплитуды; дополнительное временное расширение активности припадков. Также показана репрезентативная регистрация в идентичных условиях регистрации в сибсовых контрольных личинках через 5 dpf. Масштабная метка: 2 мВ; 3 0 с.

Фиг. 5. Фармакологическое подтверждение мутантов *scn1Lab* данио-рерио. (A) Тепловая карта, демонстрирующая ответ на девять различных AED. Каждый столбец соответствует процентному изменению частоты импульса (исходный уровень лекарственное средство/исходный уровень $\times 100$) для одного индивидуального мутанта данио-рерио. Лекарственные средства, которые ингибируют судороги, показаны темно-синим цветом. Все лекарственные средства исследовали в концентрации 1 мМ. Следует отметить, что в некоторых испытаниях карбамазепин и вигабатрин увеличивали частоту импульсов относительно первоначальных исходных уровней. (B) График среднего изменения частоты импульсов и стандартной ошибки данных представлен на тепловой карте. Парный t-критерий или знаковый критерий суммы рангов Уилкоксона для данных, которые провалили тест на нормальность, продемонстрировали значимость следующим образом: диазепам ($p=0,002$; $n=7$), бромид калия ($p=0,016$; $n=7$), стирипентол ($p=0,024$; $n=7$) и вальпроат ($p=0,004$; $n=7$). (C) График длительности импульса для всех испытаний, показанных на A. Данные представлены в качестве среднего значения \pm S.E.M. для электрографических припадков на исходном уровне (черные столбики) и после воздействия лекарственного средства (белые столбики). На вставке показана репрезентативная регистрация 2-мин интервалов в ходе испытания со стирипентолом; масштабные метки: большая линия, 1 мВ, 1с; малая линия, 1 мВ, 100 мс. (D) График долей времени, потраченного на припадки для всех испытаний, показанных на A. Данные представлены в качестве среднего значения \pm S.E.M. для электрографических припадков на исходном уровне (черные столбики) и после воздействия лекарственного средства (белые столбики). T-критерий Стьюдента или критерий суммы рангов Манна-Уитни для данных, которые провалили тест на нормальность, продемонстрировали значимость следующим образом: диазепам ($p=0,001$; $n=1$); бромид калия ($p=0,043$; $n=1$); стирипентол ($p=0,007$; $n=1$) и вальпроат ($p=0,007$; $n=1$) (E) Графики отслеживания передвижения для 10 индивидуальных мутантных личинок, выращенных в среде для эмбрионов (верхний ряд) или на кетогенном рационе в течение 48 ч. Графики демонстрируют скорость плавания и линии передвижения, причем более темные цвета указывают на более высокие скорости; показаны испытания в течение 10 мин. (F) Репрезентативная регистрация 10-мин интервалов для тех же рыб, которые показаны на E; репрезентатив-

ные примеры указаны * на графиках передвижения. Масштабная метка: 1 мВ, 30 с. На вставке показан импульс при более высоком временном разрешении (обозначено как #); масштабная метка: 1 мВ, 100 мс.

Фиг. 6. Скрининг для идентификации лекарственных средств, которые спасают мутантный эпилептический фенотип *scn1Lab*. (А) Прямоугольная диаграмма средней скорости (в мм/с) для двух последовательных регистраций у мутантных личинок в среде для эмбрионов. Эксперименты проводили, сначала помещая мутантные личинки в среду для эмбрионов и получая исходный ответ передвижения, затем среду для эмбрионов заменяли новой средой для эмбрионов (для имитации процедуры, использованной для исследуемых соединений) и получали второй ответ передвижения. Показано процентное изменение скорости от исходного уровня (регистрация #1) против экспериментального уровня (регистрация #2). На прямоугольной диаграмме нижняя и верхняя части прямоугольника соответствуют 25-му и 75-му процентилю, соответственно. Линия через прямоугольник соответствует срединной величине и вертикальные линии охватывают весь диапазон значений. Этот график соответствует нормальным изменениям при отслеживании активности в отсутствие нагрузки лекарственным средством. (В) График эффекта одиннадцати известных противосудорожных лекарственных средств на поведение двигательных припадков у мутантов *scn1Lab* через 5 dpf. Анализ на основе фенотипа проводили в 96-луночном формате (например, см. панель 5C1). Столбики соответствуют процентному изменению средней скорости, сравниваемому исходные данные активности припадков мутанта с тем же мутантом после применения лекарственного средства. Для всех исследований лекарственных средств использовали 6-12 рыб на эксперимент. Лекарственные средства исследовали в концентрации 1 мМ; диазепам (Dzp; $p < 0,001$), карбамазепин (Carb, $p = 0,024$), ганаксолон (Gan; $p = 0,003$), стирипентол (Stp; $p = 0,001$), вальпроат (Vpa, $p = 0,026$) и воздействие в течение 48 ч кетогенной диеты (KD; $p = 0,003$) снижали активность припадков, измеренную в качестве изменение скорости, более чем на 34% (пунктирная линия на В; соответствует кратности изменения, превышающей стандартное отклонение в контрольных данных). Ацетазоламид (Acet, $p < 0,001$) и этосуксимид (Etx; $p = 0,250$) усиливали припадки; леветирацетам (Lev; $p = 0,243$) и ламотригин (Ltg; $p = 0,058$) не имели эффекта. (С) График поведения двигательных припадков для мутантов *Scn1Laab* через 5 dpf для 320 исследованных соединений. Цветные круги соответствуют положительным результатам; соединения, которые снижали активность на 100%, в основном были токсичными; 6-12 рыб на испытание. Указатель стрелки обозначает первое испытание с клемизолом. Следует отметить, что некоторые соединения повышали активность судорог, как и ожидалось. (D) График повторных испытаний лекарственных средств на отдельных группах мутантов *scn1Lab* через 5 dpf; 100 мкМ на лекарственное средство; 10 рыб на испытание. Сокращенные обозначения: Clem, клемизол; Clem+PTZ, клемизол+15 мМ PTZ; Clorg, клоргиллин; Tolp, толперизон; Zox, зоксазоламин. Эффект экстренного клемизола на индуцированный PTZ припадок показан для личинок дикого типа. Столбики соответствуют среднему значению \pm S.E.M. Для панелей В и D: парный t-критерий Стьюдента или критерий суммы рангов Манна-Уитни со значимостью, установленной на $p = 0,01$ (*) или $p < 0,001$ (**). (Е) Электрофизиологическая регистрация образцов мутантов *scn1Lab*, подвергнутых воздействию клемизола, сначала в анализе передвижения (панель D), а затем подвергнутая мониторингу с использованием внеклеточного регистрирующего электрода переднего мозга (верхняя кривая; на вставке показан подобный иктальному импульс). Сходные кривые показаны для не подвергнутого воздействию мутанта *Nav1.1* (средняя кривая) и мутанта, обработанного зоксазоламином (нижняя кривая). Анализ импульсов для мутантов без введения ($n = 3$): частота импульсов = $1,5 \pm 0,3$ импульсов/мин; длительность импульсов = 926 ± 414 мс; время в долях, потраченное на припадок = $0,73 \pm 0,17\%$ против мутантов, которым вводили клемизол ($n = 7$): частота импульсов = $0,2 \pm 0,01$ импульсов/мин; длительность импульса = 154 ± 127 мс; время в долях, потраченное на припадок = $0,03 \pm 0,02\%$; $p = 0,001$ для всех сравнений, ANOVA Крускала-Уоллиса с критерием попарного множественного сравнения Данна). Масштабные метки: большая кривая: 0,5 мВ, 10 с; вставка: 0,5 мВ, 100 мс.

Фиг. 7: Подтверждение активности клемизола у мутантов *Scn1Laa*. (А) Репрезентативные 10-мин интервалы регистрации, проведенные в переднем мозге парализованных, иммобилизованных и залитых агаром мутантных личинок *Scn1Laa* через 6 dpf. Следует отметить присутствие спонтанного импульсного разряда малой и большой амплитуды. (В) Графики отслеживания передвижения для 10 индивидуальных мутантных личинок и сибсовых личинок дикого типа. На графике показана скорость плавания и линии передвижения, причем более темные цвета указывают на более высокую скорость; показаны испытания в течение 10 мин. Судороги оценивали по системе определения стадий, описанной в Varaban et al. (Neuroscience 2005). SO, небольшая активность плавания или ее отсутствие; S1, увеличенная подвижность; S2 подобная водовороту активность плавания и S3; конвульсии всего тела с явлениями быстрого плавания и утратой положения тела. (С) Прямоугольный график средней скорости (в мм/с) для 96 данио-рерио, причем рыб сортировали на группы предполагаемых *Scn1Laa* и сибсовых контролей, исходя из стадий судорог, описанных выше. Эксперименты проводили, сначала помещая мутантных личинок в среду для эмбрионов и получая исходный ответ передвижения, затем среду для эмбрионов заменяли новой средой для эмбрионов и получали второй ответ передвижения. Показано процентное изменение скорости от исходного уровня (регистрация #1) против экспериментального уровня (регистрация #2). На прямоугольной диаграмме нижняя и верхняя части прямоугольника соответствуют 25-му и 75-му про-

центиллю соответственно. Линия через прямоугольник соответствует срединной величине и вертикальные линии охватывают весь диапазон значений. Графики показаны для всех 96 рыб (слева), предполагаемых данио-рерио *Scn1Laa* (середина) и сибсовых контролей (слева). Последующий анализ ПЦР проводили для подтверждения мутантных и контрольных объединенных групп. (D) График эффекта стрипентола (Str), диазепама (Dzp), клемизола (Clem) и ламотригина (Ltg) на поведение передвижения припадков у мутантов *Scn1Laa* через 5 dpf. Средняя скорость показана до и после применения лекарственного средства. N=7 рыб на лекарственное средство. Столбики соответствуют среднему значению \pm S.E.M. Парный t-критерий Стьюдента или критерий суммы рангов Манна-Уитни со значимостью на уровне $p=0,01$ (*) или $p < 0,001$ (**).

Фиг. 8: Антигистамины не обладают противозипилептическими свойствами у мутантов *scn1Lab*. График эффекта различных антигистаминов в анализе передвижения при судорогах с использованием мутантов *scn1Lab* через 5 dpf. Средняя скорость показана до и после применения лекарственного средства. N=7 рыб на лекарственное средство. Дополнительные соединения приведены справа. Столбики соответствуют среднему значению \pm S.E.M. Парный t-критерий Стьюдента или критерий суммы рангов Манна-Уитни со значимостью на уровне $p=0,01$ (*) или $p < 0,001$ (**). Примечание: некоторые антигистамины повышали активность припадков в этом анализе.

Фиг. 9: Исследования концентрация клемизола-ответ у *scn1Lab*. Графики из двух различных исследований концентрация-ответ, демонстрирующих процентное ингибирование средней скорости от исходной величины. N=7 рыб на концентрацию и испытания проводили на отдельных группах мутантных личинок.

Фиг. 10: Шельфовый скрининг проводили с использованием 34 различных соединений с антигистаминными свойствами. Все соединения исследовали против спонтанных припадков у личинок *scn1Lab* через 5 dpf; 6-10 рыб на лекарственное средство. Результаты показаны в качестве изменения средней скорости от графика данных отслеживания передвижения. Соединения исследовали в концентрациях между 0,1 и 1 мМ. Пороговое значение для положительного совпадения указано пунктирной линией. Три соединения достигли этого порогового значения, однако все 3 были идентифицированы как токсичные (стрелки).

Фиг. 11: скрининг библиотеки 5НТ. График поведения передвижения при судорогах для мутантов *scn1Lab* через 5 dpf для 62 протестированных соединений. Пороговое значение для ингибирования активности судорог (положительные результаты) было выбрано как снижение средней скорости плавания $\geq 38\%$; пороговое значение для проконвульсивного эффекта или эффекта гипервозбудимости было выбрано как повышение средней скорости плавания $\geq 44\%$ (зеленые пунктирные линии). Соединения исследовали в концентрации 250 мкМ и исследовали 6 рыб на лекарственное средство. Перечень соединений представлен с положительными результатами, указанными серым цветом (на карте) или черными кругами (на графике).

Фиг. 12А-12В: фиг. 12А. График изменения средней скорости для мутантов *scn1Lab* через 5 dpf, подвергнутых воздействию различных концентраций тразодона в ходе периодов воздействия лекарственного средства в течение 30 мин (черные столбики) или 90 мин (серые столбики). Пороговое значение для ингибирования активности припадков (положительные результаты) было выбрано как снижение средней скорости плавания $>40\%$. Тразодон был токсичным в концентрации 750 мкМ (пунктирные линии). Соединения исследовали в группах по 6 рыб на лекарственное средство. Фиг. 12В. Записи ЭЭГ образцов мутантных личинок *scn1Lab*, подвергнутых воздействию тразодона (подавление эпилептических припадков) или контрольного лекарственного средства МК-801 (без подавления эпилептических припадков).

Подробное описание изобретения

Под "рецептором 5НТ" или "рецептором 5-гидрокситриптамина" подразумевают группу сопряженных с G-белком рецепторов (GPCR) и лиганд-зависимых ионных каналов (LGIC), которые встречаются в центральной (ЦНС) и периферической (ПНС) нервной системе и принадлежат, главным образом, к группе рецепторов серотонина. Рецепторы 5НТ можно подразделить на семь семейств рецепторов, включая: 5НТ₁ (например, сопряженные с G_i/G_o-белком рецепторы), 5НТ₂ (например, сопряженные с G_q/G₁₁-белком рецепторы), 5НТ₃ (например, лигандзависимый Na⁺ и K⁺-катионный канал), 5НТ₄ (например, сопряженные с G_s-белком рецепторы), 5НТ₅ (например, сопряженные с G_i/G_o-белком рецепторы), 5НТ₆ (например, сопряженные с G_s-белком рецепторы) и 5НТ₇ (например, сопряженные с G_s-белком рецепторы). Кроме того, семь семейств рецепторов 5НТ могут быть далее подразделены на ряд подсемейств. Например, семейство 5НТ₁ также включает следующие подсемейства: 5НТ_{1A} (например, о котором известно, что оно функционирует в кровеносных сосудах и ЦНС и может быть вовлечено в пристрастие, агрессию, тревожность, аппетит, ауторецепторную функцию, кровяное давление, сердечно-сосудистую функцию, рвоту, частоту сердцебиений, импульсивность, память, настроение, тошноту, ноцицепцию, эрекцию полового члена, расширение зрачка, дыхание, половое поведение, сон, социальность, терморегуляцию и сужение сосудов), 5НТ_{1B} (например, о котором известно, что оно функционирует в кровеносных сосудах и ЦНС и может быть вовлечено в пристрастие, агрессию, тревожность, ауторецепторную

функцию, обучение, двигательную активность, память, настроение, эрекцию полового члена, половое поведение и сужение сосудов), 5HT_{1D} (например, о котором известно, что оно функционирует в кровеносных сосудах и ЦНС и может быть вовлечено в тревожность, ауторецепторную функцию, двигательную активность и сужение сосудов), 5HT_{1E} (например, о котором известно, что оно функционирует в ЦНС и может быть вовлечено в мигрень). В качестве другого примера, семейство 5HT₂ может быть подразделено на следующие подсемейства: 5HT_{2A} (например, о котором известно, что оно функционирует в кровеносных сосудах, ЦНС, желудочно-кишечном тракте, тромбоцитах, ПНС и гладких мышцах, и может быть вовлечено в пристрастие, тревожность, аппетит, когнитивную функцию, воображение, обучение, память, настроение, чувственное восприятие, половое поведение, сон, терморегуляцию и сужение сосудов), 5HT_{2B} (например, о котором известно, что оно функционирует в кровеносных сосудах, ЦНС, желудочно-кишечном тракте, тромбоцитах, ПНС и гладких мышцах и может быть вовлечено в тревожность, аппетит, сердечно-сосудистую функцию, подвижность желудочно-кишечного тракта, сон и сужение сосудов) и 5HT_{2C} (например, о котором известно, что оно функционирует в кровеносных сосудах, ЦНС, желудочно-кишечном тракте, тромбоцитах, ПНС и гладких мышцах, и может быть вовлечено в пристрастие, тревожность, аппетит, желудочно-кишечную подвижность, двигательную активность, настроение, эрекцию полового члена, половое поведение, сон, терморегуляцию и сужение сосудов). Кроме того, семейство 5HT₅, кроме того, может быть подразделено на следующие подсемейства: 5HT_{5A} (например, которое может функционировать в ЦНС и играть роль в двигательной активности и сне, а также функционировать в качестве ауторецептора) и 5HT_{5B} (например, которое может функционировать у грызунов и, по-видимому, является псевдогеном у человека).

Под "агонистом рецептора 5HT" подразумевают любое средство, которое активирует рецептор 5HT относительно отсутствия агониста рецептора 5HT или аналогично серотонину. Иллюстративные агонисты рецептора 5HT включают, но не ограничиваются ими, любой один или несколько из: ACP-104, ACP-106, AR-116081, AR-116082, ATHX-105, белладонны в комбинации с эрготамин тартратом, BW 723C86, цизаприда, циза-MPS, цизапа, цизап-Mps, CSC-500 Series, DOI или его соли, эрготамин тартрата и кофеина, эзорида MPS, флибансерина, икарана L.P., манотак плюс, мигрила, миртазапина римафар, миртазапина, наратриптана, нелотансерина, норфенфлурамина, нормагута таб., нефадозона гидрохлорида, OSU-6162, придофина, сенсифлу, PRX-00933, RP-5063, низкомолекулярного агониста 5-HT_{2A} против воспалительных заболеваний, низкомолекулярного агониста 5-HT_{2C} против шизофрении и ожирения, низкомолекулярного агониста рецептора 5-HT_{2C} против ожирения, низкомолекулярных соединений для нацеливания на рецептор 5-HT_{2C} и 5-HT₆ против шизофрении, низкомолекулярных соединений для модулирования 5HT₂ против нарушений ЦНС и метаболических нарушений, TGBA-01AD, тразодона гидрохлорида, теманогрела гидрохлорида, вабикасерина гидрохлорида, вирдекса, VR-1065, зипразидона гидрохлорида и/или зипразидона-сигиллаты.

В вариантах осуществления агонист рецептора 5HT представляет собой суматриптан, наратриптан, ризатриптан, золмитриптан, урапидил, BRL-54443 (3-(1-метилпиперидин-4-ил)-1H-индол-5-ол), лоркасерин, бупирон, зипразидон, TCB-2 ((4-бром-3,6-диметоксибензоциклобутен-1-ил)метиламина гидробромид), BRL-15572 (3-(4-(4-хлорфенил)пиперазин-1-ил)-1,1-дифенил-2-пропанол), тразодон, ВМУ 7378 (8-(2-[4-(2-метоксифенил)-1-пиперазинил]этил)-8-азаспиро[4.5]декан-7,9-дион), атомоксетин или венлафаксин.

В вариантах осуществления агонист рецептора 5HT представляет собой тразодон.

Кроме того, в рамках изобретения предусматривается, что в некоторых вариантах осуществления агонист рецептора 5HT не включает один или несколько из следующих: ацетазоламид, бензодиазепин (диазепам; клобазам), каннабадиол, карбамазепин, клемизол, этосуксимид, фелбамат, фенфлурамин, флуоксетин, габапентин, ганаксолон, лакозамид, ламотригин, леветирацетам, нитразепам, окскарбазепин, перампенел, фенитоин, фенобарбитал, пирацетам, бромид калия, прегабалин, примидон, ретигабин, руфинамид, стирипентол, тиагабин, топирамат, вальпроевая кислота, верапамил, вигабатрин и зонисамид.

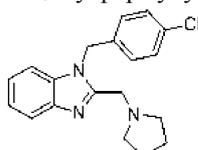
Под "средством" подразумевают любое низкомолекулярное химическое соединение, антитело, молекулу нуклеиновой кислоты или полипептид, или их фрагменты.

Под "сердечным состоянием" подразумевают родственные заболевания, включающие, но не ограничивающиеся ими коронарную болезнь сердца (CHD), кардиомиопатию, сердечно-сосудистое заболевание (CVD), ишемическую болезнь сердца, сердечную недостаточность, гипертоническое заболевание сердца, воспалительное заболевание сердца, заболевание клапана сердца, атеросклероз и гипертрофию сердца. Сердечное состояние может представлять собой системное заболевание, которое может поражать сердце, головной мозг, наиболее важные органы и конечности. Под "коронарной болезнью сердца (CHD)" подразумевают заболевание, которое вызывает недостаточный коронарный кровоток для обеспечения достаточного кровотока в сердечной мышце и окружающих тканях. Под "сердечно-сосудистым заболеванием (CVD)" подразумевают любое из ряда определенных заболеваний, которые поражают само сердце или кровеносную систему, особенно ткань миокарда, а также вены и артерии, ведущие к и от сердца. Например, CVD может включать, но не ограничивается ими, острый коронарный синдром, аритмию, атеросклероз, сердечную недостаточность, инфаркт миокарда, неоинтимальную гиперплазию, легочную гипертензию, инсульт, заболевание клапанов и гипертрофию сердца. Заболевание сердца может

быть диагностировано различными способами, известными в данной области. Например, такие способы могут включать оценку у индивидуума диспноэ, ортопноэ, пароксизмального ночного диспноэ, перемежающейся хромоты, стенокардии, боли в груди, при которых могут присутствовать любой из ряда симптомов, известных в данной области, таких как непереносимость физической нагрузки, отек, сердцебиение, слабость, потеря сознания или кашель; заболевание сердца можно диагностировать посредством биохимического анализа крови. Как описано выше и как используют в рамках изобретения, "заболевание сердца" относится к нарушению, поражающему непосредственно сердце или кровеносную систему.

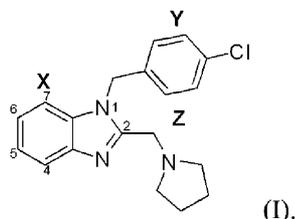
"Аналогичный" или "аналог" используют в соответствии с его обычным значением в химии и биологии, и он относится к химическому соединению, которое структурно сходно с другим соединением (т.е. так называемым "эталонным" соединением), но отличается составом, например, заменой одного атома атомом другого элемента, или присутствием конкретной функциональной группы, или заменой одной функциональной группой другой функциональной группой, или абсолютной стереохимией одного или нескольких хиральных центров эталонного соединения. Таким образом, аналог представляет собой соединение, которое является сходным или сравнимым по функции и внешнему виду, но не по структуре или происхождению эталонного соединения.

"Клемизол" относится к соединению, имеющему формулу



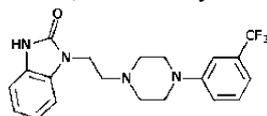
Клемизол включает фармацевтически приемлемые соли и составы клемизола, как описано в настоящем описании (например, "соль клемизола"). Иллюстративные соли клемизола включают, но не ограничиваются ими, клемизол-НСl, клемизолпенициллин, клемизол-сульфат или клемизол-ундецилат.

"Аналог клемизола", как описано в настоящем описании, относится к соединениям сходной структуры. Такие соединения включают, например, соединения, описанные в РСТ/US 2008/076804 и патенте США № 4011322, которые включены в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме. Следующие иллюстративные аналоги клемизола указаны, например, в US 2012/0232062; публикациях РСТ № 2009/038248; US 2010/107739; US 2010/107742, WO 2002/089731, WO 2005/032329, WO 2009/039248, WO 2010/039195, WO 2010/107739 и WO 2010/107742, каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Аналоги клемизола, описанные в настоящем описании (включая соединения, описанные в указанных выше ссылках) могут быть замещенными (т.е. модифицированными) в 1 или 2 положениях, как указано ниже в формуле (I) (рамки Y и Z). Аналоги клемизола могут быть замещенными (т.е. модифицированными) в положениях 4, 5, 6 или 7, как указано рамкой X в формуле (I).



(I).

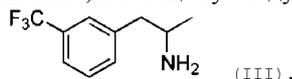
"Флибансерин" относится к соединению, имеющему следующую формулу (II):



(II).

Флибансерин включает фармацевтически приемлемые соли и составы флибансерина (например, "соль флибансерина").

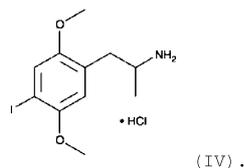
"Норфенфлурамин" относится к соединению, имеющему следующую формулу (III):



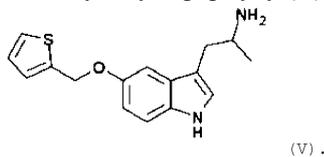
(III).

Норфенфлурамин включает фармацевтически приемлемые соли и составы норфенфлурамина (например, "соль норфенфлурамина").

"DOI" относится к 2,5-диметокси-4-йодамфетамину. DOI включает фармацевтически приемлемые соли и составы DOI. Иллюстративные соли DOI включают, но не ограничиваются ими, 2,5-диметокси-4-йодамфетамин моногидрохлорид (DOI HCl), имеющий следующую формулу (IV):



"BW 723C86" относится к лекарственному средству-производному триптамина, которое действует в качестве агониста рецептора 5HT_{2B} и имеет следующую формулу (V):



BW 723C86 включает фармацевтически приемлемые соли и составы BW 723C86 (например, "соль BW 723C86").

Термин "фармацевтически приемлемые соли" включает соли активных соединений, которые получены с относительно нетоксичными кислотами или основаниями, в зависимости от конкретных заместителей на соединениях, описанных в настоящем описании. Когда агонист 5-НТ содержит относительно кислотные функциональные группы, основно-аддитивные соли можно получать путем приведения в контакт нейтральной формы таких соединений с достаточным количеством желаемого основания, либо в чистом виде, либо в подходящем инертном растворителе. Примеры фармацевтически приемлемых основно-аддитивных солей включают соль натрия, калия, кальция, аммония, органическую аминосоль или соль магния, или сходную соль. Когда агонист 5-НТ содержит относительно основные функциональные группы, кислотнo-аддитивные соли можно получать путем приведения в контакт нейтральной формы таких соединений с достаточным количеством желаемой кислоты, либо в чистом виде, либо в подходящем инертном растворителе. Примеры фармацевтически приемлемых кислотнo-аддитивных солей включают соли, образованные из неорганических кислот, таких как хлористоводородная, бромистоводородная, азотная, угольная, моногидрокарбонoвая, фосфорная, моногидрофосфорная, дигидрофосфорная, серная, моногидросерная, йодистоводородная кислота или фосфористые кислоты и т.п., а также соли, полученные из относительно нетоксичных органических кислот, таких как уксусная, пропионовая, изомаляновая, малеиновая, малоновая, бензойная, янтарная, субериновая, фумаровая, молочная, миндальная, фталовая, бензолсульфоновая, п-толилсульфоновая, лимонная, виннокаменная, метансульфоновая и т.п. Также включены соли аминокислот, такие как аргинат и т.п., и соли органических кислот, таких как глюкуроновая или галактуриновая кислоты и т.п. (см., например, Berge et al., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Science, 1977, 66, 1-19). Агонист 5-НТ может содержать как основные, так и кислотные функциональные группы, которые позволяют конвертирование либо в основно-аддитивные, либо в кислотнo-аддитивные соли.

Таким образом, агонист 5-НТ может существовать в качестве соли, например, с фармацевтически приемлемыми кислотами. Настоящее изобретение включает такие соли. Неограничивающие примеры таких солей включают гидрохлориды, гидробромиды, фосфаты, сульфаты, метансульфонаты, нитраты, малеаты, ацетаты, цитраты, фумараты, пропионаты, тартраты (например, (+)-тартраты, (-)-тартраты или их смеси, включая рацемические смеси), сукцинаты, бензоаты и соли с аминокислотами, такими как глутаминовая кислота, и четвертичные соли аммония (например, метилйодид, этилйодид и т.п.). Эти соли можно получать способами, известными специалистам в данной области.

Нейтральные формы агониста 5-НТ предпочтительно восстанавливают путем приведения в контакт соли с основанием или кислотой и выделения исходного соединения обычным способом. Исходная форма соединения может отличаться от различных солевых форм определенными физическими свойствами, такими как растворимость в полярных растворителях.

В дополнение к формам солей, агонист 5-НТ может быть предоставлен в форме пролекарства. Пролекарства представляют собой соединения, которые легко подвергаются химическим изменениям в физиологических условиях, в результате чего образуются соединения по настоящему изобретению. Пролекарства агониста 5-НТ могут конвертироваться *in vivo* после введения. Кроме того, пролекарства агониста 5-НТ можно преобразовать в активные соединения с помощью химических или биохимических способов в условиях *ex vivo*, например, при контакте с подходящими ферментом или химическим реагентом.

Агонист 5-НТ может существовать как в несольватированных, так и в сольватированных формах, включая гидратированные формы. Как правило, сольватированные формы эквивалентны несольватированным формам и охватываются объемом настоящего изобретения. Агонист 5-НТ может существовать в поликристаллической или в аморфной форме. Как правило, все физические формы эквивалентны для применений, охватываемых настоящим изобретением, и находятся в пределах объема настоящего изобретения.

"Эффективное количество" представляет собой количество, достаточное для достижения агонистом

5-НТ (включая его фармацевтически приемлемые соли) назначенной цели относительно отсутствия агониста 5-НТ (включая его фармацевтически приемлемые соли) (например, достижения эффекта, для которого его вводят, лечения заболевания, снижения активности белка/фермента, повышения активности белка/фермента, ингибирования каскада передачи сигнала или уменьшение одного или нескольких симптомов заболевания или состояния). Примером "эффективного количества" является количество агониста 5-НТ (включая его фармацевтически приемлемые соли), которое является достаточным для обеспечения лечения, предупреждения или уменьшения симптома или симптомов заболевания, которое также может быть названо "терапевтически эффективным количеством". "Уменьшение" симптома или симптомов (и грамматические эквиваленты этого выражения) означает уменьшение тяжести или частоты симптома(ов) или устранение симптома(ов) (например, припадков). "Профилактически эффективное количество" лекарственного средства представляет собой количество лекарственного средства, которое при введении индивидууму имеет намеченный профилактический эффект, например предупреждение или замедление возникновения (или повторного возникновения) повреждения, заболевания, патологии или состояния, или снижение вероятности возникновения (или повторного возникновения) повреждения, заболевания, патологии или состояния, или их симптомов (например, припадков). Полный профилактический эффект необязательно возникает при введении одной дозы, и он может возникать только после ведения серии доз. Таким образом, профилактически эффективное количество можно вводить за одно или несколько введений. Точные количества зависят от цели лечения и могут быть определены специалистом в данной области с использованием известных способов (см., например, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vol. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); и Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition, 2003, Genaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

Терапевтически эффективное количество агониста 5-НТ (включая его фармацевтически приемлемые соли) первоначально можно определять в анализах на клеточной культуре. Целевые концентрации представляют собой те концентрации активного соединения(ий), которые способны обеспечивать способы, описанные в настоящем описании, как определяют с использованием способов, описанных в настоящем описании или известных в данной области.

Как хорошо известно в данной области, терапевтически эффективные количества для применения у человека также можно определять в моделях на животных. Например, дозу для человека можно составлять, чтобы достигать концентрации, для которой обнаружено, что она является эффективной у животных. Дозировку у человека можно корректировать посредством мониторинга эффективности соединений и изменения дозировки в сторону увеличения или уменьшения, как описано выше. Коррекция дозы для достижения максимальной эффективности у человека на основе способов, описанных выше, и других способов, входит в пределы способностей специалиста в данной области.

Дозировки можно варьировать в зависимости от потребностей пациента и используемого соединения. Доза, вводимая пациенту, в контексте настоящего изобретения должна быть достаточной для обеспечения благоприятного терапевтического ответа у пациента с течением времени. Размер дозы также будет определяться существованием, природой и степенью каких-либо неблагоприятных побочных эффектов. Определение надлежащей дозировки для конкретной ситуации входит в пределы квалификации практикующего специалиста. Как правило, лечение начинают с использованием более маленьких дозировок, которые являются меньшими, чем оптимальная доза соединения. После этого дозировку увеличивают с небольшим приращением до тех пор, пока не достигают оптимального эффекта в данных обстоятельствах.

Дозировки и интервалы можно корректировать индивидуально для обеспечения уровней вводимого соединения, эффективных для конкретного клинического показания, подвергаемого лечению. Это может обеспечить терапевтический режим, соответствующий тяжести болезненного состояния индивидуума.

С использованием идей, описанных в настоящем описании, может быть запланирован эффективный профилактический или терапевтический режим лечения, который не вызывает значительной токсичности и, тем не менее, является эффективным для лечения клинических симптомов, которые демонстрирует конкретный пациент. Это планирование должно вовлекать тщательный выбор активного соединения с учетом таких факторов, как эффективность соединения, относительная биодоступность, масса тела пациента, наличие и тяжесть неблагоприятных побочных эффектов, предпочтительный способ введения и профиль токсичности выбранного средства.

"Контроль" или "контрольный эксперимент" используют в соответствии с его обычным значением, и он относится к эксперименту, в котором индивидуумы или реагенты эксперимента подвергаются такому же воздействию, как и в параллельном эксперименте, за исключением некоторой процедуры, реагента или переменной эксперимента. В некоторых случаях контроль используют в качестве стандарта для сравнения при оценке эффектов эксперимента. В некоторых вариантах осуществления контроль является показателем активности агониста 5-НТ в отсутствие агониста 5-НТ (включая его фармацевтически приемлемые соли).

"Исследуемое соединение", как используют в рамках изобретения, относится к экспериментальному соединению, используемому в процессе скрининга для идентификации активности, неактивности или

другого модулирования конкретной биологической мишени или каскада, например, рецептора 5-НТ. Исследуемое соединение может представлять собой агонист 5-НТ, описанный в настоящем описании, включая его фармацевтически приемлемые соли.

Термин "модулирование", "модулировать" или "модулятор" используют в соответствии с его обычным значением, и он относится к действию по изменению или варьированию одного или нескольких свойств. "Модулятор" относится к композиции или соединению, которые увеличивают или снижают уровень молекулы-мишени или функцию молекулы-мишени, или физическое состояние мишени молекулы. "Модулирование" относится к процессу изменения или варьирования одного или нескольких свойств. Например, как используют в отношении эффектов модулятора биологической мишени, "модулировать" означает изменять посредством повышения или снижения свойства или функции биологической мишени или количества биологической мишени (например, рецептора 5-НТ).

Как определено в настоящем описании, термин "ингибирование", "ингибировать", "ингибирующий" и т.п. в отношении взаимодействия белок-ингибитор означает негативное влияние (например, снижение) на активность или функцию белка относительно активности или функции белка в отсутствие ингибитора. В некоторых вариантах осуществления ингибирование относится к уменьшению заболевания или симптомов заболевания. В некоторых вариантах осуществления ингибирование относится к снижению активности конкретного белка-мишени или нуклеиновой кислоты-мишени. Таким образом, ингибирование включает, по меньшей мере отчасти, частичное или полное блокирование стимуляции, снижение, предупреждение или замедление активации или инактивацию, десенсибилизацию или подавление передачи сигнала или активности белка/фермента или количества белка.

Термин "активация" или "активирующий" и т.п. относится к взаимодействиям белок-соединение, которые положительно влияют (например, повышают) на активность или функцию белка относительно активности или функции белка в отсутствие соединения-активатора. Активация может относиться к усиленной активности конкретного белка-мишени. Активация может относиться к восстановлению утраченной функции мутантного белка-мишени. Активация, как используют в рамках изобретения, может относиться к активации одного или нескольких рецепторов 5-НТ.

"Приведение в контакт" используют в соответствии с его обычным значением, и оно относится к процессу обеспечения нахождения двух различных структур (например, химических соединений, включая биомолекулы, или клеток) достаточно близко, чтобы они реагировали, взаимодействовали или физически соприкасались. Однако должно быть понятно, что конечный продукт реакции можно получать непосредственно из реакции между добавленными реагентами или из промежуточного соединения одного или нескольких добавленных реагентов, которые могут образоваться в реакционной смеси.

Термин "приведение в контакт" может включать обеспечение реакции, взаимодействия или физического соприкосновения двух структур, где две структуры могут представлять собой соединение, как описано в настоящем описании, и белок или фермент. В некоторых вариантах осуществления приведение в контакт включает обеспечение взаимодействия соединения, описанного в настоящем описании, с рецептором, например, рецептором 5-НТ.

Термин "ассоциированный" или "ассоциированный с" в контексте вещества, или активности или функции вещества, ассоциированных с заболеванием, означает, что заболевание вызвано (полностью или частично), или симптом заболевания вызван (полностью или частично) веществом, или активностью или функцией вещества.

Термин "пациент" или "индивидуум, нуждающийся в этом," относится к живому организму, страдающему или предрасположенному к заболеванию или состоянию, которое можно лечить посредством введения фармацевтической композиции, описанной в настоящем описании. Неограничивающие примеры включают людей, других млекопитающих, животных семейства бычьих, крыс, мышей, собак, обезьян, коз, овец, коров, оленей и других не являющихся млекопитающими животных, таких как даниорио. Пациентом может быть человек.

Термин "заболевание" или "состояние" относятся к состоянию или статусу здоровья пациента или индивидуума, которые могут быть подвергнуты лечению соединениями или способами, описанными в настоящем описании.

Термины "эпилептическое нарушение", "эпилептическое расстройство", "судорожное нарушение" или "эпилепсия" в настоящем описании относятся к спектру хронических неврологических нарушений, наиболее часто характеризующихся присутствием неспровоцированных припадков. См., например, Noebels et. al., Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies, 4th edition, Bethesda (MD) : National Center for Biotechnology Information (US); 2012. Эпилепсия, как используют в рамках изобретения, может относиться к повреждению головного мозга (например, вследствие травмы, инсульта или злокачественной опухоли) или генетической мутации. Симптомы эпилептических расстройств могут быть результатом аномальной электрохимической передачи сигнала между нейронами в головном мозге. Пациентов, испытавших два или более неспровоцированных припадка, можно считать имеющими эпилепсию.

Типы эпилептических расстройств включают, например, доброкачественную роландическую эпилепсию, эпилепсию передних долей, младенческие судороги, ювенильную миоклоническую эпилепсию (JME), ювенильную абсансную эпилепсию, детскую абсансную эпилепсию (например, пикнолепсия),

фебрильные судороги, прогрессирующую миоклоническую эпилепсию Лафора, синдром Леннокса-Гасто, синдром Ландау-Клеффнера, синдром Драве (DS), генерализованную эпилепсию с фебрильными судорогами (GEFS+), тяжелую миоклоническую эпилепсию младенцев (SMEI), доброкачественные неонатальные семейные судороги (BFNC), синдром Веста, синдром Отахара, ранние миоклонические энцефалопатии, мигрирующую парциальную эпилепсию, младенческие эпилептические энцефалопатии, комплекс туберозного склероза (TSC), фокальную кортикальную дисплазию, лиссэнцефалию типа I, синдром Миллера-Дайкера, синдром Ангельмана, синдром ломкой X-хромосомы, эпилепсию при нарушениях аутистического спектра, субкортикальную лентовидную гетеротопию, синдром Уокера-Варбург, болезнь Альцгеймера, посттравматическую эпилепсию, прогрессирующую миоклоническую эпилепсию, рефлекторную эпилепсию, синдром Расмуссена, эпилепсию височных долей, лимбическую эпилепсию, эпилептический статус, абдоминальную эпилепсию, массивный билатеральный миоклонус, менструальную эпилепсию, джексоновское эпилептическое нарушение, болезнь Унферрихта-Лундборга или светочувствительную эпилепсию.

"Фармацевтически приемлемый эксципиент" и "фармацевтически приемлемый носитель" или "часть носителя" относятся к веществу, которое способно введению агониста 5-НТ (включая его фармацевтически приемлемые соли) и всасыванию у индивидуума, и может быть включено в композиции без обеспечения значительного неблагоприятного токсикологического эффекта на пациента. Неограничивающие примеры фармацевтически приемлемых эксципиентов включают воду, NaCl, нормальные солевые растворы, лактатный раствор Рингера, нормальный раствор сахарозы, нормальный раствор глюкозы, связующие вещества, наполнители, разрыхлители, смазывающие вещества, покрытия, подсластители, вкусовые добавки, растворы солей (такие как раствор Рингера), спирты, масла, желатины, углеводы, такие как лактоза, амилоза или крахмал, сложные эфиры жирных кислот, гидроксиметилцеллюлоза, поливинилпирролидин и красители, и т.п. Такие препараты можно стерилизовать и, если желательно, смешивать с вспомогательными средствами, такими как смазывающие вещества, консерванты, стабилизаторы, смачивающие вещества, эмульгаторы, соли для влияния на осмотическое давление, буферы, красители и/или ароматические вещества и т.п., которые не реагируют неблагоприятным образом с соединениями по изобретению. Специалисту в данной области будет понятно, что другие фармацевтически приемлемые эксципиенты являются пригодными в рамках настоящего изобретения.

Термин "препарат" включает состав агониста 5-НТ (включая его фармацевтически приемлемые соли) с инкапсулирующим материалом в качестве носителя, обеспечивающим капсулу, в которой активный компонент с другими носителями или без них окружен носителем, который таким образом ассоциирован с ним. Аналогично, включены крахмальные капсулы и таблетки. В качестве дозированных форм, пригодных для перорального введения, можно использовать таблетки, порошки, капсулы, пилюли, крахмальные капсулы и таблетки.

Как используют в рамках изобретения, термин "введение" означает пероральное введение, введение в качестве суппозитория, местный контакт, внутривенное, внутрибрюшинное, внутримышечное, проводимое внутрь очага повреждения, интратекальное, интраназальное или подкожное введение, или имплантацию устройства с замедленным высвобождением, например, осмотического мини-насоса, индивидууму. Введение осуществляют любым путем, включая парентеральный или чресслизистый (например, буккальный, сублингвальный, небный, десневой, назальный, вагинальный, ректальный или трансдермальный). Парентеральное введение включает, например, внутримышечное, осуществляемое внутри артериол, внутрикожное, подкожное, внутрибрюшинное, внутрижелудочковое и внутричерепное. Другие способы доставки включают, но не ограничиваются ими, использование липосомальных составов, внутривенной инфузии, трансдермальных пластырей и т.д.

Агонист 5-НТ (включая его фармацевтически приемлемые соли) и его фармацевтические композиции можно доставлять трансдермально, местным путем, в качестве состава в виде аппликаторных палочек, растворов, суспензий, эмульсий, гелей, кремов, мазей, паст, желе, красок, порошков и аэрозолей. Пероральные препараты включают таблетки, пилюли, порошок, драже, капсулы, жидкости, таблетки, крахмальные капсулы, гели, сиропы, взвеси, суспензии, и т.д., пригодные для приема внутрь пациентом. Препараты в твердой форме включают порошки, таблетки, пилюли, капсулы, крахмальные капсулы, суппозитории и диспергируемые гранулы. Препараты в жидкой форме включают растворы, суспензии и эмульсии, например, водные растворы или растворы вода/пропиленгликоль. Кроме того, агонисты 5-НТ (включая их фармацевтически приемлемые соли) могут включать компоненты, обеспечивающие непрерывное высвобождение и/или комфорт. Такие компоненты включают высокомолекулярные анионные имитирующие слизь полимеры, гелеобразующие полисахариды и тонкоизмельченные субстраты носителей лекарственных средств. Эти компоненты более подробно рассмотрены в патентах США № 4911920; 5403841; 5212162 и 4861760. Полное содержание этих патентов включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме для всех целей. Агонист 5-НТ (включая его фармацевтически приемлемые соли) также можно доставлять в качестве микросфер для замедленного высвобождения в организм. Например, микросферы можно вводить посредством внутрикожной инъекции содержащих лекарственное средство микросфер, которые осуществляют медленное высвобождение подкожно (см. Rao, J. Biomater Sci. Polym. Ed. 7:623-645, 1995) в качестве биodeградируемых и инъекционных гелеобразных составов

(см., например, Gao Pharm. Res. 12:857-863, 1995); или в качестве микросфер для перорального введения (см., например, Eyles, J. Pharm. Pharmacol. 49:669-674, 1997). Составы композиций агониста 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) можно доставлять с использованием липосом, которые сливаются с клеточной мембраной или подвергаются эндоцитозу, т.е. с использованием лигандов рецепторов, связанных с липосомой, которые связываются с белковыми рецепторами поверхности мембраны клетки, что приводит к эндоцитозу. С использованием липосом, в частности, когда поверхность липосом содержит лиганды, специфичные к клеткам-мишеням или иным образом предпочтительно направлены на конкретный орган, можно фокусировать доставку композиций агониста 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) в клетки-мишени *in vivo* (см., например, Al-Muhammed, J. Microencapsul. 13:293-306, 1996; Chonn, Curr. Opin. Biotechnol. 6:698-708, 1995; Ostro, Am. J. Hosp. Pharm. 46:1576-1587, 1989). Также композиции можно доставлять в качестве наночастиц.

Под "совместным введением" подразумевают, что композицию, описанную в настоящем описании, вводят в то же время, непосредственно до или непосредственно после проведения одного или нескольких дополнительных способов терапии. Агонист 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) можно вводить отдельно или можно совместно вводить пациенту. Совместное введение включает одновременное или последовательное введение соединений индивидуально или в комбинации (более одного соединения). Таким образом, препараты также можно комбинировать, когда это желательно, с другими активными веществами (например, для снижения метаболической деградации). Агонист 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) можно доставлять трансдермально, местным путем или составлять в качестве аппликаторных палочек, растворов, суспензий, эмульсий, гелей, кремов, мазей, паст, желе, красок, порошков и аэрозолей.

Термины "дополнительная терапия", "терапия дополнительным средством", "вспомогательная терапия" и "терапия вспомогательным средством" используют в настоящем описании взаимозаменяемо, и они относятся к комбинированию агониста 5-HT или его фармацевтически приемлемой соли с другим противосудорожным препаратом для лечения эпилепсии.

"Противосудорожное лекарственное средство", "противоэпилептическое лекарственное средство", "AED" или "противосудорожный препарат" используют в настоящем описании взаимозаменяемо и в соответствии с их распространенным и обычным значением, и он включает композиции для снижения или устранения судорог. Противосудорожные препараты включают, но не ограничиваются ими, ацетазоламид, бензодиазепин, каннабидиолы, карбамазепин, клобазам, клонезепам, эликарбазепина ацетат, этосуксимид, этогтоин, фелбамат, фенфлурамин, фосфенитоин, габапентин, ганаксолон, гуперзин А, лакозамид, ламотригин, леветирацетам, нитразепам, окскарбазепин, перампанел, пирацетам, фенобарбитал, фенитоин, бромид калия, прегабалин, примидон, ретигабин, руфинамид, вальпроевую кислоту, вальпроат натрия, стирипентол, тиагабин, топирамат, вигабатрин или зонисамид.

Как используют в рамках изобретения, термин "резистентный" относится к снижению эффективности агента или лекарственного средства. Например, индивидуум, который является "резистентным" к лечению ингибитором обратного захвата серотонина (например, такому как фенфлурамин) демонстрирует сниженный ответ относительно ответа, наблюдаемого, когда индивидуума впервые лечили ингибитором обратного захвата серотонина.

Как используют в рамках изобретения, термин "не связывает в значительной степени" означает, что агонист рецептора 5HT по изобретению демонстрирует в 10 раз, или в 20 раз, или в 50 раз, или в 60 раз, или в 70 раз, или в 80 раз, или в 90 раз, или в 100 раз меньшее связывание с другим трансмембранным белком, например, таким как рецептор 5HT, рецептор NPY YP, Ca⁺-канал, C1-канал, переносчик GABA или рецептор GABA-A1, Na-канал, переносчик 5HT и/или рецептор CB1 или CB2. Этот сниженный уровень связывания можно измерять посредством ELISA или биосенсорного анализа (например, Biacore). В одном примере агонист рецептора 5HT по изобретению не связывается на поддающемся обнаружению уровне с рецептором 5HT_{1A}, 5HT_{1B}, 5HT_{1D}, 5HT_{2C}, 5HT₃, 5HT₄, 5HT₆, 5HT₇, NPY Y1, Ca-каналом L-типа, Ca-каналом (N-типа), SK-Ca-каналом, GABA-зависимым C1-каналом, переносчиком GABA, рецептором GABA-A1, рецептором GABA-B1b, Na-каналом, переносчиком 5HT, рецептором CB1, рецептором CB2, BZD или эстрогеном ER альфа, при измерении посредством ELISA, или Biacore, или вестерн-блоттинга, или FACS. В этом отношении, "не связывает на поддающемся обнаружению уровне" означает, что уровень связывания не превышает в значительной степени фоновый уровень. В иллюстративных вариантах осуществления агонист 5-HT не модулирует в значительной степени активность по меньшей мере одного из рецептора 5HT_{1A}, 5HT_{1B}, 5HT_{1D}, 5HT_{2C}, 5HT₃, 5HT₄, 5HT₆, 5HT₇, NPY Y1, Ca-канала L-типа, Ca-канала N-типа, SK-Ca-канала, GABA-зависимого C1-канала, переносчика GABA, рецептора GABA-A1, рецептора GABA-B1b, Na-канала, переносчика 5HT, рецептора CB1, рецептора CB2, BZD или ER эстрогена альфа. Как используют в рамках изобретения, термин "не модулирует в значительной степени активность" означает, что агонист рецептора 5HT по изобретению индуцирует опосредуемый рецептором биологический ответ, который по существу сходен с его активностью в отсутствие активирующего или ингибирующего лиганда.

Способы лечения

В рамках настоящего изобретения предусматриваются способы лечения эпилептического расстрой-

ства. В одном аспекте способ представляет собой способ лечения эпилептического расстройства посредством введения индивидууму, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества агониста рецептора 5-HT или его фармацевтически приемлемой соли. В другом аспекте способ представляет собой способ лечения эпилептического расстройства путем введения индивидууму, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции, как описано в настоящем описании, где фармацевтическая композиция включает агонист рецептора 5-HT или его фармацевтически приемлемую соль. Индивидуум может иметь (например, может принимать пищу в соответствии с) кетогенную диету. Индивидуум может иметь сердечно-сосудистое заболевание. Индивидуум может быть резистентным к лечению ингибитором обратного захвата серотонина. Индивидуум может быть подвержен побочным эффектам при введении ингибитора обратного захвата серотонина. Индивидуум может представлять собой ребенка (например, индивидуум, имеющий педиатрическое эпилептическое состояние).

Эпилептическое расстройство может представлять собой доброкачественную роландическую эпилепсию, эпилепсию передних долей, младенческие судороги, ювенильную миоклоническую эпилепсию (JME), ювенильную абсансную эпилепсию, детскую абсансную эпилепсию (например, пикнолепсия), фебрильные судороги, прогрессирующую миоклоническую эпилепсию Лафора, синдром Леннокса-Гасто, синдром Ландау-Клеффнера, синдром Драве, генерализованную эпилепсию с фебрильными судорогами (GEFS+), тяжелую миоклоническую эпилепсию младенцев (SMEI), доброкачественные неонатальные семейные судороги (BFNC), синдром Веста, синдром Отахара, ранние миоклонические энцефалопатии, мигрирующую парциальную эпилепсию, младенческие эпилептические энцефалопатии, комплекс туберозного склероза (TSC), фокальную кортикальную дисплазию, лиссэнцефалию типа I, синдром Миллера-Дайкера, синдром Ангельмана, синдром ломкой X-хромосомы, эпилепсию при нарушениях аутистического спектра, субкортикальную лентовидную гетеротопию, синдром Уокера-Варбург, болезнь Альцгеймера, посттравматическую эпилепсию, прогрессирующую миоклоническую эпилепсию, рефлекторную эпилепсию, синдром Расмуссена, эпилепсию височных долей, лимбическую эпилепсию, эпилептический статус, абдоминальную эпилепсию, массивный билатеральный миоклонус, катамениальную эпилепсию, джексоновское эпилептическое нарушение, болезнь Унферрихта-Лундборга или светочувствительную эпилепсию. Эпилепсия эпилепсия может включать генерализованные судороги или парциальные (т.е. фокальные) судороги.

Эпилептическое расстройство может представлять собой синдром Драве, синдром Леннокса-Гасто, младенческие судороги или синдром Отахара. Эпилептическое расстройство может представлять собой синдром Драве, синдром Леннокса-Гасто, младенческие судороги или синдром Отахара, или педиатрическое эпилептическое расстройство. Педиатрическое эпилептическое расстройство может представлять собой доброкачественную детскую эпилепсию, доброкачественные неонатальные семейные судороги (BFNC), фебрильные судороги, синдром Драве, синдром Леннокса-Гасто, младенческие судороги, синдром Отахара, ювенильную миоклоническую эпилепсию, ювенильную абсансную эпилепсию, детскую абсансную эпилепсию (например, пикнолепсию), младенческие судороги. Эпилептическое расстройство может представлять собой синдром Драве.

Педиатрическое эпилептическое расстройство может представлять собой доброкачественную детскую эпилепсию. Педиатрическое эпилептическое расстройство может представлять собой доброкачественные неонатальные семейные судороги (BFNC). Педиатрическое эпилептическое расстройство может представлять собой фебрильные судороги. Педиатрическое эпилептическое расстройство может представлять собой синдром Драве. Педиатрическое эпилептическое расстройство может представлять собой синдром Леннокса-Гасто. Педиатрическое эпилептическое расстройство может представлять собой младенческие судороги. Педиатрическое эпилептическое расстройство может представлять собой синдром Отахара. Педиатрическое эпилептическое расстройство может представлять собой ювенильную миоклоническую эпилепсию. Педиатрическое эпилептическое расстройство может представлять собой ювенильную абсансную эпилепсию.

Педиатрическое эпилептическое расстройство может представлять собой детскую абсансную эпилепсию (например, пикнолепсию).

Педиатрическое эпилептическое расстройство может представлять собой младенческие судороги.

Эпилептическое расстройство может быть результатом неврологического заболевания или повреждения, например, такого как энцефалит, церебрит, абсцесс, инсульт, опухоль, травма, генетическое повреждение, туберозный склероз, церебральная дисгенезия или гипоксическая-ишемическая энцефалопатия.

Эпилептическое расстройство может быть ассоциировано с нейродегенеративным заболеванием, например, таким как болезнь Альцгеймера или болезнь Паркинсона. Эпилептическое расстройство может быть ассоциировано с аутизмом. Эпилептическое расстройство может быть ассоциировано с мутацией в гене. Эпилептическое заболевание может быть ассоциировано с компульсивным поведением или электрографическими судорогами. Введение агониста рецептора 5-HT или его фармацевтически приемлемой соли может ингибировать компульсивное поведение или электрографические судороги при эпилептическом расстройстве, у индивидуума с болезнью Альцгеймера (например, у индивидуума, страдающего болезнью Альцгеймера), у индивидуума с аутизмом (например, у индивидуума, имеющего ау-

тизм) или у индивидуума с болезнью Паркинсона (например, у индивидуума, страдающего болезнью Паркинсона). Таким образом, агонист рецептора 5-HT или его фармацевтически приемлемая соль может ингибировать судорожное поведение или электрографические судороги при эпилептическом расстройстве. Агонист 5-HT или его фармацевтически приемлемая соль может ингибировать судорожное поведение или электрографические судороги у индивидуума с болезнью Альцгеймера. Агонист рецептора 5-HT или его фармацевтически приемлемая соль может ингибировать судорожное поведение или электрографические судороги у индивидуума с аутизмом. Агонист рецептора 5-HT или его фармацевтически приемлемая соль может ингибировать судорожное поведение или электрографические судороги у индивидуума с болезнью Паркинсона.

Введение агониста рецептора 5-HT или его фармацевтически приемлемой соли может снижать встречаемость (например, количество случаев возникновения) неспровоцированных припадков у индивидуума по сравнению с отсутствием агониста рецептора 5-HT или его фармацевтически приемлемой соли. Таким образом, можно проводить мониторинг ответа пациента на введение агониста рецептора 5-HT или его фармацевтически приемлемой соли постепенно по сравнению с моментом времени до введения соединений, описанных в настоящем описании (например, контроль или контрольный момент времени).

Введение агониста рецептора 5-HT или его фармацевтически приемлемой соли может снижать или предупреждать миоклонические судороги или эпилептический статус у индивидуума по сравнению с отсутствием агониста рецептора 5-HT или его фармацевтически приемлемой соли. Введение агониста рецептора 5-HT или его фармацевтически приемлемой соли может снижать или предотвращать миоклонические судороги у индивидуума по сравнению с отсутствием агониста рецептора 5-HT или его фармацевтически приемлемой соли. Введение агониста рецептора 5-HT или его фармацевтически приемлемой соли может снижать или предотвращать эпилептический статус у индивидуума по сравнению с отсутствием агониста рецептора 5-HT или его фармацевтически приемлемой соли. Таким образом, можно проводить мониторинг ответа пациента на введение агониста рецептора 5-HT или его фармацевтически приемлемой соли постепенно по сравнению с моментом времени до введения соединений, описанных в настоящем описании (например, контроль или контрольный момент времени).

Эпилептическое расстройство может представлять собой эпилептическое расстройство, которое не отвечает на лечение противосудорожным лекарственным средством (AED). Индивидуум может иметь кетогенную диету. Эпилептическое расстройство может представлять собой эпилептическое расстройство у взрослого индивидуума (например, старше 16 лет).

Эпилептическое расстройство может представлять собой эпилептическое расстройство у детей. Таким образом, эпилептическое расстройство может представлять собой педиатрическое эпилептическое расстройство. Возраст ребенка может составлять менее чем приблизительно 1 неделя. Возраст ребенка может составлять менее чем приблизительно 1 месяц.

Возраст ребенка может составлять менее чем приблизительно 6 месяцев. Возраст ребенка может составлять менее чем приблизительно 12 месяцев. Возраст ребенка может составлять менее чем приблизительно 2 года. Возраст ребенка может составлять менее чем приблизительно 3 года. Возраст ребенка может составлять менее чем приблизительно 4 года. Возраст ребенка может составлять менее чем приблизительно 5 лет. Возраст ребенка может составлять менее чем приблизительно 6 лет. Возраст ребенка может составлять менее чем приблизительно 7 лет. Возраст ребенка может составлять менее чем приблизительно 8 лет. Возраст ребенка может составлять менее чем приблизительно 9 лет. Возраст ребенка может составлять менее чем приблизительно 10 лет. Возраст ребенка может составлять менее чем приблизительно 12 лет.

Возраст ребенка может составлять более чем приблизительно 1 неделя. Возраст ребенка может составлять более чем приблизительно 1 месяц. Возраст ребенка может составлять более чем приблизительно 6 месяцев. Возраст ребенка может составлять более чем приблизительно 12 месяцев. Возраст ребенка может составлять более чем приблизительно 2 года. Возраст ребенка может составлять более чем приблизительно 3 года. Возраст ребенка может составлять более чем приблизительно 4 года. Возраст ребенка может составлять более чем приблизительно 5 лет. Возраст ребенка может составлять более чем приблизительно 5 лет. Возраст ребенка может составлять более чем приблизительно 6 лет. Возраст ребенка может составлять более чем приблизительно 7 лет. Возраст ребенка может составлять более чем приблизительно 8 лет. Возраст ребенка может составлять более чем приблизительно 9 лет. Возраст ребенка может составлять более чем приблизительно 10 лет. Возраст ребенка может составлять более чем приблизительно 11 лет. Возраст ребенка может составлять более чем приблизительно 12 лет.

Ребенок может иметь эпилептическое расстройство, которое лечат введением AED, как описано в настоящем описании. Таким образом, агонист рецептора 5-HT или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить такому ребенку (например, в качестве вспомогательной терапии).

В другом аспекте предусматривается способ лечения синдрома Драве. Способ лечения синдрома Драве включает введение индивидууму, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества агониста рецептора 5-HT или его фармацевтически приемлемой соли. Способ лечения синдрома Драве может включать введение индивидууму, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции агониста

рецептора 5-HT или его фармацевтически приемлемой соли, как описано в настоящем описании. Агонист рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) можно совместно вводить индидууму, нуждающемуся в этом, с AED, как описано в настоящем описании.

В способах, описанных в настоящем описании, агонист рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) можно совместно вводить с противоэпилептическим лекарственным средством (AED). AED может представлять собой ацетазоламид, бензодиазепин, каннабидиолы, карбамазепин, клобазам, клонезепам, эсликарбазепина ацетат, этосуксимид, этотоин, фелбамат, фенфлурамин, фосфенитоин, габапентин, ганаксолон, гуперзин А, лакозамид, ламотригин, леветирацетам, нитразепам, окскарбазепин, перампанел, пирацетам, фенобарбитал, фенитоин, бромид калия, прегабалин, примидон, ретигабин, руфинамид, вальпроевую кислоту, вальпроат натрия, стирипентол, тиагабин, топирамат, вигабатрин или зонисамид. AED может представлять собой вальпроевую кислоту, вальпроат натрия, клонезепам, этосуксимид, фелбамат, габапентин, карбамазепин, окскарбазепин, ламотригин, леветирацетам, бензодиазепин, фенобарбитал, прегабалин, примидон, тиагабин, топирамат, бромид калия, фенитоин, стирипентол, вигабатрин или зонисамид. AED может представлять собой вальпроевую кислоту, вальпроат натрия, габапентин, топирамат, карбамазепин, окскарбазепин или вигабатрин.

AED может представлять собой ацетазоламид. AED может представлять собой бензодиазепин. AED может представлять собой каннабидиолы. AED может представлять собой карбамазепин. AED может представлять собой клобазам. AED может представлять собой клонезепам. AED может представлять собой эсликарбазепина ацетат.

AED может представлять собой этосуксимид. AED может представлять собой этотоин. AED может представлять собой фелбамат. AED может представлять собой фенфлурамин. AED может представлять собой фосфенитоин. AED может представлять собой габапентин. AED может представлять собой ганаксолон. AED может представлять собой гуперзин А. AED может представлять собой лакозамид. AED может представлять собой ламотригин. AED может представлять собой леветирацетам. AED может представлять собой нитразепам. AED может представлять собой окскарбазепин. AED может представлять собой перампанел. AED может представлять собой пирацетам. AED может представлять собой фенобарбитал. AED может представлять собой фенитоин. AED может представлять собой бромид калия. AED может представлять собой прегабалин. AED может представлять собой примидон. AED может представлять собой ретигабин. AED может представлять собой руфинамид. AED может представлять собой вальпроевая кислота. AED может представлять собой вальпроат натрия. AED может представлять собой стирипентол. AED может представлять собой тиагабин. AED может представлять собой топирамат. AED может представлять собой вигабатрин. AED может представлять собой зонисамид. Клемизол или аналог клемизола (включая его фармацевтически приемлемые соли) или фармацевтическую композицию клемизола или аналога клемизола можно вводить в качестве вспомогательной терапии для одного или нескольких AED, описанных в настоящем описании.

Агонист рецептора 5-HT или его фармацевтически приемлемую соль, таким образом, можно вводить в качестве вспомогательной (например, в комбинации с) терапии для AED для лечения судорого, включая судороги, ассоциированные с эпилептическими расстройствами, описанными в настоящем описании. Агонист рецептора 5-HT или его фармацевтически приемлемую соль можно вводить в качестве вспомогательной терапии (например в комбинации с) для AED для лечения судорог, включая судороги, ассоциированные с эпилептическими расстройствами, описанными в настоящем описании.

Эпилептическое расстройство может характеризоваться парциальными припадками или генерализованными припадками.

Эпилептическое расстройство может характеризоваться парциальными припадками. Эпилептическое расстройство может характеризоваться генерализованными припадками. Парциальный припадок может представлять собой простой фокальный припадок, комплексный фокальный припадок или парциальный фокальный припадок с вторичной генерализацией. Генерализованный припадок может представлять собой генерализованный тонико-клонический припадок, абсанс-припадок (т.е. малый припадок), миоклонические судороги, клонические судороги, тонические судороги или атонические судороги.

При совместном введении с AED, описанными в настоящем описании, агонист рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) и AED можно вводить одновременно. При одновременном введении агонист рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) можно составлять вместе с AED (т.е. в одной дозированной единице). Агонист рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) можно составлять для отдельного введения от AED, но проводимого в одно и то же время. При совместном составлении с AED, описанными в настоящем описании, агонист рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) можно вводить последовательно (например, до или после) введения AED. Как указано в данной области, специалист в данной области может без труда определить последовательный порядок введения.

Агонист рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) можно вводить в дозе от приблизительно 1 до приблизительно 1000 мг/кг. Агонист рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) можно вводить в дозе от приблизительно 10 до приблизительно 1000 мг/кг. Агонист рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) можно вводить в дозе от прибли-

дые 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 ч). Агонист рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) можно вводить каждые сутки в дозировках, описанных в настоящем описании. Агонист рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) можно вводить по меньшей мере два раза в неделю в дозировках, описанных в настоящем описании. Агонист рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) можно вводить по меньшей мере три раза в неделю, как описано в настоящем описании. Агонист рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) можно вводить раз в месяц, как описано в настоящем описании.

В рамках настоящего изобретения предусматриваются способы лечения заболевания или нарушения, вызванного дефицитом серотонина в головном мозге или активностью одного или нескольких рецепторов 5HT, посредством введения терапевтически эффективного количества клемизола, аналога клемизола или их фармацевтически приемлемой соли. Заболевание или нарушение, вызванное дефицитом серотонина в головном мозге или активностью одного или нескольких рецепторов 5HT, может представлять собой синдром ломкой X-Хромосомы. Заболевание или нарушение, вызванное дефицитом серотонина в головном мозге или активностью одного или нескольких рецепторов 5HT, может представлять собой синдром Прадера-Вилли. Заболевание или нарушение, вызванное дефицитом серотонина в головном мозге или активностью одного или нескольких рецепторов 5HT, может представлять собой шизофрению. Заболевание или нарушение, вызванное дефицитом серотонина в головном мозге или активностью одного или нескольких рецепторов 5HT, может представлять собой депрессию. Заболевание или нарушение, вызванное дефицитом серотонина в головном мозге или активностью одного или нескольких рецепторов 5HT, может представлять собой болезнь Альцгеймера. Заболевание или нарушение, вызванное дефицитом серотонина в головном мозге или активностью одного или нескольких рецепторов 5HT, может представлять собой аутизм. Заболевание или нарушение, вызванное дефицитом серотонина в головном мозге или активностью одного или нескольких рецепторов 5HT, может представлять собой невротическую боль. Заболевание или нарушение, вызванное дефицитом серотонина в головном мозге или активностью одного или нескольких рецепторов 5HT, может представлять собой болезнь Паркинсона. Заболевание или нарушение, вызванное дефицитом серотонина в головном мозге или активностью одного или нескольких рецепторов 5HT, может представлять собой синдром раздраженного кишечника. Заболевание или нарушение, вызванное дефицитом серотонина в головном мозге или активностью одного или нескольких рецепторов 5HT, может представлять собой деменцию.

Кроме того, в рамках настоящего изобретения предусматривается способ модулирования активности рецептора 5HT, включающий приведение в контакт рецептора 5HT с клемизолом, аналогом клемизола или их фармацевтически приемлемой солью.

Аналог клемизола может включать соединения формулы (I), описанные в настоящем описании, и может включать соединения сходной структуры, как указано, например, в PCT/US 2008/076804, WO 10107739, WO 2009039248 или патенте США № 4011322, которые включены в настоящее описание в качестве ссылок.

В вариантах осуществления изобретение относится к способам лечения эпилепсии или синдрома Драве посредством введения терапевтически эффективного количества тразадона или его фармацевтически приемлемой соли. В вариантах осуществления терапевтически эффективное количество составляет от приблизительно 10 до приблизительно 600 мг/сутки. В вариантах осуществления способы предназначены для лечения эпилепсия. В вариантах осуществления эпилепсия представляет собой педиатрическую эпилепсию. В вариантах осуществления способы предназначены для лечения синдрома Драве.

Фармацевтические композиции

В рамках настоящего изобретения предусматриваются фармацевтические композиции, содержащие агонист рецептора 5-HT или его фармацевтически приемлемую соль, пригодные для лечения вышеупомянутых заболеваний или нарушений. Фармацевтическая композиция может быть составлена в качестве таблетки, порошка, капсулы, пилюли, крахмальной капсулы или пастилки, как описано в настоящем описании. Фармацевтическая композиция может быть составлена в качестве таблетки, капсулы, пилюли, крахмальной капсулы или пастилки для перорального введения. Фармацевтическая композиция может быть составлена для растворения в растворе для введения такими способами, как, например, внутривенное введение. Фармацевтическая композиция может быть составлена для перорального введения, введения посредством суппозитория, местного введения, внутривенного введения, внутривенного введения, внутримышечного введения, введения внутрь очага повреждения, интратекального введения, интраназального введения, подкожного введения, имплантации, трансдермального введения или трансмукозального введения, как описано в настоящем описании.

При введении в качестве фармацевтической композиции фармацевтические композиции могут включать оптические изомеры, диастереомеры, энантиомеры, изоформы, полиморфы, гидраты, сольваты или продукты, или фармацевтически приемлемые соли агониста рецептора 5-HT. Агонист рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли), включенный в фармацевтическую композицию, может быть ковалентно связан с частью носителя, как описано выше. Альтернативно агонист рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли), включенный в фармацевтическую композицию, не связан ковалентно с частью носителя.

Агонист рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) можно вводить или совместно вводить индивидууму, нуждающемуся в этом, с AED, как описано в настоящем описании. Совместное введение подразумевает включение одновременного или последовательного введения, как описано в настоящем описании, агониста рецептора 5-HT по отдельности или в комбинации (например, более одного соединения - например, AED, описанного в настоящем описании). Препараты также можно комбинировать, когда это желательно, с другими активными веществами (например, для предотвращения припадков).

Составы

Агонист рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) или фармацевтическую композицию, описанную в настоящем описании, можно получать и вводить в широком множестве пероральных, парентеральных и местных дозированных форм. Таким образом, агонист рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) или фармацевтическую композицию, описанную в настоящем описании, можно вводить посредством инъекции (например внутривенно, внутримышечно, внутрикожно, подкожно, внутрь двенадцатиперстной кишки или внутривнутрибрюшинно). Также агонист рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) или фармацевтическую композицию, описанную в настоящем описании, можно вводить посредством ингаляции, например интраназально. Кроме того, агонист рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) или фармацевтическую композицию можно вводить трансдермально. Также предусматривается, что множество путей введения (например, внутримышечный, пероральный, трансдермальный) можно использовать для введения агониста рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) или фармацевтической композиции, содержащей его. Фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, могут включать фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент и один или несколько агонистов рецептора 5-HT (включая их фармацевтически приемлемые соли). Фармацевтические композиции, описанные в настоящем описании, могут включать фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент, один или несколько агонистов рецептора 5-HT (включая их фармацевтически приемлемые соли) и один или несколько AED, как описано в настоящем описании.

Препарат может включать фармацевтически приемлемые носители. Фармацевтически приемлемые носители могут быть либо твердыми, либо жидкими. Препараты в твердой форме включают порошки, таблетки, пилюли, капсулы, крахмальные капсулы, суппозитории и диспергируемые гранулы. Твердый носитель может представлять собой одно или несколько веществ, которые могут действовать в качестве разбавителей, вкусовых добавок, связующих веществ, консервантов, разрыхлителей таблеток или инкапсулирующего материала.

В порошках носитель может быть тонкоизмельченным твердым веществом в смеси с тонкоизмельченным активным компонентом. В таблетках активный компонент может быть смешан с носителем, имеющим необходимые связывающие свойства, в подходящих соотношениях и прессованным в желаемой форме и желаемом размере.

Порошки и таблетки предпочтительно содержат от 5 до 70% активного соединения. Подходящие носители представляют собой карбонат магния, стеарат магния, тальк, сахар, лактозу, пектин, декстрин, крахмал, желатин, трагакант, метилцеллюлозу, натрий карбоксиметилцеллюлозу, легкоплавкий воск, масло какао и т.п. Термин "препарат" включает состав активного соединения с инкапсулирующим материалом, таким как носитель, обеспечивающий капсулу, в которой активный компонент с другими носителями или без них окружен носителем, который таким образом ассоциирован с ним. Аналогично, включены крахмальные капсулы и пастилки. В качестве твердых дозированных форм, пригодных для перорального введения, можно использовать таблетки, порошки, капсулы, пилюли, крахмальные капсулы и пастилки.

Подходящие твердые эксципиенты включают, но не ограничиваются ими, карбонат магния; стеарат магния; тальк; пектин; декстрин; крахмал; трагакант; легкоплавкий воск; масло какао; углеводы; сахара, включая, но не ограничиваясь ими, лактозу, сахарозу, маннит или сорбит, крахмал из кукурузы, пшеницы, риса, картофеля или других растений; целлюлозу, такую как метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза или натрий карбоксиметилцеллюлоза; и камеди, включая гуммиарабик и трагакант; а также белки, включая, но не ограничиваясь ими, желатин и коллаген. Если желательно, можно добавлять дезитегрирующие или солюбилизующие средства, такие как поперечно-сшитый поливинилпирролидон, агар, альгиновая кислота или ее соль, такая как альгинат натрия.

Сердцевины драже предоставляются с подходящими покрытиями, такими как концентрированные растворы сахаров, которые также могут содержать гуммиарабик, тальк, поливинилпирролидон, карбопол гель, полиэтиленгликоль и/или диоксид титана, лакирующие растворы и подходящие органические растворители или смеси растворителей. В таблетки и покрытия драже можно добавлять красители или пигменты для идентификации продукта или для охарактеризации количества агониста рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) или фармацевтической композиции (т.е. дозировки). Фармацевтические препараты, описанные в настоящем описании, можно использовать перорально, с использованием, например, твердых капсул, изготовленных из желатина, а также мягких запаянных капсул, изготовленных из желатина и покрытия, такого как глицерин или сорбит.

Для получения суппозиторий легкоплавкий воск, такой как смесь глицеридов жирных кислот или масло какао, сначала плавят и активный компонент гомогенно диспергируют в ней, например, посредством перемешивания. Затем расплавленную гомогенную смесь переливают в формы удобного размера, позволяют остыть и, тем самым, затвердеть.

Препараты в жидкой форме включают растворы, суспензии и эмульсии, например водные растворы или растворы в воде/пропиленгликоле. Для парентеральной инъекции жидкие препараты можно составлять в растворе в виде водного раствора полиэтиленгликоля.

Когда требуется или является желательным парентеральное применение, особенно подходящими добавками для агониста рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) или фармацевтической композиции, содержащей его, являются инъекционные стерильные растворы, предпочтительно масляные или водные растворы, а также суспензии, эмульсии или имплантаты, в том числе суппозитории. В частности, носители для парентерального введения включают водные растворы декстрозы, солевой раствор, чистую воду, этанол, глицерин, пропиленгликоль, арахисовое масло, кунжутное масло, блок-полимеры полиоксипропилена и т.п. Удобными единичными дозировками являются ампулы. Агонист рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) или фармацевтическая композиция, содержащая его, также может быть заключен в липосомы или введен посредством трансдермальных пластырей. Фармацевтические добавки, пригодные для применения в рамках настоящего изобретения, включают добавки, описанные, например, в *Pharmaceutical Sciences* (17th Ed., Mack Pub. Co., Easton, PA) и WO 96/05309, идеи обеих из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Водные растворы, пригодные для перорального применения, можно получать путем растворения активного компонента в воде и добавления подходящих красителей, вкусовых добавок, стабилизаторов и загустителей, если желательно. Водные суспензии, пригодные для перорального применения, можно получать путем диспергирования тонкоизмельченного активного компонента в воде с вязким материалом, таким как природные или синтетические камеди, смолы, метилцеллюлоза, натрий карбоксиметилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, альгинат натрия, поливинилпирролидон, трагакантовая камедь и гуммиарабик, и диспергирующих или смачивающих веществ, таких как встречающийся в природе фосфатид (например, лецитин), продукт конденсации оксида алкилена с жирной кислотой (например, полиоксипропилстеарат), продукт конденсации оксида этилена с алифатическим спиртом длинной цепи (например, гептадекаэтил оксипропанол), продукт конденсации оксида этилена с неполным эфиром, образованным жирной кислотой и гекситом (например, полиоксипропил сорбит моноолеат) или продукт конденсации оксида этилена с неполным эфиром, образованным жирной кислотой и ангидридом гексита (например, полиоксипропил сорбитан моноолеат). Водная суспензия также может содержать один или несколько консервантов, таких как этил или *n*-пропил *p*-гидроксibenзоат, один или несколько красителей, одну или несколько вкусовых добавок и один или несколько подсластителей, таких как сахароза, аспартам или сахарин. Составы можно корректировать по осмолярности.

Также настоящее изобретение охватывает препараты в твердой форме, которые предназначены для конвертирования, непосредственно перед применением, в препараты в жидкой форме для перорального введения. Такие жидкие формы включают растворы, суспензии и эмульсии. Эти препараты могут содержать, в дополнение к активному компоненту, красители, вкусовые добавки, стабилизаторы, буферы, искусственные и натуральные подсластители, диспергирующие средства, загустители, солибилизаторы и т.п.

Масляные суспензии могут содержать загуститель, такой как пчелиный воск, твердый парафин или цетиловый спирт. Подсластители, такие как глицерин, сорбит или сахароза, можно добавлять для обеспечения имеющего приятный вкус перорального препарата. Эти составы можно консервировать добавлением антиоксиданта, такого как аскорбиновая кислота. В качестве примера инъекционного масляного носителя, см. Minto, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281:93-102, 1997. Фармацевтические составы, описанные в настоящем описании, также могут иметь форму эмульсий типа "масло в воде". Масляная фаза может представлять собой растительное масло или минеральное масло, описанное выше, или их смесь. Подходящие эмульгаторы включают встречающиеся в природе камеди, такие как гуммиарабик и трагакантовая камедь, встречающиеся в природе фосфатиды, такие как соевый лецитин, сложные эфиры или неполные эфиры, образованные жирными кислотами и ангидридами гекситов, такие как сорбитан моноолеат, и продукты конденсации этих неполных эфиром с оксидом этилена, такие как полиоксипропил сорбитан моноолеат. Эмульсия также может содержать подсластители и вкусовые добавки, например, в составах сиропов и эликсиров. Такие составы также могут содержать средство, уменьшающее раздражение, консервант или краситель.

Предпочтительно фармацевтический находится в единичной дозированной форме. В такой форме препарат подразделен на единичные дозы, содержащие соответствующие количества активного компонента. Единичная дозированная форма может представлять собой упакованный препарат, упаковку, содержащую дискретные количества препарата, такую как упакованные таблетки, капсулы и порошки во флаконах или ампулах. Также единичная дозированная форма может представлять собой непосредственно капсулу, таблетку, крахмальную капсулу или пастилку, или она может представлять собой подходящее количество любого из них в упакованной форме.

Количество активного компонента в препарате единичной дозы может варьироваться или может быть доведено до величины от 0,1 до 10000 мг в зависимости от конкретного применения и эффективности активного компонента. Если желательно, композиция также может содержать другие совместимые лекарственные средства.

Составы могут включать поверхностно-активное вещество или другой подходящий соразтворитель в композиции. Такие соразтворители включают полисорбат 20, 60 и 80; плуроник F-68, F-84 и P-103; циклодекстрин; и полиоксил 35 касторовое масло. Такие соразтворители обычно используют на уровне от приблизительно 0,01 до приблизительно 2% по массе. Вязкость, превышающая вязкость простых водных растворов, может быть желательной для снижения вариабельности при распределении составов, для снижения физического разделения компонентов суспензионного или эмульсионного состава, и/или в ином случае для улучшения состава. Такие загустители включают, например, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, гидроксиэтилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, хондроитинсульфат и его соли, гиалуроновую кислоту и ее соли и комбинации вышеуказанных. Такие средства обычно используют на уровне от приблизительно 0,01 до приблизительно 2% по массе.

Вязкость, превышающая вязкость простых водных растворов, может быть желательной для снижения вариабельности при распределении составов, для снижения физического разделения компонентов суспензионного или эмульсионного состава, и/или в ином случае для улучшения состава. Такие загустители включают, например, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, гидроксиэтилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, хондроитинсульфат и его соли, гиалуроновую кислоту и ее соли и комбинации вышеуказанных, и другие средства, известные специалистам в данной области. Такие средства обычно используют на уровне от приблизительно 0,01 до приблизительно 2% по массе. Определение приемлемых количеств любого из вышеуказанных адъювантов может без труда осуществить специалист в данной области.

Фармацевтические композиции, кроме того, могут включать компоненты для обеспечения замедленного высвобождения и/или комфорта. Такие компоненты включают высокомолекулярные, анионные, имитирующие слизь полимеры, гелеобразующие полисахариды и тонкоизмельченные субстраты носителей лекарственных средств. Эти компоненты более подробно рассмотрены в патентах США № 4911920; 5403841; 5212162 и 4861760. Полное содержание этих патентов включено в настоящее описание в качестве ссылок в полном объеме для всех целей.

Фармацевтическая композиция может быть предназначена для внутривенного применения. Фармацевтически приемлемый эксципиент может включать буферы для коррекции pH до желаемого диапазона для внутривенного применения. Известны многие буферы, включая соли неорганических кислот, такие как фосфат, борат и сульфат.

Агонист рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) или его фармацевтическую композицию можно доставлять трансдермально для лечения эпилептических расстройств, описанных в настоящем описании, местным путем, составленные в качестве аппликаторных палочек, растворов, суспензий, эмульсий, гелей, кремов, мазей, паст, желе, красок, порошков и аэрозолей.

Агонист рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) может быть предоставлен в качестве соли в фармацевтических композициях, описанных в настоящем описании, и может быть образован с множеством кислот, включая, но не ограничиваясь ими, хлористоводородную, серную, уксусную, молочную, виннокаменную, яблочную, янтарную и т.д. Соли имеют тенденцию к тому, чтобы быть более растворимыми в водных или других протонных растворителях, чем соответствующие формы свободных оснований.

Агонист рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) или его фармацевтическую композицию, вводимые для лечения эпилептических расстройств, описанных в настоящем описании, можно вводить посредством парентерального введения, такого как внутривенное (в/в) введение или введение в полость тела или просвет органа. Составы для введения обычно содержат раствор композиций по настоящему изобретению, растворенный в фармацевтически приемлемом носителе. Среди приемлемых носителей и растворителей, которые можно использовать, находятся вода и раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, обычно в качестве растворителя или суспендирующей среды можно использовать стерильные жирные масла. Для этой цели можно использовать любое мягкое жирное масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, аналогично для получения инъекционных препаратов можно использовать жирные кислоты, такие как *as* олеиновая кислота. Эти растворы являются стерильными и обычно свободны от нежелательных материалов. Эти составы можно стерилизовать общепринятыми хорошо известными способами стерилизации. Составы могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для приближения к физиологическим условиям, такие как корректирующие pH и буферные средства, корректирующие токсичность средства, например ацетат натрия, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция, лактат натрия и т.п. Концентрация композиций по настоящему изобретению в эти составы может широко варьироваться, и она будет выбрана в основном, исходя из объемов жидкости, вязкости, массы тела и т.п., в соответствии с конкретным выбранным способом введения и потребностями пациента. Для в/в введения состав

может представлять собой стерильный инъекционный препарат, такой как стерильная инъекционная водная или масляная суспензия. Эту суспензию можно составлять в соответствии с уровнем техники с использованием подходящих диспергирующих или смачивающих веществ и суспендирующих веществ. Стерильный инъекционный препарат также может представлять собой стерильный инъекционный раствор или суспензию в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, таком как раствор 1,3-бутандиола.

Фармацевтические составы агониста рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) для лечения эпилептического расстройства можно доставлять с использованием липосом, которые сливаются с клеточной мембраной или подвергаются эндоцитозу, т.е. с использованием лигандов, связанных с липосомой, или связанных непосредственно с олигонуклеотидом, который связывается с белковыми рецепторами поверхности мембраны клетки, что может приводить к эндоцитозу. С использованием липосом, в частности, когда поверхность липосом содержит лиганды, специфичные к клеткам-мишеням, или в ином случае предпочтительно направленные на конкретный орган, можно фокусировать доставку композиций по настоящему изобретению в клетки-мишени *in vivo* (см., например, Al-Muhammed, J. Microencapsul. 13: 293-306, 1996; Chonn, Curt. Opin. Biotechnol. 6:698-708, 1995; Ostro, Am. J. Hosp. Pharm. 46:1576-1587, 1989).

Совместное введение включает введение одного активного вещества (например, клемизол или аналог клемизола (включая его фармацевтически приемлемые соли)) в пределах 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 или 24 ч от второго активного вещества (например, противосудорожный препарат). Совместное введение может включать введение одного активного вещества в пределах 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 или 24 ч от второго активного вещества. Совместное введение может включать введение двух активных веществ одновременно, приблизительно одновременно (например, в пределах приблизительно 1, 5, 10, 15, 20 или 30 мин друг от друга), или последовательно в любом порядке. Совместное введение можно проводить посредством совместного составления, т.е. получения одной фармацевтической композиции, включающей оба активных вещества. В других вариантах осуществления активные вещества могут быть составлены по отдельности. Активные и/или вспомогательные вещества могут быть связаны или конъюгированы друг с другом.

Совместное введение также включает комбинацию со способами лечения эпилептических расстройств, таких как необходимость диеты или изменение диеты. Таким образом, агонист рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) или его фармацевтическую композицию можно вводить индивидуумам на специализированных диетах, включая, но не ограничиваясь ими, кетогенную диету (например, диету с высоким содержанием жиров, достаточным содержанием белка, низким содержанием углеводов).

Эффективные дозировки

Фармацевтическая композиция может включать агонист рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли), содержащий в терапевтической эффективном количестве, т.е. в количестве, эффективном для достижения его предполагаемой цели. Истинное количество, эффективное для конкретного применения, зависит, среди прочего, от состояния, подвергаемого лечению. Например, при введении в способах лечения эпилептического расстройства (например, синдрома Драве), такие композиции содержат количества агониста рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) или его фармацевтической композиции, эффективные для достижения желаемого результата (например, ингибирования судорог).

Дозировка и частота введения (однократная или многократные дозы) агониста рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) или его фармацевтической композиции может варьироваться в зависимости от различных факторов, включающих путь введения; размер, возраст, пол, состояние здоровья, массу тела, индекс массы тела и диету реципиента; природу и степень выраженности симптомов заболевания, подвергаемого лечению; присутствие других заболеваний или связанных со здоровьем проблем; тип сопутствующего лечения; и осложнения любого заболевания или режима лечения. Совместно со способами, описанными в настоящем описании, можно использовать другие терапевтические режимы и средства.

Терапевтически эффективное количество агониста рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) или его фармацевтической композиции для лечения эпилептических заболеваний, описанных в настоящем описании, первоначально можно определять в анализах культуры клеток. Целевые концентрации представляют собой концентрации агониста рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) или его фармацевтической композиции, способные ингибировать или иным образом уменьшать судороги, испытываемые пациентом.

Терапевтически эффективные количества агониста рецептора 5-HT (включая его фармацевтически приемлемые соли) или его фармацевтической композиции для применения у человека можно определять в моделях на животных. Например, дозу для человека можно составлять для достижения концентрации, для которой было обнаружено, что она является эффективной у животных. Дозировку у человека можно корректировать посредством мониторинга ответа пациента на лечение и коррекции дозировки в сторону увеличения или снижения, как описано выше.

Дозировки могут варьироваться в зависимости от потребностей индивидуума и используемого соединения. Доза, вводимая индивидууму, в контексте фармацевтических композиций, описанных в настоящем описании, должна быть достаточной для обеспечения благоприятного терапевтического ответа у индивидуума с течением времени. Размер дозы также будет определяться существованием, природой и степенью каких-либо неблагоприятных побочных эффектов. Как правило, лечение начинают с более маленьких дозировок, меньших чем оптимальная доза соединения. После этого дозировку увеличивают с небольшими приращениями до тех пор, пока не достигнут оптимального эффекта в данных обстоятельствах.

Дозировки и интервалы можно корректировать индивидуально для обеспечения уровней агониста рецептора 5-НТ (включая его фармацевтически приемлемые соли) или его фармацевтической композиции, эффективных для конкретного эпилептического расстройства, подвергаемого лечению. Это может обеспечить терапевтический режим, соответствующий тяжести болезненного состояния индивидуума.

С использованием идей, описанных в настоящем описании, может быть запланирован эффективный профилактический или терапевтический режим лечения, который не вызывает значительной токсичности и, тем не менее, является эффективным для лечения клинических симптомов, которые демонстрирует конкретный пациент. Это планирование должно вовлекать тщательный выбор агониста рецептора 5-НТ (включая его фармацевтически приемлемые соли) или его фармацевтической композиции, с учетом таких факторов, как эффективность, относительная биодоступность, масса тела пациента, наличие и тяжесть неблагоприятных побочных эффектов, предпочтительный способ введения и профиль токсичности выбранного средства.

Токсичность

Соотношение между токсичностью и терапевтическим эффектом для конкретного соединения представляет собой его терапевтический индекс, и он может быть выражен как соотношение между LD₅₀ (количество соединения, летальное в 50% популяции) и ED₅₀ (количество соединения, эффективное в 50% популяции). Предпочтительными являются соединения, которые демонстрируют высокие терапевтические индексы. Данные о терапевтических индексах, полученные в анализах на клеточной культуре и/или исследованиях на животных, можно использовать при составлении диапазона дозировок для применения у человека. Дозировка таких соединений предпочтительно находится в диапазоне концентраций в плазме, которые включают ED₅₀ с небольшой токсичностью или ее отсутствием. Дозировка может варьироваться в этом диапазоне в зависимости от используемой дозированной формы и используемого пути введения. См., например, Fingl et al., THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, Ch.1, p.1, 1975. Точный состав, путь введения и дозировка могут быть выбраны лечащим врачом индивидуума с учетом состояния пациента и конкретного способа, в котором соединение используют.

Когда является необходимым или желательным парентеральный состав, особенно подходящие добавки для агониста рецептора 5-НТ (включая его фармацевтически приемлемые соли), включенные в фармацевтическую композицию, могут представлять собой инъекционные стерильные растворы, масляные или водные растворы, а также суспензии, эмульсии или имплантаты, в том числе суппозитории. В частности, носители для парентерального введения включают водные растворы декстрозы, солевой раствор, чистую воду, этанол, глицерин, пропиленгликоль, арахисовое масло, кунжутное масло, блок-полимеры полиоксиэтилена и т.п. Удобными единичными дозировками являются ампулы.

Фармацевтические добавки для применения в фармацевтических композициях, описанных в настоящем описании, могут включать добавки, описанные, например, в Pharmaceutical Sciences (17th Ed., Mack Pub. Co., Easton, PA) и WO 96/05309, идеи обеих из которых включены в настоящее описание в качестве ссылок.

Примеры

Пример 1.

Эпилепсия может быть приобретенной в результате повреждения головного мозга или генетической мутации. Среди генетической эпилепсии было идентифицировано 650 вариантов в гене SCN1A (Harkin, L.A. et al. The spectrum of SCN1A-related infantile epileptic encephalopathies. Brain 130, 843-852 (2007); Mulley J. C, et al., SCN1A mutations and epilepsy. Hum. Mutat. 25, 535-542 (2005)). Миссенс-мутации или мутации со сдвигом рамки считывания в этом гене ассоциированы с наличием генерализованной эпилепсии с фебрильными судорогами (GEFS+) (Ceulemans, B. P., et al., Clinical correlations of mutations in the SCN1A gene: from febrile seizures to severe myoclonic epilepsy in infancy. Pediatric Neurol. 30, 236-243 (2004)), а также с более тяжелым нарушением, известным как синдром Драве. Дети с DS первоначально демонстрируют нормальное развитие, но часто испытывают эпизоды фебрильных судорог в течение первого года жизни с прогрессированием в конечном итоге в тяжелые спонтанные рецидивирующие припадки, умственную отсталость, атаксию и психомоторную дисфункцию. Припадки недостаточно контролируются с использованием доступных противозепилептических лекарственных средств (AED), и эти дети являются кандидатами для нейрохирургической резекции (Bender, A. C, et al., SCN1A mutations in Dravet syndrome: Impact of interneuron dysfunction on neural networks and cognitive outcome. Epilepsy Beh. 23, 177-186 (2012)).

В головном мозге млекопитающих существует четыре основных подтипа альфа-субъединиц потен-

циал-зависимых натриевых каналов: Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3 и Nav1.6, кодируемых генами SCN1A, SCN2A, SCN3A и SCN8A соответственно. Открытие этих каналов обеспечивает натриевую проводимость и быструю деполяризацию клеточной мембраны, например, что является признаками, необходимыми для инициации потенциала действия (Catterall, W. A., et al., Nav1.1 channels and epilepsy. *J. Physiol.* 588, 1849-1859 (2010)). У мышей Nav1.1 широко экспрессируется в центральной нервной системе, включая начальный сегмент аксона положительных по парвальбумину гиппокампальных промежуточных нейронов и возбуждающие главные клетки (Kim, D. Y., et al., Reduced sodium channel Na(v)1.1 levels in BACE1-null mice. *J. Biol. Chem.* 286, 8106-8116 (2011); Chen, C, et al., Mice lacking sodium channel beta1 subunits display defects in neuronal excitability, sodium channel expression, and nodal architecture. *J. Neurosci.* 24, 4030-4042 (2004)). Гетерозиготная делеция Nav1.1 у мышей приводит к снижению способности к разряду сильно диссоциированных быстро разряжающихся промежуточных нейронов (Yu, F. H., et al., Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nat. Neurosci.* 9, 1142-1149 (2006)). Мыши с глобальной или специфичной к промежуточным нейронам гетерозиготной делецией Nav1.1 демонстрируют индуцируемые температурой и спонтанные судороги, мягкую атаксию, аутизм-подобное поведение и преждевременную смерть (Yu F. H., et al., Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nat. Neurosci.* 9, 1142-1149 (2006); Oakley, J. C, et al., Temperature- and age-dependent seizures in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 3994-3999 (2009); Cheah, C. S., et al., Specific deletion of Nav1.1 sodium channels in inhibitory interneurons causes seizures and premature death in a mouse model of Dravet syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 14646-14651 (2012)). Мыши с нокином, содержащие преждевременный стоп-кодон в домене III канала Nav1.1, также демонстрируют снижение амплитуды пика в ходе длительного разряда промежуточных нейронов и повышенную чувствительность к индуцированным температурой судорогам (Ogiwara, I., et al., Nav1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an Scn1a gene mutation. *J. Neurosci.* 27, 5903-5914 (2007)).

Создание и охарактеризация действующих моделей на животных являются важными для понимания патофизиологии DS и для облегчения идентификации новых способов терапии. В то время как значительное внимание было сосредоточено на моделировании мутаций SCN1A у мышей, было показано, что этих животных трудно разводить и на эпилептические фенотипы строго влияет фоновая генетика линий. Индуцированные плюрипотентные стволовые клетки можно получать от пациентов с DS, однако индивидуальные нейроны не повторяют условия сети, необходимые для индукции припадков *in vivo*. Данио-рерио (*Danio rerio*), простой вид позвоночных, обеспечивает альтернативную модельную систему со значительными преимуществами генетического манипулирования, экономичного разведения и разработки лекарственных средств *in vivo* (Lessman, C. A., The developing zebrafish (*Danio rerio*): a vertebrate model for high-throughput screening of chemical libraries. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 93, 268-280 (2011); Delvecchio, C, et al., The zebrafish: a powerful platform for *in vivo*, HTS drug discovery. *Assay Drug Dev. Technol.* 9, 354-361 (2011); Rinkwitz, S., et al., Zebrafish: an integrative system for neurogenomics and neurosciences. *Prog. Neurobiol.* 93, 231-243 (2011)). В идеальном случае модель на животных должна быть основана на известной генетической причине заболевания (мутация SCN1A), точно воспроизводить ключевые признаки заболевания (эпилепсия) и отвечать или не отвечать на способы терапии, широко используемые у пациентов с заболеванием (фармакологическая валидация). В случае успеха такая модель может обеспечить понимание процесса заболевания и катализировать исследования новых способов терапии.

В данио-рерио семейство потенциал-зависимых натриевых каналов состоит из четырех групп дублированных генов: *Scn1Laa* и *scn1Lab*, *scn4aa* и *scn4ab*, *scn5Laa* и *scn5Lab* и *scn8aa* и *scn8ab* (Novak, A. E., et al., Embryonic and larval expression of zebrafish voltage-gated sodium channel alpha-subunit genes. *Dev. Dyn.* 235, 1962-1973 (2006)). Ген *scn1Lab* данио-рерио обладает 77% идентичностью с SCN1A человека и экспрессируется в центральной нервной системе. Гомозиготный мутант данио-рерио по этому гену (первоначально названный *didys552*) был обнаружен при скрининге с химическим мутагенезом с использованием оптокинетической реакции для анализа (Schoonheim, P. J., Arrenberg, A. B., Del Bene, F., & Baier H., Optogenetic localization and genetic perturbation of saccade-generating neurons in zebrafish. *J. Neurosci.* 30, 7111-7120 (2010)). Эти типы скрининга основаны на индукции случайных точковых мутаций с использованием алкилирующего средства N-этил-N-нитрозомочевины (ENU), полученные мутации, как правило, имеют потерю функции и являются рецессивными. Хотя эта мутация является гомозиготной, мутанты данио-рерио *scn1Lab* соответствуют аутосомно-доминантному синдрому Драве у человека, учитывая дубликацию генома у данио-рерио и присутствие дополнительного гомолога Nav1.1 (*Scn1Laa*).

Мутанты *scn1Lab* были охарактеризованы на молекулярном и поведенческом уровне, было показано, что мутанты демонстрируют спонтанные резистентные к лекарственным средствам судороги, а затем их использовали в новой высокопроизводительной программе скрининга для идентификации соединений, которые смягчают фенотип эпилепсии. Скрининг на основе фенотипа идентифицировал клемизол, одобренное FDA соединение, в качестве эффективного ингибитора спонтанного судорожного поведения и электрографических судорог у этих мутантов.

Экспрессия *scn1Lab* и охарактеризация мутантных данио-рерио. Данио-рерио с мутацией в домене III потенциалзависимого натриевого канала были идентифицированы Dr. Herwig Baier в ходе скрининга с использованием химического мутагенеза (Schoonheim, P. J., Arrenberg, A. B., Del Bene, F., & Baier H., *Optogenetic localization and genetic perturbation of saccade-generating neurons in zebrafish*. *J. Neurosci.* 30, 7111-7120 (2010)). Исходные мутанты *scn1Lab* подвергали обратному скрещиванию с фоном *Tupfel long* (TL) на протяжении 7-10 поколений и подтверждали мутацию метионина (M) на аргинин (R) в колонии (фиг. 1A). Количественная (q) ПЦР и ПЦР с обратной транскриптазой (RT) выявила снижение экспрессии мРНК *scn1Lab* в мутантных личинках через 3, 5 и 7 суток после оплодотворения (dpf) (фиг. 1B); антитела, распознающие этот белок в данио-рерио, не доступны. Как и ожидалось (Novak, A. E., et al., *Embryonic and larval expression of zebrafish voltage-gated sodium channel alpha-subunit genes*. *Dev. Dyn.* 235, 1962-1973 (2006)), *scn1Lab* на заметном уровне экспрессируется на ранних стадиях развития личинок (фиг. 1B) и, в частности, в центральной нервной системой через 3 dpf (фиг. 1D, E). Гибридизация тотального препарата *in situ* выявила диффузную, но выраженную экспрессию в областях головного мозга, соответствующих переднему мозгу (конечный мозг), оптическому тектуму и мозжечку. Сходный профиль экспрессии наблюдали для *Scn1Laa* через 3 dpf. Через 5 и 7 dpf, экспрессия в ЦНС оставалась выраженной, и слабый сигнал *scn1Lab* также отмечался в сердце (фиг. 1D). Относительная экспрессия *scn8aa* или *scn8ab* (*Nav1.6*), например, субъединицы, предположительно действующей в качестве генетического модификатора DS (Martin M. S., et al., *The voltage-gated sodium channel Scn8a is a genetic modifier of severe myoclonic epilepsy of infancy*. *Hum. Mol. Gen.* 16, 2892-2899 (2007)), не продемонстрировала значимых отличий в экспрессии между мутантами и сибсовыми контролями через 5 dpf (фиг. 1C). Аналогично, анализ на микрочипах через 5 dpf также не обнаружил компенсаторное изменение экспрессии мРНК тринадцати различных субъединиц *scn* данио-рерио (табл. I) включая другой гомолог (*Scn1Laa*). Эти результаты демонстрируют селективный дефект в гене *Nav1.1* данио-рерио, экспрессируемом в ЦНС на ранней стадии развития.

Крупномасштабный транскриптомный анализ мутантов *scn1Lab*. Хотя наследственные нарушения потенциалзависимых ионных каналов признаны в качестве этиологии эпилепсии, исследование транскрипционных изменений не было описано ни для каких связанных с эпилепсией каналопатий. Для обнаружения различий в экспрессии генов без искажений использовали чип Agilent *Danio gerio*, охватывающий ~44000 зондов (фиг. 2A, B). Иерархический кластерный анализ продемонстрировал, что ~2,5% (1099) этих зондов экспрессировались дифференциально между мутантами и сибсовыми контролями через 5 dpf ($p < 0,01$, t-критерий; 674 активированных и 425 подавленных); 405 были отнесены к категории "неизвестная функция". Перечень из 30 подавленных и активированных известных генов, демонстрирующий наиболее значимые отличия в экспрессии, показан на фиг. 2C. Эти отличия были умеренными, поскольку 90% (990/1099) из идентифицированных генов продемонстрировали кратность изменений между 0,8 и 2,0. Аналогично анализу на микрочипах мышей с мутацией в одном гене *MeCP2* (Jordan, C, et al., *Cerebellar gene expression profiles of mouse models for Rett syndrome reveal novel MeCP2 targets*. *BMC Med. Genet.* 8, 36 (2007)), многие из идентифицированных не имели очевидной связанной с ЦНС функции и/или экспрессии.

Два гена с наибольшей кратностью изменений, ген соматолактоина β и Na, K-АТФ-азы, имеют экспрессию, в основном ограниченную гипофезом (*smtlb*) (Lopez, M., et al., *Expression of the somatolactin β gene during zebrafish embryonic development*. *Gene Expr. Patterns* 6, 156-161 (2006)) или ухом, кишечной луковицей и пронефрическим протоком (*atp1a1a.5*) (Blasiolo, B., et al., *Cloning, mapping, and developmental expression of a sixth zebrafish Na, K-ATPase alpha subunit gene (atp1a1a.5)*. *Mech. Dev.* 119, Suppl 1:S211-S214 (2002)). Зонды для нескольких генов, связанных с апоптозом (*caspr8*, *caspr8b* и *caspr3b*) не выявили никаких статистически значимых изменений в исследованиях на микрочипах. Среди генов с измененной экспрессией в мутантах *scn1Lab*, для шести ранее было показано, что они вовлечены в неврологические нарушения, например, *pcdh19* (младенческая эпилептическая энцефалопатия), *cyfip1* и *fxr2* (синдром ломкой X-хромосомы), *ocrl* (синдром Лоу), *ubarp21* (болезнь Паркинсона) и *osa2* (синдром Ангельмана). Измерения экспрессии генов на основе микрочипов были подтверждены для 14 случайным образом выбранных генов с использованием кПЦР (фиг. 3A).

Биологические функции приписывали всем генам с использованием аннотаций онтологии генов (GO) и 482 гена, демонстрирующих изменение экспрессии по меньшей мере в 1,5 раза и значение $p < 0,01$, далее подразделяли на категории (фиг. 3C). Гены, связывающие ионы кальция, включают гены аннексина A1c, A1b и 2a, спектрина $\alpha 2$, нейрексина 2a, кальсинтеина 1 и парвальбумина 3. Также отмечались значимые изменения в гене канала щелевого контакта (*cx43*), вовлеченного в кластеризацию потенциалзависимых натриевых каналов в начальном сегменте аксона (*spna2*) и убиквитинового домена рецептора ГАВА (*tap1lc3b*). Три дополнительных гена, не обнаруженных на микрочипе, были выбраны для анализа посредством кПЦР (фиг. 3B): ген *hcn1*, для которого показано, что он коррелирует с *SCN1A*, с использованием сбора данных, и подавлен в нескольких моделях судорог (Noam, Y., et al., *Towards an integrated view of HCN channel role in epilepsy*. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21, 873-879 (2011)) был значительно подавлен в мутантах *scn1Lab* по сравнению с сибсовым контролем ($p < 0,05$ 2-сторонний t-критерий Стьюдента).

Однако, например, гены *homer* и *bdnf*, вовлеченные в синаптогенез, связанный с образованием рекуррентных возбуждающих синапсов и эпилепсией (Avedissian M., et al., Hippocampal gene expression analysis using the ORESTES methodology shows that *homer 1a* mRNA is upregulated in the acute period of the pilocarpine epilepsy model. *Hippocampus* 17, 130-136 (2007); Tongiorgi E., et al., Brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein are targeted to discrete dendritic laminae by events that trigger epileptogenesis. *J. Neurosci.* 24, 6842-6852 (2004)) были неизменными.

Спонтанные судороги у мутантных данио-рерио *scn1Lab*.

Проводили мониторинг мутантов *scn1Lab* в отношении признаков спонтанных электрографических припадков, начинающихся через 3 dpf, например, на первой личиночной стадии, когда может быть обнаружен эпилептиформный разряд (Baraban S.C., et al., A large-scale mutagenesis screen to identify seizure-resistant zebrafish. *Epilepsia* 48, 1151-157 (2007); Hortopan G. A., et al., Spontaneous seizures and altered gene expression in GABA signaling pathways in a mind bomb mutant zebrafish. *J. Neurosci.* 30, 13718-13728 (2010); Hunt R. F., Hortopan G. A., Gillespie A., & Baraban S. C., A novel zebrafish model of hyperthermia-induced seizures reveals a role for TRPV4 channels and NMDA-type glutamate receptors. *Exp. Neurol.* 237, 199-206 (2012); Baraban S. C., Taylor M. R., Castro P. A., & Baier H., Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience* 131, 759-768 (2005); Chege S. W., Hortopan G. A., Dinday M. T., & Baraban S.C., Expression and function of KCNQ channels in larval zebrafish. *Dev. Neurobiol.* 72, 186-198 (2012)). Мутантные личинки идентифицировали по их "черному" внешнему виду (фиг. 4А), который указывает на дефект агрегации пигмента, и они преждевременно погибают между 10 и 12 dpf, как описано ранее (Novak A. E., et al., Embryonic and larval expression of zebrafish voltage-gated sodium channel alpha-subunit genes. *Dev. Dyn.* 235, 1962-1973 (2006)). Регистрация внеклеточных полей переднего мозга от парализованных и иммобилизованных на агаре мутантов *scn1Lab* отмечалась частыми кратковременными подобными мешприпадочным разрядами и длительными подобными иктальными явлениями с большой амплитудой, начинающимися через 3 dpf (n=4) и постепенно становящимися более выраженными между 4 и 7 dpf (n=132) (фиг. 2С). Эти явления были подтверждены в 100% мутантов через 3 dpf, 100% через 4 dpf, 97% через 5 dpf, 98% через 6 dpf и 100% через 7 dpf.

Аномальные электрические явления не наблюдали у совпадающих по возрасту сибсовых контролей ни на какой стадии развития (n=36). Индуцированные гипертермией судороги (Hunt R. F., Hortopan G. A., Gillespie A., & Baraban S. C. A novel zebrafish model of hyperthermia-induced seizures reveals a role for TRPV4 channels and NMDA-type glutamate receptors. *Exp. Neurol.* 237, 199-206 (2012)) можно было индуцировать через 5 dpf у мутантов *scn1Lab* и контролей при приблизительно сходных температурных порогах (мутант: $26,9 \pm 0,5$ °C; n=14; контроль: $25,9 \pm 0,5$ °C; n=14; p=0,164 t-критерий). Однако эти измерения осложнялись у мутантов одновременной встречаемостью высокочастотных спонтанных эпилептиформных разрядов. Мутанты имели повышенные уровни активности плавания и демонстрировали неспровоцированное подобное судорогам поведение, состоящей из судорог всего тела и быстрого направленного движения, начиная через 4 dpf (n=36). Репрезентативный график отслеживания передвижения мутанта *scn1Lab*, демонстрирующего гиперактивность и судорожное поведение, представлен на фиг. 4В. Это поведение является сходным с поведением, классифицируемым как судороги стадии III у личинок, подвергнутых воздействию пентилентетразола (Baraban S. C., Taylor M. R., Castro P. A., & Baier H., Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience* 131, 759-768 (2005)). Судорожное поведение никогда не наблюдали у контролей ни на какой стадии развития (n=36). В объединенных мутантных и сибсовых контрольных личинок, мутанты *scn1Lab* остаются вблизи краев чашек Петри, что считается формой тигмотаксиса у рыб (Ellis, L. D., Seibert, J., & Soanes, K. H., Distinct modes of induced hyperactivity in zebrafish larvae.

Brain Res. 1449, 46-59 (2012)). Эти результаты демонстрируют поразительный эпилептический фенотип у мутантов данио-рерио *scn1Lab*.

Фармакологическая оценка мутантных данио-рерио *scn1Lab*.

Судороги, ассоциированные с мутациями *SCN1A*, плохо отвечают на большинство АЕД. Для оценки фармакологической чувствительности спонтанные электрографические судороги регистрировали в залитых агаром мутантах *scn1Lab* (5-6 dpf) в исходных условиях и вновь после применения коммерчески доступного АЕД. Все лекарственные средства добавляли в емкость в концентрации 1 мМ; для каждого лекарственного средства исследовали семь рыб. Частота эпилептиформных явлений (включая подобные межприпадочным и иктальным разрядам) и доленое время, потраченное на судороги, у мутантов *scn1Lab* снижалось посредством вальпроата, диазепама, бромида калия и стирипентола (фиг. 5А, В, D). Длительность импульса не изменялась на значимом уровне ни для какого из этих воздействий лекарственных средств (фиг. 5С).

Как и ожидалось, большинство АЕД не имели эффекта и эпилептиформная активность становилась более частой после воздействия карбамазепина (у 2 из 7 рыб), этосуксимида (у 4 из 7 рыб) или вигабатрина (у 6 из 7 рыб). Поскольку дети с DS часто отвечают на кетогенную диету (KD) (Dravet C, et al., Severe myoclonic epilepsy in infancy: Dravet syndrome. *Adv. Neurol.* 95, 71-102 (2005)) отдельную группу мутантов *scn1Lab*, сибсы и контроли WT подвергали воздействию этой форме рациона в течение 48 ч, начиная с 4 dpf. Данные отслеживания передвижений у подвергнутых воздействию KD личинок через 6 dpf

подтверждают снижение подобного судорогам поведения до контрольных уровней у 7 из 10 мутантов (фиг. 5; средняя скорость, обработанные мутанты= $0,43 \pm 0,09$ мм/ч, $n=16$; необработанные мутанты= $0,81 \pm 0,05$ мм/ч, $n=28$; $p < 0,05$, ранговый ANOVA Крускала-Уоллиса с попарным множественным сравнением Данна). Не отмечалось значимых отличий в поведении плавания у сибсовых контролей, обработанных KD (средняя скорость= $0,63 \pm 0,05$ мм/ч, $n=20$) по сравнению с необработанными личинками WT через 6 dpf (средняя скорость= $0,62 \pm 0,07$ мм/ч; $n=20$). Кратковременное воздействие (20 мин) рациону не имело эффекта на судорожное поведение у мутантов в анализе передвижения ($n=14$; изменение средней скорости $< 34\%$). Последующая регистрация полей переднего мозга, проведенная на тех же данио-рерио, которые использовались в анализе передвижений (фиг. 5E, верхняя линия) подтвердила возникновение спонтанного эпилептиформного разряда для подвергнутых воздействию среды для эмбрионов мутантов *scn1Lab* и подавление активности импульсов у мутантов, подвергаемых воздействию KD в течение 48 ч (фиг. 5E, нижняя линия). Эти результаты демонстрируют, что фармакологический профиль для мутантов *scn1Lab* напоминает профиль, наблюдаемый у детей с DS.

Высокопроизводительный скрининг лекарственных средств у мутантов *scn1Lab*. Мониторинг поведенческой судорожной активности проводить легко и быстро с использованием формата отслеживания передвижений (Baraban S.C., et al., A large-scale mutagenesis screen to identify seizure-resistant zebrafish. *Epilepsia* 48, 1151-157 (2007); Hortopan G. A., et al., Spontaneous seizures and altered gene expression in GABA signaling pathways in a mind bomb mutant zebrafish. *J. Neurosci.* 30, 13718-13728 (2010); Baraban S. C., Taylor M. R., Castro P. A., & Baier H., Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience* 131, 759-768 (2005); Chege S. W., Hortopan G. A., Dinday M. T., & Baraban S.C., Expression and function of KCNQ channels in larval zebrafish. *Dev. Neurobiol.* 72, 186-198 (2012); Berghmans S., Hunt J., Roach, A., & Goldsmith P., Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. *Epilepsy Res.* 75, 18-28 (2007); Baxendale S., et al., Identification of compounds with anti-convulsant properties in a zebrafish model of epileptic seizures. *Dis. Model. Mech.* 5, 773-774 (2012); Cario C L., Farrell T. C., Milanese C., & Burton E. A., Automated measurement of zebrafish larval movement. *J. Physiol.* 589, 3703-3708 (2011); Winter M. J., et al., Validation of a larval zebrafish locomotor assay for assessing the seizure liability of early-stage development drugs. *J. Pharm. Tox. Methods* 5, 176-187 (2008); Orellana-Paucar A. M., et al., Anticonvulsant activity of bisabolene sesquiterpenoids of *Curcuma longa* in zebrafish and mouse seizure models. *Epilepsy Beh.* 24, 14-22 (2012) (фиг. 4B и 5B1).

Высокопроизводительная стратегия на основе фенотипа была разработана для скрининга химических библиотек в отношении соединений, которые уменьшают мутантное поведение до стадии 0 (очень маленькая активность плавания) или стадии I (увеличенная, но не судорожная активность плавания), например, до поведения, эквивалентного поведению, наблюдаемому у нормальных мутантов WT. Автоматизированное измерение активности личинки осуществляли с использованием отслеживающего программного обеспечения EthoVision (Noldus Information Technology) и высокоскоростной камеры. Предшествующие исследования подтвердили, что движение с высокой скоростью ≥ 20 мм/с соответствует пароксизмальным подобным припадку судорогам (стадия III) (Winter M. J., et al., Validation of a larval zebrafish locomotor assay for assessing the seizure liability of early-stage development drugs. *J. Pharm. Tox. Methods* 5, 176-187 (2008); Orellana-Paucar A. M., et al., Anticonvulsant activity of bisabolene sesquiterpenoids of *Curcuma longa* in zebrafish and mouse seizure models. *Epilepsy Beh.* 24, 14-22 (2012)).

С использованием 96-луночного формата активность плавания мутанта на исходном уровне отслеживали автоматически, а затем вновь после добавления исследуемого соединения (100 мкл); каждое соединение исследовали на 6-12 индивидуальных личинках через 5 dpf. Изменение активности плавания мутанта между двумя последовательными интервалами регистрации в среде для эмбрионов принимали за исходный уровень, и оно показано на фиг. 6A ($n=28$). Исходя из стандартного отклонения 17,3 для регистрации на исходном уровне, ассоциированном просто с заменой раствора, проводили скрининг соединений, которые ингибировали передвижение (измеряемое в качестве изменения средней скорости) на $\geq 34\%$. Для подтверждения этого подхода с использованием этого анализа сначала проводили скрининг одиннадцати AED и KD. Как и ожидалось из электрофизиологического анализа (фиг. 5), диазепам, бромид калия, стирипентол, вальпроат и воздействие KD в течение 48 ч эффективно ингибировали судорожное поведение в анализе на основе передвижения (фиг. 6B); ганаксолон, нейроактивный стероид, родственный аллопрегналону, также был эффективным. Далее проводили скрининг исследуемых соединений в начальной концентрации 667 мкМ из библиотеки, которая включала одобренные US Food and Drug Administration (FDA) и исследованные в отношении токсикологии лекарственные средства.

Было обнаружено, что среди 320 соединений, подвергнутых скринингу *in vivo*, 18 на значимом уровне ингибировали спонтанные судороги у мутантов *scn1Lab* до уровней, сравнимых с поведением стадии 0 или стадии I и/или снижали среднюю скорость плавания (красные круги на фиг. 6C). Затем эти 18 соединений повторно исследовали на отдельной группе мутантов *scn1Lab* в концентрациях 667, 67 и 6,7 мкМ. При первоначальном скрининге 81 соединение было идентифицировано как летальное, т.е. без заметного сердцебиения или движения в ответ на прикосновение после воздействия в течение 30 мин, и их повторно оценивали в разведении 1:100; ни одно из них не достигло продолжения исследования. Библиография

лиотека лекарственных средств включала ряд дополнительных соединений с предполагаемыми противосудорожными свойствами (бекламид, амингидроксималяная кислота и тилетамин), которые также были неэффективными в 96-лучном анализе передвижения в концентрации 667 мкМ. 14 из повторно исследованных соединений либо не ингибировали успешно судорожное поведение на второй группе мутантов *scn1Lab*, либо подавляли только поведение при более высокой концентрации лекарственного средства. Были выбраны следующие 4 (из 18) соединения, которые были эффективными в отношении снижения индуцированной судорогами активности плавания и средней скорости при всех трех концентрациях лекарственного средства для дальнейшего исследования: зоксазоламин, клемизол HCl, клогилин HCl и толперизон HCl (фиг. 6D). Каждое из этих соединений оценивали третий раз в анализе передвижения в концентрации 100 мкМ, а затем подвергали мониторингу в отношении электрографической активности переднего мозга. Клогилин (ингибитор моноаминоксидазы А) и мышечные релаксанты зоксазоламин (Hadra, R. & Millichap J. G., Quantitative assessment of motor function in cerebral palsy: evaluation of zoxazolamine (flexin), a new muscular relaxant agent. *Neurology* 6, 843-852 (1956)) и толперизон (Sakitama, K., The effects of centrally acting muscle relaxants on the intrathecal noradrenaline-induced facilitation of the flexor reflex mediated by group II afferent fibers in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 63, 369-736 (1993)) были идентифицированы как "ложноположительные", поскольку они снижали активность плавания при этой концентрации, однако, когда тот же мутант заливали агаром, явления электрографических судорог все еще наблюдали (см. фиг. 6Е).

Только одно соединение, клемизол (антигистамин и ингибитор связывания РНК NS4B) (Finkelstein, M., Kromer C. M., Sweeney S. A., & Delahunt C. S., Some aspects of the pharmacology of clemizole hydrochloride. *J. Am. Pharm. Assoc.* 49, 18-22 (1960); Einav S., Sobol H. D., Gehrig E., & Glenn J. S., Discovery of a hepatitis C target and its pharmacological inhibitors by microfluidic affinity analysis. *Nat. Biotechnol.* 26, 1019-1027 (2008)), был эффективным в отношении подавления спонтанной судорожной активности в обоих анализах (фиг. 6D-E). Клемизол не имел значительного эффекта на судорожное поведение в анализе передвижений в концентрациях между 6,25 и 50 мкМ (n=33). В качестве дополнительной оценки терапевтического потенциала кратковременного лечения клемизолом было продемонстрировано, что 100 мкМ клемизол был эффективным в отношении снижения судорожного поведения у данио-рерио WT, подвергнутых воздействию 15 мМ пентилепететразола (фиг. 6D; n=10) т.е. в модели острых судорог на основе антагониста рецептору GABA. Эти результаты указывают на то, что мутанты *scn1Lab* можно использовать в высокопроизводительном скрининге для идентификации лидирующих соединений для синдрома Драве.

Мутант данио-рерио *scn1Lab*, описанный в настоящем описании, представляет собой первую простую модель на позвоночных для мутации натриевых каналов, которая воспроизводит признаки синдрома Драве, катастрофической формы резистентной к лекарственному средству эпилепсии у детей. Эти мутанты демонстрируют гиперактивность, включая судорожное поведение, спонтанные электрографические судороги, укороченную продолжительность жизни и фармакологический профиль, сходный с состоянием у человека. Дополнительный молекулярный анализ мутантов *scn1Lab* указывает на отсутствие значительных изменений в глобальной экспрессии генов и отсутствие компенсации, на уровне РНК, посредством других субъединиц потенциалзависимого Na⁺-канала. Двухстадийная основанная на фенотипе стратегия скрининга лекарственных средств для идентификации лидирующих соединений с потенциалом к смягчению эпилептических фенотипов, ассоциированных с мутацией *SCN1A*, идентифицировала одно одобренное FDA лекарственное средство (клемизол).

Электроэнцефалографическая (ЭЭГ) активность обычно является нормальной на первом году жизни пациентов с DS, и изменение в аномальную пароксизмальную или многопиковую активность происходит в возрасте между 1 и 9 годами. Этот зависимый от возраста характер имитировали у развивающихся личинок данио-рерио в возрастах, когда экспрессия *Scn1a* была значительной. Внеклеточная регистрация переднего мозга у очень молодых личинок (3 dpf) выглядела по большей части нормальной с редкими небольшими импульсами многопиковой активности. Частая кратковременная подобная межприпадной активность с многопиковыми импульсными разрядами большой амплитуды становится более выраженной по мере взросления личинок. Архитектура этих электрических явлений напоминала явления, ранее описанные для личинок дикого типа, подвергнутых воздействию пентилепететразола (Baraban, S. C., Taylor, M. R., Castro, P. A., & Baier H., Pentylentetrasol induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience* 131, 759-768 (2005)), 4-аминопиридина (Baraban, S.C., et al., A large-scale mutagenesis screen to identify seizure-resistant zebrafish. *Epilepsia* 48, 1151-157 (2007)), линопиридина (Chege S. W., Hortopan G. A., Dinday M. T., & Baraban S.C., Expression and function of KCNQ channels in larval zebrafish. *Dev. Neurobiol.* 72, 186-198 (2012)) или гипертермии (Hunt R. F., Hortopan G. A., Gillespie A., & Baraban S. C., A novel zebrafish model of hyperthermia-induced seizures reveals a role for TRPV4 channels and NMDA-type glutamate receptors. *Exp. Neurol.* 237, 199-206 (2012)).

Форма электрографической судорожной активности соответствует гиперактивности, судорогам всего организма с ассоциированной активностью плавания на высокой скорости и кратковременной утрате положения тела у мутантов со свободным поведением. Эти типы спонтанного поведения никогда не наблюдаются у личинок дикого типа и вновь напоминают поведение, наблюдаемое только при воздействии

вызывающих судороги лекарственных средств. Это поведение является непрямым признаком судорожной активности, и его можно использовать для быстрой оценки *in vivo* медикаментозного лечения и летальности в многолуночном формате с использованием автоматизированного программного обеспечения для отслеживания передвижений (Berghmans, S., Hunt, J., Roach, A., & Goldsmith, P., Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. *Epilepsy Res.* 75, 18-28 (2007); Baxendale, S., et al., Identification of compounds with anti-convulsant properties in a zebrafish model of epileptic seizures. *Dis. Model. Mech.* 5, 773-774 (2012); Winter, M. J., et al., Validation of a larval zebrafish locomotor assay for assessing the seizure liability of early-stage development drugs. *J. Pharm. Tox. Methods* 5, 176-187 (2008)). Судороги у мутантов данио-рерио *scn1Lab* отвечали на кетогенную диету и четыре AED (например, вальпроат, бензодиазепин, бромид калия и стирипентол), назначаемых в клиниках пациентам с DS.

Интересно, что электрографическая активность судорог у мутантов *scn1Lab* оставалась неизменной (или, возможно, ухудшалась) в ответ на несколько коммерчески доступных AED. В то время как является возможным, что концентрации лекарственного средства, превышающие 1 мМ, могут потребовать для устранения электрических явлений, их можно считать высокими и потенциально неселективными концентрациями. В испытаниях лекарственных средств с использованием модели острых индуцированных PTZ судорог у личинок данио-рерио (Baraban, S.C., et al., A large-scale mutagenesis screen to identify seizure-resistant zebrafish. *Epilepsia* 48, 1151-1157 (2007); Berghmans, S., Hunt, J., Roach, A., & Goldsmith, P., Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. *Epilepsy Res.* 75, 18-28 (2007); Baxendale, S., et al., Identification of compounds with anti-convulsant properties in a zebrafish model of epileptic seizures. *Dis. Model. Mech.* 5, 773-774 (2012); Afrikanova, T., et al., Validation of the zebrafish pentylenetetrazol seizure model: locomotor versus electrographic responses to antiepileptic drugs. *PLoS One* 8, e54166 (2013)), концентрации AED 1 мМ и ниже часто являются достаточными для оценки противоэпилептической активности. Будучи неуспешной в отношении ответа на семь различных AED, эта модель соответствует клиническому определению резистентной к лекарственным средствам эпилепсии (de Toffol, B., et al., ESPERA study: Applicability of the new ILAE criteria for antiepileptic drug resistance of focal epilepsies in current clinical practice. *Epilepsy Behav* 25, 166-169 (2012)).

В течение практически 40 лет открытие и идентификация новых AED практически полностью были основаны на доклинических моделях на животных, приобретенных или острых припадков у грызунов (Loscher, W. & Schmidt, D., Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: Ways out of the current dilemma. *Epilepsia* 52, 657-658 (2011)). Этот подход успешно идентифицировал лекарственные средства, которые блокируют генерализованные тонико-клонические припадки у человека (Bialer, M. & White H. S., Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 10-19 (2012)), но остается времязатратным, ресурсоемким, дорогостоящим и трудоемким. В то время как исследование против PTZ или других типов приобретенных припадков у личинок данио-рерио может быть более эффективным, чем сходные анализы у грызунов (Berghmans, S., Hunt, J., Roach, A., & Goldsmith, P., Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. *Epilepsy Res.* 75, 18-28 (2007); Baxendale, S., et al., Identification of compounds with anti-convulsant properties in a zebrafish model of epileptic seizures. *Dis. Model. Mech.* 5, 773-774 (2012) Afrikanova, T., et al., Validation of the zebrafish pentylenetetrazol seizure model: locomotor versus electrographic responses to antiepileptic drugs. *PLoS One* 8, e54166 (2013)), они в конечном итоге должны идентифицировать одни и те же классы соединений.

В противоположность этому в настоящем описании описана альтернативная стратегия скрининга с использованием 96-луночного формата для быстрого автоматизированного мониторинга поведения с последующим чувствительным электрофизиологическим анализом спонтанной электрографической активности припадка у мутантных рыб, имитирующих известное генетическое нарушение человека. Эта стратегия *in vivo* одновременно осуществляет мониторинг летальности и не ограничивается SCN1A, но может быть использована для любого эпилептического расстройства.

Действительно, этот подход на основе фенотипа может формировать основание для генетически информированного или "персонализированного" подхода для разработки лекарственных средств. В то время как были разработаны генетически модифицированные мыши, имитирующие известные мутации SCN1A и демонстрирующие эпилепсию, разведение может быть затруднено, фоновая линия может модифицировать фенотипы припадков и AED редко исследуются у этих животных. Например, у мутантных мышей *Scn1a^{RX/+}* оценивали только стирипентол и клобазам в отношении эффектов на индуцированные гипертермией судорожные пороги (Cao D., et al., Efficacy of stiripentol in hyperthermia-induced seizures in a mouse model of Dravet syndrome. *Epilepsia* 53, 1140-1145 (2012)). Лечение мутантных мышей *Scn1a^{+/-}* клобазепамом, аллостерическим модулятором рецепторов GABA-A, частично восстанавливало подобное аутистическое поведение, но оно не было оценено как противоэпилептическое (de Toffol, B., et al., ESPERA study: Applicability of the new ILAE criteria for antiepileptic drug resistance of focal epilepsies in current clinical practice. *Epilepsy Behav* 25, 166-169 (2012)).

Когда были описаны модели резистентной к лекарственным средствам эпилепсии на грызунах, таких как подгруппа крыс дикого типа, выбранных из моделей киндинга или постэпилептического статуса

(Han S., et al., Autistic-like behaviour in *Scn1a*^{+/-} mice and rescue by enhanced GABA-mediated neurotransmission. *Nature* 489, 385-390 (2012)), они остаются очень плохо охарактеризованными и не пригодны для первоначальных высокопроизводительных стадий скрининга лекарственных средств. Напротив, с использованием мутанта данио-рерио *scn1Lab* с более чем 75% идентичностью последовательности с мутацией натриевого канала человека, было осуществлено крупномасштабное определение профиля с более чем 44000 хондами, было продемонстрировано связанное с развитием прогрессированием экспрессии каналов у *scn1Lab* и эпилептические фенотипы, были проанализированы эффекты доступных противоэпилептических способов терапии и был проведен скрининг библиотеки из 320 соединений против спонтанных неспровоцированных припадков. Хотя этот первый скрининг для проверки принципа был осуществлен только для одной рыбы на лунку, 6-12 рыб на испытание и одного испытания в неделю, простота, с которой данио-рерио могут быть масштабированы в сторону увеличения (особенно в коммерческих условиях) для исследования сотен тысяч личинок в неделю, делает это привлекательной системой для первой стадии программы быстрой крупномасштабной разработки лекарственных средств *in vivo* лекарственное средство. Одновременно оценка токсичности *in vivo* одного из наибольших источников неуспеха при продвижении лидирующих соединений от лаборатории до клиники - является ключевым преимуществом этого подхода над доступными стратегиями скрининга на основе органотипической гиппокампальной культуры или стратегий скрининга *in silico*.

Хотя любые данные о разработке лекарственного средства в моделях на животных следует обрабатывать осторожно, клемизол, соединение со свойствами антагониста H1 и ингибитора РНК NS4B, представляет собой одобренное FDA лекарственное средство с безопасным токсикологическим профилем, выявленным при этом скрининге, и он обеспечивает внушительную начальную точку для дальнейших исследований. Например, хотя недавно стало понятно, что антигистамины ингибируют индуцированные судороги у новорожденных крыс (Yamada, K., Takizawa, F., Tamura, T., & Kanda T., The effect of antihistamines on seizures induced by increasing-current electroshocks: ketotifen, but not olopatadine, promotes the seizures in infant rats. *Biol. Pharm. Bull.* 35, 693-697 (2012)), без связи с какой-либо конкретной теорией, это, вероятно, не является механизмом действия в данном случае. Авторы изобретения продемонстрировали, что четыре других антигистаминов H1 (пиметиксен малеат, хлорпирамин HCl, мебгидролин нафталинсульфонат и ипрогептин) не подавляли судорожное поведение у мутантов *scn1Lab*. Более того, данные указывают на потенциал антигистаминов H1 к неблагоприятной модификации судорог у детей (Miyata, I., Saegusa, H., & Sakurai, M., Seizure-modifying potential of histamine H1 antagonists: a clinical observation. *Pediatr. Int.* 53, 706-708 (2011)), что указывает на то, что потребуется более детальный анализ для идентификации механизма действия. Учитывая, что клемизол также был эффективен в версии теста с метразолом с использованием данио-рерио, может быть целесообразным проведение дополнительного доклинического испытания в спонсируемой NIH программе по разработке противосудорожных лекарственных средств в University of Utah. Наиболее важно эти исследования указывают на то, что скрининг лекарственных средств *in vivo* и экспериментальный анализ мутантов данио-рерио *scn1Lab* может оказаться чрезвычайно ценным для понимания (и лечения) синдрома Драве.

Животные.

Эмбрионы данио-рерио *scn1Lab* (*didys552*) были любезным подарком от Herwig Baier. Взрослые данио-рерио *HuC:GFP* были любезным подарком от Stephen Ekker. Данио-рерио выводили и поддерживали в соответствии с руководством University of California, San Francisco Committee on the Use and Care of Animals. Личинок данио-рерио поддерживали "в среде для эмбрионов", состоявшей из 0,03% Instant Ocean (Aquarium Systems, Inc., Mentor, OH, США) в деионизированной воде, содержавшей 0,002% метиленового синего в качестве фунгицида. Выводки личинок данио-рерио выводили из гетерозиготных животных *scn1Lab*, которые подвергали обратному скрещиванию с TL дикого типа или данио-рерио *HuC:GFP* на протяжении по меньшей мере 7 поколений. Использовали гомозиготные мутанты (отсортированные на основе пигментации) и совпадающие по возрасту сибсовы личинки. Хотя точный генетический дефект, ответственный за проблемы пигментации кожи неизвестен, интересно, что активация гена, кодирующего рецептор меланокортин 5a в 1,5 раза отмечалась в данных микрочипов.

Мониторинг судорог.

Методики отслеживания передвижений и электрофизиологии были описаны (Baraban S.C., et al., A large-scale mutagenesis screen to identify seizure-resistant zebrafish. *Epilepsia* 48, 1151-157 (2007); Baraban, S. C, Taylor M. R., Castro P. A., & Baier H., Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience* 131, 759-768 (2005)). Предварительных экспериментах данио-рерио *HuC:GFP* использовали в экспериментах электрофизиологии для проведения оценки положения регистрирующих электродов. Графики передвижения были получены для одной рыбы на лунку с интервалом регистрации 10 мин с использованием системы *DanioVision*, управляемой программным обеспечением *EthoVision XT* (Noldus Information Technology; Leesburg, VA). Оценку судорог проводили, как описано (Baraban S. C, Taylor M. R., Castro P. A., & Baier H., Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience* 131, 759-768 (2005)). Графики передвижений анализировали в отношении пройденного расстояния (в мм) и средней скорости (в мм/с). Эпилептиформные явления анализировали в *pClamp* (Molecular Devices; Sunnyvale, CA), и их определяли как от-

клонения мембраны вверх или вниз более чем в 2-х от исходного фонового уровня, и их классифицировали либо как подобные межприпадочным (длительность от 100 до 300 мс), либо как подобные иктальным (длительность от 1000 до 5000 мс). Частоту импульсов определяли путем подсчета количества эпилептиформных явлений в минуту в ходе 10-мин интервала регистрации. Длительность импульсов определяли путем измерения интервала от начала до завершения для всех явлений в ходе одного и того же интервала.

Лекарственные средства получали от Sigma-Aldrich и растворяли в среде для эмбрионов. Исходные растворы получали в среде для эмбрионов концентрации 1 мМ и pH доводили до ~7,5. Ганаксолон был любезным подарком от BioCrea GmbH (Radebeul, Германия). Соединения для скрининга лекарственных средств приобретали от MicroSource Discovery Systems, Inc. (International Drug Collection; Gaylordsville, CT), и их предоставляли в качестве 10 мМ растворов в DMSO. Исследуемые соединения растворяли в среде для эмбрионов и исследовали в концентрациях от 6,7 до 667 мкМ; конечная концентрация DMSO ~7%. Первоначальная концентрация для скрининга 667 мкМ была выбрана для исследования поведения у свободно плавающих рыб, поскольку она попадает в нижний диапазон концентраций AED, для которых ранее сообщалось, что они являются эффективными против индуцированных PTZ (10-20 мМ) судорог у личинок данио-рерио (от 0,1 до 25 мМ) (Baraban S. C, Taylor M. R., Castro P. A., & Baier H., Pentylene-tetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience* 131, 759-768 (2005); Berghmans S., Hunt J., Roach A., & Goldsmith P., Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. *Epilepsy Res.* 75, 18-28 (2007); Afrikanova T., et al., Validation of the zebrafish pentylene-tetrazol seizure model: locomotor versus electrographic responses to antiepileptic drugs. *PLoS One* 8, e54166 (2013)), и была наиболее эффективным применением малого объема исходного раствора (250 мкл), предоставленного MicroSource Discovery Systems, Inc. Немного более высокая концентрация (1 мМ) была выбрана для первоначальных валидирующих анализов AED на фиг. 5 и 6 для учета любых потенциальных затруднений, связанных с диффузией через агар. DMSO оценивали в отношении токсичности в разведениях от 0,01 до 100% с использованием личинок дикого типа (n=12 рыб на концентрацию); DMSO в концентрации >25% был летальным.

Во всех скрининговых исследованиях лекарственных средств соединения кодировали и эксперименты проводились исследователями вслепую в отношении природы соединения. Исходную регистрацию судорожной активности проводили для мутантов, находящихся в среде для эмбрионов; затем строили второй график после замены раствора на исследуемое соединение. Каждое исследуемое соединение, классифицированное как "положительный результат" в анализе передвижения, визуально подтверждали в качестве живых на основе движения в ответ на прикосновение и заметного сердцебиения. Рыбы WT демонстрируют от небольшой до отсутствия спонтанной активности плавания в ходе этих 10-мин интервалов регистрации (см. фиг. 3В), и их не использовали в анализе разработки лекарственных средств.

Методики для анализа на микроципах, количественной ПЦР и гибридизации тотального препарата *in situ* были описаны (Hortopan G. A., et al., Spontaneous seizures and altered gene expression in GABA signaling pathways in a mind bomb mutant zebrafish. *J. Neurosci.* 30, 13718-13728 (2010)).

Данные представлены в качестве средних значений и SEM, если нет иных указаний. Парную статистическую значимость определяли с использованием двухстороннего непарного t-критерия Стьюдента, ANOVA или критерия суммы рангов Манна-Уитни, в соответствующих случаях, если нет иных указаний. Результаты считали значимыми при $P < 0,05$, если нет иных указаний.

Пример 2.

Исходя из предшествующего обсуждения и некоторой активности, наблюдаемой в дозах 100 и 300 мг/кг в качественном скрининге MES у мышей, авторы изобретения продолжили количественное исследование в моделях на мышах MES/scMET/Tox для определения ED50/TD50. В ходе определения TPE в модели MES не наблюдали активности при начальной дозе 300 мг/кг. Однако, активность наблюдали в дозе 500 мг/кг причем 2/4 животных были защищены через 0,25 мин и 4/4 животных были защищены через 30 мин. Не наблюдали активности или токсичности (способность хватать вращающийся стержень) ни в одной другой исследованной дозе или момент времени. Не наблюдали активности в модели scMET. Данные в модели MES показывают, что существует значительная активность/защита посредством ASP469016 в этой модели с ED50 < 400 мг/кг.

Результаты скрининга противосудорожных препаратов Количественное определение IP мышей

ASP ID: 469016	ID скрининга: 1	ID спонсора: 642	Класс спонсора:
			Спонсор ASP/CM
Код растворителя: MC		Приготовление растворителя: M&P, TW	
Масса животного: - г			
Дата начала: 06 мая 2014 года		Дата завершения: 09 мая 2014 года	
Ссылка: 503:294,297.509:3,4			

Значение ED50

Тест	Время (ч)	ED50	95% доверительный интервал	Наклон	Стандартная ошибка	Значение р
MES	0,5	<400,0	-			
SCMET	0,5	>250,0	-			
TOX	0,5	>500,0	-			

ED50, биологический ответ

Тест	Время (ч)	Доза (мг/кг)	Смерти	N/F C
MES	0,50	350		0/8
MES	0,50	400		7/8
MES	0,50	500		4/4
SCMET	0,50	200		0/8
SCMET	0,50	250		0/4
TOX	0,50	500		0/4

Примечание: присутствие звездочки (*) указывает на то, что существует несколько кодов комментариев

Время до максимального эффекта

Время (часы)			0,25	0,5	1,0	2,0	4,0	6,0	8,0	24	3,0
Тест	Доза	Смерти	N/F C								
MES	300		0/4	0/4	0/4	0/4	0/4	/	/	/	/
MES	500		2/4	4/4	0/4	0/4	0/4	/	/	/	/
TOX	400		0/8	0/8	/	/	/	/	/	/	/
TOX	500		0/4	0/4	0/4	/	/	/	/	/	/

Примечание: N/F=количество животных, активных или токсических относительно количества исследованных

C= код комментария. Присутствие звездочки (*) указывает на то, что существует несколько кодов комментариев

Комментарии для NIH	
Комментарии для поставщика	Дозы MES 350 мг/кг и 400 мг/кг и дозу Scmet 200 мг/кг использовали для партии Ori, и все другие дозы использовали для партии A. Недостаточно материала для продолжения исследования

Пример 3.

ASP469016 исследовали в первоначальном скрининге авторов изобретения T31 (MES/scMET/Tox) в дозе 30, 100 и 300 мг/кг. Данные для каждого условия представлены в качестве N/F, где N равен количеству защищенных животных и F равен количеству исследованных животных. Для исследований токсичности (TOX) N равен количеству животных, демонстрирующих эффекты токсичности, и F равен количеству исследованных животных. Коды в столбце C относятся к комментариям технических специалистов, проводивших эксперимент, и они определены в разделе комментариев, если необходимо. Были отмечены смерти. Как показано в модели с 6 Гц (32 мА) только 1/4 животных были защищены в дозе 100 мг/кг в течение 30 мин. В модели индуцированных MES судорог только 1/4 животных были защищены в дозах 100 и 300 мг/кг в течение 30 мин. Не было выявлено токсичности (неспособность хватать вращающийся стержень) или активности ни в какой другой исследованной дозе или момент времени.

Результаты скрининга противосудорожных препаратов - мыши MES и идентификация при 6 Гц

ASP ID: 469016 ID скрининга: 1 ID спонсора: 642 Класс спонсора:

Спонсор ASP/CM

Код растворителя: MC

Приготовление

Код пути: в/б

растворителя: M&P, TW

Масса животного: - г

Дата начала: 11 февраля 2014 года Дата завершения: 11 февраля 2014 года Ток (мА)

Ссылка: 503:153

Ответ

Время (часы)				0,5	2,0	0,25	1,0	4,0	6,0	3,0	28,0	24
Тест	Доза	Форма	Смерти	N/F	N/F	N/F	N/F	N/F	N/F	N/F	N/F	N/F
				С	С	С	С	С	С	С	С	С
6 Гц	30			0/4	0/4	/	/	/	/	/	/	/
6 Гц	100			1/4	0/4	/	/	/	/	/	/	/
6 Гц	300			0/4	0/4	/	/	/	/	/	/	/
MES	30			0/4	0/4	/	/	/	/	/	/	/
MES	100			1/4	0/4	/	/	/	/	/	/	/
MES	300			1/4	0/4	/	/	/	/	/	/	/
TOX	30	SUS		0/8	0/8	/	/	/	/	/	/	/
TOX	100	SUS		0/8	0/8	/	/	/	/	/	/	/
TOX	300	SUS		0/8	0/8	/	/	/	/	/	/	/

Примечание: N/F=количество животных, активных или токсических относительно количества исследованных С= код комментария.

Присутствие звездочки (*) указывает на то, что существует несколько кодов комментариев.

Пример 4.

Клемизол (149934-L6) исследовали в CEREP BioPrint Profile, который является панелью из 139 различных анализов связывания рецепторов и ферментных анализов *in vitro*. Для первоначального скрининга BioPrint использовали концентрацию свободного соединения 10 мкМ (1,0E-5 М). Связывание соединения вычисляли в качестве % ингибирования связывания радиоактивно меченного лиганда, специфичного к каждой мишени. Эффект ингибирования фермента соединением вычисляли как % ингибирование активности контрольного фермента. В каждом эксперименте соответствующее эталонное соединение исследовали одновременно с клемизолом (149934-L6), и данные сравнивали с ранее зафиксированными значениями, определенными в CEREP. Эксперимент был принят в соответствии с валидирующей стандартной процедурой CEREP. Результаты, демонстрирующие ингибирование (или стимуляцию для анализов, проводимых в исходных условиях), превышающее 50%, считаются демонстрирующими значимые эффекты исследуемых соединений. Обобщение этих результатов приведено ниже:

Анализ	1,0E
5-НТ _{2A} (h) (радиолиганд-агонист)	86%
5-НТ _{2B} (h) (радиолиганд-агонист)	82,5
5-НТ _{1A} (h) (радиолиганд-агонист)	19,5
5-НТ _{1B} (h) (радиолиганд-агонист)	4,4%
5-НТ _{1D} (h) (радиолиганд-агонист)	22,7
5-НТ ₃ (h) (радиолиганд-агонист)	9,8%
5-НТ _{4e} (h) (радиолиганд-агонист)	-
GABA _{A1} (h) (радиолиганд-агонист)	-
GABA _{B(1B)}} (h) (радиолиганд-агонист)	-
BZD (центральный) (радиолиганд-агонист)	-
CB ₁ (h) (радиолиганд-агонист)	17,9
CB ₂ (h) (радиолиганд-агонист)	28,4
GABA-зависимый Cl-канал	24,9
SK-Ca-канал	-
Переносчик GABA	-

Пример 5.

Клемизол не демонстрирует противоэпилептическую активность посредством антигистаминергического механизма действия. 32 различных антигистаминовых соединения, фиг. 10, подвергали скринингу в анализе данио-рерио scnlLab и ни одно из этих соединений не имитировало противоэпилептическое действие клемизола. Три из соединений были токсичными, что согласовывалось с клиническими сообщениями о том, что антигистамины могут усиливать припадки у педиатрических пациентов с эпилепсией, пять соединений усиливали судорожное поведение.

Пример 6.

Заявители провели скрининг библиотеки Selleck Customized Library, содержащей 62 лекарственных средства, действующих на каскады передачи сигнала серотонина. Первоначально эти соединения подвергали скринингу в анализе передвижения данио-рерио, и 15 соединений были идентифицированы в качестве положительных результатов в анализе передвижения первого прохождения (детали анализа могут быть найдены в Varaban et al. Nat. Comm. 2013 и Dinday и Varaban, eNeuro 2015), и их можно видеть на фиг. 11. Эти исследования указывают на то, что модулирование передачи сигнала 5HT, особенно ак-

тивация постсинаптических рецепторов 5HT, обладает потенциальной противоэпилептической активностью.

Проводили исследования для повторного исследования концентрация-ответа всех соединений 5HT, идентифицированных в анализе передвижения первого прохождения. Результаты тразодона (Desryl, Olerptro) представлены в качестве репрезентативного примера. В дополнение к демонстрации надежного ингибирования спонтанного судорожного поведения в анализе передвижения в концентрациях от 100 до 750 мкМ (фиг. 12А), тразодон также эффективно подавлял активность ЭЭГ у мутантов *scn1Lab* (n=15) в концентрациях между 250 и 500 мкМ (фиг. 12В) и в отдельных испытаниях с вымыванием лекарственного средства (n=12). Соединения с положительными результатами включают суматриптан, наратриптан, ризатриптан, золмитриптан, урапидил, BRL-54443 (3-(1-метилпиперидин-4-ил)-1Н-индол-5-ол), лоркасерин, буспирон, зипразидон, ТСВ-2 ((4-бром-3,6-диметоксибензоциклобутен-1-ил)метиламина гидробромид), BRL-15572 (3-(4-(4-хлорфенил)пиперазин-1-ил)-1,1-дифенил-2-пропанол), тразодон, ВМУ 7378 (8-(2-[4-(2-метоксифенил)-1-пиперазинил]этил)-8-азаспиро[4.5]декан-7,9-дион), атомоксетин и венлафаксин.

Дополнительные варианты осуществления

Вариант осуществления 1. Способ лечения эпилептического расстройства, причем способ включает введение индивидууму, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества агониста рецептора 5HT или его фармацевтически приемлемой соли.

Вариант осуществления 2. Способ согласно варианту осуществления 1, где агонист рецептора 5HT представляет собой агонист рецептора 5HT_{2A} или агонист рецептора 5HT_{2B}.

Вариант осуществления 3. Способ согласно варианту осуществления 2, где агонист рецептора 5HT представляет собой двойной агонист рецептора 5HT_{2A} и рецептора 5HT_{2B}.

Вариант осуществления 4. Способ согласно варианту осуществления 1, где агонист рецептора 5HT не является клемизолом или фенфлураминном.

Вариант осуществления 5. Способ согласно варианту осуществления 1, где агонист рецептора 5HT связывается прямо с рецептором 5HT.

Вариант осуществления 6. Способ согласно варианту осуществления 1, где агонист рецептора 5HT специфически активизирует рецептор 5HT.

Вариант осуществления 7. Способ согласно варианту осуществления 1, где агонист рецептора 5HT обеспечивает повышенную активность, опосредуемую рецептором 5HT_{2A} или рецептором 5HT_{2B}, с эквивалентной или сниженной активностью, опосредуемой рецептором 5HT_{2C}.

Вариант осуществления 8. Способ согласно варианту осуществления 1, где агонист рецептора 5HT не является ингибитором обратного захвата серотонина.

Вариант осуществления 9. Способ согласно варианту осуществления 1, где агонист рецептора 5HT не связывается в значительной степени или не модулирует активность по меньшей мере одного из рецептора 5HT_{1A}, 5HT_{1B}, 5HT_{1D}, 5HT_{2C}, 5HT₃, 5HT₄, 5HT₆, 5HT₇, NPY Y1, Са-канала L-типа, Са-канала N-типа, СК-Са-канала, ГАВА-зависимого Cl-канала, переносчика ГАВА, рецептора ГАВА-A1, рецептора ГАВА-B1b, Na-канала, переносчика 5HT, рецептора CB1, рецептора CB2, BZD или ER эстрогена альфа.

Вариант осуществления 10. Способ согласно варианту осуществления 1, где агонист рецептора 5HT представляет собой флибансерин, DOI HCl, норфенфлурамин или BW 723C86.

Вариант осуществления 11. Способ согласно варианту осуществления 1, где агонист рецептора 5HT представляет собой суматриптан, наратриптан, ризатриптан, золмитриптан, урапидил, BRL-54443 (3-(1-метилпиперидин-4-ил)-1Н-индол-5-ол), лоркасерин, буспирон, зипразидон, ТСВ-2 ((4-бром-3,6-диметоксибензоциклобутен-1-ил)метиламин гидробромид), BRL-15572 (3-(4-(4-хлорфенил)пиперазин-1-ил)-1,1-дифенил-2-пропанол), тразодон, ВМУ 7378 (8-(2-[4-(2-метоксифенил)-1-пиперазинил]этил)-8-азаспиро[4.5]декан-7,9-дион), атомоксетин и венлафаксин.

Вариант осуществления 12. Способ согласно варианту осуществления 1, где агонист рецептора 5HT представляет собой тразодон или его фармацевтически приемлемую соль. В вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль тразодона представляет собой гидрохлорид, гидробромид, фосфат, сульфат, метансульфонат, нитрат, малеат, ацетат, цитрат, фумарат, пропионат, тартрат, сукцинат, бензоат, глутамат или четвертичную соль аммония.

Вариант осуществления 13. Способ согласно варианту осуществления 1, где эпилептическое расстройство представляет собой синдром Драве, Леннокса-Гасто, младенческие судороги или синдром Отахара.

Вариант осуществления 14. Способ согласно варианту осуществления 13, где эпилептическое расстройство представляет собой синдром Драве.

Вариант осуществления 15. Способ согласно варианту осуществления 1, где эпилептическое расстройство представляет собой педиатрическое эпилептическое расстройство.

Вариант осуществления 16. Способ согласно варианту осуществления 1, где индивидуум имеет сердечно-сосудистое заболевание.

Вариант осуществления 17. Способ согласно варианту осуществления 1, где индивидуум является резистентным к лечению ингибитором обратного захвата серотонина.

Вариант осуществления 18. Способ согласно варианту осуществления 1, где индивидуум подвержен побочным эффектам при введении ингибитора обратного захвата серотонина.

Вариант осуществления 19. Способ согласно варианту осуществления 17 или 18, где ингибитор обратного захвата серотонина представляет собой фенфлурамин.

Вариант осуществления 20. Способ согласно варианту осуществления 1, где индивидуум имеет кетогенную диету.

Вариант осуществления 21. Способ согласно варианту осуществления 1, где агонист рецептора 5HT ингибирует судорожное поведение или электрографические судороги у индивидуума с эпилепсией, индивидуума с болезнью Альцгеймера, индивидуума с аутизмом или индивидуума с болезнью Паркинсона.

Вариант осуществления 22. Способ согласно варианту осуществления 1, где агонист рецептора 5HT уменьшает встречаемость неспровоцированных припадков у индивидуума по сравнению с отсутствием агониста рецептора 5HT.

Вариант осуществления 23. Способ согласно варианту осуществления 1, где введение агониста рецептора 5HT снижает или предупреждает миоклонические судороги или эпилептический статус у индивидуума по сравнению с отсутствием агониста рецептора 5HT.

Вариант осуществления 24. Способ согласно варианту осуществления 1, где агонист рецептора 5HT вводят индивидууму в количестве от приблизительно 0,1 до приблизительно 1000 мг на кг массы тела.

Вариант осуществления 25. Способ согласно варианту осуществления 22, где агонист рецептора 5HT вводят индивидууму в суточной дозе от приблизительно 0,1 до приблизительно 1000 мг на кг массы тела индивидуума.

Вариант осуществления 26. Способ согласно варианту осуществления 1, где агонист рецептора 5HT вводят совместно с противоэпилептическим лекарственным средством (AED).

Вариант осуществления 27. Способ согласно варианту осуществления 1, где агонист рецептора 5HT является вспомогательной терапией для противоэпилептического лекарственного средства (AED).

Вариант осуществления 28. Способ согласно варианту осуществления 26 или 27, где AED представляет собой ацетазоламид, бензодиазепин, каннабидиолы, карбамазепин, клобазам, клонезепам, эсликарбазепина ацетат, этосуксимид, этотин, фелбамат, фенфлурамин, фосфенитоин, габапентин, ганаксолон, гуперзин А, лакозамид, ламотригин, леветирацетам, нитразепам, окскарбазепин, перампанел, пир-ацетам, фенобарбитал, фенитоин, бромид калия, прегабалин, примидон, ретигабин, руфинамид, вальпроевая кислота, вальпроат натрия, стирипентол, тиагабин, топирамат, вигабатрин или зонисамид.

Вариант осуществления 29. Способ согласно варианту осуществления 28, где AED представляет собой вальпроевую кислоту, вальпроат натрия, клонезепам, этосуксимид, фелбамат, габапентин, карбамазепин, окскарбазепин, ламотригин, леветирацетам, бензодиазепин, фенобарбитал, прегабалин, примидон, тиагабин, топирамат, бромид калия, фенитоин, стирипентол, вигабатрин или зонисамид.

Вариант осуществления 30. Способ согласно варианту осуществления 29, где AED представляет собой вальпроевую кислоту, вальпроат натрия, габапентин, топирамат, карбамазепин, окскарбазепин или вигабатрин.

Вариант осуществления 31. Способ согласно варианту осуществления 26, где AED не является фенфлурамином или топираматом.

Вариант осуществления 32. Способ согласно варианту осуществления 26, где AED вводят одновременно или последовательно с агонистом рецептора 5HT.

Вариант осуществления 33. Способ лечения эпилептического расстройства, причем способ включает введение индивидууму, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества агониста рецептора 5HT или его фармацевтически приемлемой соли, где индивидуум имеет сердечно-сосудистое заболевание, является резистентным к лечению ингибитором обратного захвата серотонина или является подверженным побочным эффектам при введении ингибитора обратного захвата серотонина.

Вариант осуществления 34. Способ согласно варианту осуществления 33, где агонист рецептора 5HT представляет собой агонист рецептора 5HT_{2A} или агонист рецептора 5HT_{2B}.

Вариант осуществления 35. Способ согласно варианту осуществления 32, где агонист рецептора 5HT представляет собой двойной агонист рецептора 5HT_{2A} и рецептора 5HT_{2B}.

Вариант осуществления 36. Способ согласно варианту осуществления 33, где агонист рецептора 5HT представляет собой клемизол, аналог клемизола или их фармацевтически приемлемую соль.

Вариант осуществления 37. Способ согласно варианту осуществления 36, где фармацевтически приемлемый соль представляет собой клемизол HCl.

Вариант осуществления 38. Способ согласно варианту осуществления 36, где клемизол, аналог клемизола или их фармацевтически приемлемая соль составляют часть фармацевтической композиции.

Вариант осуществления 39. Способ согласно варианту осуществления 38, где фармацевтическая композиция дополнительно включает фармацевтически приемлемый эксципиент.

Вариант осуществления 40. Способ согласно варианту осуществления 38, где фармацевтическая композиция включает терапевтически эффективное количество клемизола, аналога клемизола или их фармацевтически приемлемой соли.

Вариант осуществления 41. Способ согласно варианту осуществления 40, где фармацевтическую

композицию вводят совместно с противоэпилептическим лекарственным средством (AED).

Вариант осуществления 42. Способ согласно варианту осуществления 41, где фармацевтическая композиция включает клемизол, аналог клемизола или их фармацевтически приемлемую соль и AED.

Вариант осуществления 43. Способ согласно варианту осуществления 33, где агонист рецептора 5HT не является фенфлурамином.

Вариант осуществления 44. Способ согласно варианту осуществления 33, где агонист рецептора 5HT связывается прямо с рецептором 5HT.

Вариант осуществления 45. Способ согласно варианту осуществления 33, где агонист рецептора 5HT специфически активирует рецептор 5HT.

Вариант осуществления 46. Способ согласно варианту осуществления 33, где агонист рецептора 5HT обеспечивает повышенную активность, опосредуемую рецептором 5HT_{2A} или рецептором 5HT_{2B}, с эквивалентной или сниженной активностью, опосредуемой рецептором 5HT_{2C}.

Вариант осуществления 47. Способ согласно варианту осуществления 33, где агонист рецептора 5HT не является ингибитором обратного захвата серотонина.

Вариант осуществления 48. Способ согласно варианту осуществления 33, где агонист рецептора 5HT не связывает в значительной степени или не модулирует активность по меньшей мере одного из рецептора 5HT_{1A}, 5HT_{1B}, 5HT_{1D}, 5HT_{2C}, 5HT₃, 5HT₄, 5HT₆, 5HT₇, NPY Y1, Ca-канала L-типа, Ca-канала N-типа, SK-Ca-канала, GABA-зависимого Cl-канала, переносчика GABA, рецептора GABA-A1, рецептора GABA-B1b, Na-канала, переносчика 5HT, рецептора CB1, рецептора CB2, BZD или ER эстрогена альфа.

Вариант осуществления 49. Способ согласно варианту осуществления 33, где агонист рецептора 5HT представляет собой суматриптан, наратриптан, ризатриптан, золмитриптан, урапидил, BRL-54443 (3-(1-метилпиперидин-4-ил)-1H-индол-5-ол), лоркасерин, буспирон, зипразидон, TCB-2 ((4-бром-3,6-диметоксибензоциклобутен-1-ил)метиламин гидробромид), BRL-15572 (3-(4-(4-хлорфенил)пиперазин-1-ил)-1,1-дифенил-2-пропанол), тразодон, BMY 7378 (8-(2-[4-(2-метоксифенил)-1-пиперазинил]этил)-8-азаспиро[4.5]декан-7,9-дион), атомоксетин и венлафаксин.

Вариант осуществления 50. Способ согласно варианту осуществления 33, где агонист рецептора 5HT представляет собой тразодон или его фармацевтически приемлемую соль.

Вариант осуществления 51. Способ модулирования активности рецептора 5HT, включающий введение в контакт рецептора 5HT с клемизолом, аналогом клемизола или их фармацевтически приемлемой солью.

Вариант осуществления 52. Способ согласно варианту осуществления 51, где модулирование представляет собой активацию.

Вариант осуществления 53. Способ согласно варианту осуществления 51, где рецептор 5HT представляет собой рецептор 5HT_{2A} или рецептор 5HT_{2B}.

Вариант осуществления 54. Способ лечения заболевания или нарушения, вызванного дефицитом серотонина в головном мозге или активностью одного или нескольких рецепторов 5HT, включающий введение индивидууму, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества клемизола, аналога клемизола или их фармацевтически приемлемой соли.

Вариант осуществления 55. Способ согласно варианту осуществления 54, где заболевание или нарушение не является эпилепсией.

Вариант осуществления 56. Способ согласно варианту осуществления 54, где заболевание или нарушение не является синдромом Драве.

Вариант осуществления 57. Способ согласно варианту осуществления 51, где заболевание или нарушение выбрано из группы, состоящей из мигрени, синдрома ломкой X-хромосомы, синдрома Прадера-Вилли, шизофрении, депрессии, болезни Альцгеймера, аутизма, невропатической боли, болезни Паркинсона, синдрома раздраженного кишечника и деменции.

Вариант осуществления 58. Способ согласно варианту осуществления 50, где фармацевтически приемлемый представляет собой клемизол HCl.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения эпилептического расстройства, причем указанный способ включает введение индивидууму, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества агониста рецептора 5HT или его фармацевтически приемлемой соли, где указанный агонист рецептора 5HT представляет собой тразодон или лоркасерин, где указанное эпилептическое расстройство представляет собой синдром Драве.

2. Способ по п.1, где указанный агонист рецептора 5HT представляет собой агонист рецептора 5HT_{2A} или агонист рецептора 5HT_{2B}.

3. Способ по п.1, где указанный агонист рецептора 5HT представляет собой тразодон или его фармацевтически приемлемую соль.

4. Способ по п.1, где указанный агонист 5HT-рецептора представляет собой лоркасерин или его фармацевтически приемлемую соль.

5. Способ по п.1, где указанный индивидуум имеет сердечно-сосудистое заболевание или является резистентным к лечению ингибитором обратного захвата серотонина, или подвержен побочным эффектам при введении ингибитора обратного захвата серотонина, где указанный ингибитор обратного захвата серотонина представляет собой фенфлурамин.

6. Способ по п.1, где указанный индивидуум имеет кетогенную диету.

7. Способ по п.1, где указанный агонист рецептора 5HT ингибирует судорожное поведение у индивидуума с эпилепсией, по сравнению с отсутствием указанного агониста 5HT-рецептора.

8. Способ по п.1, где указанный агонист рецептора 5HT уменьшает встречаемость неспровоцированных припадков, миоклонических судорог или эпилептический статус у индивидуума по сравнению с отсутствием агониста рецептора 5HT.

9. Способ по п.1, где указанный агонист рецептора 5HT вводят индивидууму в количестве от приблизительно 0,1 до приблизительно 1000 мг на кг массы тела.

10. Способ по п.1, где указанный агонист рецептора 5HT вводят совместно с противоэпилептическим лекарственным средством (AED) или является вспомогательной терапией для противоэпилептического лекарственного средства с указанным AED, где указанное AED представляет собой ацетазоламид, бензодиазепин, карбамазепин, клобазам, клонезепам, эсликарбазепина ацетат, этосуксимид, этотоин, фелбамат, фенфлурамин, фосфенитоин, габапентин, ганаксолон, гуперзин А, лакозамид, ламотригин, леветирацетам, нитразепам, окскарбазепин, перампанел, пирацетам, фенобарбитал, фенитоин, бромид калия, прегабалин, примидон, ретигабин, руфинамид, вальпроевую кислоту, вальпроат натрия, стирипентол, тиагабин, топирамат, вигабатрин или зонисамид.

11. Способ по п.10, где указанное AED вводят одновременно или последовательно с агонистом рецептора 5HT.

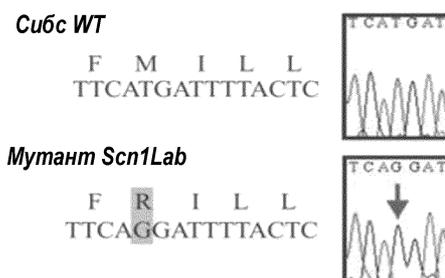
12. Способ по п.1, где агонистом рецептора 5HT является лоркасерин, где указанное эпилептическое расстройство не реагирует на лечение противоэпилептическим лекарственным средством (AED).

13. Способ лечения эпилептического расстройства, указанный способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества агониста 5HT-рецептора или его фармацевтически приемлемой соли, где указанным агонистом 5HT-рецептора является лоркасерин, и указанным эпилептическим расстройством является синдром Леннокса-Гасто.

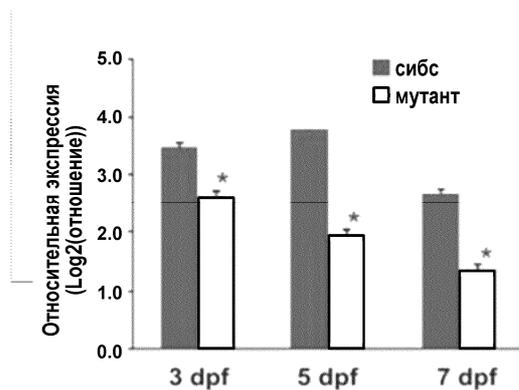
14. Способ лечения синдрома Драве, где указанный способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества лоркасерина или его фармацевтически приемлемой соли.

15. Способ лечения синдрома Драве, где указанный способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества тразодона или его фармацевтически приемлемой соли.

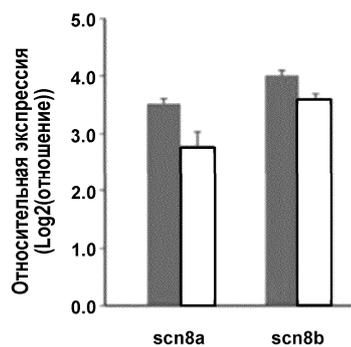
16. Способ лечения эпилептического расстройства, причем указанный способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества агониста 5HT-рецептора или его фармацевтически приемлемой соли и противоэпилептического лекарственного средства (AED), где агонист 5HT-рецептора представляет собой тразодон или лоркасерин и где указанное эпилептическое расстройство представляет собой синдром Драве или синдром Леннокса-Гасто.



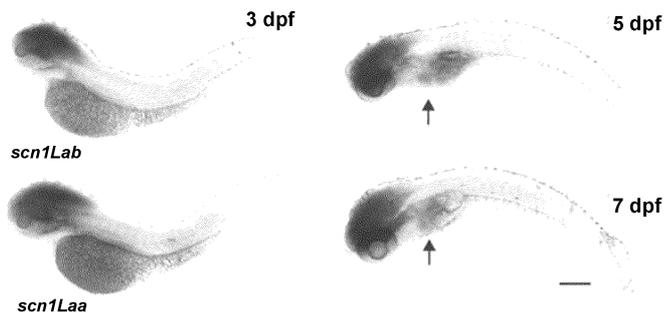
Фиг. 1А



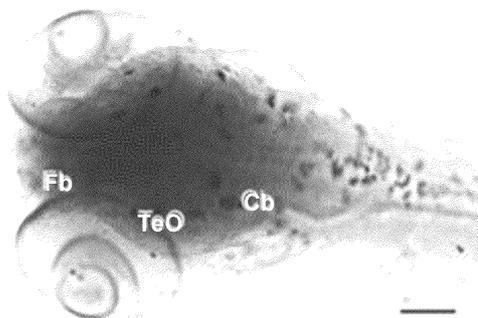
Фиг. 1В



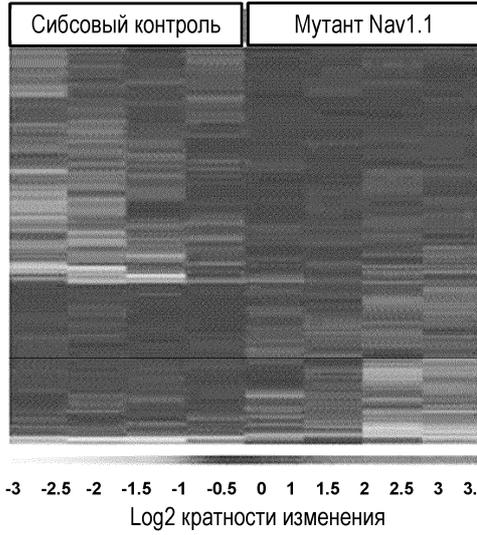
Фиг. 1С



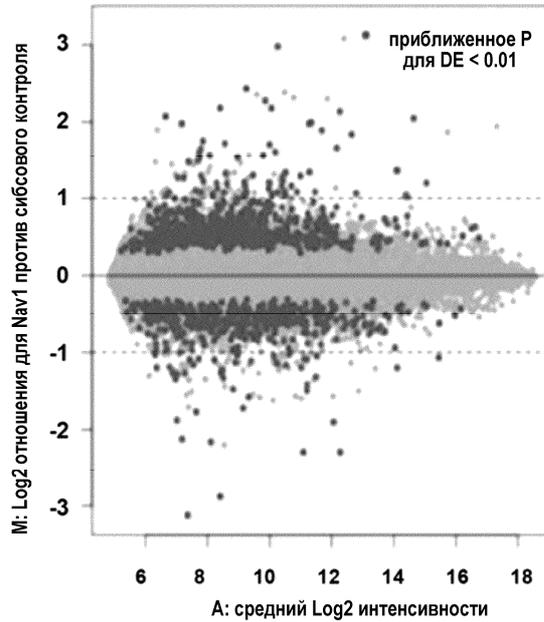
Фиг. 1D



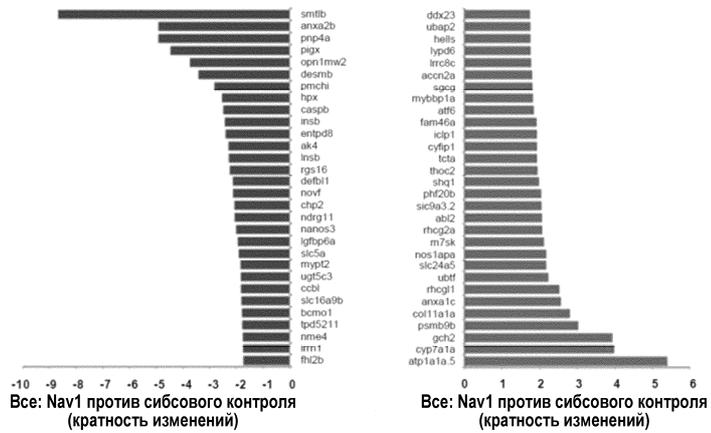
Фиг. 1Е



Фиг. 2А

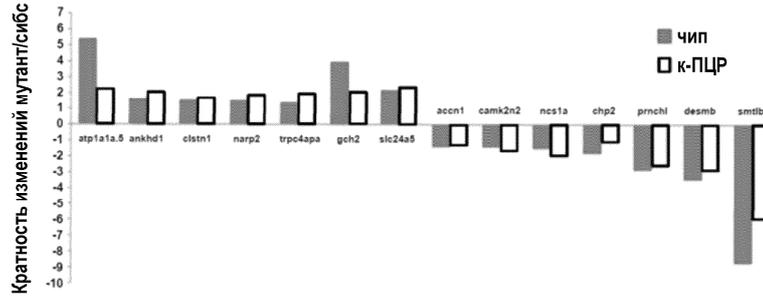


Фиг. 2В

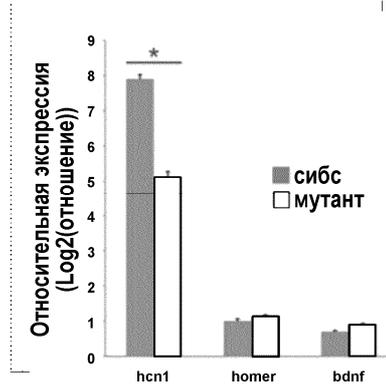


Фиг. 2С

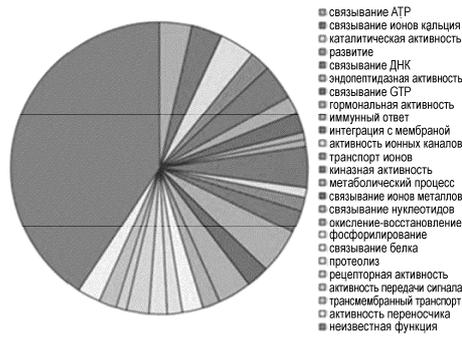
040818



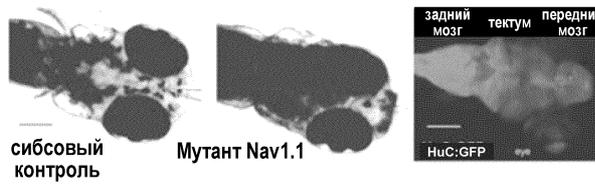
Фиг. 3А



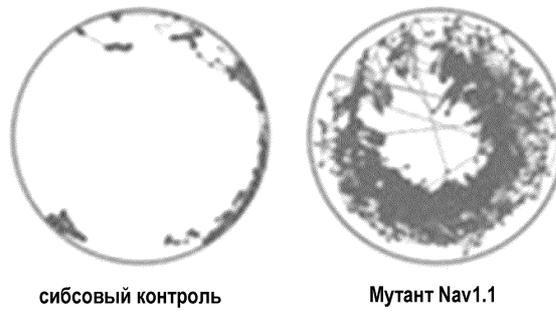
Фиг. 3В



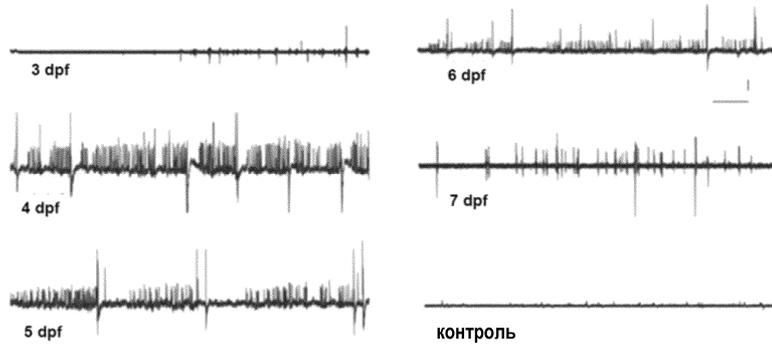
Фиг. 3С



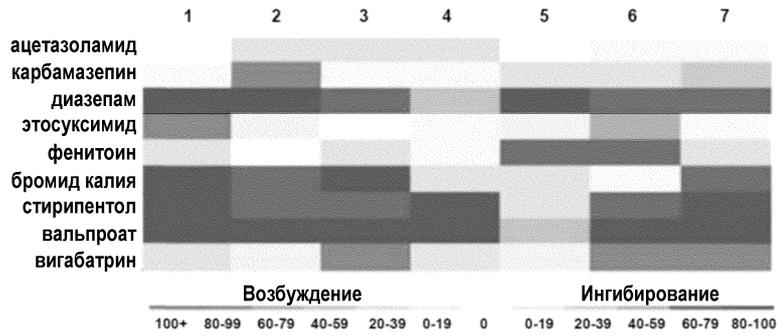
Фиг. 4А



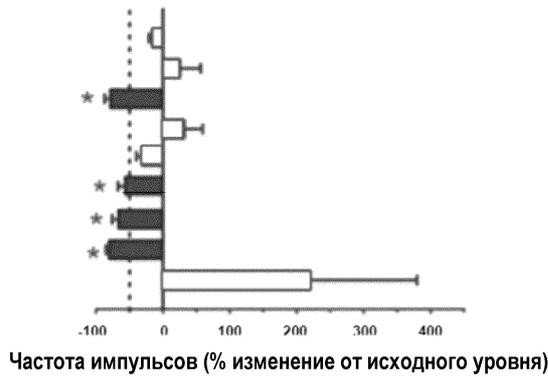
Фиг. 4В



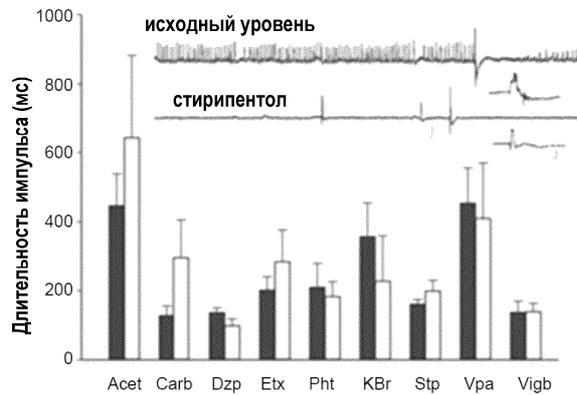
Фиг. 4С



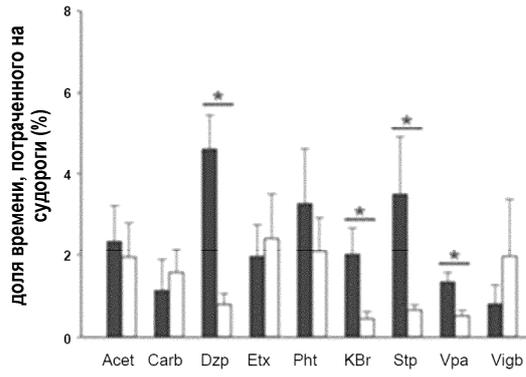
Фиг. 5А



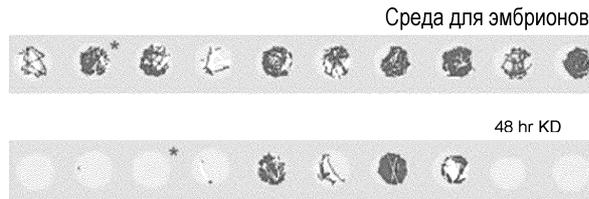
Фиг. 5В



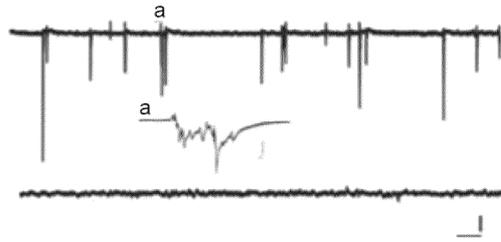
Фиг. 5С



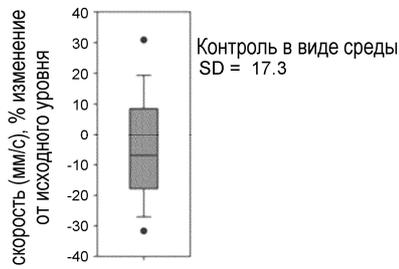
Фиг. 5D



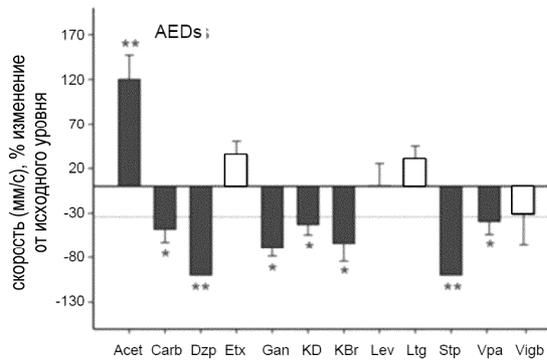
Фиг. 5E



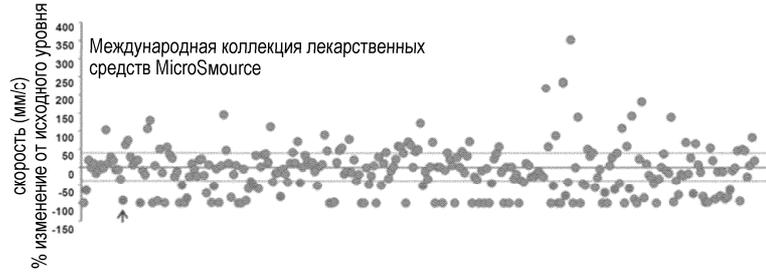
Фиг. 5F



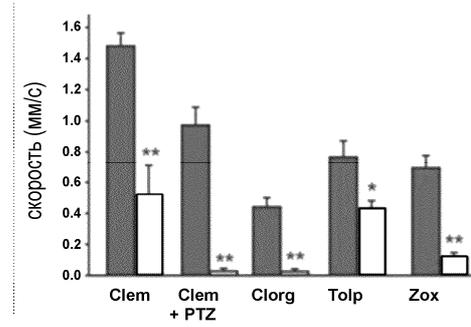
Фиг. 6A



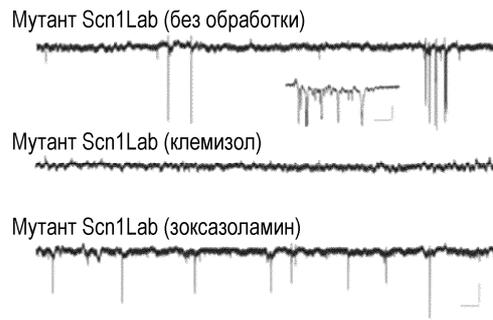
Фиг. 6B



Фиг. 6С



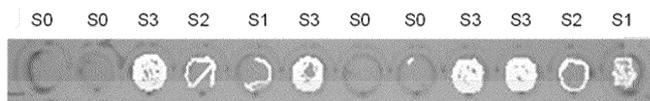
Фиг. 6D



Фиг. 6E

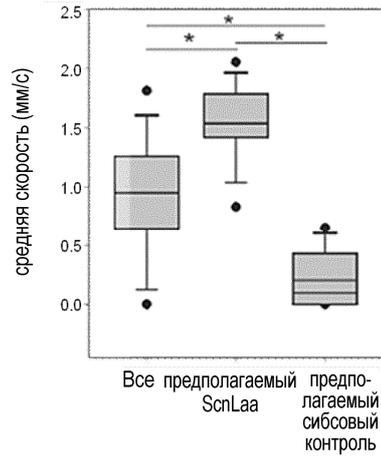


Фиг. 7А

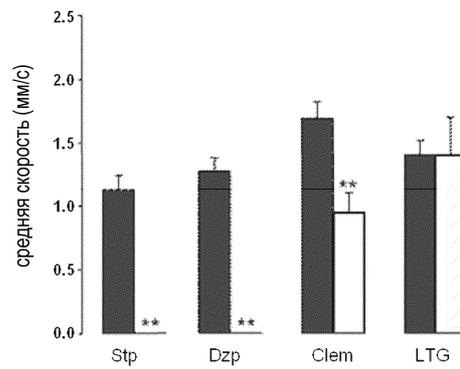


Фиг. 7В

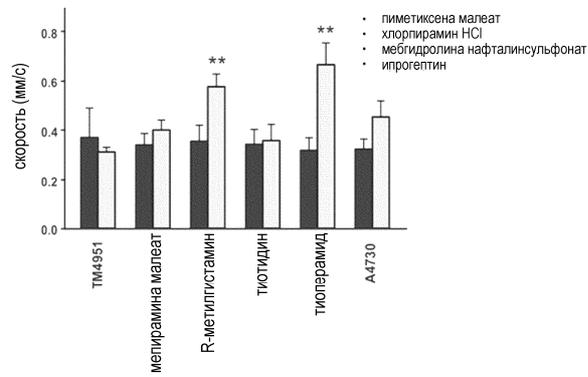
040818



Фиг. 7С



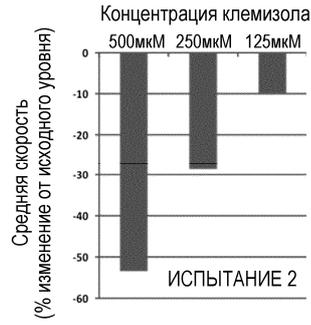
Фиг. 7D



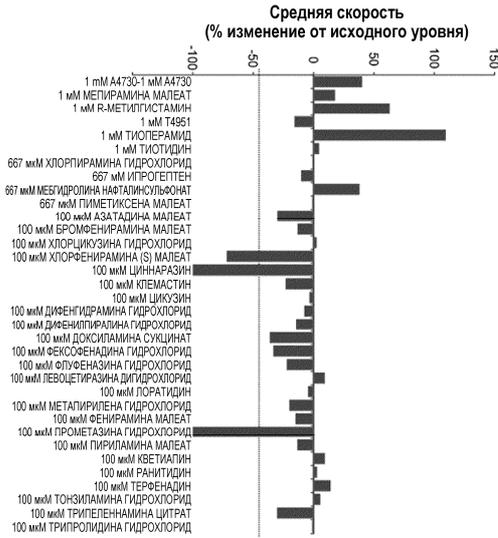
Фиг. 8



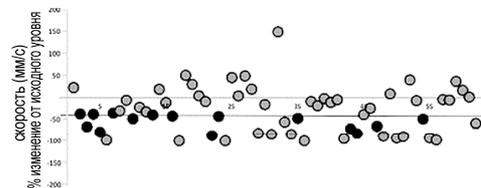
Фиг. 9А



Фиг. 9В

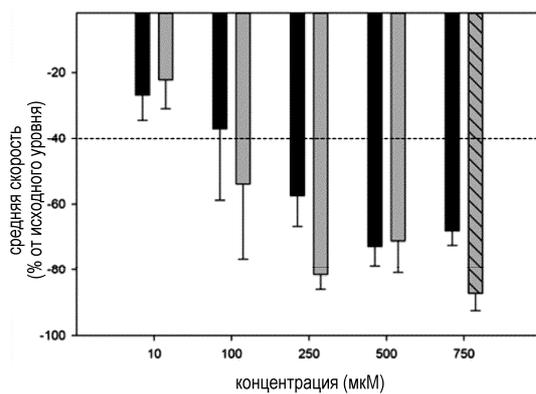


Фиг. 10

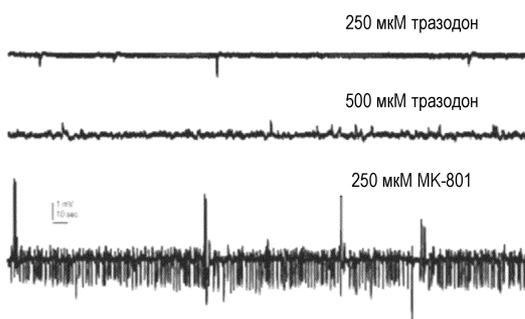


Мозаприда цитрат	зипразидон HCl	PRX-080966, малеиновая кислота
суматриптана суццинат	тсв-2	тразодол HCl
набатриптан	Илоперидон	вмУ 7378
ризатриптана бензоат	Рисперидон	Ламотригин
золмитриптан	Трописетрон HCl	Атомефетин HCl
Арипипразол	Ондансетрон	Амитриптилин HCl
уралидил HCl	Азаветрон HCl	Доксалина суццинат
элитриптан HCl	Элонансерин	Воллкетин (ш. А421004) HBr
WAY-100635 малеат	Кетансерин	Тианелтин натрий
ввL-54443	Клозапин	Флуоксетин HCl
Проклопид	Оланзапин	Флувоксамин малеат
элетриптан HBr	Кломипрамин HCl	венлафаксин
лоркасерин HCl	у310762	Лалоксетин HCl
Сердолон HCl	ввL-35572	Милгазалин
Проклопидина суццинат	85-127445	Пароксетин HCl
Буспирон HCl	88269970 HCl	Пароксетин HCl
Атомелатин	88271046	Эсциталопрама оксалат
Латрелидин	ввL 10166	Десвенлафаксина суццинат
Асенапин	88242457	Десвенлафаксин
Трамсетрон HCl	Лалонсетрон HCl	Вилазодол HCl
Ондансетрон HCl	Сертралин HCl	

Фиг. 11



Фиг. 12А



Фиг. 12В

