

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392251 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.11.16

(22) Дата подачи заявки
2022.02.09

(51) Int. Cl. *A61K 31/435* (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 31/165 (2006.01)
A61K 31/19 (2006.01)
A61K 31/4015 (2006.01)
A61K 31/41 (2006.01)
A61K 31/4166 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/08 (2006.01)

(54) КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СУДОРОЖНЫХ РАССТРОЙСТВ

(31) 63/147,736

(32) 2021.02.09

(33) US

(86) PCT/US2022/015851

(87) WO 2022/173853 2022.08.18

(71) Заявитель:

КСЕНОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ
ИНК. (СА)

(72) Изобретатель:

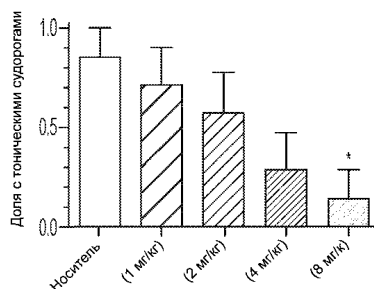
Джонсон Джеймс Филип, мл. (СА)

(74) Представитель:

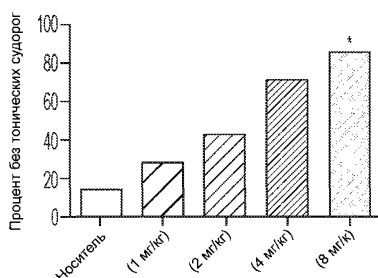
Фелицына С.Б. (RU)

(57) В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на способы и применения для лечения судорожных расстройств у человека, нуждающегося в этом, где способы и применения включают совместное введение N-[4-(6-фтор-3,4-дигидро-1H-изохинолин-2-ил)-2,6-диметилфенил]-3,3-диметилбутанамида (соединения А) и противосудорожного средства (ASM) человеку в количествах, которые являются терапевтически эффективными при совместном введении. Настоящее изобретение также направлено на различные усовершенствованные способы лечения и применения соединения А.

Доля с тоническими судорогами – 2 часа



Процент без тонических судорог – 2 часа



A1

202392251

202392251

A1

КОМБИНИРОВАННАЯ ТЕРАПИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ СУДОРОЖНЫХ РАССТРОЙСТВ

1. Предшествующий уровень техники

Эпилепсия является распространенным неврологическим расстройством, частота которого, по оценкам, во всем мире составляет 0,7% от населения (т.е. примерно 50 миллионов человек) (см. Hirtz, D. et al., *Neurology*, (2007), 68:326-337). Она характеризуется аномальной электрической активностью в головном мозге, приводящей к судорогам. В эпидемиологических целях определение требует наличия более одного неспровоцированного приступа любого типа.

Пациенты с эпилепсией имеют повышенный риск смертности по сравнению с населением в целом, что обусловлено главным образом этиологией заболевания. Однако у пациентов с неконтролируемой эпилепсией наибольший риск смертности, связанный с приступами, обусловлен внезапной неожиданной смертью при эпилепсии (SUDEP) (см. Hirtz, N. et al., *Epilepsy and Behavior* (2007), 10:363-376). Пациенты, участвующие в клинических испытаниях исследуемых противосудорожных препаратов (ASM), как правило, болели эпилепсией более 10 лет, и лечение множеством ASM оказалось безуспешным.

Патофизиология большинства форм эпилепсии остается плохо изученной, но известно, что эпилептические приступы возникают из-за чрезмерно синхронного и продолжительного возбуждения группы нейронов. Стойкое повышение возбудимости нейронов является общим для всех эпилептических синдромов. Терапевтическая стратегия при лечении эпилепсии включает снижение возбудимости нейронов с помощью различных механизмических путей. За последние два десятилетия было разработано и выведено на рынок несколько новых ASM для расширения терапевтического спектра за счет ориентирования на различные механизмы действия и улучшения соотношения риска и пользы. Считается, что доступные в настоящее время ASM действуют путем ингибирования гликопротеина синаптических везикул, усиления ингибирующей ГАМКергической нейротрансмиссии, снижения глутамат-опосредованной возбуждающей нейротрансмиссии или ингибирования потенциалзависимых натриевых или кальциевых каналов. Несмотря на это, до 30% пациентов остаются невосприимчивыми к традиционному лечению и продолжают испытывать неконтролируемые приступы (см. Brown, D.A. et al., *Nature* (1980), 283:673-676, и Elger, C.E. et al., *Epilepsy Behavior*. (2008), 12:501-539). Качество жизни у не отвечающих на лечение пациентов является низким; они

не могут водить автомобиль, и им трудно работать или жить самостоятельно. Кроме того, у многих пациентов наблюдаются поведенческие, неврологические и/или интеллектуальные нарушения как последствия их судорожного расстройства. Современные препараты оказывают минимальное воздействие или вообще не оказывают никакого воздействия на нейрональные калий-зависимые каналы, несмотря на тот факт, что эти каналы играют важную роль в контроле возбудимости нейронов. Таким образом, для удовлетворения имеющейся значительной клинической потребности в контроле приступов у пациентов с резистентной к лечению эпилепсией необходимы лекарства с новыми механизмами действия или лекарства, улучшающие уже имеющиеся на рынке ASM.

Потенциалзависимые калиевые каналы Kv7.2 и Kv7.3 (Kv7.2/Kv7.3) важны для контроля возбудимости нейронов. Kv7.2/Kv7.3 лежат в основе нейронального «М-тока», названного в соответствии с его первоначальной характеристикой как нейронального тока, снижающегося в ответ на воздействие мускариновых/холинергических агонистов (см. Brown, D.A. et al., Nature (1980), 283:673-676). М-ток - это неинактивирующий, гиперполяризующий ток, который, как известно, действует как тормоз при повышенной возбудимости нейронов. Следовательно, уменьшение М-тока, опосредованного Kv7.2, например, из-за генетической потери функции, может вызвать деполяризацию нейронов и увеличение мембранной и нейрональной возбудимости, что может привести к всплескам потенциала действия, проявляющимся в виде эпилептических приступов. Напротив, увеличение М-тока, опосредованного Kv7.2, может гиперполяризовать клеточную мембрану и тем самым снижать возбудимость нейронов и предотвращать инициацию и распространение всплесков потенциала действия и возникающих в результате судорог. Усиление открытого состояния каналов Kv7.2/Kv7.3 в нейронах способствует гиперполяризованному состоянию покоя, что уменьшает всплеск потенциала быстрого действия (т.е. импульсное возбуждение). Такое усиление может оказывать стабилизирующее действие на возбудимые, особенно гипервозбудимые, нейроны и, следовательно, быть полезным при лечении определенных судорожных расстройств. Клинически доказано, что это усовершенствование эффективно для лечения судорожных расстройств, таких как парциальные приступы у взрослых с эпилепсией, с помощью ретигабина (эзогабина), известного открывателя Kv7.2/Kv7.3.

Несмотря на то, что в этой области были достигнуты значительные успехи, особенно в контексте Соединения А, определенного ниже, и его применения при лечении судорожных расстройств, сохраняется существенная потребность в предоставлении пациентам дополнительных вариантов лечения судорожных расстройств.

2. Изложение сущности изобретения

В настоящем описании изложены определенные способы и применения для низкомолекулярного N-[4-(6-фтор-3,4-дигидро-1H-изохинолин-2-ил)-2,6-диметилфенил]-3,3-диметилбутанамида (здесь называемого «Соединением А»).

В одном варианте осуществления настоящее изобретение направлено на способ лечения судорожного расстройства у нуждающегося в нем человека, включающий совместное введение Соединения А и ASM человеку в количествах, которые являются терапевтически эффективными при совместном введении. Аналогично, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на применение Соединения А и ASM в количествах, которые являются терапевтически эффективными при совместном введении, для лечения судорожного расстройства у человека, нуждающегося в этом.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение направлено на способ снижения количества ASM, которое требуется для терапевтической эффективности у человека, страдающего судорожным расстройством, включающий введение человеку, совместно с ASM, количества Соединения А, которое эффективно для достижения такого снижения при введении вместе с ASM. Аналогично, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на применение Соединения А для уменьшения количества ASM, которое требуется для терапевтической эффективности у человека, страдающего судорожным расстройством, например, путем введения человеку, совместно с ASM, количества Соединения А, которое является эффективным для достижения такого снижения при одновременном применении с ASM. В некоторых примерах этих вариантов осуществления ASM представляет собой вальпроевую кислоту, леветирацетам, фенитоин, лакосамид, ценобамат или их комбинацию, в частности, вальпроевую кислоту.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение направлено на способ снижения количества Соединения А, которое требуется для терапевтической эффективности у человека, страдающего судорожным расстройством, включающий введение человеку, совместно с Соединением А, количества ASM, которое эффективно для достижения такого снижения при введении с Соединением А. Аналогично, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на применение ASM для уменьшения количества Соединения А, которое требуется для терапевтической эффективности у человека, страдающего судорожным расстройством, например, путем введения человеку, совместно с Соединением А, количества ASM, которое является эффективным для достижения такого снижения при введении Соединения А. В некоторых

примерах этих вариантов осуществления ASM представляет собой вальпроевую кислоту, леветирацетам, фенитоин, лакосамид, ценобамат или их комбинацию, в частности фенитоин.

В некоторых аспектах способы и применения, описанные в настоящей заявке, для лечения судорожного расстройства у человека, нуждающегося в этом, для уменьшения количества ASM, необходимого для терапевтической эффективности, для уменьшения количества Соединения А, необходимого для терапевтической эффективности, или для уменьшения абсорбции введенного количества Соединения А в плазму или головной мозг человека при эффективном лечении судорожного расстройства, включают усиление открытия калиевого канала Kv7 у человека.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение направлено на способ усиления открытия калиевого канала Kv7 у человека, включающий совместное введение Соединения А и ASM человеку в количествах, которые являются терапевтически эффективными при совместном введении, например, при судорожном расстройстве у человека. Аналогично, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на применение Соединения А и ASM в количествах, которые являются терапевтически эффективными при совместном введении, для усиления открытия калиевого канала Kv7 у человека, например, когда человек страдает судорожным расстройством.

В некоторых аспектах калиевый канал Kv7 является одним или несколькими из Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4 или Kv7.5. В определенных случаях открытие или усиленное открытие одного или нескольких из калиевых каналов Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4 и Kv7.5 является селективным по сравнению с Kv7.1. В других случаях способ включает открытие или усиленное открытие калиевого канала Kv7.2/Kv7.3 (KCNQ2/3).

В некоторых аспектах настоящих способов и применений ASM представляет собой бензодиазепин, карбамазепин, ценобамат, фелбамат, габапентин, лакосамид, ламотриджин, леветирацетам, окскарбазепин, фенобарбитал, фенитоин, прегабалин, руфинамид, тиагабин, топирамат, вальпроевую кислоту, вигабатрин, зонисамид или их комбинацию. В конкретных аспектах, противосудорожным препаратом является вальпроевая кислота, леветирацетам, фенитоин, лакосамид, ценобамат или их комбинация. В некоторых случаях противосудорожный препарат не усиливает открытие калиевого канала Kv7 у человека.

В некоторых вариантах осуществления ASM уменьшает возбуждение нейронов путем блокирования натриевого канала у человека, уменьшает возбуждение нейронов путем блокирования кальциевого канала у человека, уменьшает возбуждение нейронов

путем связывания с гликопротеином 2A синаптических везикул (SV2A) у человека или увеличивает ингибирование нейронов у человека.

В некоторых аспектах ASM является глутаматергическим агентом. В других аспектах ASM является ГАМКергическим агентом.

В некоторых случаях судорожное расстройство, которое лечат настоящими способами или ассоциированное с ними, связано с дисфункцией калиевого канала Kv7. В других случаях судорожным расстройством является эпилепсия с фокальным началом.

В некоторых вариантах осуществления настоящих способов и применений Соединение А вводят человеку перорально. В определенных вариантах осуществления настоящих способов и применений ASM перорально вводят человеку. В других вариантах осуществления настоящих способов и применений как Соединение А, так и ASM перорально вводят человеку.

В некоторых аспектах настоящих способов и применений Соединение А вводят, например, перорально, совместно с ASM, в дозе Соединения А от 1 до 200 мг для человека, в дозе Соединения А от 2 до 100 мг для человека, в дозе Соединения А от 5 до 50 мг для человека, в дозе Соединения А 5, 10, 15, 20 или 25 мг для человека или в дозе Соединения А 20 мг для человека. В других аспектах Соединение А вводят, например, перорально, совместно с ASM, в дозе Соединения А, составляющей по меньшей мере 10 мг для человека, в дозе Соединения А, составляющей по меньшей мере 20 мг для человека, или в дозе Соединения А, составляющей по меньшей мере 50 мг для человека. В других аспектах Соединение А вводят, например, перорально, совместно с ASM, в дозе Соединения А, составляющей 5-1000 мг в сутки для человека, в дозе Соединения А, составляющей 5-500 мг в сутки для человека, в дозе Соединения А, составляющей 5-250 мг в сутки для человека, в дозе Соединения А 20-150 мг в сутки для человека или в дозе Соединения А 100 мг в сутки для человека. В других случаях Соединение А вводят, например, перорально, совместно с ASM, в дозе Соединения А, составляющей 0,01-2,0 мг/кг для человека, в дозе Соединения А, составляющей 0,03-1,0 мг/кг для человека, или в дозе Соединения А, составляющей 0,05-0,5 мг/кг для человека.

В некоторых вариантах осуществления настоящих способов и применений Соединение А перорально вводят человеку примерно за 30 минут до и примерно через 2 часа после приема пищи, например, Соединение А может быть перорально введено человеку во время приема пищи или в течение 15 минут после приема пищи.

В другом варианте осуществления настоящих способов и применений ASM представляет собой вальпроевую кислоту. В некоторых аспектах вальпроевую кислоту вводят человеку совместно с Соединением А в дозе вальпроевой кислоты 2-16 мг/кг,

например, вальпроевую кислоту можно вводить человеку в дозе 4-12 мг/кг.

В другом варианте осуществления настоящих способов и применений ASM представляет собой фенитоин. В некоторых аспектах фенитоин вводят совместно с Соединением А в дозе фенитоина 0,05-5 мг/кг для человека, например, фенитоин может быть введен человеку в дозе 0,1-1 мг/кг.

В другом варианте осуществления настоящих способов и применений ASM представляет собой лакосамид. В некоторых аспектах лакосамид вводят человеку совместно с Соединением А в дозе лакосамида 0,1-5 мг/кг, например, лакосамид вводят человеку в дозе 0,5-1 мг/кг.

В другом варианте осуществления настоящих способов и применений ASM представляет собой ценобамат. В некоторых аспектах ценобамат вводят человеку совместно с Соединением А в дозе ценобамата 0,05-5 мг/кг, например, ценобамат вводят человеку в дозе 0,1-1 мг/кг.

В определенных вариантах осуществления настоящих способов и применений совместное введение Соединения А и ASM (например, вальпроевой кислоты, фенитоина, леветирацетама, лакосамида, ценобамата или их комбинации) обеспечивает повышенную эффективность (например, усиливает уменьшение числа эпизодов судорог или уменьшение тяжести приступов у человека) по сравнению с введением Соединения А или ASM по отдельности. В некоторых таких вариантах осуществления совместное введение обеспечивает аддитивный эффект, где аддитивный эффект относится к сумме индивидуальных эффектов введения Соединения А и ASM. В некоторых вариантах осуществления совместное введение обеспечивает синергетический эффект, который относится к эффекту, превышающему сумму индивидуальных эффектов введения Соединения А и ASM.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую Соединение А, противосудорожное лекарственное средство (ASM) и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых аспектах фармацевтической композиции ASM представляет собой бензодиазепин, карбамазепин, ценобамат, фелбамат, габапентин, лакосамид, ламотриджин, леветирацетам, окскарбазепин, фенобарбитал, фенитоин, прегабалин, руфинамид, тиагабин, топирамат, вальпроевую кислоту, вигабатрин, зонисамид или их комбинацию.

Соединение А представляет собой небольшую молекулу, разрабатываемую в настоящее время для лечения судорожных расстройств, и его применение в качестве модулятора калиевых каналов раскрыто в патентах США № 8,293,911 и 8,993,593, а также в заявках США № 16/409,684 и 16/410,851, раскрытия которых настоящим включены

путем ссылки во всей полноте.

Эти и другие аспекты настоящего изобретения станут очевидными при обращении к следующему подробному описанию. С этой целью в настоящей заявке приведены различные ссылки, которые более подробно описывают определенную справочную информацию и процедуры, и каждая из них включена в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте.

3. Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показаны результаты для перорального введения Соединения А в дозах 1, 2, 4, 8 мг/кг или носителя за 2 часа до анализа у мышей CF-1 ($n=7$ на группу). Верхний график: доля мышей, у которых проявлялся тонический разгибательный компонент задних конечностей во время теста MES. В каждом столбце показана средняя реакция $\pm$ S.E.M. Нижний график: процент мышей, защищенных от тонического приступа. Единственная звездочка на этой и всех других фигурах указывает на $0,01 < p < 0,05$. «Мрк» на этой и всех других фигурах означает «мг/кг».

На фиг. 2 показаны результаты для перорального введения Соединения А в дозе 1, 2, 4, 8 мг/кг или носителя за 0,5 часа до анализа у мышей CF-1 ($n=7$ на группу доз, $n=5$ для одного носителя). Верхний график: наличие или отсутствие тонического разгибательного компонента задних конечностей во время тонического приступа у каждого животного. Нижний график: процент защищенных мышей.

На фиг. 3 показаны фармакокинетические (ФК) и фармакодинамические (ФД) свойства Соединения А в анализе MES на мышах. Горизонтальные планки погрешностей указывают стандартную ошибку среднего (S.E.M.) для концентрации в плазме или головном мозге. Когда они не видны, то означает, что они меньше символа, указывающего среднее значение. Сплошная кривая для каждого набора данных, полученных через 2 часа после введения препарата, наилучшим образом соответствует кривой концентрация-эффект. Значение IC_{50} , основанное на концентрациях в головном мозге и плазме, составило 275 нМ и 154 нМ, соответственно. Эффективность, измеренная через 0,5 часа после введения препарата, соответствовала соотношению ФК-ФД, определенному через 2 часа введения препарата.

На фиг. 4 показаны результаты для перорального введения Соединения А в дозе 1 мг/кг за 2 часа до анализа и интраперитонеального введения вальпроевой кислоты в дозе 30, 56 или 100 мг/кг за 0,5 часа до анализа у мышей CF-1 (группы с введением препаратов по отдельности: $n=15$ для Соединения А в дозе 1 мг/кг, $n=15$ для вальпроевой кислоты в дозе 100 мг/кг, $n=7$ для вальпроевой кислоты в дозе 30 и 56 мг/кг; группы комбинированных доз: $n=15$ для Соединения А + вальпроевой кислоты по 100 мг/кг, $n=8$

для Соединения А + вальпроевой кислоты по 30 и 56 мг/кг; $n=15$ для носителя). Верхний график: наличие или отсутствие тонического разгибательного компонента задних конечностей во время тонического приступа у каждого животного. Нижний график: сравнение отдельного или комбинированного введения Соединения А и вальпроевой кислоты. Четыре звездочки указывают на $p<0,0001$.

На фиг. 5 показано соотношение ФК/ФД для вальпроевой кислоты с Соединением А в дозе 1 мг/кг и без него в анализе MES на мышах. Сплошные кривые указывают на наилучшее соответствие кривым концентрация-эффект для вальпроевой кислоты с Соединением А в дозе 1 мг/кг и без него. Кривая соответствовала максимуму 100% судорог при применении только вальпроевой кислоты и 73,3% при применении Соединения А в дозе 1 мг/кг, что отражает эффективность Соединения А по отдельности в этой дозе. Эффект совместного применения с Соединением А заключался в снижении IC_{50} для вальпроевой кислоты с 1440 мкМ до 608 мкМ.

На фиг. 6 показаны результаты для перорального введения Соединения А в дозе 1 или 1,5 мг/кг за 2 часа до анализа и интраперитонеального введения леветирацетама в дозе 120 или 150 мг/кг за 2 часа до анализа у мышей. Верхний график: наличие или отсутствие тонического разгибательного компонента задних конечностей во время тонического приступа у каждого животного. Нижний график: сравнение отдельного или комбинированного введения Соединения А и леветирацетама.

На фиг. 7 показаны результаты для перорального введения Соединения А в дозе 0,25; 0,75; 1; 1,5 или 2,5 мг/кг за 2 часа до анализа и интраперитонеального введения фенитоина в дозе 2 мг/кг за 2 часа до анализа. Отдельное введение: Соединение А, $n=8$ на дозу, фенитоин 2 мг/кг, $n=24$; комбинированное введение: $n=8$ на группу, $n=24$ для носителя. Верхний график: наличие или отсутствие тонического разгибательного компонента задних конечностей во время тонического приступа у каждого животного. Нижний график: сравнение отдельного или комбинированного применения Соединения А и фенитоина. Две звездочки указывают на $0,001<p<0,01$.

На фиг. 8 показано соотношение ФК/ФД Соединения А с фенитоином в дозе 2 мг/кг и без него в анализе MES на мышах. Сплошные кривые указывают на наилучшее соответствие кривым концентрация-эффект для Соединения А с фенитоином в дозе 2 мг/кг и без него. Кривая соответствовала максимуму в 94,1% судорог при применении Соединения А по отдельности и 75% при применении фенитоина в дозе 2 мг/кг, что отражает эффективность фенитоина в дозе 2 мг/кг по отдельности. Эти верхние значения обозначены горизонтальными пунктирными линиями. Эффект совместного введения фенитоина с Соединением А заключается в снижении IC_{50} для Соединения А с 147 нМ до

39,7 нМ.

На фиг. 9 показана доля мышей, у которых отмечены судороги, в зависимости от различных доз Соединения А, и что Соединение А обеспечивает дозозависимую эффективность в анализе АС-MES у мышей (А, В и С). Соединение А вводили перорально в дозах 1, 3, 5, 7,5 и 10 мг/кг за 0,5 часа до анализа мышам CF-1 (группы: n=8 Соединение А в дозе 1 мг/кг, n=8 Соединение А в дозе 3 мг/кг, n=16 Соединение А в дозе 5 мг/кг, n=7 Соединение А в дозе 7,5 мг/кг, n=17 Соединение А в дозе 10 мг/кг; n=24 носитель). Результаты выражены в виде доли животных, у которых отмечены судороги в любой данной группе доз. Доля животных, у которых отмечены судороги в группах, получавших Соединение А, значительно отличалась от группы, получавшей носитель, во всех трех испытаниях (соответствующие значения р показаны на фиг. 9А-С). Кривые концентрация-эффект для Соединения А в плазме (D) и ткани головного мозга (E), основанные на уравнении Хилла-Ленгмюра, показывают, что эффективность зависит от концентрации. Анализ кривой концентрация-эффект для Соединения А показал, что EC_{50} составляет 0,30 мкМ для плазмы, и EC_{50} составляет 0,47 мкМ для ткани головного мозга. Конечные образцы плазмы и головного мозга были получены через 0,5 часа после введения Соединения А. Каждая точка данных в D и E представляет долю животных, у которых отмечены судороги при среднем уровне концентрации для каждой группы доз.

На фиг. 10 показано, что лакосамид обеспечивает дозозависимую эффективность в анализе АС-MES на мышах (А, В, С и D). Лакосамид вводили перорально в дозах 6, 8, 10 и 20 мг/кг за 2 часа до анализа мышам CF-1 (группы: n=16 лакосамид в дозе 6 мг/кг; n=8 лакосамид в дозе 8 мг/кг; n=16 лакосамид в дозе 10 мг/кг; n=8 лакосамид в дозе 20 мг/кг; n=32 носитель). Результаты выражены в виде доли животных, у которых отмечены судороги, в любой группе с заданной дозой (n=8). В испытании 2D доля животных с судорогами в группе, получавшей лакосамид в дозе 20 мг/кг, значительно отличалась от группы, получавшей носитель (значение р показано на фиг. 10А). Кривые концентрация-эффект для лакосамида в плазме (E) и ткани головного мозга (F), основанные на уравнении Хилла-Ленгмюра, показывают, что эффективность зависит от концентрации. Анализ кривой концентрация-эффект для лакосамида показал, что EC_{50} для плазмы составляет 21,6 мкМ, а EC_{50} для ткани головного мозга - 22,2 мкМ. Конечные образцы плазмы и головного мозга были получены через 2 часа после введения лакосамида. Каждая точка данных в E и F представляет долю животных, у которых отмечены судороги, при среднем уровне концентрации для каждой группы доз (n=8).

На фиг. 11 показаны результаты комбинации Соединения А и лакосамида в тесте АС-MES на мышах (А). Соединение А вводили перорально в дозе 3 мг/кг за 0,5 часа до

анализа; лакосамид вводили перорально в дозе 10 мг/кг за 2 часа до анализа мышам CF-1 (группы отдельного применения: $n=8$ Соединение А в дозе 3 мг/кг, $n=8$ лакосамид в дозе 10 мг/кг; группа комбинированного применения: $n=8$ Соединение А в дозе 3 мг/кг + лакосамид в дозе 10 мг/кг; $n=8$ носитель). Результаты выражены в виде доли животных, у которых наблюдали судороги в любой группе с заданной дозой ($n=8$). Разница между группой, получавшей лакосамид, и группой, получавшей комбинацию, была статистически значимой (p -значения показаны на фиг. 11А). Фармакокинетико-фармакодинамическое соотношение (ФК/ФД) Соединения А с лакосамидом в дозе 10 мг/кг и без него и ФК/ФД лакосамида с Соединением А в дозе 3 мг/кг и без него в анализе АС-MES на мышах показано на фиг. В и С. Каждая точка данных на В и С представляет индивидуальную концентрацию от одного животного и наличие у этого животного тонических судорог. Конечные образцы плазмы и головного мозга были получены через 0,5 часа после перорального введения Соединения А и через 2 часа после перорального введения лакосамида.

На фиг. 12 показана зависимость доза-эффект для Соединения А в анализе психомоторных приступов у мышей при индукции 6 Гц через 1 час после однократного перорального введения. Пероральное введение Соединения А за 1 час до индукции судорог показало дозозависимую эффективность (А), при этом значительный эффект был достигнут при дозе 8 мг/кг ($**p=0,0081$ по сравнению с носителем). Кривая доза-эффект (В), основанная на уравнении Хилла-Ленгмюра-, показывает, что ED_{50} составляет 6,48 мг/кг, а ED_{20} - 4,13 мг/кг при коэффициенте Хилла $n = -3,09$.

На фиг. 13 показана зависимость концентрация-эффект для Соединения А в анализе психомоторных приступов у мышей с индукцией 6 Гц через 1 час после однократного перорального введения. Экспозиция в плазме крови (А) и головном мозге (В) отдельных животных через 1 час после однократного перорального введения дозы Соединения А демонстрирует четкую взаимосвязь между концентрацией Соединения А в тканях и эффективностью при анализе судорог с индукцией 6 Гц. Животное, которое испытывало судороги и было холодным на ощупь, имело наибольшую экспозицию и отмечено кружком. Кривые концентрация-эффект для плазмы (С) и головного мозга (D), основанные на уравнении Хилла-Ленгмюра, показывают значение EC_{50} плазмы, равное 0,35 мкМ при коэффициенте Хилла $n = -1,95$, и значение EC_{50} головного мозга, равное 0,54 мкМ при коэффициенте Хилла $n = -2,17$.

На фиг. 14 показана эффективность Соединения А и леветирацетама по отдельности и в сочетании при анализе психомоторных приступов при индукции 6 Гц через 1 час после введения препарата. (А) Соединение А (при пероральном введении) и

леветирацетам (при интраперитонеальном введении) по отдельности продемонстрировали различные уровни эффективности в каждом из двух испытаний (отсутствие защиты в испытании 3В и защита до 25% в испытании 3С). В каждом испытании комбинация Соединения А и леветирацетама приводила к значительному повышению защиты от судорог по сравнению с любым из этих соединений по отдельности и по сравнению с носителем (* $p=0,034$; ** $p<0,01$; *** $p=0,0002$). (В) При объединении обоих испытаний максимальная эффективность при применении любого из этих соединений была достигнута при введении леветирацетама с судорогами у 14/16 животных, в то время как комбинация обоих соединений приводила к судорогам у 5/15 животных. Таким образом, комбинация Соединения А и леветирацетама защитила 66,7% животных от судорог, что значительно отличалось как от носителя (**** $p<0,0001$), так и от любого из соединений по отдельности (*** $p<0,001$).

На фиг. 15 показана фармакокинетика Соединения А и леветирацетама по отдельности и в комбинации через 1 час после введения мышам CD-1. (А) Сравнение концентраций Соединения А в плазме крови (при пероральном введении) и леветирацетама (при интраперитонеальном введении) во всех экспериментальных группах показывает, что концентрация Соединения А в плазме крови была достигнута в 12 раз выше через 1 час после введения в испытании 3С по сравнению с испытанием 3В. Концентрации леветирацетама в плазме крови были сопоставимы в ходе двух испытаний. Введение Соединения А и леветирацетама в комбинации (Combo) существенно не изменяло экспозицию ни одного, ни другого соединения. У одного животного из группы с введением комбинации в испытании 3С не было измеримой концентрации леветирацетама в плазме, и оно было исключено (не показано). (В) Сравнение концентраций Соединения А в головном мозге (при пероральном введении) и леветирацетама (при интраперитонеальном введении) во всех экспериментальных группах показывает, что концентрация Соединения А в головном мозге была достигнута в 11 раз выше через 1 час после введения в испытании 3С по сравнению с испытанием 3В. Концентрации леветирацетама в головном мозге были сопоставимы между двумя испытаниями. Введение Соединения А и леветирацетама в комбинации (Combo) существенно не изменяло экспозицию ни одного, ни другого соединения. У одного животного из группы введения комбинации в испытании 3С не было измеримой концентрации леветирацетама в головном мозге, и оно было исключено (не показано).

На фиг. 16 показаны фармакокинетико-фармакодинамические сдвиги в эффективности Соединения А и леветирацетама после комбинированного введения. LEV: Леветирацетам. При введении Соединения А (перорально) в комбинации с

леветирацетамом (при интраперитонеальном введении; незакрашенные круги) доля животных, у которых отмечались судороги, снижалась по сравнению с введением Соединения А отдельно (закрашенные круги), хотя обе группы имеют сходные концентрации Соединения А в плазме (А) и головном мозге (В). Аналогичным образом, доля животных, у которых отмечались судороги, снижалась в группе комбинированного введения (закрашенные квадраты) по сравнению с введением только леветирацетама (закрашенные квадраты), хотя обе группы имеют сходные концентрации леветирацетама в плазме (С) и головном мозге (D).

На фиг. 17 показан ответ на дозу и концентрацию Соединения А после однократного перорального введения в тесте АС-MES на мышах. Данные по группам Соединения А и контрольного носителя приведены на основе указанных испытаний. Соединение А демонстрирует дозозависимую эффективность в тесте АС-MES на мышах (А, В, С и D). Соединение А вводили перорально в дозе 1; 2; 3; 5; 7,5 и 10 мг/кг за 0,5 часа до испытания у мышей CF-1 (группы: n=8 Соединение А в дозе 1 мг/кг, n=8 Соединение А в дозе 2 мг/кг, n=8 Соединение А в дозе 3 мг/кг, n=16 Соединение А в дозе 5 мг/кг, n=7 Соединение А в дозе 7,5 мг/кг, n=17 Соединение А в дозе 10 мг/кг; n=24 носитель). Результаты выражены в виде доли животных, у которых отмечены судороги в любой данной группе доз. Доля животных с судорогами в группах, получавших Соединение А, значительно отличалась от группы, получавшей носитель, в 3/4 испытаний (показаны соответствующие значения р). Кривые концентрация-эффект для Соединения А в плазме (Е) и ткани головного мозга (F), основанные на уравнении Хилла-Ленгмюра, показывают, что эффективность зависела от концентрации. Анализ кривой концентрация-эффект для Соединения А показал, что EC_{50} составляет 0,296 мкМ для плазмы и 0,471 мкМ для ткани головного мозга. Конечные образцы плазмы и головного мозга были получены через 0,5 часа после введения Соединения А. Каждая точка данных на Е и F представляет долю животных, у которых отмечены судороги при среднем уровне концентрации для каждой группы доз.

На фиг. 18 показан ответ на дозу и концентрацию ценобамата после однократного перорального введения в тесте АС-MES на мышах. Данные по группам ценобамата и носителя приведены на основе указанных испытаний. Ценобамат демонстрирует дозозависимую эффективность в тесте АС-MES на мышах (А, В и С). Ценобамат вводили перорально в дозах 3; 5; 7,5; 10 и 30 мг/кг за 2 часа до анализа мышам CF-1 (группы: n=15 ценобамат в дозе 3 мг/кг; n=15 ценобамат в дозе 5 мг/кг; n=8 ценобамат в дозе 7,5 мг/кг; n=8 ценобамат в дозе 10 мг/кг; n=8 ценобамат в дозе 30 мг/кг; n=24 носитель). Результаты выражены в виде доли животных, у которых отмечались судороги, в любой данной группе

доз. Доля животных, у которых отмечены судороги, в группе, получавшей ценобамат, в 2/3 испытаний значительно отличалась от группы, получавшей носитель (показано значение p). Кривые концентрация-эффект для ценобамата в плазме (D) и ткани головного мозга (E), основанные на уравнении Хилла-Ленгмюра, показывают, что эффективность зависит от концентрации. Анализ кривой концентрация-эффект для ценобамата показал, что EC_{50} для плазмы составляет 70,5 мкМ, а EC_{50} для ткани головного мозга - 25,2 мкМ. Конечные образцы плазмы и головного мозга были получены через 2 часа после введения ценобамата. Каждая точка данных на D и E представляет долю животных, у которых отмечены судороги, при среднем уровне концентрации для каждой группы доз.

На фиг. 19 показаны противосудорожные эффекты Соединения А и ценобамата в комбинации в тесте АС-MES на мышах. Комбинация Соединения А и ценобамата в тесте АС-MES на мышах (А и В). Соединение А вводили перорально в дозе 0,5; 1 и 2 мг/кг за 0,5 часа до анализа; ценобамат вводили перорально в дозе 5 мг/кг за 2 часа до анализа мышам CF-1 (группы введением по отдельности: $n=8$ Соединение А в дозе 2 мг/кг, $n=8$ ценобамат в дозе 5 мг/кг; группа комбинированных доз: $n=8$ Соединение А в дозе 2 мг/кг + ценобамат в дозе 5 мг/кг; $n=8$ Соединение А в дозе 1 мг/кг + ценобамат в дозе 5 мг/кг; $n=8$ Соединение А в дозе 0,5 мг/кг + ценобамат в дозе 5 мг/кг; $n=8$ носитель). Результаты выражены в виде доли животных, у которых отмечались судороги, в любой данной группе доз. В испытании 4F разница между группой, получавшей ценобамат, и группой, получавшей комбинацию препаратов, была статистически значимой, тогда как разница между группой, получавшей Соединение А, и группой, получавшей комбинацию препаратов, не была статистически значимой. В испытании 4G разница между группой, получавшей носитель, и группами, получавшими комбинацию препаратов, была статистически значимой. Показаны Р-значения. Фармакокинетико-фармакодинамическое (ФК/ФД) соотношение Соединения А с ценобаматом и без него в зависимости от концентрации в плазме и головном мозге показано на С и D. Каждая точка данных на С и D представляет долю животных, у которых отмечены судороги, при среднем уровне концентрации для каждой группы доз. Конечные образцы плазмы и головного мозга были получены через 0,5 часа после перорального введения Соединения А и через 2 часа после перорального введения ценобамата.

4. Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится, среди прочего, к новым и усовершенствованным способам и применениям для лечения судорожного расстройства у нуждающегося в этом человека, включающим совместное применение Соединения А и противосудорожного лекарственного средства (ASM) у человека, в том числе путем

перорального введения.

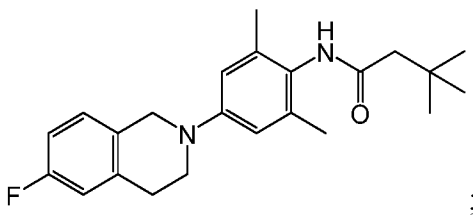
В следующем описании изложены некоторые конкретные детали для того, чтобы обеспечить полное понимание различных вариантов осуществления. Однако специалист в данной области техники поймет, что способы и применения, описанные в настоящей заявке, могут быть применены на практике без этих деталей. В других случаях хорошо известные структуры не были показаны или изложены подробно, чтобы избежать ненужного описания, затрудняющего понимание вариантов осуществления. Если контекст не требует иного, во всем описании и формуле изобретения, которые следуют далее, термин «включать» и его варианты, такие как «содержит» и «включающий», следует толковать в открытом, всеобъемлющем смысле, то есть как «включающий, но не ограничивающийся». Далее, заголовки, приведенные в настоящей заявке, приведены исключительно для удобства и не интерпретируют объем или значение заявленного изобретения.

Ссылка во всем настоящем описании на «один вариант осуществления» или «вариант осуществления» означает, что конкретный признак, структура или характеристика, описанные в связи с вариантом осуществления, включены по меньшей мере в один вариант осуществления. Таким образом, появление фраз «в одном варианте осуществления» или «в варианте осуществления» в различных местах по всему данному описанию не обязательно все относится к одному и тому же варианту осуществления. Кроме того, конкретные признаки, структуры или характеристики могут быть объединены любым подходящим образом в одном или нескольких вариантах осуществления. Кроме того, как используется в данном описании и прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают обозначения во множественном числе, если содержание явно не диктует иное. Следует также отметить, что термин «или» обычно используется в его значении, включающем «и/или», если содержание явно не диктует иное.

4.1. Определения

Как используется в описании и прилагаемой формуле изобретения, если не указано иное, следующие термины и сокращения имеют указанное значение.

«Соединение А» относится к соединению, имеющему следующую формулу:



и имеющему химическое название N-[4-(6-фтор-3,4-дигидро-1H-изохинолин-2-ил)-2,6-диметилфенил]-3,3-диметилбутанамид. Получение Соединения А и его применение в

качестве агента для открытия каналов Kv7.2/Kv7.3 (KCNQ2/3) раскрыто в патентах США №№ 8,293,911 и 8,993,593, а также заявках США с серийными номерами 16/409,684 и 16/410,851. Соединение А отличается от большинства известных противосудорожных препаратов тем, что оно потенцирует и усиливает открытие потенциалзависимых калиевых каналов Kv7.2 и Kv7.3 (Kv7.2/Kv7.3), которые важны для контроля возбудимости нейронов. Соединение А используется в способах и применениях, описанных в настоящей заявке. Следует понимать, что любая ссылка на Соединение А или любой из ASM, упомянутых в описании, также включает их фармацевтически приемлемые соли (например, вальпроевая кислота также может быть вальпроатом натрия или полунатриевыми формами вальпроата).

«Совместное введение» относится здесь к любой форме введения двух или более различных терапевтических соединений таким образом, что второе вводимое соединение вводят, в то время как первое вводимое терапевтическое соединение все еще действует в организме (например, два соединения одновременно эффективны у пациента, что может включать аддитивный или синергетический эффект этих двух соединений). Например, Соединение А и описанные здесь противосудорожные лекарственные средства могут быть введены либо в одном и том же составе, либо в отдельном составе, либо одновременно, либо последовательно. В определенных вариантах осуществления Соединение А и описанные здесь противосудорожные лекарственные средства могут быть введены в течение одного часа, 12 часов, 24 часов, 36 часов, 48 часов, 72 часов или недели друг от друга. Таким образом, индивидуум, который получает такое лечение, может получить пользу от комбинированного действия различных терапевтических соединений.

«Пониженное возбуждение нейронов» или «пониженная возбудимость нейронов», как используется в настоящей заявке, относится к уровню активности нейрональных клеток, который в некоторой степени снижается по отношению к нормальному физиологическому состоянию, которое наблюдалось бы при отсутствии судорожного расстройства у пациента. Конкретные агенты, которые снижают возбудимость нейронов, включают агенты, которые воздействуют на каналы и рецепторы, экспрессируемые на нейрональных клетках, непосредственно снижая уровень возбудимости нейрона. И наоборот, агент может действовать косвенно, снижая уровень возбудимости нейрона, инициируя каскад клеточных событий, последующие эффекты которых приводят к снижению возбудимости нейронов. Здесь описаны некоторые противосудорожные препараты, которые снижают возбудимость нейронов для восстановления физиологических уровней нейрональной активности.

«Повышенное нейрональное торможение», используемое в настоящей заявке,

относится к уровню нейронального торможения, который в некоторой степени повышается по отношению к нормальному физиологическому состоянию, которое наблюдалось бы при отсутствии судорожного расстройства у пациента. Здесь описаны некоторые противосудорожные препараты, такие как ГАМКергические агенты, которые усиливают нейронное торможение для восстановления физиологических уровней нейрональной активности.

«Судорожное расстройство (расстройства)» относится к приступам и расстройствам, связанным с приступами, таким как парциальные (фокальные) приступы, светочувствительная эпилепсия, самопроизвольный обморок, фармакорезистентная эпилепсия, синдром Ангельмана, доброкачественная роландическая эпилепсия, расстройство CDKL5, детская и юношеская абсансная эпилепсия, синдром Драве, лобно-долевая эпилепсия, синдром дефицита Glut1, гамартома гипоталамуса, инфантильные спазмы/синдром Веста, ювенильная миоклоническая эпилепсия, синдром Ландау-Клеффнера, синдром Леннокса-Гасто (LGS), эпилепсия с миоклоническими абсансами, синдром Отахара, синдром Панайотопулоса, эпилепсия PCDH19, прогрессирующие миоклонические эпилепсии, синдром Расмуссена, синдром кольцевой хромосомы 20, рефлекторная эпилепсия, височно-долевая эпилепсия, прогрессирующая миоклонус-эпилепсия Лафоры, нейрокутанные синдромы, комплекс туберозного склероза, ранняя детская эпилептическая энцефалопатия, эпилептическая энцефалопатия с ранним началом, генерализованная эпилепсия с фебрильными судорогами⁺, синдром Ретта, рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера, аутизм, атаксия, гипотония и пароксизмальная дискинезия. В некоторых вариантах осуществления термин «судорожное расстройство» относится к эпилепсии с фокальным началом, также известной как парциальная (фокальная) эпилепсия.

«Терапевтически эффективное количество», используемое в настоящей заявке, относится к количеству Соединения А, количеству ASM или как к количеству Соединения А, так и к количеству ASM, которое является достаточным для лечения заявленного заболевания, расстройства или состояния, или оказывает необходимый заявленный эффект на заболевание, расстройство или состояние, или один или несколько механизмов, лежащих в основе заболевания, расстройства или состояния у субъекта-человека. В некоторых вариантах осуществления, когда Соединение А вводят совместно с ASM для лечения судорожного расстройства, терапевтически эффективное количество относится как к количеству Соединения А, так и к количеству ASM, которое при совместном введении человеку лечит или ослабляет судорожное расстройство у человека или проявляет обнаруживаемый терапевтический эффект у человека, страдающего

судорожным расстройством. Эффект может быть обнаружен, например, по уменьшению количества эпизодов судорожных приступов или по уменьшению тяжести эпизодов судорожных приступов.

Термин «лечение», используемый в настоящей заявке, относится к терапевтическим применениям, связанным с совместным введением Соединения А и ASM, которые облегчают указанное заболевание, расстройство или состояние, или один или несколько механизмов, лежащих в основе указанного заболевания, расстройства или состояния, включая замедление или остановку прогрессирования заболевания, расстройства или состояния, или одного или нескольких механизмов, лежащих в их основе, у человеческого индивидуума. В некоторых вариантах осуществления, когда Соединение А и ASM совместно вводят для лечения судорожного расстройства, лечение относится к терапевтическим применениям для замедления или остановки прогрессирования судорожного расстройства и/или для регресса судорожного расстройства. Регресс судорожного расстройства отличается от терапевтического применения, которое замедляет или останавливает судорожное расстройство, тем, что при использовании метода индукции регресса не только прекращается прогрессирование судорожного расстройства, но и поведение клеток в некоторой степени приближается к нормальному состоянию, которое наблюдалось бы при отсутствии судорожного расстройства. В некоторых вариантах осуществления лечение судорожного расстройства, включающее совместное введение Соединения А с ASM, сопровождается изменением клеточной активности одного или нескольких калиевых каналов Kv7 (например, Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4 и/или Kv7.5, в частности, Kv7.2 и/или Kv7.3, при необходимости по сравнению с Kv7.1) к нормальному уровню, который наблюдался бы при отсутствии судорожного расстройства.

«После приема пищи» относится к состоянию после употребления пищи в течение периода времени примерно от 4 часов до перорального введения эффективного количества (например, в пределах терапевтически эффективного диапазона доз) Соединения А до примерно 4 часов после введения Соединения А. Пища может быть твердой, жидкой или смесью твердой и жидкой пищи с достаточным объемом и содержанием жира, чтобы она не растворялась быстро и не абсорбировалась в желудке. В некоторых случаях пищей является прием пищи, такой как завтрак, обед, ужин или, в качестве альтернативы, детское питание (например, молочная смесь или грудное молоко). Терапевтически эффективное количество Соединения А может быть перорально введено субъекту, например, примерно от 30 минут до приема пищи до примерно спустя 2 часа после приема пищи, наиболее предпочтительно единицу дозы Соединения А вводят

перорально во время приема пищи или в течение 15 минут после приема пищи.

«Натощак» относится к состоянию, при котором не употреблялась пища в течение периода времени по меньшей мере от 4 часов до перорального введения терапевтически эффективного количества Соединения А до примерно 4 часов после введения Соединения А.

4.2. Варианты осуществления

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на способ лечения судорожного расстройства у нуждающегося в нем человека, включающий совместное введение (например, перорально) Соединения А и противосудорожного лекарственного средства (ASM) человеку в количествах, которые являются терапевтически эффективными при совместном введении. Аналогично, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на применение Соединения А и ASM в количествах, которые являются терапевтически эффективными при совместном введении, для лечения судорожного расстройства у человека, нуждающегося в этом. Совместное введение предполагает, что Соединение А может быть введено одновременно, до или после введения ASM. В некоторых случаях судорожное расстройство, лечение которого включает совместное введение Соединения А и ASM, является эпилепсией с фокальным началом.

В дальнейших вариантах осуществления, когда лечат судорожное расстройство, то судорожное расстройство выбирают из эпилепсии с фокальным началом, светочувствительной эпилепсии, самопроизвольного обморока, фармакорезистентной эпилепсии, синдрома Ангельмана, доброкачественной роландической эпилепсии, расстройства CDKL5, детской и юношеской абсансной эпилепсии, синдрома Драве, лобно-долевой эпилепсии, синдрома дефицита Glut1, гамартумы гипоталамуса, инфантильных спазмов/синдрома Веста, ювенильной миоклонической эпилепсии, синдрома Ландау-Клеффнера, синдрома Леннокса-Гасто (ЛГС), эпилепсии с миоклоническими абсансами, синдрома Отахара, синдрома Панайотопулоса, эпилепсии PCDH19, прогрессирующих миоклонических эпилепсий, синдрома Расмуссена, синдрома кольцевой хромосомы 20, рефлекторных эпилепсий, височно-долевой эпилепсии, прогрессирующей миоклонус-эпилепсии Лафоры, нейрокутанных синдромов, комплексного туберозного склероза, ранней детской эпилептической энцефалопатии, эпилептической энцефалопатии с ранним началом, генерализованной эпилепсии с фебрильными приступами+, синдрома Ретта, рассеянного склероза, болезни Альцгеймера, аутизма, атаксии, гипотонии и пароксизмальной дискинезии. В некоторых вариантах осуществления судорожным расстройством является эпилепсия с фокальным началом,

также известная как парциальная (фокальная) эпилепсия.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на способ уменьшения количества ASM, которое требуется для терапевтической эффективности у человека, страдающего судорожным расстройством, включающий введение (например, перорально) человеку совместно с ASM количества Соединения А, которое является эффективным для достижения такого снижения при одновременном применении с ASM. Аналогично, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на применение Соединения А для уменьшения количества ASM, которое требуется для терапевтической эффективности у человека, страдающего судорожным расстройством, например, путем введения человеку совместно с ASM количества Соединения А, которое является эффективным для достижения такого снижения при одновременном применении с ASM. Например, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения судорожного расстройства у субъекта (например, человека), нуждающегося в этом, включающий совместное введение (например, перорально) Соединения А и ASM, при этом количество вводимого ASM меньше количества ASM, которое необходимо для достижения такого же или аналогичного уменьшения количества эпизодов судорог или уменьшения тяжести эпизодов судорог при отсутствии введения Соединения А. В некоторых вариантах осуществления ASM представляет собой вальпроевую кислоту, леветирацетам, фенитоин, лакосамид, ценобамат или их комбинацию, в частности, вальпроевую кислоту.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на способ уменьшения количества Соединения А, которое требуется для терапевтической эффективности у человека, страдающего судорожным расстройством, включающий введение (например, перорально) человеку совместно с Соединением А количества ASM, которое является эффективным для достижения такого снижения при введении с Соединением А. Аналогично, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на использование ASM для уменьшения количества Соединения А, которое требуется для терапевтической эффективности у человека, страдающего судорожным расстройством, например, путем введения человеку совместно с Соединением А количества ASM, которое является эффективным для достижения такого снижения при введении Соединения А. Например, в некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ лечения судорожного расстройства у субъекта (например, человека), нуждающегося в этом, включающий совместное введение (например, перорально) Соединения А и ASM, при этом количество вводимого Соединения А меньше количества Соединения А, которое необходимо для достижения

такого же или аналогичного сокращения числа эпизодов судорожных приступов или уменьшения тяжести эпизодов судорожных приступов при отсутствии введения ASM. В некоторых вариантах осуществления ASM представляет собой вальпроевую кислоту, леветирацетам, фенитоин, лакосамид, ценобамат или их комбинацию, в частности фенитоин.

В некоторых вариантах осуществления описанные здесь способы и применения для лечения судорог у нуждающегося в этом человека, уменьшения количества ASM, необходимого для терапевтической эффективности, или уменьшения количества Соединения А, необходимого для терапевтической эффективности, включают усиление открытия калиевого канала Kv7 в организме человека.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способ или применение, включающее открытие или усиление открытия калиевого канала Kv7, такого как калиевый канал Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4 и/или Kv7.5, в частности, калиевый канал Kv7.2/Kv7.3 (KCNQ2/3) у человека, нуждающегося в этом, путем введения эффективного количества Соединения А совместно с ASM. В некоторых таких вариантах осуществления у человека наблюдается судорожное расстройство, подобное описанному в настоящей заявке.

В определенных случаях способ или применение, описанные в настоящей заявке, включают селективное открытие или усиление открытия калиевого канала Kv7, такого как один или несколько из Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4 или Kv7.5 по сравнению с Kv7.1. В некоторых вариантах осуществления способ или применение является селективным для Kv7.2, по сравнению с Kv7.1. В других вариантах осуществления способ или применение является селективным для Kv7.3 по сравнению с Kv7.1. В еще одних вариантах осуществления способ или применение является селективным для Kv7.4 по сравнению с Kv7.1. В еще одних вариантах осуществления способ или применение является селективным для Kv7.5, но не для Kv7.1. В некоторых вариантах осуществления способ или применение является селективным для Kv7.2 и Kv7.3 по сравнению с Kv7.1. В некоторых вариантах осуществления способ или применение является селективным для Kv7.2 и Kv7.3 по сравнению с другими калиевыми каналами Kv7. В некоторых вариантах осуществления способ или применение является селективным для Kv7.2 и Kv7.3 по сравнению с Kv7.4 и Kv7.5.

В одном варианте осуществления способы и применения, описанные в настоящей заявке, такие как способ или применение при лечении судорожного расстройства у человека, нуждающегося в этом, обеспечивают путем введения (например, перорально) количества Соединения А совместно с ASM, например, приблизительно от 0,01 мг/кг до

приблизительно 2,0 мг/кг Соединения А. Более конкретные типичные количества Соединения А включают 0,05 мг/кг, 0,10 мг/кг, 0,20 мг/кг, 0,30 мг/кг, 0,40 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,6 мг/кг, 0,7 мг/кг, 0,80 мг/кг, 0,90 мг/кг, 1,0 мг/кг, 1,1 мг/кг, 1,2 мг/кг, 1,3 мг/кг, 1,4 мг/кг, 1,5 мг/кг, 1,6 мг/кг, 1,7 мг/кг, 1,8 мг/кг, 1,9 мг/кг и 2,0 мг/кг, или любой диапазон количеств, создаваемых с применением двух из вышеупомянутых количеств в качестве конечных точек. В некоторых аспектах способ или применение включает введение (например, перорально) 0,03-1,0 мг/кг Соединения А совместно с указанным количеством ASM. В некоторых аспектах способ включает введение (например, перорально) 0,05-0,5 мг/кг Соединения А совместно с указанным количеством ASM.

В некоторых вариантах осуществления способы и применения, описанные в настоящей заявке, такие как способ или применение при лечении судорожного расстройства у человека, нуждающегося в этом, обеспечивают путем введения (например, перорально) количества Соединения А совместно с ASM, такого как от 2 до 200 мг Соединения А в однократных или разделенных дозах. Например, способ может включать введение Соединения А (например, перорально), в однократных или разделенных дозах, примерно 2 мг, примерно 3 мг, примерно 4 мг, примерно 5 мг, примерно 6 мг, примерно 7 мг, примерно 8 мг, примерно 9 мг, примерно 10 мг, примерно 11 мг, примерно 12 мг, примерно 13 мг, примерно 14 мг, примерно 15 мг, примерно 16 мг, примерно 17 мг, примерно 18 мг, примерно 19 мг, примерно 20 мг, примерно 21 мг, примерно 22 мг, примерно 23 мг, примерно 24 мг, примерно 25 мг, примерно 26 мг, примерно 27 мг, примерно 29 мг, примерно 30 мг, примерно 31 мг, примерно 32 мг, примерно 33 мг, примерно 34 мг, примерно 35 мг, примерно 36 мг, примерно 37 мг, примерно 38 мг, примерно 39 мг, примерно 40 мг, примерно 41 мг, примерно 42 мг, примерно 43 мг, примерно 44 мг, примерно 45 мг, примерно 46 мг, примерно 47 мг, примерно 48 мг, примерно 49 мг, примерно 50 мг, примерно 51 мг, примерно 52 мг, примерно 53 мг, примерно 54 мг, примерно 55 мг, примерно 56 мг, примерно 57 мг, примерно 58 мг, примерно 59 мг, примерно 60 мг, примерно 61 мг, примерно 62 мг, примерно 63 мг, примерно 64 мг, примерно 65 мг, примерно 66 мг, примерно 67 мг, примерно 68 мг, примерно 69 мг, примерно 70 мг, примерно 71 мг, примерно 72 мг, примерно 73 мг, примерно 74 мг, примерно 75 мг, примерно 76 мг, примерно 77 мг, примерно 78 мг, примерно 79 мг, примерно 80 мг, примерно 81 мг, примерно 82 мг, примерно 83 мг, примерно 84 мг, примерно 85 мг, примерно 86 мг, примерно 87 мг, примерно 88 мг, примерно 89 мг, примерно 90 мг, примерно 91 мг, примерно 92 мг, примерно 93 мг, примерно 94 мг, примерно 95 мг, примерно 96 мг, примерно 97 мг, примерно 98 мг, примерно 99 мг, примерно 100 мг, примерно 101 мг, примерно 102 мг, примерно 103 мг,

примерно 104 мг, примерно 105 мг, примерно 106 мг, примерно 107 мг, примерно 108 мг, примерно 109 мг, примерно 110 мг, примерно 111 мг, примерно 112 мг, примерно 113 мг, примерно 114 мг, примерно 115 мг, примерно 116 мг, примерно 117 мг, примерно 118 мг, примерно 119 мг, примерно 120 мг, примерно 121 мг, примерно 122 мг, примерно 123 мг, примерно 124 мг, примерно 125 мг, примерно 126 мг, примерно 127 мг, примерно 129 мг, примерно 130 мг, примерно 131 мг, примерно 132 мг, примерно 133 мг, примерно 134 мг, примерно 135 мг, примерно 136 мг, примерно 137 мг, примерно 138 мг, примерно 139 мг, примерно 140 мг, примерно 141 мг, примерно 142 мг, примерно 143 мг, примерно 144 мг, примерно 145 мг, примерно 146 мг, примерно 147 мг, примерно 148 мг, примерно 149 мг, примерно 150 мг, примерно 151 мг, примерно 152 мг, примерно 153 мг, примерно 154 мг, примерно 155 мг, примерно 156 мг, примерно 157 мг, примерно 158 мг, примерно 159 мг, примерно 160 мг, примерно 161 мг, примерно 162 мг, примерно 163 мг, примерно 164 мг, примерно 165 мг, примерно 166 мг, примерно 167 мг, примерно 168 мг, примерно 169 мг, примерно 170 мг, примерно 171 мг, примерно 172 мг, примерно 173 мг, примерно 174 мг, примерно 175 мг, примерно 176 мг, примерно 177 мг, примерно 178 мг, примерно 179 мг, примерно 180 мг, примерно 181 мг, примерно 182 мг, примерно 183 мг, примерно 184 мг, примерно 185 мг, примерно 186 мг, примерно 187 мг, примерно 188 мг, примерно 189 мг, примерно 190 мг, примерно 191 мг, примерно 192 мг, примерно 193 мг, примерно 194 мг, примерно 195 мг, примерно 196 мг, примерно 197 мг, примерно 198 мг, примерно 199 мг или примерно 200 мг, или введение (например, перорально) любого диапазона количеств, созданного с использованием двух из вышеупомянутых количеств в качестве конечных точек. В некоторых аспектах способ или применение включает пероральное введение от 2 до 100 или от 5 до 50 мг Соединения А в однократных или разделенных дозах совместно с указанным количеством ASM. В некоторых аспектах способ или применение включает пероральное введение однократной или разделенной дозы 5, 10, 15, 20 или 25 мг Соединения А совместно с указанным количеством ASM. В некоторых аспектах способ или применение включает пероральное введение однократной или разделенной дозы 20 мг Соединения А совместно с указанным количеством ASM.

В некоторых аспектах способы и применения, описанные в настоящей заявке, такие как способ или применение при лечении судорожного расстройства у человека, нуждающегося в этом, обеспечивают путем введения (например, перорально) по меньшей мере 10 мг Соединения А, такого как по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 75 или 100 мг Соединения А совместно с указанным количеством ASM. В некоторых вариантах осуществления способы и применения, описанные в настоящей заявке, такие как способ или применение при лечении судорожного расстройства у человека, нуждающегося в

этом, обеспечивают путем введения (например, перорально) по меньшей мере 50 мг Соединения А, такого как по меньшей мере 75, 100, 125, 150, 175, или 200 мг Соединения А совместно с указанным количеством ASM.

В некоторых вариантах осуществления способы и применения, описанные в настоящей заявке, такие как способ или применение при лечении судорожного расстройства у человека, нуждающегося в этом, обеспечивают путем введения (например, перорально) количества Соединения А в сутки, такого как от 5 до 1000 мг Соединения А в сутки, например, от 5 до 500 мг или от 5 до 250 мг Соединения А в сутки совместно с ASM. Например, способ или применение может включать введение (например, перорально) примерно 5 мг, примерно 10 мг, примерно 15 мг, примерно 20 мг, примерно 25 мг, примерно 30 мг, примерно 35 мг, примерно 40 мг, примерно 45 мг, примерно 50 мг, примерно 55 мг, примерно 60 мг, примерно 65 мг, примерно 70 мг, примерно 75 мг, примерно 80 мг, примерно 85 мг, примерно 90 мг, примерно 95 мг, примерно 100 мг, примерно 105 мг, примерно 110 мг, примерно 115 мг, примерно 120 мг, примерно 125 мг, примерно 130 мг, примерно 135 мг, примерно 140 мг, примерно 145 мг, примерно 150 мг, примерно 155 мг, примерно 160 мг, примерно 165 мг, примерно 170 мг, примерно 175 мг, примерно 180 мг, примерно 185 мг, примерно 190 мг, примерно 195 мг, примерно 200 мг, примерно 205 мг, примерно 210 мг, примерно 215 мг, примерно 220 мг, примерно 225 мг, примерно 230 мг, примерно 235 мг, примерно 240 мг, примерно 245 мг, примерно 250 мг, примерно 255 мг, примерно 260 мг, примерно 265 мг, примерно 270 мг, примерно 275 мг, примерно 280 мг, примерно 285 мг, примерно 290 мг, примерно 295 мг, примерно 300 мг, примерно 305 мг, примерно 310 мг, примерно 315 мг, примерно 320 мг, примерно 325 мг, примерно 330 мг, примерно 335 мг, примерно 340 мг, примерно 345 мг, примерно 350 мг, примерно 355 мг, примерно 360 мг, примерно 365 мг, примерно 370 мг, примерно 375 мг, примерно 380 мг, примерно 385 мг, примерно 390 мг, примерно 395 мг, примерно 400 мг, примерно 405 мг, примерно 410 мг, примерно 415 мг, примерно 420 мг, примерно 425 мг, примерно 430 мг, примерно 435 мг, примерно 440 мг, примерно 445 мг, примерно 450 мг, примерно 455 мг, примерно 460 мг, примерно 465 мг, примерно 470 мг, примерно 475 мг, примерно 480 мг, примерно 485 мг, примерно 490 мг, примерно 495 мг, примерно 500 мг или примерно 1000 мг Соединения А в сутки или введение (например, перорально) в сутки в диапазоне количеств, получаемых при использовании двух из вышеупомянутых количеств в качестве конечных точек. В некоторых аспектах способ или применение включает пероральное введение от 5 до 250 мг Соединения А в сутки, такого как 10, 15, 20, 25, 30, 35, или 40 мг до 75, 100, 125, 150, 175, или 200 мг Соединения А в сутки, включая от 20 до 150 мг в сутки совместно с указанным количеством ASM. В некоторых

аспектах пероральное введение включает 50, 75, 100 или 125 мг Соединения А в сутки, например, 100 мг в сутки совместно с указанным количеством ASM.

В некоторых случаях вышеуказанные суточные дозы Соединения А вводят (например, перорально) в виде многократных доз в сутки, таких как две, три, четыре или пять доз в сутки. Например, суточная доза 100 мг может быть введена пятью дозами по 20 мг, четырьмя дозами по 25 мг, тремя дозами по 33,3 мг или двумя дозами по 50 мг в течение дня совместно с указанным количеством ASM.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанные суточные дозы Соединения А вводят (например, перорально) в виде однократной дозы Соединения А или в виде однократной дозы Соединения А совместно с однократной дозой ASM. Например, приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, или от 30 мг до примерно 50, 65, 75, 100, 125, или 150 мг Соединения А в сутки можно вводить перорально в виде разовой дозы, включая 10-25 мг, 10-30 мг и 10-40 мг в сутки в виде однократной дозы, например, 10-25 мг в сутки в качестве однократной дозы. Соответственно, любая из доз Соединения А, рассмотренных в предыдущих параграфах, может быть включена в однодозовую лекарственную форму.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанные дозы Соединения А вводят (например, перорально) в виде многократных доз в неделю, таких как две, три, четыре, пять, десять, пятнадцать или двадцать доз в неделю. Например, недельная доза в 100 мг может быть введена пятью дозами по 20 мг, четырьмя дозами по 25 мг или двумя дозами по 50 мг в течение недели совместно с указанным количеством ASM.

В некоторых вариантах осуществления способы и применения, описанные в настоящей заявке, при использовании суточной дозы, раскрытой в настоящей заявке, достигают равновесного состояния Соединения А в течение 6-9 дней, например, приблизительно за 1 неделю.

В некоторых вариантах осуществления способы и применения, описанные в настоящей заявке, такие как способ или применение при лечении судорожного расстройства у человека, нуждающегося в этом, обеспечивают путем введения (например, перорально) количества ASM совместно с Соединением А, например, приблизительно от 0,01 мг/кг до примерно 2,0 мг/кг ASM. Более конкретные типичные количества ASM включают 0,05 мг/кг, 0,10 мг/кг, 0,20 мг/кг, 0,30 мг/кг, 0,40 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,6 мг/кг, 0,7 мг/кг, 0,80 мг/кг, 0,90 мг/кг, 1,0 мг/кг, 1,1 мг/кг, 1,2 мг/кг, 1,3 мг/кг, 1,4 мг/кг, 1,5 мг/кг, 1,6 мг/кг, 1,7 мг/кг, 1,8 мг/кг, 1,9 мг/кг и 2,0 мг/кг, или любой диапазон количеств, полученных с использованием двух из вышеупомянутых количеств в качестве конечных точек. В некоторых аспектах способ или применение включает введение (например, перорально) 0,03-1,0 мг/кг ASM совместно с Соединением А. В некоторых аспектах

способ включает введение (например, перорально) 0,05-0,5 мг/кг ASM совместно с Соединением А.

В некоторых вариантах осуществления способы и применения, описанные в настоящей заявке, такие как способ или применение при лечении судорожного расстройства у человека, нуждающегося в этом, обеспечивают путем введения (например, перорально) количества ASM совместно с Соединением А, такого как от 2 до 200 мг ASM ASM в однократных или разделенных дозах. Например, способ может включать введение ASM (например, перорально), в однократных или разделенных дозах, примерно 2 мг, примерно 3 мг, примерно 4 мг, примерно 5 мг, примерно 6 мг, примерно 7 мг, примерно 8 мг, примерно 9 мг, примерно 10 мг, примерно 11 мг, примерно 12 мг, примерно 13 мг, примерно 14 мг, примерно 15 мг, примерно 16 мг, примерно 17 мг, примерно 18 мг, примерно 19 мг, примерно 20 мг, примерно 21 мг, примерно 22 мг, примерно 23 мг, примерно 24 мг, примерно 25 мг, примерно 26 мг, примерно 27 мг, примерно 29 мг, примерно 30 мг, примерно 31 мг, примерно 32 мг, примерно 33 мг, примерно 34 мг, примерно 35 мг, примерно 36 мг, примерно 37 мг, примерно 38 мг, примерно 39 мг, примерно 40 мг, примерно 41 мг, примерно 42 мг, примерно 43 мг, примерно 44 мг, примерно 45 мг, примерно 46 мг, примерно 47 мг, примерно 48 мг, примерно 49 мг, примерно 50 мг, примерно 51 мг, примерно 52 мг, примерно 53 мг, примерно 54 мг, примерно 55 мг, примерно 56 мг, примерно 57 мг, примерно 58 мг, примерно 59 мг, примерно 60 мг, примерно 61 мг, примерно 62 мг, примерно 63 мг, примерно 64 мг, примерно 65 мг, примерно 66 мг, примерно 67 мг, примерно 68 мг, примерно 69 мг, примерно 70 мг, примерно 71 мг, примерно 72 мг, примерно 73 мг, примерно 74 мг, примерно 75 мг, примерно 76 мг, примерно 77 мг, примерно 78 мг, примерно 79 мг, примерно 80 мг, примерно 81 мг, примерно 82 мг, примерно 83 мг, примерно 84 мг, примерно 85 мг, примерно 86 мг, примерно 87 мг, примерно 88 мг, примерно 89 мг, примерно 90 мг, примерно 91 мг, примерно 92 мг, примерно 93 мг, примерно 94 мг, примерно 95 мг, примерно 96 мг, примерно 97 мг, примерно 98 мг, примерно 99 мг, примерно 100 мг, примерно 101 мг, примерно 102 мг, примерно 103 мг, примерно 104 мг, примерно 105 мг, примерно 106 мг, примерно 107 мг, примерно 108 мг, примерно 109 мг, примерно 110 мг, примерно 111 мг, примерно 112 мг, примерно 113 мг, примерно 114 мг, примерно 115 мг, примерно 116 мг, примерно 117 мг, примерно 118 мг, примерно 119 мг, примерно 120 мг, примерно 121 мг, примерно 122 мг, примерно 123 мг, примерно 124 мг, примерно 125 мг, примерно 126 мг, примерно 127 мг, примерно 129 мг, примерно 130 мг, примерно 131 мг, примерно 132 мг, примерно 133 мг, примерно 134 мг, примерно 135 мг, примерно 136 мг, примерно 137 мг, примерно 138 мг, примерно 139 мг, примерно 140 мг,

примерно 141 мг, примерно 142 мг, примерно 143 мг, примерно 144 мг, примерно 145 мг, примерно 146 мг, примерно 147 мг, примерно 148 мг, примерно 149 мг, примерно 150 мг, примерно 151 мг, примерно 152 мг, примерно 153 мг, примерно 154 мг, примерно 155 мг, примерно 156 мг, примерно 157 мг, примерно 158 мг, примерно 159 мг, примерно 160 мг, примерно 161 мг, примерно 162 мг, примерно 163 мг, примерно 164 мг, примерно 165 мг, примерно 166 мг, примерно 167 мг, примерно 168 мг, примерно 169 мг, примерно 170 мг, примерно 171 мг, примерно 172 мг, примерно 173 мг, примерно 174 мг, примерно 175 мг, примерно 176 мг, примерно 177 мг, примерно 178 мг, примерно 179 мг, примерно 180 мг, примерно 181 мг, примерно 182 мг, примерно 183 мг, примерно 184 мг, примерно 185 мг, примерно 186 мг, примерно 187 мг, примерно 188 мг, примерно 189 мг, примерно 190 мг, примерно 191 мг, примерно 192 мг, примерно 193 мг, примерно 194 мг, примерно 195 мг, примерно 196 мг, примерно 197 мг, примерно 198 мг, примерно 199 мг или примерно 200 мг, или введение (например, перорально) любого диапазона количеств, созданного с использованием двух из вышеупомянутых количеств в качестве конечных точек. В некоторых аспектах способ или применение включает пероральное введение от 2 до 100 или от 5 до 50 мг ASM в однократных или разделенных дозах совместно с Соединением А. В некоторых аспектах способ или применение включает пероральное введение однократной или разделенной дозы 5, 10, 15, 20 или 25 мг ASM совместно с Соединением А. В некоторых аспектах способ или применение включает пероральное введение однократной или разделенной дозы 20 мг ASM совместно с указанным количеством Соединения А.

В некоторых аспектах способы и применения, описанные в настоящей заявке, такие как способ или применение при лечении судорожного расстройства у человека, нуждающегося в этом, обеспечивают путем введения (например, перорально) по меньшей мере 10 мг ASM, такого как по меньшей мере 20, 30, 40, 50, 75 или 100 мг ASM совместно с Соединением А. В некоторых вариантах осуществления способы и применения, описанные в настоящей заявке, такие как способ или применение при лечении судорожного расстройства у человека, нуждающегося в этом, обеспечивают путем введения (например, перорально) по меньшей мере 50 мг ASM, такого как по меньшей мере 75, 100, 125, 150, 175, или 200 мг ASM совместно с Соединением А.

В некоторых вариантах осуществления способы и применения, описанные в настоящей заявке, такие как способ или применение при лечении судорожного расстройства у человека, нуждающегося в этом, обеспечивают путем введения (например, перорально) количества ASM в сутки, такого как от 5 до 1000 мг ASM в сутки, например, от 5 до 500 мг или от 5 до 250 мг ASM в сутки совместно с Соединением А. Например,

способ или применение может включать введение (например, перорально) примерно 5 мг, примерно 10 мг, примерно 15 мг, примерно 20 мг, примерно 25 мг, примерно 30 мг, примерно 35 мг, примерно 40 мг, примерно 45 мг, примерно 50 мг, примерно 55 мг, примерно 60 мг, примерно 65 мг, примерно 70 мг, примерно 75 мг, примерно 80 мг, примерно 85 мг, примерно 90 мг, примерно 95 мг, примерно 100 мг, примерно 105 мг, примерно 110 мг, примерно 115 мг, примерно 120 мг, примерно 125 мг, примерно 130 мг, примерно 135 мг, примерно 140 мг, примерно 145 мг, примерно 150 мг, примерно 155 мг, примерно 160 мг, примерно 165 мг, примерно 170 мг, примерно 175 мг, примерно 180 мг, примерно 185 мг, примерно 190 мг, примерно 195 мг, примерно 200 мг, примерно 205 мг, примерно 210 мг, примерно 215 мг, примерно 220 мг, примерно 225 мг, примерно 230 мг, примерно 235 мг, примерно 240 мг, примерно 245 мг, примерно 250 мг, примерно 255 мг, примерно 260 мг, примерно 265 мг, примерно 270 мг, примерно 275 мг, примерно 280 мг, примерно 285 мг, примерно 290 мг, примерно 295 мг, примерно 300 мг, примерно 305 мг, примерно 310 мг, примерно 315 мг, примерно 320 мг, примерно 325 мг, примерно 330 мг, примерно 335 мг, примерно 340 мг, примерно 345 мг, примерно 350 мг, примерно 355 мг, примерно 360 мг, примерно 365 мг, примерно 370 мг, примерно 375 мг, примерно 380 мг, примерно 385 мг, примерно 390 мг, примерно 395 мг, примерно 400 мг, примерно 405 мг, примерно 410 мг, примерно 415 мг, примерно 420 мг, примерно 425 мг, примерно 430 мг, примерно 435 мг, примерно 440 мг, примерно 445 мг, примерно 450 мг, примерно 455 мг, примерно 460 мг, примерно 465 мг, примерно 470 мг, примерно 475 мг, примерно 480 мг, примерно 485 мг, примерно 490 мг, примерно 495 мг, примерно 500 мг или примерно 1000 мг ASM в сутки, или введение (например, перорально) в сутки в диапазоне количеств, полученных путем использования двух из вышеупомянутых количеств в качестве конечных точек. В некоторых аспектах способ или применение включает пероральное введение от 5 до 250 мг ASM в сутки, например, от 10, 15, 20, 25, 30, 35, или 40 мг до 75, 100, 125, 150, 175, или 200 мг ASM в сутки, включая от 20 до 150 мг в сутки совместно с Соединением А. В некоторых аспектах пероральное введение включает 50, 75, 100 или 125 мг ASM в сутки, например, 100 мг в сутки совместно с Соединением А.

В некоторых случаях вышеуказанные суточные дозы ASM вводят (например, перорально) в виде многократных доз в сутки, таких как две, три, четыре или пять доз в сутки. Например, суточная доза 100 мг может быть введена пятью дозами по 20 мг, четырьмя по 25 мг, тремя по 33,3 мг или двумя по 50 мг в течение дня совместно с Соединением А.

В некоторых вариантах осуществления вышеуказанные суточные дозы ASM вводят (например, перорально) в виде однократной дозы совместно с Соединением А. Например,

приблизительно от 5, 10, 15, 20, 25, или 30 мг до примерно 50, 65, 75, 100, 125, или 150 мг ASM в сутки может быть введено перорально в виде однократной дозы, включая 10-25 мг, 10-30 мг и 10-40 мг в сутки в виде однократной дозы, такой как 10-25 мг в сутки в виде однократной дозы совместно с Соединением А. Соответственно, любая из доз ASM, рассмотренных в предыдущих параграфах, может быть включена в однократной лекарственной форме.

В некоторых вариантах осуществления настоящих способов и применений, описанных в настоящей заявке, ASM, который вводят совместно с Соединением А, представляет собой один или несколько бензодиазепинов (например, хлоразепат, клобазам, клоназепам, диазепам, лоразепам, нитразепам и т.д.), карбамазепин, ценобамат, фелбамат, габапентин, лакосамид, ламотриджин, леветирацетам, окскарбазепин, фенобарбитал, фенитоин, прегабалин, руфинамид, тиагабин, топирамат, вальпроевую кислоту, вигабатрин или зонисамид. В некоторых вариантах осуществления ASM, вводимый совместно с соединением А, представляет собой вальпроевую кислоту, леветирацетам, фенитоин, лакосамид, ценобамат или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления настоящих способов и применений, описанных в настоящей заявке, ASM лечит судорожное расстройство, указанное в патенте, не усиливая открытие калиевого канала Kv7 у человека (например, лечит судорожное расстройство в патенте с помощью механизма, отличного от Соединения А). В некоторых вариантах осуществления ASM уменьшает возбуждение нейронов, блокируя натриевый канал в организме человека. ASM, которые, как известно, являются блокаторами натриевых каналов, включают, например, карбамазепин, лакосамид, ламотриджин, окскарбазепин, фенитоин, руфинамид, топирамат и зонисамид. В некоторых вариантах осуществления блокатор натриевых каналов ингибирует возбуждение и передачу потенциала действия нейронов, способствуя инактивации и уменьшая вклад в электрическую активность в начальном сегменте аксона (AIS), а также в самом аксоне.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на способ лечения судорожного расстройства у нуждающегося в этом человека, включающий совместное введение (например, перорально) Соединения А и карбамазепина человеку в количествах, которые являются терапевтически эффективными при совместном введении.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на способ лечения судорожного расстройства у нуждающегося в этом человека, включающий совместное введение (например, перорально) Соединения А и лакосамида

человеку в количествах, которые являются терапевтически эффективными при совместном введении.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на способ лечения судорожного расстройства у нуждающегося в этом человека, включающий совместное введение (например, перорально) Соединения А и ламотриджина человеку в количествах, которые являются терапевтически эффективными при совместном введении.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на способ лечения судорожного расстройства у нуждающегося в этом человека, включающий совместное введение (например, перорально) Соединения А и окскарбазепина человеку в количествах, которые являются терапевтически эффективными при совместном введении.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на способ лечения судорожного расстройства у нуждающегося в этом человека, включающий совместное введение (например, перорально) Соединения А и фенитоина человеку в количествах, которые являются терапевтически эффективными при совместном введении.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на способ лечения судорожного расстройства у нуждающегося в этом человека, включающий совместное введение (например, перорально) Соединения А и руфинамида человеку в количествах, которые являются терапевтически эффективными при совместном введении.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на способ лечения судорожного расстройства у нуждающегося в этом человека, включающий совместное введение (например, перорально) Соединения А и топирамата человеку в количествах, которые являются терапевтически эффективными при совместном введении.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на способ лечения судорожного расстройства у нуждающегося в этом человека, включающий совместное введение (например, перорально) Соединения А и зонисамида человеку в количествах, которые являются терапевтически эффективными при совместном введении.

В некоторых вариантах осуществления настоящих способов и применений, описанных в настоящей заявке, ASM уменьшает возбуждение нейронов путем блокирования кальциевого канала у человека. ASM, которые, как известно, являются

блокаторами кальциевых каналов, включают, например, габапентин, фенobarбитал, прегаблин и зонисамид. В некоторых вариантах осуществления блокатор кальциевых каналов уменьшает передачу возбуждения за счет уменьшения пресинаптического высвобождения нейромедиатора, процесса, зависящего от кальция.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на способ лечения судорожного расстройства у нуждающегося в этом человека, включающий совместное введение (например, перорально) Соединения А и габапентина человеку в количествах, которые являются терапевтически эффективными при совместном введении.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на способ лечения судорожного расстройства у нуждающегося в этом человека, включающий совместное введение (например, перорально) Соединения А и фенobarбитала человеку в количествах, которые являются терапевтически эффективными при совместном введении.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на способ лечения судорожного расстройства у нуждающегося в этом человека, включающий совместное введение (например, перорально) Соединения А и прегаблина человеку в количествах, которые являются терапевтически эффективными при совместном введении.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на способ лечения судорожного расстройства у нуждающегося в этом человека, включающий совместное введение (например, перорально) Соединения А и габапентина человеку в количествах, которые являются терапевтически эффективными при совместном введении.

В некоторых вариантах осуществления настоящих способов и применений, описанных в настоящей заявке, ASM уменьшает возбуждение нейронов путем связывания с гликопротеином 2А синаптических везикул (SV2А) у человека. ASM, которые, как известно, связываются с SV2А, включают, например, леветирacetам. В некоторых вариантах осуществления агент, связывающий SV2А, уменьшает передачу возбуждения за счет уменьшения высвобождения пресинаптического нейромедиатора.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на способ лечения судорожного расстройства у нуждающегося в этом человека, включающий совместное введение (например, перорально) Соединения А и леветирacetам человека в количествах, которые являются терапевтически эффективными при совместном введении.

В некоторых вариантах осуществления настоящих способов и применений, описанных в настоящей заявке, ASM усиливает нейрональное торможение у человека. ASM, которые, как известно, усиливают нейрональное торможение, включают, например, бензодиазепины (например, хлоразепат, клобазам, клоназепам, диазепам, лоразепам, нитразепам и т.д.), фелбамат, фенобарбитал, тиагабин, топирамат, вальпроевую кислоту и вигабатрин. В некоторых вариантах осуществления ASM является глутаматергическим агентом. В некоторых аспектах глутаматергический агент уменьшает воздействие этого нейромедиатора на рецепторы AMPA или NMDA на постсинаптической мембране. В некоторых вариантах осуществления глутаматергическим агентом является карбамазепин, фелбамат, ламотриджин, прегабалин, фенитоин, прегабалин, тиагабин или топирамат. В других вариантах ASM является ГАМКергическим агентом. В некоторых аспектах ГАМКергическим агентом является бензодиазепин (например, хлоразепат, клобазам, клоназепам, диазепам, лоразепам, нитразепам и т.д.), фелбамат, фенобарбитал, тиагабин, топирамат, вальпроевая кислота или вигабатрин. В некоторых случаях ГАМКергический агент может воздействовать на ГАМК-рецепторы путем прямой положительной аллостерической модуляции активности ГАМК-рецепторов (например, бензодиазепины). В других случаях ГАМКергический агент может воздействовать на ГАМК-рецепторы путем косвенного повышения уровня ГАМК посредством ингибирования ГАМК-трансаминазы (например, вигабатрин) или ГАМК-транспортера-1 (GAT1, например, тиагабин).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на способ лечения судорожного расстройства у нуждающегося в этом человека, включающий совместное введение (например, перорально) Соединения А и бензодиазепа (например, хлоразепа, клобазама, клоназепама, диазепама, лоразепама, нитразепама и т.д.) человеку в количествах, которые терапевтически эффективны при совместном применении.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на способ лечения судорожного расстройства у нуждающегося в этом человека, включающий совместное введение (например, перорально) Соединения А и фелбамата человеку в количествах, которые являются терапевтически эффективными при совместном введении.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на способ лечения судорожного расстройства у нуждающегося в этом человека, включающий совместное введение (например, перорально) Соединения А и фенобарбитала человеку в количествах, которые являются терапевтически эффективными

при совместном введении.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на способ лечения судорожного расстройства у нуждающегося в этом человека, включающий совместное введение (например, перорально) Соединения А и тиагабина человеку в количествах, которые являются терапевтически эффективными при совместном введении.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на способ лечения судорожного расстройства у нуждающегося в этом человека, включающий совместное введение (например, перорально) Соединения А и топирамата человеку в количествах, которые являются терапевтически эффективными при совместном введении.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на способ лечения судорожного расстройства у нуждающегося в этом человека, включающий совместное введение (например, перорально) Соединения А и вальпроевой кислоты человеку в количествах, которые являются терапевтически эффективными при совместном введении.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение направлено на способ лечения судорожного расстройства у нуждающегося в этом человека, включающий совместное введение (например, перорально) Соединения А и вигабатрина человеку в количествах, которые являются терапевтически эффективными при совместном введении.

В некоторых вариантах осуществления настоящих способов и применений ASM, вводимый совместно с Соединением А, представляет собой вальпроевую кислоту. В некоторых аспектах вальпроевую кислоту вводят совместно с Соединением А в любой из доз ASM, рассмотренных в параграфах выше. В некоторых вариантах осуществления вальпроевую кислоту вводят человеку совместно с Соединением А в дозе 2-16 мг/кг, например, вальпроевую кислоту можно вводить человеку в дозе 4-12 мг/кг.

В некоторых вариантах осуществления настоящих способов и применений ASM, вводимый совместно с Соединением А, представляет собой фенитоин. В некоторых аспектах фенитоин вводят совместно с Соединением А в любой из доз ASM, рассмотренных в параграфах выше. В некоторых вариантах фенитоин вводят человеку совместно с Соединением А в дозе 0,05-5 мг/кг, например, фенитоин можно вводить (например, перорально) в дозе 0,1-1 мг/кг человеку.

В некоторых вариантах осуществления настоящих способов и применений ASM, вводимый совместно с Соединением А, представляет собой лакосамид. В некоторых аспектах лакосамид вводят совместно с Соединением А в любой из доз ASM,

рассмотренных в параграфах выше. В некоторых вариантах осуществления лакосамид вводят человеку совместно с Соединением А в дозе 0,1-5 мг/кг, например, лакосамид вводят (например, перорально) в дозе 0,5-1 мг/кг человеку.

В других вариантах осуществления настоящих способов и применений ASM, вводимый совместно с Соединением А, представляет собой ценобамат. В некоторых аспектах ценобамат вводят совместно с Соединением А в любой из доз ASM, рассмотренных в параграфах выше. В некоторых вариантах осуществления ценобамат вводят совместно с Соединением А в дозе 0,05-5 мг/кг человеку, например, ценобамат вводят (например, перорально) в дозе 0,1-1 мг/кг человеку.

В некоторых вариантах осуществления настоящих способов и применений совместное введение Соединения А и ASM (например, вальпроевой кислоты, фенитоина, леветирацетама, лакосамида или ценобамата) обеспечивает повышенную эффективность (например, усиливает сокращение числа эпизодов судорог или уменьшение тяжести эпизодов судорог у человека) по сравнению с введением Соединения А или ASM по отдельности. В некоторых таких вариантах осуществления совместное введение обеспечивает аддитивный эффект, который относится к сумме индивидуальных эффектов введения Соединения А и введения одного или нескольких ASM. В некоторых вариантах осуществления совместное введение обеспечивает синергетический эффект, где синергетический эффект относится к эффекту, который превышает сумму эффектов введения Соединения А и одного или нескольких ASM по отдельности.

В дополнительных вариантах осуществления рассмотренные выше способы и применения лечения судорожного расстройства путем введения (например, перорально) Соединения А включают введение Соединения А человеку в условиях приема пищи. В некоторых вариантах осуществления пероральное введение Соединения А человеку в условиях приема пищи (т.е. одновременно с приемом пищи или близко по времени от приема пищи) значительно повышает биодоступность и экспозицию Соединения А по сравнению с пероральным введением Соединения А человеку натощак (т.е. вне приема пищи или не близко по времени от приема пищи). В некоторых вариантах осуществления пероральное введение Соединения А человеку в условиях приема пищи увеличивает один или несколько фармакокинетических параметров Соединения А (например, C_{max} , AUC_{inf} , T_{max} , $t_{1/2\lambda_z}$ и т.д.) по сравнению с тем, когда такое же количество Соединения А перорально вводят человеку натощак.

В некоторых вариантах осуществления способы и применения, описанные в настоящей заявке, обеспечивают введение Соединения А, ASM, или и Соединения А, и ASM в форме фармацевтически приемлемой пероральной композиции, которая содержит

Соединение А, ASM или оба из Соединения А и ASM, в зависимости от обстоятельств, и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей или вспомогательных веществ. Количество (количества) Соединения А, ASM или обоих из Соединения А и ASM, включенных в эти композиции, может соответствовать одному или нескольким из количеств, описанных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления композиции представляют собой единичную дозу.

Примеры фармацевтически приемлемых композиций для перорального приема, которые содержат Соединение А, ASM или оба из Соединения А и ASM, включают твердые композиции (такие как таблетки, капсулы, пастилки, драже, гранулы, порошки, капсулы с покрытыми частицами, облатки, мультичастицы и пленки), жидкие композиции (такие как водные растворы, эликсиры, настойки, тоники, кашицы, суспензии и дисперсии) и аэрозольные композиции (такие как аэрозоли и спреи). В одном варианте фармацевтически приемлемая пероральная композиция Соединения А включает детскую суспензию или гранулят. Все указанные выше количества Соединения А, ASM или как Соединения А, так и ASM могут быть включены в такие композиции, например, в капсулу, содержащую 5, 10, 15, 10, 25, 30, или 35 мг Соединения А, в капсулу, содержащую 5, 10, 15, 10, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 75, 85, 90, 95, или 100 мг ASM, или в капсулу, содержащую 5, 10, 15, 10, 25, 30, или 35 мг Соединения А и 5, 10, 15, 10, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 75, 85, 90, 95, или 100 мг ASM.

Другие пути введения, подходящие для введения Соединения А, ASM или обоих из Соединения А и ASM в соответствии со способами и применениями, описанными в настоящей заявке, включают сублингвальный и буккальный (например, с пленкой или другой композицией, которая растворяется во рту под языком или на внутренней стороне щеки), глазной (например, глазные капли), ушной (например, ушные капли), пероральную или назальную ингаляцию (например, путем инсуффляции или распыления), кожное или местное (например, с помощью кремов или лосьонов) или трансдермальное введение (например, с помощью кожных пластырей). Помимо перорального введения, для Соединения А, ASM или обоих из Соединения А и ASM, могут быть использованы другие способы энтерального введения, включая вагинальное и ректальное (например, с помощью мази, суппозитория, клизмы).

Примеры композиций, подходящих для парентерального введения Соединения А, ASM или обоих из Соединения А и ASM, включают стерильные растворы, суспензии или дисперсии для инъекций, в том числе водные или маслянистые препараты, в частности водный раствор. В некоторых вариантах осуществления Соединение А, ASM или оба из Соединения А и ASM вводят в соответствии со способом или применением, описанными

в настоящей заявке, в стерильной водной композиции для инъекций, которая включает приемлемый для парентерального введения разбавитель или растворитель, такой как вода, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия, забуференные водные растворы, и водные растворы, содержащие смешиваемый спирт, такой как 1,3-бутандиол. Дополнительные подходящие вспомогательные вещества для парентеральных препаратов Соединения А, ASM или обоих из Соединения А и ASM включают моно- или диглицериды; жирные кислоты, такие как олеиновая кислота и ее глицеридные производные; натуральные фармацевтически приемлемые масла, такие как оливковое масло или касторовое масло, включая их полиоксиэтилированные варианты; разбавители или диспергаторы на основе спиртов с длинной цепью, такие как алкилцеллюлозы, включая карбоксиметилцеллюлозу; и поверхностно-активные вещества, такие как Твины, Спаны и другие эмульгирующие агенты или усилители биодоступности.

В другом варианте осуществления предусмотрены наборы для перорального введения Соединения А и ASM совместно для лечения депрессивного расстройства при пероральном введении. Такие наборы содержат множество пероральных дозированных форм Соединения А, ASM, или как Соединения А, так и ASM в дополнение к инструкциям по пероральному введению Соединения А и ASM совместно.

В настоящей заявке описаны дополнительные варианты осуществления и примеры настоящего изобретения. Эти варианты осуществления и примеры являются иллюстративными и не должны толковаться как ограничивающие объем заявленного изобретения.

4.3. Пронумерованные варианты осуществления

Вариант осуществления 1. Способ лечения судорожного расстройства у нуждающегося в этом человека, включающий совместное введение Соединения А и противосудорожного препарата (ASM) человеку в количествах, которые являются терапевтически эффективными при совместном введении; где Соединением А является N-[4-(6-фтор-3,4-дигидро-1H-изохинолин-2-ил)-2,6-диметилфенил]-3,3-диметилбутанамид.

Вариант осуществления 2. Способ снижения количества противосудорожного препарата (ASM), которое требуется для терапевтической эффективности у человека, страдающего судорожным расстройством, включающий введение человеку, совместно с ASM, количества Соединения А, которое эффективно для достижения такого снижения при введении вместе с ASM; причем Соединение А представляет собой N-[4-(6-фтор-3,4-дигидро-1H-изохинолин-2-ил)-2,6-диметилфенил]-3,3-диметилбутанамид.

Вариант осуществления 3. Способ снижения количества Соединения А, которое требуется для терапевтической эффективности у человека, страдающего судорожным

расстройством, включающий введение человеку, совместно с Соединением А, количества противосудорожного препарата (ASM), которое эффективно для достижения такого снижения при введении с Соединением А; причем Соединение А представляет собой N-[4-(6-фтор-3,4-дигидро-1Н-изохинолин-2-ил)-2,6-диметилфенил]-3,3-диметилбутанамид.

Вариант осуществления 4. Способ по любому из вариантов осуществления 1-3, который включает усиление открытия калиевого канала Kv7 у человека.

Вариант осуществления 5. Способ усиления открытия калиевого канала Kv7 у человека, включающий совместное введение Соединения А и противосудорожного препарата (ASM) человеку в количествах, которые являются терапевтически эффективными при совместном введении; где Соединением А является N-[4-(6-фтор-3,4-дигидро-1Н-изохинолин-2-ил)-2,6-диметилфенил]-3,3-диметилбутанамид; и в котором у человека имеется судорожное расстройство.

Вариант осуществления 6. Способ по варианту осуществления 4 или варианту осуществления 5, в котором калиевый канал Kv7 является одним или несколькими из Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4 или Kv7.5.

Вариант осуществления 7. Способ по варианту осуществления 6, где способ является избирательным для усиления открытия одного или нескольких из Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4 или Kv7.5 по сравнению с Kv7.1.

Вариант осуществления 8. Способ по варианту осуществления 4 или 5, который включает открытие калиевого канала Kv7.2/Kv7.3 (KCNQ2/3).

Вариант осуществления 9. Способ по любому из вариантов осуществления 1-8, в котором ASM представляет собой бензодиазепин, карбамазепин, ценобамат, фелбамат, габапентин, лакосамид, ламотриджин, леветирацетам, окскарбазепин, фенобарбитал, фенитоин, прегабалин, руфинамид, тиагабин, топирамат, вальпроевую кислоту, вигабатрин, зонисамид или их комбинацию.

Вариант осуществления 10. Способ по любому из вариантов осуществления 1-9, в котором ASM представляет собой вальпроевую кислоту, леветирацетам, фенитоин, лакосамид или ценобамат.

Вариант осуществления 11. Способ по любому из вариантов осуществления 1-10, в котором ASM не усиливает открытие калиевого канала Kv7 у человека.

Вариант осуществления 12. Способ по любому из вариантов осуществления 1-11, в котором ASM уменьшает возбуждение нейронов у человека.

Вариант осуществления 13. Способ по варианту осуществления 12, в котором ASM уменьшает возбуждение нейронов путем блокирования натриевого канала у человека.

Вариант осуществления 14. Способ по варианту осуществления 12, в котором ASM

уменьшает возбуждение нейронов путем блокирования кальциевого канала у человека.

Вариант осуществления 15. Способ по варианту осуществления 12, в котором ASM уменьшает возбуждение нейронов путем связывания с гликопротеином 2A синаптических везикул (SV2A) у человека.

Вариант осуществления 16. Способ по любому из вариантов осуществления 1-11, в котором ASM усиливает нейрональное торможение у человека.

Вариант осуществления 17. Способ по любому из вариантов осуществления 1-11, в котором ASM является глутаматергическим агентом.

Вариант осуществления 18. Способ по любому из вариантов осуществления 1-11, в котором ASM является ГАМКергическим агентом.

Вариант осуществления 19. Способ по любому из вариантов осуществления 1-18, в котором судорожное расстройство связано с дисфункцией калиевого канала Kv7.

Вариант осуществления 20. Способ по любому из вариантов осуществления 1-19, в котором судорожным расстройством является эпилепсия с фокальным началом.

Вариант осуществления 21. Способ по любому из вариантов осуществления 1-20, в котором Соединение А перорально вводят человеку.

Вариант осуществления 22. Способ по любому из вариантов осуществления 1-21, в котором ASM перорально вводят человеку.

Вариант осуществления 23. Способ по любому из вариантов осуществления 1-22, в котором Соединение А вводят человеку в дозе от 1 до 200 мг.

Вариант осуществления 24. Способ по любому из вариантов осуществления 1-23, в котором Соединение А вводят человеку в дозе от 2 до 100 мг.

Вариант осуществления 25. Способ по любому из вариантов осуществления 1-24, в котором Соединение А вводят человеку в дозе от 5 до 50 мг.

Вариант осуществления 26. Способ по любому из вариантов осуществления 1-25, в котором Соединение А вводят человеку в дозе 5, 10, 15, 20 или 25 мг.

Вариант осуществления 27. Способ по любому из вариантов осуществления 1-26, в котором Соединение А вводят человеку в дозе 20 мг.

Вариант осуществления 28. Способ по любому из вариантов осуществления 1-22, в котором Соединение А вводят человеку в дозе по меньшей мере 10 мг.

Вариант осуществления 29. Способ по варианту осуществления 28, в котором Соединение А вводят человеку в дозе по меньшей мере 20 мг.

Вариант осуществления 30. Способ по варианту осуществления 28, в котором Соединение А вводят человеку в дозе по меньшей мере 50 мг.

Вариант осуществления 31. Способ по любому из вариантов осуществления 1-22, в

котором Соединение А вводят человеку в дозе 5-1000 мг в сутки.

Вариант осуществления 32. Способ по варианту осуществления 31, в котором Соединение А вводят человеку в дозе 5-500 мг в сутки.

Вариант осуществления 33. Способ по варианту осуществления 31, в котором Соединение А вводят человеку в дозе 5-250 мг в сутки.

Вариант осуществления 34. Способ по варианту осуществления 31, в котором Соединение А вводят человеку в дозе 20-150 мг в сутки.

Вариант осуществления 35. Способ по варианту осуществления 31, в котором Соединение А вводят человеку в дозе 100 мг в сутки.

Вариант осуществления 36. Способ по любому из вариантов осуществления 1-22, в котором Соединение А вводят человеку в дозе 0,01-2,0 мг/кг.

Вариант осуществления 37. Способ по варианту осуществления 36, в котором Соединение А вводят человеку в дозе 0,03-1,0 мг/кг.

Вариант осуществления 38. Способ по варианту осуществления 36, в котором Соединение А вводят человеку в дозе 0,05-0,5 мг/кг.

Вариант осуществления 39. Способ по любому из вариантов осуществления 1-38, в котором Соединение А перорально вводят человеку от времени примерно за 30 минут до приема пищи до времени примерно через 2 часа после приема пищи.

Вариант осуществления 40. Способ по варианту осуществления 39, в котором Соединение А перорально вводят человеку во время приема пищи или в течение 15 минут после приема пищи.

Вариант осуществления 41. Способ по любому из вариантов осуществления 1-40, в котором ASM представляет собой вальпроевую кислоту.

Вариант осуществления 42. Способ по варианту осуществления 41, в котором вальпроевую кислоту вводят человеку в дозе 2-16 мг/кг.

Вариант осуществления 43. Способ по варианту осуществления 41, в котором вальпроевую кислоту вводят человеку в дозе 4-12 мг/кг.

Вариант осуществления 44. Способ по любому из вариантов осуществления 1-40, в котором ASM представляет собой фенитоин.

Вариант осуществления 45. Способ по варианту осуществления 44, в котором фенитоин вводят человеку в дозе 0,05-5 мг/кг.

Вариант осуществления 46. Способ по варианту осуществления 44, в котором фенитоин вводят человеку в дозе 0,1-1 мг/кг.

Вариант осуществления 47. Способ по любому из вариантов осуществления 1-40, в котором ASM представляет собой лакосамид.

Вариант осуществления 48. Способ по варианту осуществления 47, в котором лакосамид вводят человеку в дозе 0,1-5 мг/кг.

Вариант осуществления 49. Способ по варианту осуществления 47, в котором лакосамид вводят человеку в дозе 0,5-1 мг/кг.

Вариант осуществления 50. Способ по любому из вариантов осуществления 1-40, в котором ASM представляет собой ценобамат.

Вариант осуществления 51. Способ по варианту осуществления 50, в котором ценобамат вводят человеку в дозе 0,05-5 мг/кг.

Вариант осуществления 52. Способ по варианту осуществления 50, в котором ценобамат вводят человеку в дозе 0,1-1 мг/кг.

Вариант осуществления 53. Способ по любому из вариантов осуществления 1-52, в котором совместное введение Соединения А и ASM обеспечивает повышенную эффективность по сравнению с введением Соединения А или ASM по отдельности.

5. Примеры

Были проведены исследования для определения эффекта Соединения А с другими ASM.

5.1. Пример 1. Противосудорожные эффекты Соединения А по отдельности и в комбинации с обычными ASM

Взаимодействие Соединения А с другими ASM оценивали после перорального введения в тесте максимального электрошока у мышей (MES), чтобы определить, были ли некоторые комбинации благоприятными или неблагоприятными. Эффективность оценивали количественно путем расчета доли животных с тоническими судорогами задних конечностей после стимуляции роговицы.

5.1.1 Соединение А

При отдельном введении Соединение А (1, 2, 4 или 8 мг/кг) снижало частоту тонических судорог в анализе MES как через 0,5, так и через 2 часа после перорального приема. Зависимость «концентрация-эффект» соответствовала изотерме связывания со значением IC_{50} для концентрации в плазме крови, равным 154 нМ, и IC_{50} для концентрации в головном мозге, равным 275 нМ ($n=7$ на дозу, в каждый момент времени).

Приготовление соединения: Соединение А первоначально растворяли в ДМСО. Затем этот раствор добавляли в 0,5% раствор метилцеллюлозы для получения более однородной и менее агрегированной суспензии соединения. Из пробирки готовили серийные разведения с наибольшей концентрацией Соединения А, и суспензии соединений дополнительно перемешивали на вихревой мешалке перед введением животным. Конечная концентрация ДМСО составила 5%; это количество не обладало

очевидной токсичностью или нейропротекцией в анализе MES. Фенитоин и вальпроевую кислоту растворяли в 100% физиологическом растворе (0,9%). Леветирацетам растворяли в 0,5% метилцеллюлозы и 0,2% Твин 80 в деионизированной воде.

Животные: Использовали взрослых самцов мышей-альбиносов CF-1 (25-35 г), приобретенных у Harlan-Envigo. Мышей содержали по четыре в клетке и на протяжении всего эксперимента обеспечивали доступ к фильтрованной воде и корму без ограничений.

Анализ MES: Соединения вводили перорально с помощью зонда перед тестированием, если не указано иное. Во время тестирования MES переменный ток частотой 60 Гц (50 мА) подавали мышам в течение 0,2 секунды через роговичные электроды. Перед стимуляцией током на глаз наносили каплю 0,5% раствора алкаина. Затем электроды осторожно помещали на глаза животного, и электрический разряд инициировали путем приведения в действие активатора с помощью ножной педали. Животных удерживали вручную и осторожно отпускали, когда был нанесен удар током и начался приступ. Животных оценивали на предмет тонического разгибания задних конечностей в качестве конечной точки этого теста.

Статистический анализ: Все статистические данные были рассчитаны с использованием программного обеспечения Prism версии 7 (программное обеспечение Graphpad). Метод, использованный для каждого эксперимента, указан в разделе «Результаты». Кривые зависимости концентрации от реакции были рассчитаны, как наилучшим образом соответствующие уравнению:

$$Y = \text{Нижняя точка} + (\text{Верхняя точка} - \text{Нижняя точка}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{Коэффициент Хилла}))};$$

где X - логарифм концентрации в плазме. Если не указано иное, значение «Нижняя точка» было ограничено значением 0. Значение «Верхняя точка» было ограничено значением, определенным экспериментально с помощью измерений контрольного носителя.

Доза-эффект для Соединения А: Зависимость доза-эффект после перорального введения Соединения А в дозе 1, 2, 4 или 8 мг/кг оценивали в MES-анализе на мышах в 2 различных временных точках: через 0,5 и 2 часа после перорального введения (фиг. 1 и фиг. 2). Животных случайным образом распределяли на группы с применением носителя (n=7 через 2 часа, n=5 через 0,5 часа) или группы с различными дозами (n=7 на дозу, в каждый момент времени), и экспериментатор, не знающий об условиях лечения, проводил анализ MES.

Через 2 часа после введения Соединение А продемонстрировало дозозависимое снижение числа тонических судорог, оцениваемое по разгибанию задних конечностей.

Доза 8 мг/кг обеспечивала значительную защиту по сравнению с мышами, получавшими носитель (количество мышей с тоническими судорогами/общее количество протестированных: 1 мг/кг: 5/7 ($p=0,939$), 2 мг/кг: 4/7 ($p=0,598$), 4 мг/кг: 2/7 ($p=0,085$), 8 мг/кг: 1/7 ($p=0,023$), носитель: 6/7. Значения p рассчитаны методом одностороннего ANOVA с использованием теста множественных сравнений Даннетта. Те же данные были использованы для расчета процента мышей, защищенных от тонического разгибания задних конечностей (1 мг/кг: 28,6% ($p>0,999$), 2 мг/кг: 42,9% ($p>0,999$), 4 мг/кг: 71,4% ($p=0,103$), 8 мг/кг: 85,7% ($p=0,029$), носитель: 14,3%; значения p рассчитаны с помощью точного критерия Фишера). Образцы головного мозга и плазмы были взяты у мышей сразу после тестирования эффективности и проанализированы с помощью УВЭЖХ-ЭРИ-МС/МС (таблица 1).

Таблица 1. Концентрация Соединения А в плазме и головном мозге

Описание соединения	Доза (мг/кг)	Число дней	Число доз	Время сбора ткани (часы)	Концентрация (мкМ)	
					Плазма	Головной мозг
Соединение А	1	1	1	2	0,10	0,19
Соединение А	2	1	1	2	0,13	0,21
Соединение А	4	1	1	2	0,23	0,36
Соединение А	8	1	1	2	0,43	0,56

Общие концентрации в головном мозге и плазме крови 1 мг/кг: 0,19 мкМ (70,2 нг/г) и 0,1 мкМ (35,8 нг/мл); 2 мг/кг: 0,21 мкМ (75,8 нг/г) и 0,13 мкМ (46,7 нг/мл); 4 мг/кг: 0,36 мкМ (131,3 нг/г) и 0,23 мкМ (83 нг/мл); 8 мг/кг: 0,56 мкМ (207,7 нг/г) и 0,43 мкМ (157,8 нг/мл), соответственно.

Через 0,5 часа после введения дозы 1, 2 и 4 мг/кг показали дозозависимое снижение числа тонических судорог с разгибанием задних конечностей, при этом доза 4 мг/кг обеспечивала значительную защиту по сравнению с мышами, получавшими носитель (1 мг/кг: 4/7 ($p=0,449$); 2 мг/кг: 2/7 ($p=0,088$); 4 мг/кг: 1/7 ($p=0,032$); 8 мг/кг: 3/7 ($p=0,215$); носитель: 5/5; односторонний ANOVA рассчитывали с использованием теста множественных сравнений Даннетта. При дозе 8 мг/кг у 1/7 животных было два тонических приступа с разгибанием задних конечностей после стимуляции, частота иначе не наблюдалась в других группах доз или у мышей, получавших носитель. Аналогичная дозозависимая эффективность наблюдалась у мышей, защищенных от тонического разгибательного компонента задних конечностей тонического приступа (1 мг/кг: 42,9% ($p>0,205$); 2 мг/кг: 71,4% ($p=0,028$); 4 мг/кг: 85,7% ($p=0,015$); 8 мг/кг: 71,4% ($p=0,028$); носитель: 0%; рассчитывали с использованием точного критерия Фишера). Образцы головного мозга и плазмы были взяты у мышей сразу после тестирования эффективности и проанализированы с помощью УВЭЖХ-ЭРИ-МС/МС (таблица 2).

Таблица 2. Концентрация Соединения А в плазме и головном мозге

Описание соединения	Доза (мг/кг)	Число дней	Число доз	Время сбора ткани (часы)	Концентрация (мкМ)	
					Плазма	Головной мозг
Соединение А	1	1	1	0,5	0,13	0,27
Соединение А	2	1	1	0,5	0,22	0,36
Соединение А	4	1	1	0,5	0,42	0,64
Соединение А	8	1	1	0,5	0,71	1,09

Средние суммарные концентрации в головном мозге и плазме для каждой группы доз составляли: 1 мг/кг: 0,27 мкМ (97,9 нг/г) и 0,13 мкМ (48,9 нг/мл); 2 мг/кг: 0,36 мкМ (132 нг/г) и 0,22 мкМ (80,7 нг/мл); 4 мг/кг: 0,64 мкМ (234,7 нг/г) и 0,42 мкМ (154,4 нг/мл); 8 мг/кг: 1,09 мкМ (402 нг/г) и 0,71 мкМ (261,3 нг/мл), соответственно.

На фиг. 3 показано соотношение концентрация-эффект, которое суммирует все данные ФК-ФД для Соединения А в анализе MES. В верхней панели показано подавление тонических судорог в зависимости от концентрации в плазме, а в нижней панели показано подавление в зависимости от концентрации в головном мозге. Хотя более высокая экспозиция в мозге и плазме наблюдалось через 0,5 часа по сравнению с 2-часовым периодом после введения, эффективность, наблюдаемая при каждом уровне экспозиции, отражала концентрацию в мозге или плазме независимо от времени после введения (фиг. 3). Из-за четко определенного ответа на дозу спустя 2 часа после применения Соединения А, этот временной интервал был выбран для дальнейших исследований. Данные, собранные через 2 часа после введения, соответствовали кривой концентрация-эффект, при этом для оптимального соответствия варьировали только IC_{50} и коэффициент Хилла. Горизонтальная пунктирная линия указывает на частоту тонических судорог при введении носителя: $94,1 \pm 0,03\%$ (среднее значение $\pm$ S.E.M., $n=85$). Это значение было взято за верхнюю точку кривой, а нижняя точка была ограничена значением 0 (полное ингибирование). Значения IC_{50} , основанные на концентрации в головном мозге и плазме, составили 275 нМ и 154 нМ, соответственно.

5.1.2 Комбинация Соединения А и вальпроевой кислоты

Для первоначального испытания комбинации были выбраны дозы 1 мг/кг перорально с введением за 2 часа для Соединения А, и 100 мг/кг интраперитонеально с введением за 0,5 часа для вальпроевой кислоты. Был проведен второй эксперимент, чтобы повторить результаты первого испытания и протестировать дополнительные дозы вальпроевой кислоты (30 и 56 мг/кг интраперитонеально), чтобы количественно оценить степень дополнительной эффективности, обеспеченной Соединением А (1 мг/кг ПО). Результаты этих двух экспериментов в совокупности обсуждаются ниже.

Животных распределяли в группы случайным образом и перорально вводили Соединение А или носитель за 2 часа до тестирования эффективности, с последующим

ИП введением вальпроевой кислоты или носителя за 0,5 часа до тестирования эффективности. Основываясь на этом плане эксперимента, животные в контрольных группах с однократной дозой или контрольной группе с носителем также получали по две дозы: (Соединение А + носитель, носитель + вальпроевая кислота, Соединение А + вальпроевая кислота или носитель + носитель).

Совместное введение Соединения А и вальпроевой кислоты в дозе 100 мг/кг приводило к значительному увеличению числа мышей без тонических судорог с разгибанием задних конечностей по сравнению с мышами, получавшими Соединение А по отдельности (Соединение А + вальпроевая кислота в дозе 100 мг/кг: 10/15 по сравнению с Соединением А в дозе 1 мг/кг + носитель: 4/15 ($p=0,021$), и по сравнению с группой носитель + вальпроевая кислота в дозе 100 мг/кг: 5/15 ($p=0,059$); значения p были рассчитаны методом двустороннего дисперсионного анализа с последующим проведением теста множественных сравнений Даннетта. Тенденция к повышению защиты от тонических судорог была отмечена при комбинированном применении Соединения А и 56 мг/кг вальпроевой кислоты, в то время как при комбинации Соединения А и 30 мг/кг вальпроевой кислоты не было отмечено разницы: Соединение А + вальпроевая кислота в дозе 56 мг/кг: 4/8 по сравнению с Соединением А в дозе 1 мг/кг + носитель: 4/15 ($p=0,396$); и по сравнению с группой носитель + вальпроевая кислота в дозе 56 мг/кг: 1/7 ($p=0,226$); Соединение А + вальпроевая кислота в дозе 30 мг/кг: 2/8 против группы Соединения А в дозе 1 мг/кг + носитель: 4/15 ($p=0,995$) и против группы носитель + вальпроевая кислота в дозе 56 мг/кг: 0/8 ($p=0,463$) (фиг. 4).

Обе группы комбинированного введения Соединения А (1 мг/кг) + вальпроевой кислоты в дозах 56 и 100 мг/кг показали значительную защиту по сравнению с животными, получавшими носитель: Соединение А + вальпроевая кислота в дозе 100 мг/кг: 10/15 ($p=0,0001$) и Соединение А + вальпроевая кислота в дозе 56 мг/кг: 4/8 ($p=0,0381$), по сравнению с группой носитель + носитель: 0/15; значения p были рассчитаны с помощью одностороннего ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Даннетта.

Образцы плазмы и головного мозга были взяты у мышей сразу после тестирования эффективности и проанализированы с помощью УВЭЖХ-ЭРИ-МС/МС (таблица 3).

Таблица 3. Концентрации Соединения А и вальпроевой кислоты в плазме крови и головном мозге

Плазма							
1 мг/кг Соединения А		+ 100 мг/кг Вальпроевой кислоты		100 мг/кг Вальпроевой кислоты		+ 1 мг/кг Соединения А	
Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD
24 нг/мл	22	15 нг/мл	6	151710 нг/мл	78134	144073 нг/мл	52101
0,066 мкМ	0,05	0,042 мкМ	0,016	1059 мкМ	546	1006 мкМ	364
SD-стандартное отклонение							
Головной мозг							
1 мг/кг Соединения А		+ 100 мг/кг Вальпроевой кислоты		100 мг/кг Вальпроевой кислоты		+ 1 мг/кг Соединения А	
Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD
59 нг/г	51	36 нг/г	23	40084 нг/г	8722	42686 нг/г	15028
0,16 мкМ	0,14	0,097 мкМ	0,062	280 мкМ	61	298 мкМ	105

Не было обнаружено существенной разницы в концентрациях Соединения А в плазме или головном мозге при введении отдельно или в комбинации с вальпроевой кислотой. Средние суммарные концентрации Соединения А в плазме крови и головном мозге при 1 мг/кг при введении отдельно: 0,066 мкМ (24 нг/мл) и 0,16 мкМ (59 нг/г); при введении с вальпроевой кислотой (30 мг/кг): 0,038 мкМ (14 нг/мл) и 0,075 мкМ (28 нг/г); при введении с вальпроевой кислотой (56 мг/кг): 0,050 мкМ (18 нг/мл) и 0,117 мкМ (43 нг/г), и при введении с вальпроевой кислотой (100 мг/кг): 0,042 мкМ (15 нг/мл) и 0,097 мкМ (36 нг/г). Аналогичным образом, не было обнаружено существенных изменений концентрации вальпроевой кислоты в плазме крови или головном мозге при применении 3 протестированных доз в комбинации с Соединением А.

Эксперименты по совместному применению Соединения А и вальпроевой кислоты также были проанализированы для оценки влияния Соединения А на соотношение концентрация-эффект вальпроевой кислоты для количественной оценки влияния на IC₅₀ при ингибировании тонических судорог с помощью вальпроевой кислоты (фиг. 5).

5.1.3 Комбинация Соединения А и леветирацетама

Сообщается, что леветирацетам неактивен в анализе MES (ED₅₀ >500 мг/кг), но активен в анализе с током 6 Гц, 32 мА с ED₅₀ = 19,4 мг/кг (Barton et al., Epilepsy Res. 2001, 47:217-227). Были выбраны высокие дозы леветирацетама, которые, как известно, обладают биологической активностью.

Леветирацетам оценивали в MES-анализе путем ИП введения доз 120 и 150 мг/кг. Эти дозы привели к концентрации в плазме крови 1001 мкМ (170,3 мкг/мл) и 1154 мкМ (196,4 мкг/мл), а в головном мозге - 583 мкМ (99,2 мкг/г) и 540 мкМ (91,9 мкг/г) соответственно (таблица 4).

Таблица 4. Концентрации Соединения А и леветирацетама в плазме крови и головном мозге

Плазма							
1 мг/кг Соединения А		+ 120 мг/кг Леветирацетама		120 мг/кг Леветирацетама		+ 1 мг/кг Соединения А	
Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD
11,1 нг/мл	3,8	11,1 нг/мл	5,6	170,3 мкг/мл	12,7	162,8 мкг/мл	12,8
0,03 мкМ	0,01	0,03 мкМ	0,02	1001 мкМ	75	957 мкМ	75

Головной мозг							
1 мг/кг Соединения А		+ 120 мг/кг Леветирацетама		120 мг/кг Леветирацетама		+ 1 мг/кг Соединения А	
Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD
20,9 нг/г	4,8	20,0 нг/г	12,5	99,2 мкг/г	14,4	94,3 мкг/г	2,0
0,06 мкМ	0,01	0,05 мкМ	0,03	583 мкМ	85	554 мкМ	12

Плазма							
1,5 мг/кг Соединения А		+ 150 мг/кг Леветирацетама		150 мг/кг Леветирацетама		+ 1,5 мг/кг Соединения А	
Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD
15 нг/мл	4	25 нг/мл	24	196,4 µg/mL	29,7	210,3 µg/mL	28,9
0,04 мкМ	0,01	0,07 мкМ	0,06	1154 мкМ	174	1235 мкМ	169

Головной мозг							
1,5 мг/кг Соединения А		+ 150 мг/кг Леветирацетама		150 мг/кг Леветирацетама		+ 1,5 мг/кг Соединения А	
Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD
31 нг/г	8	52 нг/г	56	91,9 мкг/г	7,0	90,4 мкг/г	12,8
0,08 мкМ	0,02	0,14 мкМ	0,15	539,9 мкМ	41	531 мкМ	75,3

Ни одна из доз не приводила к значительному увеличению доли мышей без тонических судорог по сравнению с мышами, получавшими носитель: 120 мг/кг: 0/6 ($p=0,98$); 150 мг/кг: 2/8 ($p=0,93$); носитель: 2/18; значение p рассчитывали методом одностороннего ANOVA с помощью теста множественных сравнений Даннетта (фиг. 6).

Одновременное применение с Соединением А в дозе 1 или 1,5 мг/кг не оказывало влияния на уровни леветирацетама в плазме или головном мозге: 957 мкМ (163 мкг/мл) в плазме и 554 мкМ (943 мкг/г) в головном мозге (LEV 120 мг/кг + 1 мг/кг Соединения А); 1235 мкМ (210 мкг/мл) в плазме и 531 мкМ (90,4 мкг/г) в головном мозге (LEV 150 мг/кг + 1,5 мг/кг Соединения А). Значения экспозиции Соединения А в дозе 1 мг/кг отдельно или в комбинации с леветирацетамом в дозе 120 мг/кг составляли 0,03 мкМ (11,1 нг/мл) и 0,03 мкМ (11,1 нг/мл) в плазме, а также 0,06 мкМ (20,9 нг/г) и 0,05 мкМ (20,0 нг/г) в головном мозге, соответственно. Значения экспозиции Соединения А в дозе 1,5 мг/кг отдельно или в комбинации с леветирацетамом в дозе 150 мг/кг составляли 0,04 мкМ (15 нг/мл) и 0,07 мкМ (25 нг/мл) в плазме, а также 0,08 мкМ (31 нг/г) и 0,14 мкМ (52 нг/г) в головном мозге, соответственно.

Увеличение доли мышей без тонических судорог при любой комбинации доз было незначительно повышено по сравнению с эффектом Соединения А по отдельности: Соединение А в дозе 1 мг/кг: 2/11 по сравнению с Соединением А (1 мг/кг) + LEV (120 мг/кг): 2/5, $p=0,578$; и Соединение А в дозе 1,5 мг/кг: 3/8 по сравнению с Соединением А (1,5 мг/кг) + LEV (150 мг/кг): 4/8, $p=0,805$; значение p рассчитано методом двустороннего ANOVA с помощью теста множественных сравнений Даннетта (фиг. 6).

5.1.4 Комбинация Соединения А и фенитоина

Каналы KV7 совместно локализируются в начальном сегменте аксона с каналами NaV1.6 и NaV1.2. Поскольку Соединение А активирует каналы KV7, а фенитоин ингибирует потенциалзависимые натриевые каналы, ожидалось благоприятное взаимодействие, но величина была неизвестна.

Зависимость доза-эффект Соединения А (0,25; 0,75; 1; 1,5 и 2,5 мг/кг), вводимого перорально, спустя 2 часа после введения, была протестирована в MES-анализе в присутствии или отсутствии заранее определенной постоянной дозы фенитоина (2 мг/кг, интраперитонеально, через 2 часа после введения).

По сравнению с животными, получавшими носитель, однократные дозы Соединения А приводили к дозозависимому увеличению доли животных без тонических судорог: Соединение А в дозе 0,25 мг/кг: 0/8 ($p=0,999$); 0,75 мг/кг: 2/8 ($p=0,948$); 1 мг/кг: 2/8 ($p=0,948$); 1,5 мг/кг: 2/8 ($p=0,948$); 2,5 мг/кг: 4/8 ($p=0,12$); фенитоин в дозе 2 мг/кг: 6/24 ($p=0,72$); носитель 2/24. При совместном введении с фенитоином Соединение А в дозах 0,75; 1; 1,5 и 2,5 мг/кг приводило к значительному увеличению доли животных без тонических судорог по сравнению с животными, получавшими носитель: Соединение А 0,25 мг/кг + фенитоин 2 мг/кг: 3/8 ($p=0,48$); Соединение А 0,75 мг/кг + фенитоин 2 мг/кг: 5/8 ($p=0,018$); Соединение А 1 мг/кг + фенитоин 2 мг/кг: 6/8 ($p=0,002$); Соединение А 1,5 мг/кг + фенитоин 2 мг/кг: 6/8 ($p=0,002$); Соединение А 2,5 мг/кг + фенитоин 2 мг/кг: 7/8 ($p=0,0001$). Значения p были рассчитаны с помощью одностороннего ANOVA, с применением теста множественных сравнений Даннетта (фиг. 7).

Сравнение группы животных, которым вводили Соединение А по отдельности, с группами, которым вводили как Соединение А, так и фенитоин, показало значительное увеличение доли животных без тонических судорог в группах, получавших комбинацию препаратов, в дозах 1 и 1,5 мг/кг. Аналогичная тенденция наблюдалась при сравнении группы, получавшей фенитоин по отдельности, с группами, получавшими комбинированные препараты, при этом значительное уменьшение приступов отмечалось при 1; 1,5 и 2,5 мг/кг Соединения А: комбинация Соединения А 0,25 + фенитоин 2 мг/кг: 3/8 по сравнению с одним Соединением А (0,25 мг/кг): 0/8 ($p=0,165$) и 6/24 фенитоин (2

мг/кг; $p=0,715$); комбинация Соединения А 0,75 + фенитоин 2 мг/кг: 5/8 по сравнению с одним Соединением А (0,75 мг/кг): 2/8 ($p=0,165$) и 6/24 фенитоина (2 мг/кг; $p=0,074$); комбинация Соединения А 1 + фенитоин 2 мг/кг: 6/8 по сравнению с одним Соединением А (1 мг/кг): 2/8 ($p=0,048$) и 6/24 фенитоина (2 мг/кг; $p=0,012$), комбинация Соединения А 1,5 + фенитоин 2 мг/кг: 6/8 по сравнению с одним Соединением А (1,5 мг/кг): 2/8 ($p=0,048$) и 6/24 фенитоина (2 мг/кг; $p=0,012$), комбинация Соединения А 2,5 + фенитоин 2 мг/кг: 7/8 по сравнению с одним Соединением А (2,5 мг/кг): 4/8 ($p=0,165$) и 6/24 фенитоина (2 мг/кг; $p=0,001$). Значения p были рассчитаны с помощью двустороннего ANOVA с последующим использованием теста множественных сравнений Даннетта (фиг. 7).

Не было отмечено существенного изменения концентраций фенитоина в плазме или головном мозге при введении с Соединением А или без него (таблица 4).

Таблица 4. Концентрация Соединения А и фенитоина в плазме и головном мозге

Плазма											
2 мг/кг Фенитоина		+ 0,25 мг/кг Соединения А		+ 0,75 мг/кг Соединения А		+ 1 мг/кг Соединения А		+ 1,5 мг/кг Соединения А		+ 2,5 мг/кг Соединения А	
Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD
1019 нг/мл	206	1014 нг/мл	80	1025 нг/мл	149	989 нг/мл	101	1210 нг/мл	232	971 нг/мл	82
4,1 мкМ	0,8	4,0 мкМ	0,3	4,1 мкМ	0,6	3,9 мкМ	0,4	4,8 мкМ	0,9	3,9 мкМ	0,3

Головной мозг											
2 мг/кг Фенитоина		+ 0,25 мг/кг Соединения А		+ 0,75 мг/кг Соединения А		+ 1 мг/кг Соединения А		+ 1,5 мг/кг Соединения А		+ 2,5 мг/кг Соединения А	
Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD
1052 нг/г	137	1055 нг/г	126	1070 нг/г	119	1263 нг/г	67	1196 нг/г	133	1051 нг/г	67
4,2 мкМ	0,5	4,2 мкМ	0,5	2,9 мкМ	0,3	5,0 мкМ	0,4	4,8 мкМ	0,5	2,9 мкМ	0,2

Экспозиция фенитоина в однократной дозе 2 мг/кг в плазме и головном мозге, соответственно: 4,1 мкМ (1019 нг/мл) и 4,2 мкМ (1052 нг/г); при комбинации с 0,25 мг/кг Соединения А: 4,0 мкМ (1014 нг/мл) и 4,2 мкМ (1055 нг/г); при комбинации с 0,75 мг/кг Соединения А: 4,1 мкМ (1025 нг/мл) и 2,9 мкМ (1070 нг/г); при комбинации с 1 мг/кг Соединения А: 3,9 мкМ (989 нг/мл) и 5,0 мкМ (1263 нг/г); при комбинации с 1,5 мг/кг Соединения А: 4,8 мкМ (1210 нг/мл) и 4,8 мкМ (1196 нг/г); и при комбинации с 2,5 мг/кг Соединения А: 3,9 мкМ (971 нг/мл) и 2,9 мкМ (1051 нг/г).

Аналогичным образом, не отмечено существенных изменений концентрации Соединения А в плазме и головном мозге при отдельном введении или в комбинации с фенитоином (таблица 5).

Таблица 5. Концентрация Соединения А и фенитоина в плазме и головном мозге

Плазма											
0,25 мг/кг Соединения А		+ 2 мг/кг Фенитоина		0,75 мг/кг Соединения А		+ 2 мг/кг Фенитоина		1 мг/кг Соединения А		+ 2 мг/кг Фенитоина	
Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD
4,3 нг/мл	2,6	5,6 нг/мл	1,3	11,7 нг/мл	2,3	16,0 нг/мл	3,9	17,0 нг/мл	8,0	19,0 нг/мл	5,0
0,01 мкМ	0,01	0,02 мкМ	0,00	0,03 мкМ	0,01	0,04 мкМ	0,01	0,05 мкМ	0,02	0,05 мкМ	0,01

1,5 мг/кг Соединения А		+ 2 мг/кг Фенитоина		2,5 мг/кг Соединения А		+ 2 мг/кг Фенитоина	
Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD
19,5 нг/мл	12,5	23,4 нг/мл	12,8	45,1 нг/мл	12,7	58,4 нг/мл	14,6
0,05 мкМ	0,03	0,06 мкМ	0,04	0,12 мкМ	0,03	0,16 мкМ	0,04

Головной мозг											
0,25 мг/кг Соединения А		+ 2 мг/кг Фенитоина		0,75 мг/кг Соединения А		+ 2 мг/кг Фенитоина		1 мг/кг Соединения А		+ 2 мг/кг Фенитоина	
Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD
14,8 нг/г	2,6	18,4 нг/г	3,3	43,8 нг/г	7,6	56,7 нг/г	17,3	35,0 нг/г	17	37,0 нг/г	11,0
0,04 мкМ	0,01	0,05 мкМ	0,01	0,12 мкМ	0,02	0,15 мкМ	0,05	0,09 мкМ	0,04	0,10 мкМ	0,03

1,5 мг/кг Соединения А		+ 2 мг/кг Фенитоина		2,5 мг/кг Соединения А		+ 2 мг/кг Фенитоина	
Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD	Среднее значение	SD
30,8 нг/г	14,3	42,0 нг/г	18,9	144,1 нг/г	8,2	186,5 нг/г	38
0,08 мкМ	0,04	0,11 мкМ	0,05	0,39 мкМ	0,07	0,51 мкМ	0,10

Соединение А при отдельном введении в дозе 0,25 мг/кг в плазме и головном мозге по сравнению с комбинацией с фенитоином (2 мг/кг), соответственно: 0,01 мкМ (4,3 нг/мл) и 0,04 мкМ (14,8 нг/г) против 0,02 мкМ (5,6 нг/мл) и 0,05 мкМ (18,4 нг/г); по отдельности в дозе 0,75 мг/кг по сравнению с комбинацией: 0,03 мкМ (11,7 нг/мл) и 0,12 мкМ (43,8 нг/г) по сравнению с 0,04 мкМ (16,0 нг/мл) и 0,15 мкМ (56,7 нг/г); по отдельности в дозе 1 мг/кг по сравнению с комбинацией: 0,05 мкМ (17,0 нг/мл) и 0,10 мкМ (35,0 нг/г) против 0,05 мкМ (19,0 нг/мл) и 0,10 мкМ (37,0 нг/г); по отдельности в дозе 1,5 мг/кг по сравнению с комбинацией: 0,05 мкМ (19,5 нг/мл) и 0,08 мкМ (30,8 нг/г) против 0,06 мкМ (23,4 нг/мл) и 0,11 мкМ (42 нг/г); по отдельности в дозе 2,5 мг/кг по сравнению с комбинацией: 0,12 мкМ (45,1 нг/мл) и 0,39 мкМ (144,1 нг/г) против 0,16 мкМ (58,4 нг/мл) и 0,51 мкМ (186,5 нг/г).

Эксперименты по совместному введению Соединения А и фенитоина также были проанализированы для определения влияния фенитоина на соотношение концентрация-эффект Соединения А для количественной оценки влияния на IC₅₀ при ингибировании тонических судорог Соединением А (фиг. 8).

5.1.5 Выводы

Соединение А продемонстрировало дозозависимую эффективность в анализе MES на мышах, которая хорошо коррелировала со значениями экспозиции в плазме и головном

мозге. Комбинация Соединения А и вальпроевой кислоты в дозе 100 мг/кг или фенитоина в дозе 2 мг/кг привела к более высокой эффективности, наблюдаемой в анализе MES, чем при применении любого из этих соединений по отдельности. Совместное применение Соединения А с леветирацетамом не привело к значительному улучшению эффективности в тесте MES по сравнению с введением только Соединения А.

Вальпроевая кислота (30, 56 или 100 мг/кг ИП, при введении за 0,5 часа до MES): комбинация Соединения А (1 мг/кг ПО, за 2 часа до MES) с вальпроевой кислотой (VA) в дозе 100 мг/кг приводила к большему ингибированию, чем при введении только Соединения А (Соединение А в дозе 1 мг/кг + вальпроевая кислота в дозе 100 мг/кг: 10/15 по сравнению с Соединением А в дозе 1 мг/кг + носитель: 4/15 ($p=0,021$)). (Группы с введением по отдельности: $n=15$ Соединение А в дозе 1 мг/кг, $n=15$ вальпроевая кислота в дозе 100 мг/кг, $n=7$ вальпроевая кислота в дозах 30 и 56 мг/кг; группы введения комбинации: $n=15$ Соединение А 1 мг/кг + вальпроевая кислота 100 мг/кг; $n=8$ Соединение А + вальпроевая кислота 30 и 56 мг/кг; $n=15$ носитель). Соединение А в дозе 1 мг/кг снижало уровень вальпроевой кислоты в плазме крови, необходимый для защиты от тонических судорог в тесте MES. Значение IC_{50} для вальпроевой кислоты по отдельности составило 1440 мкМ. При комбинации с Соединением А в дозе 1 мг/кг значение IC_{50} для вальпроевой кислоты составило 608 мкМ, что в 2,37 раза меньше. Средняя общая концентрация Соединения А в плазме крови при 1 мг/кг при отдельном введении : 0,07 мкМ (24,2 нг/мл) и при введении с вальпроевой кислотой (30 мг/кг): 0,04 мкМ (14,0 нг/мл); при введении с вальпроевой кислотой (56 мг/кг): 0,03 мкМ (12,0 нг/мл); и при введении с вальпроевой кислотой (100 мг/кг): 0,04 мкМ (15,0 нг/мл).

Леветирацетам (120 и 150 мг/кг интраперитонеально, при введении за 2 часа до MES): Доза Соединения А в 1 мг/кг приводила к концентрации в плазме крови 66 ± 14 нМ (среднее значение $\pm$ SEM, $n=15$) и уменьшала долю тонических судорог на 26,7%. Совместное применение Соединения А с леветирацетамом (LEV) не обеспечивало улучшения защиты от тонических судорог по сравнению с введением одного Соединения А: Соединение А в дозе 1 мг/кг: 2/11 по сравнению с Соединением А (1 мг/кг) + LEV (120 мг/кг): 2/5, $p=0,578$; и Соединение А в дозе 1,5 мг/кг: 3/8 по сравнению с Соединением А (1,5 мг/кг) + LEV (150 мг/кг): 4/8, $p=0,805$. Концентрации Соединения А в плазме крови в дозе 1 мг/кг отдельно или совместно с LEV в дозе 120 мг/кг составляли 0,03 мкМ (11,1 нг/мл) и 0,03 мкМ (11,1 нг/мл); в дозе 1,5 мг/кг отдельно или совместно с LEV в дозе 150 мг/кг составили 0,041 мкМ (15 нг/мл) и 0,068 мкМ (25 нг/мл), соответственно.

Фенитоин (2 мг/кг ИП, при введении за 2 часа до MES): комбинация Соединения А с фенитоином в дозе 2 мг/кг приводила к большему ингибированию, чем при введении

только Соединения А. При совместном введении за 2 часа до MES с фенитоином Соединение А в пероральных дозах 0,75; 1; 1,5 и 2,5 мг/кг приводило к значительному увеличению доли мышей без тонических судорог по сравнению с животными, получавшими носитель: Соединение А 0,25 мг/кг + фенитоин 2 мг/кг: 3/8 ($p=0,48$); Соединение А 0,75 мг/кг + фенитоин 2 мг/кг: 5/8 ($p=0,013$); Соединение А 1 мг/кг + фенитоин 2 мг/кг: 6/8 ($p=0,002$); Соединение А 1,5 мг/кг + фенитоин 2 мг/кг: 6/8 ($p=0,002$); Соединение А 2,5 мг/кг + фенитоин 2 мг/кг: 7/8 ($p=0,0001$). Значение IC_{50} для одного Соединения А составило 147 нМ. При сочетании с 2 мг/кг фенитоина значение IC_{50} для Соединения А составило 39,7 нМ. Не наблюдалось существенных изменений концентрации Соединения А в плазме крови при отдельном введении или в комбинации с фенитоином: Соединение А по отдельности в дозе 0,25 мг/кг по сравнению с комбинацией с фенитоином (2 мг/кг): 0,01 мкМ (4,3 нг/мл) против 0,02 мкМ (5,6 нг/мл); по отдельности в дозе 0,75 мг/кг против комбинации: 0,03 мкМ (11,7 нг/мл) против 0,04 мкМ (16 нг/мл); по отдельности в дозе 1 мг/кг против комбинации: 0,05 мкМ (17 нг/мл) против 0,05 мкМ (19 нг/мл); по отдельности в дозе 1,5 мг/кг против комбинация: 0,05 мкМ (19,5 нг/мл) против 0,06 мкМ (23,4 нг/мл); по отдельности в дозе 2,5 мг/кг по сравнению с комбинацией: 0,12 мкМ (45,1 нг/мл) против 0,16 мкМ (58,4 нг/мл).

5.2. Пример 2. Противосудорожное действие Соединения А по отдельности и в комбинации с лакосамидом

Эффективность Соединения А и его фармакологическое взаимодействие с лакосамидом оценивали после перорального введения в испытании максимального электрошока у мышей (AC-MES).

Целью этих испытаний была характеристика дозозависимой противосудорожной активности Соединения А и его фармакологического взаимодействия с лакосамидом в анализе AC-MES у мышей после однократного перорального введения соединений. Анализ AC-MES обычно чувствителен к неселективным блокаторам натриевых каналов и открывателям калиевых каналов и использовался в качестве трансляционной модели на животных при парциальных приступах. Анализ MES широко использовался для скрининга и характеристики новых противосудорожных соединений (Löscher et al., *Epilepsy Res.* 1991, 8(2):79-94; Piredda et al., *J Pharmacol Exp Ther.* 1985, 232(3):741-745; and White et al., *Ital J Neurol Sci.* 1995, 16(1-2):73-77). После электрошоковой стимуляции при достаточно высоких токах у мышей и крыс наблюдается тоническое разгибание, за которым следует клонус задних конечностей. Если тестируемое соединение способно предотвращать тоническое разгибание, то считают, что оно обладает защитным эффектом.

Противосудорожная эффективность Соединения А и лакосамида и эффект

комбинации Соединения А с лакосамидом были протестированы в анализе AC-MES на мышах-самцах CF-1 после однократного ПО введения. Брали образцы плазмы и головного мозга, чтобы понять взаимосвязь между концентрацией препарата и эффективностью.

5.2.1 Материалы и методы

Испытуемое соединение – Соединение А

Название:	Соединение А
Номер серии:	Серия 12
Физическое описание:	Твердое вещество, белый порошок
Чистота:	98,8%
Поставщик:	Xenon Pharmaceuticals Inc.

Испытуемое соединение – Лакосамид

Название:	Лакосамид
Номер серии:	Серия 03
Физическое описание:	Белый порошок
Чистота:	>95%
Поставщик:	Toronto Research Chemicals

Носитель F1: 0,5% метилцеллюлозы и 0,2% Твин-80 в деионизированной (ДИ) воде. 0,8 л деионизированной воды нагревали до температуры от 70°C до 80°C. Навеску пять граммов метилцеллюлозы медленно, небольшими порциями добавляли в подогретую ДИ воду. Смесь перемешивали до тех пор, пока не образовалась однородная молочная суспензия. Суспензию перенесли в холодное помещение и перемешивали в течение ночи, чтобы получить прозрачный раствор. К прозрачному раствору добавили 2 мл Tween-80 и разбавили до 1 л чистой водой. Раствор носителя хранили при температуре от 2°C до 8°C.

Носитель F2: 5% диметилсульфоксид (ДМСО) и F1. В носитель F1 было добавлено 5% ДМСО.

Композиция для введения: Готовили навески Соединения А и лакосамида в отдельных флаконах. Соединение А было приготовлено в носителе F2, а лакосамид был приготовлен в носителе F1. К порошкам Соединения А и лакосамида добавляли соответствующее количество носителя, затем смешивали в гомогенизаторе ИКА Т-18 Ultra-Turrax для получения однородной суспензии необходимой концентрации. Затем флаконы заворачивали в алюминиевую фольгу для защиты от света и помещали на пластину для перемешивания до момента введения дозы.

Тест-система

Вид/штамм:	Мышь CF-1
Численность и пол:	144 самца
Поставщик:	Charles River Laboratories
Возраст и масса тела на момент начала введения дозы:	Животным было от 6,5 до 8,5 недель, а масса тела находилась в диапазоне от 27 до 38 г на момент начала введения дозы.
Содержание:	Животных содержали группами (по 4 на клетку) в клетках,

	которые соответствуют действующим законам и нормативным актам в области защиты животных. Температура составляла от 18°C до 25°C, а относительная влажность - от 45% до 65%.
Акклиматизация:	По прибытии животных осматривали, чтобы убедиться в удовлетворительном состоянии здоровья, и акклиматизировали в учреждении не менее чем за 5 дней до испытания.
Корм/вода:	Животным предоставляли сертифицированный корм для грызунов (Teklad Rodent Chow #2014) в неограниченном количестве. Водопроводная вода была доступна в неограниченном количестве.

Схема эксперимента: Животные были распределены по опытным группам, как указано в таблице 6, таблице 7, таблице 8 и таблице 9.

Были проведены три испытания с Соединением А и четыре испытания с лакосамидом. Соответствующие даты испытания указаны в таблицах с 6 по 9.

Таблица 6. Экспериментальные группы – Испытание 2А

Группа	Соединение	Доза (мг/кг)	Введение	Число мышей	Время после введения (ч)	Объем дозы (мл/кг)	Состав
1	Носитель	0	ПО	8	0,5	10	F2
2	Соединение А	1	ПО	8	0,5	10	F2
3	Соединение А	5	ПО	8	0,5	10	F2
4	Соединение А	10	ПО	8	0,5	10	F2
5	Лакосамид	6	ПО	8	2	10	F1
6	Лакосамид	8	ПО	8	2	10	F1

ПО: перорально.

Таблицы 7. Экспериментальные группы – Испытание 2В

Группа	Соединение	Доза (мг/кг)	Введение	Число мышей	Время после введения (ч)	Объем дозы (мл/кг)	Состав
1	Носитель	0	ПО	8	0,5	10	F2
2	Соединение А	5	ПО	8	0,5	10	F2
3	Соединение А	7.5	ПО	7	0,5	10	F2
4	Соединение А	10	ПО	9	0,5	10	F2
5	Лакосамид	10	ПО	8	2	10	F1

ПО: перорально.

Таблица 8. Экспериментальные группы – Испытание 2С

Группа	Соединение	Доза (мг/кг)	Введение	Число мышей	Время после введения (ч)	Объем дозы (мл/кг)	Состав
1	Носитель	0	ПО	8	0,5	10	F2+F1
2	Соединение	3	ПО	8	0,5	10	F2+F1

	А						
3	Лакосамид	10	ПО	8	2	10	F2+F1
4	Соединение А + Лакосамид	3+10	ПО	8	0,5+2	10	F2+F1

ПО: перорально.

Таблица 9. Экспериментальные группы – Испытание 2D

Группа	Соединение	Доза (мг/кг)	Введение	Число мышей	Время после введения (ч)	Объем дозы (мл/кг)	Состав
1	Носитель	0	ПО	8	2	10	F1
2	Лакосамид	6	ПО	8	2	10	F1
3	Лакосамид	20	ПО	8	2	10	F1

ПО: перорально.

Маскировка и рандомизация: Экспериментатор, введивший соединение, случайным образом распределял каждое животное по опытным группам. Другой экспериментатор, не знающий о распределении в опытные группы, провел этот тест. Кроме того, введение соединения и тестирование MES проводили в разных помещениях, чтобы убедиться, что экспериментатор, проводящий тест, совсем не осведомлен о введении препаратов. Все животные, протестированные в данном эксперименте, имели равные шансы быть отнесенными к любой опытной группе.

Клинические наблюдения: Всех животных оценивал на предмет аномального поведения в течение 10 минут после введения Соединения А и лакосамида экспериментатор, который вводил животным дозу, и снова во время стимуляции экспериментатор, который тестировал животных. Фиксировали любые качественные изменения по сравнению с нормальным поведением.

Анализ AC-MES: Тест MES широко использовался при поиске противосудорожных веществ (Piredda et al., Löscher et al., and White et al.). Тест MES считается моделью генерализованных тонико-клонических приступов (GTC) и определяет способность соединения предотвращать распространение судорог. На модели AC-MES электрошоков переменным током (60 Гц, 40 мА) подавали в течение 0,2 секунды с помощью роговичных электродов (шокер для грызунов HSE-NA, Harvard Apparatus, номер модели: 73-0105). Мышам CF-1 вводили ПО (в соответствии со стандартной операционной процедурой (SOP) TECH-006) носитель или соединение за 0,5 часа до электрошокового анализа. Непосредственно перед электрошоковой стимуляцией глаза животных обезболивали местным применением 0,5% раствора алкаина (пропаракаина гидрохлорида, по одной капле на глаз). Затем мышей фиксировали, накладывали электроды на роговицу и применяли электрошок. У интактных животных приступ характеризуется начальным

генерализованным тоническим приступом с тоническим разгибательным компонентом задних конечностей. Животное считается защищенным от судорог, вызванных MES, после устранения тонического разгибательного компонента судорог задних конечностей, и таким образом оценивается как «0». Если мышь демонстрирует тоническое разгибание задних конечностей, то оценивается как «1». Мышей подвергали эвтаназии сразу же после первоначальной оценки количества приступов после электрошока для сбора плазмы и головного мозга.

Сбор и подготовка проб: Мышей анестезировали ингаляцией изофлурана (согласно SOP TESH-018) до тех пор, пока они не достигали хирургической стадии анестезии. Затем шприц (объемом 1 мл с иглой 22-го калибра) вводили под грудину в сердце (согласно SOP TESH-031). Собирали приблизительно 0,5 мл крови, помещали в пробирку с K₂ЭДТА и хранили на льду. Затем животных подвергали эвтаназии путем цервикальной дислокации. Головной мозг извлекали, помещали в предварительно взвешенный флакон и быстро замораживали на сухом льду. В конце сбора образцов кровь центрифугировали при 4000 об/мин в течение 10 минут при температуре 4°C, а плазму набирали пипеткой в пробирку с этикеткой. Все образцы хранили в морозильной камере при температуре -80°C до проведения биоанализа.

Образцы плазмы: Экстракцию образцов плазмы проводили путем осаждения белка с использованием ацетонитрила. Разбавленные образцы плазмы (50 мкл) смешивали с 50 мкл раствора внутреннего стандарта (IS) в соотношении 1:1 ацетонитрил: вода (о:о) с последующим добавлением 200 мкл ацетонитрила. Образцы перемешивали на вихревой мешалке в течение 30 секунд, центрифугировали при 13000 об/мин в течение 20 минут, переливали в 96-луночный планшет и далее центрифугировали при 4000 об/мин в течение 20 минут. Образцы анализировали с помощью ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии, тандемной масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией (УВЭЖХ-ЭРИ-МС/МС), как описано в методике биоанализа ниже.

Образцы головного мозга: Перед экстракцией предварительно взвешенные образцы целого головного мозга гомогенизировали в соотношении ацетонитрил:вода 1:1 (о:о) (2 мл на мозг мыши) с использованием гомогенизатора IKA T18 Ultra-Turrax при установке 4 в течение приблизительно 1 минуты. Гомогенат центрифугировали при 13000 об/мин в течение 20 минут, и 50 мкл надосадочной жидкости обрабатывали точно так, как описано выше для образцов плазмы.

Методики биоанализа: Все образцы, включая экстракты плазмы и гомогената головного мозга (включая калибровочные стандарты и образцы для контроля качества (QC), приготовленные в плазме мыши с K₂ЭДТА), экстрагировали путем осаждения

белка. К каждой аликвоте образца объемом 50 мкл добавляли 50 мкл раствора IS (2500 нг/мл лакосамида в воде:ацетонитриле (1:1)) и 50 мкл 6% (о:о) фосфорной кислоты в воде, затем добавляли 200 мкл ацетонитрила. Образцы в пробирках объемом 1,7 мл перемешивали вихревым способом, затем центрифугировали в течение 20 минут при 13000 оборотах в минуту. 50 мкл надосадочной жидкости смешивали со 150 мкл смеси вода:ацетонитрил (1:1) в 96-луночном планшете, который центрифугировали после перемешивания в течение 20 минут при 4000 об/мин. Затем образцы были готовы для УВЭЖХ-МС/МС-анализа.

Образцы анализировали на Соединение А методом УВЭЖХ-МС/МС-спектроскопии высокой точности с использованием условий, перечисленных ниже.

Прибор:	Sciex TQ-5500		
Матрикс:	Мышиная плазма (с K ₂ ЭДТА) Гомогенат головного мозга мыши		
Анализируемое вещество	Соединение А		
Внутренний стандарт (ВС)	(S)-5-хлор-4-((1-(5-хлор-2-фторфенил)этил)амино)-2-фтор-N-(пиразин-2-ил)бензолсульфонамид		
Условия МС:	ЭРИ: положительная Соединение А: [M+H] ⁺ m/z 369,2/247,2 (S)-5-хлор-4-((1-(5-хлор-2-фторфенил)этил)амино)-2-фтор-N-(пиразин-2-ил)бензолсульфонамид (IS): [M+H] ⁺ m/z 458,793/157		
Условия УВЭЖХ:	Время (мин)	% В	
	0,0	10	
	0,2	10	
	3,4	6	
	3,5	100	
	4,0	100	
	4,1	10	
	5,0	10	
	Подвижная фаза А: 0,1% муравьиная кислота в воде. Подвижная Фаза В: 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле.		
Калибровочные стандарты	Были приготовлены стандарты 2,34; 4,69; 9,38; 18,8; 37,5; 75,0; 150; 300; 600; 1200; 2400 и 4800 нг/мл		
Образцы QC	Готовили образцы для контроля качества 14,0; 225 и 3600 нг/мл, анализировали в трех повторностях.		

Образцы анализировали на лакосамид методом УВЭЖХ-МС/МС-спектроскопии высокой точности с использованием условий, перечисленных ниже.

Прибор:	Sciex TQ-5500		
Матрикс:	Мышиная плазма (с К ₂ ЭДТА) Гомогенат головного мозга мыши		
Анализируемое вещество	Лакосамид		
Внутренний стандарт (ВС)	(S)-5-((1-бензилпирролидин-3-ил)(метил)амино)-6-метил-N-(тиазол-4-ил)пиридин-2-сульфаниламид		
Условия МС:	ЭРИ: положительная		

	Лакосамид: [M+H] ⁺ m/z 251.168/91 (S)-5-((1-бензилпирролидин-3-ил)(метил)амино)-6-метил-N-(тиазол-4-ил)пиридин-2-сульфонамид (IS): [M+H] ⁺ m/z 551,1/214,0	
Условия УВЭЖХ:	Время (мин)	% В
	0,0	20
	0,6	20
	1,00	100
	1,50	100
	1,60	20
	2,5	20
	Подвижная фаза А: 0,1% муравьиная кислота в воде. Подвижная Фаза В: 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле.	
Калибровочные стандарты	Были приготовлены стандарты 2,34; 4,69; 9,38; 18,8; 37,5; 75,0; 150; 300; 600; 1200; 2400 и 4800 нг/мл	
Образцы QC	Готовили образцы для контроля качества 14,0; 225 и 3600 нг/мл, анализировали в трех повторностях.	

Концентрации образцов определяли с использованием модели наилучшего соответствия, либо линейных, либо квадратичных калибровочных функций, взвешенных 1/х, полученных путем регрессии отношения площади пика анализируемого вещества в стандартных образцах к их соответствующим концентрациям. Критерии приемлемости для аналитических прогонов требовали, чтобы значения, рассчитанные по результатам измерений для стандартов и образцов контроля качества, находились в пределах $\pm 20\%$ от их номинальных значений, за исключением самого низкого стандарта или нижнего предела количественного определения (LLOQ), для которого критерий приемлемости составлял $\pm 25\%$. По меньшей мере шесть из двенадцати стандартных точек должны были показывать значения, рассчитанные по результатам измерений, в пределах $\pm 20\%$ от их номинальных концентраций, чтобы калибровка была признана приемлемой. По меньшей мере три образца для контроля качества, по одному для каждой концентрации, должны были показывать значения, рассчитанные по результатам измерений, в пределах $\pm 20\%$ от их номинальных концентраций, чтобы вся серия образцов была признана приемлемой.

Обработка и анализ данных: Вся статистика была рассчитана с использованием программного обеспечения GraphPad Prism версии 8. Кривые зависимости концентрации были получены с использованием уравнения Хилла Ленгмюра:

Уравнение 1

$$Y = B + (T - B) \times x^n / (IC_{50}^n + x^n),$$

где:

- В = нижняя точка, устанавливается равной 0.
- Т = верхняя точка, устанавливается равной 1.
- n = коэффициент Хилла, ограниченный значением меньше нуля.
- IC₅₀ = концентрация соединения, необходимая для 50% ингибирования in vitro.

Все групповые данные выражены как среднее значение. Различия между группами были проанализированы с использованием теста Краскела-Уоллиса с последующим применением теста множественного сравнения Данна. Статистическая значимость была достигнута при значениях $p < 0,05$.

Биоанализ: Все тесты на пригодность системы (SST), контроль качества, матрикса и холостой пробы растворителя соответствовали критериям приемлемости, описанным в SOP MTD-066. Значения LLOQ для Соединения А и лакосамида составило 2,34 нг/мл в испытании 2С, 4,69 нг/мл для обоих соединений в испытаниях 2D и 2А и 2,34 нг/мл и 4,69 нг/мл для лакосамида и Соединения А, соответственно, в испытании 2В. Верхний предел количественного определения (ULOQ) составлял 4800 нг/мл для обоих соединений во всех испытаниях.

Эффективность в анализе АС-MES: Результаты испытания судорог, вызванных АС-MES, у мышей представлены в таблице 10, таблице 11, таблице 12 и таблице 13, а также на фиг. 9, фиг. 10 и фиг. 11.

Ответ на дозу и концентрацию Соединения А: Ответ на дозу и концентрацию Соединения А показан на фиг. 9. Во всех трех испытаниях эффективности (2А, 2В и 2С) у 100% мышей CF-1, получавших носитель, наблюдался тонический приступ с разгибанием задних конечностей. В испытании 2А доля животных, получавших Соединение А, у которых наблюдалась тоническая судорожная реакция на стимул АС-MES, снизилась с 8/8 при 1 мг/кг до 7/8 при 5 мг/кг и до 3/8 при 10 мг/кг, что свидетельствует о дозозависимом повышении эффективности. В испытании 2В дозы 5 мг/кг и 10 мг/кг показали большую эффективность, при этом судороги отмечены у 0/8 и 1/9 животных, соответственно, по сравнению с испытанием 2А, что, возможно, было результатом более высоких концентраций в плазме, достигнутых в испытании 2В (средние концентрации в плазме: 0,470 мкМ при 5 мг/кг и 0,553 мкМ при 10 мг/кг), по сравнению с испытанием 2А (средние концентрации в плазме: 0,276 мкМ при 5 мг/кг и 0,366 мкМ при 10 мг/кг). Кроме того, испытания 2А и 2В проводили с интервалом в неделю друг от друга, что также может объяснить разницу в эффективности. В испытании 2С при введении Соединения А в дозе 3 мг/кг у 2/8 животных наблюдался приступ при средней концентрации в плазме 0,284 мкМ. Во всех трех испытаниях (2А, 2В и 2С) разница между группами, получавшими Соединение А, и группами, получавшими носитель, достигла статистической значимости (р-значения показаны на фиг. 9).

У одной мыши из группы 10 мг/кг в испытании 2А и трех мышей в испытании 2В (две мыши из группы 10 мг/кг и одна мышь из группы 7,5 мг/кг) проявлялись поведенческие признаки (тремор, снижение активности и разведенные задние конечности)

(концентрации в плазме: 2А: 0,391 мкМ; 2В: 10 мг/кг: 0,608 и 0,516 мкМ; 7,5 мг/кг: 0,746 мкМ). Отмечалась линейная зависимость концентраций Соединения А, достигаемых в ткани головного мозга и плазме, от дозы (фиг. 9).

Результирующая кривая концентрация-эффект для Соединения А от трех испытаний показала значение EC_{50} для плазмы, равное 0,300 мкМ, и значение EC_{50} для ткани головного мозга, равное 0,471 мкМ (фиг. 9).

5.2.2 Результаты

Перед тестированием Соединения А в комбинации с лакосамидом на модели АС-MES лакосамид тестировали в различных дозах в отдельном испытании (2D) и на отдельных группах мышей в рамках испытаний, обобщенных для Соединения А выше, для установления полной дозы-эффекта. Эффект комбинаций лакосамида в зависимости от дозы и концентрации, полученный в этих 4 испытаниях, показан на фиг. 10. Лакосамид продемонстрировал зависящий от дозы и концентрации эффект против тонических судорог, вызванных АС-MES, с максимальным эффектом при дозе 20 мг/кг у 3/8 животных (средняя концентрация в плазме 23,9 мкМ). Доля животных с судорогами в группе, получавшей лакосамид в дозе 20 мг/кг, значительно отличалась от группы, получавшей носитель (значение $p = 0,0052$). Анализ кривой концентрация-эффект лакосамида показал, что EC_{50} для плазмы составляет 21,6 мкМ, а EC_{50} для ткани головного мозга - 22,2 мкМ. Для испытания комбинаций Соединения А + лакосамид, испытание 2С, была выбрана доза 10 мг/кг лакосамида и 3 мг/кг Соединения А, оба из которых показали минимальную эффективность при отдельном введении на модели АС-MES.

Комбинирование Соединения А (3 мг/кг, вводимого перорально за 0,5 часа до АС-MES) с лакосамидом (10 мг/кг, вводимого перорально за 2 часа до АС-MES) устраняло тонические судороги (таблица 12). Разница между группой, получавшей лакосамид (только лакосамид в дозе 10 мг/кг при проявлении судорог у 6/8 животных), и группой, получавшей комбинацию (Соединение А + лакосамид при проявлении судорог у 0/8 животных), была статистически значимой (значение $p = 0,0189$), тогда как разница между группой, получавшей Соединение А (только Соединение А в дозе 3 мг/кг при проявлении судорог у 2/8 животных), и группой, получавшей комбинацию, не была статистически значимой. Концентрации Соединения А (вводимого в дозе 3 мг/кг) и лакосамида (вводимого в дозе 10 мг/кг) в плазме крови были схожими независимо от того, вводились ли они отдельно или в комбинации, что позволяет предположить, что большая эффективность, наблюдаемая в группе комбинированной терапии, не была результатом более высокой экспозиции ни того, ни другого соединения. Средние достигнутые

концентрации в плазме составили: 0,284 мкМ для Соединения А при введении отдельно в дозе 3 мг/кг; 0,279 мкМ для Соединения А при введении в дозе 3 мг/кг в комбинации с лакосамидом; 17,1 мкМ для лакосамида при введении отдельно в дозе 10 мг/кг; и 15,5 мкМ для лакосамида при введении в дозе 10 мг/кг в комбинации с Соединением А.

Таблица 10. Испытание 2А: Краткое описание противосудорожных эффектов Соединения А и лакосамида у мышей в испытании АС-MES после однократного перорального введения

Название и доза соединения	Среднее для плазмы (мкМ)	Среднее для головного мозга (мкМ)	Отношение В/Р	Доля животных с судорогами	Доля с поведенческими признаками
Носитель	n/a	n/a	n/a	8/8	0/8
Соединение А (1 мг/кг)	0,08	0,15	1,85	8/8	0/8
Соединение А (5 мг/кг)	0,28	0,40	1,45	7/8	0/8
Соединение А (10 мг/кг)	0,37	0,50	1,36	3/8	1/8
Лакосамид (6 мг/кг)	9,07	4,85	0,54	8/8	0/8
Лакосамид (8 мг/кг)	10,8	6,27	0,58	8/8	0/8

В/Р: отношение головной мозг/плазма; n/a: не применимо.

Таблица 11. Испытание 2В: Краткое описание противосудорожных эффектов Соединения А и лакосамида у мышей в испытании АС-MES после однократного перорального введения

Название и доза соединения	Среднее для плазмы (мкМ)	Среднее для головного мозга (мкМ)	Отношение В/Р	Доля животных с судорогами	Доля с поведенческими признаками
Носитель	n/a	n/a	n/a	8/8	0/8
Соединение А (5 мг/кг)	1	0,71	1,51	0/8	0/8
Соединение А (7,5 мг/кг)	0,53	0,87	1,64	0/7	1/7
Соединение А (10 мг/кг)	0,55	0,91	1,64	1/9	2/9
Лакосамид (10 мг/кг)	12,6	2,63	0,21	8/8	0/8

В/Р: отношение головной мозг/плазма; n/a: не применимо.

Таблица 12. Испытание 2С: Краткое описание противосудорожных эффектов Соединения А и лакосамида в комбинации у мышей в испытании АС-MES после однократного перорального введения

Название и доза соединения	Среднее для плазмы (мкМ)	Среднее для головного мозга (мкМ)	Отношение В/Р	Доля животных с судорогами	Доля с поведенческими признаками
Носитель	п/а	п/а	п/а	8/8	0/8
Соединение А (3 мг/кг)	0,28	0,51	1,79	2/8	0/8
Лакосамид (10 мг/кг)	17,1	4,84	0,28	6/8	0/8
Соединение А (3 мг/кг) + Лакосамид (10 мг/кг)	0,28 + 15,5	0,54 + 4,52	1,95 + 0,29	0/8	0/8

В/Р: отношение головной мозг/плазма; п/а: не применимо.

Таблица 13. Испытание 2D: Краткое описание противосудорожных эффектов лакосамида у мышей в испытании АС-MES после однократного перорального введения

Название и доза соединения	Среднее для плазмы (мкМ)	Среднее для головного мозга (мкМ)	Отношение В/Р	Доля животных с судорогами	Доля с поведенческими признаками
Носитель	п/а	п/а	п/а	8/8	0/8
Лакосамид (6 мг/кг)	6,90	7,95	1,15	8/8	0/8
Лакосамид (20 мг/кг)	23,9	26,8	1,12	3/8	0/8

В/Р: отношение головной мозг/плазма; п/а: не применимо.

5.2.1 Выводы

Соединение А и лакосамид продемонстрировали эффективность, зависящую от концентрации, в анализе АС-MES на мышах CF-1. Значения EC_{50} Соединения А в плазме и головном мозге, полученные на основе анализа кривой концентрация-эффект, составили 0,30 мкМ и 0,47 мкМ, соответственно. Комбинация Соединения А в дозе 3 мг/кг и лакосамида в дозе 10 мг/кг приводила к полному подавлению тонических судорог по сравнению с частичным подавлением, когда Соединение А или лакосамид вводили отдельно в тесте АС-MES на мышах.

Каждая из пяти пероральных доз Соединения А была протестирована на модели АС-MES. Через тридцать минут после введения Соединения А в дозах 1 мг/кг (n=8), 3 мг/кг (n=8), 5 мг/кг (n=16), 7,5 мг/кг (n=7) и 10 мг/кг (n=17) через пероральный зонд самцам мышей CF-1 (масса тела от 28,2 до 43,8 г) мышей подвергали электрическому стимулу роговицы частотой 60 Гц (продолжительность 0,2 секунды, 40 мА). Этот стимул вызывал тоническое разгибание задних конечностей у всех животных, получавших

носитель. Любое животное, которое не демонстрировало разгибания задних конечностей в ответ на электрический стимул, считалось защищенным. Неврологическая оценка по результатам наблюдения (качественный тест) также была проведена во время тестирования для проверки переносимости. У всех животных были взяты конечные образцы плазмы и головного мозга, чтобы определить уровни концентрации Соединения А и понять взаимосвязь между эффективностью и концентрацией лекарства.

После однократного перорального введения Соединение А продемонстрировало зависящий от концентрации эффект против тонических судорог, вызванных АС-MES, с максимальным эффектом у 0/8 животных при концентрации в плазме 0,47 мкМ (из испытания 2В при 5 мг/кг). В испытании 2А (в дозе 1 мг/кг, n=8; 5 мг/кг, n=8; и 10 мг/кг, n=8; дата испытания 28 марта 2019) доля животных, у которых наблюдалась тоническая судорожная реакция на стимул АС-MES после предварительного введения Соединения А за 30 минут, снизилась с 8/8 (средняя концентрация в плазме 0,0815 мкМ; 1 мг/кг) до 7/8 (средняя концентрация в плазме 0,28 мкМ; 5 мг/кг) и до 3/8 (средняя концентрация в плазме 0,37 мкМ; 10 мг/кг). В испытании 2В (5 мг/кг, n=8; 7,5 мг/кг, n=7 и 10 мг/кг, n=9; дата испытания 05 июня 2019), 5 мг/кг (средняя концентрация в плазме 0,47 мкМ) и 10 мг/кг (средняя концентрация в плазме 0,55 мкМ) Соединение А показало высокую эффективность (судороги у 0/8 и 1/9 животных, соответственно). В испытании 2С (3 мг/кг, n=8; дата испытания 11 июня 2019) при введении Соединения А в дозе 3 мг/кг у 2/8 животных наблюдались судороги при концентрации в плазме 0,28 мкМ. Во всех трех испытаниях эффективности (2А, 2В и 2С) разница между группами, получавшими Соединение А, и группами, получавшими носитель, достигла статистической значимости. Данные всех 3 испытаний были объединены для анализа кривой зависимости концентрация-эффект Соединения А при его отдельном введении. Кривая концентрация-эффект для Соединения А показала значение полумаксимальной эффективной концентрации (EC₅₀) для плазмы, равное 0,30 мкМ, и значение EC₅₀ для ткани головного мозга, равное 0,47 мкМ.

У одной мыши из группы, получавшей 10 мг/кг, в испытании 2А и трех мышей в испытании 2В (у двух мышей из группы, получавшей 10 мг/кг, и одной мыши из группы, получавшей 7,5 мг/кг) проявлялись поведенческие признаки (тремор, снижение активности и разведенные задние конечности) (концентрации в плазме: 2А: 0,39 мкМ; 2В: 10 мг/кг: 0,61 и 0,52 мкМ; 7,5 мг/кг: 0,75 мкМ).

Перед тестированием Соединения А в комбинации с лакосамидом на модели АС-MES (испытание 2С) лакосамид тестировали отдельно в различных дозах для установления полной зависимости доза-эффект. Каждую из четырех доз лакосамида по

отдельности тестировали на модели AC-MES (испытание 2D: 6 мг/кг и 20 мг/кг, n=8 на группу, дата испытания 14 марта 2019; испытание 2A: 6 мг/кг и 8 мг/кг, n=8 на группу, дата испытания 28 мая 2019; испытание 2B: 10 мг/кг, n=8, дата испытания 05 июня 2019; и испытание 2C: 10 мг/кг, n=8, дата испытания 11 июня 2019) и в рамках испытания. Через два часа после введения лакосамида в дозах 6 мг/кг (n=16), 8 мг/кг (n=8), 10 мг/кг (n=16) и 20 мг/кг (n=8) через оральный зонд мышам-самцам CF-1 (масса тела 28,2 до 43,8 г), мышей подвергали стимуляции AC-MES. Лакосамид проявлял дозозависимый и зависимый от концентрации эффект в отношении тонических судорог, вызванных AC-MES, с максимальным эффектом при дозе 20 мг/кг у 3/8 животных (средняя концентрация в плазме 23,9 мкМ) и минимальным эффектом при более низких дозах 6, 8 и 10 мг/кг. Данные всех 4 испытаний (2A, 2B, 2C и 2D) были объединены для анализа кривой концентрация-эффект для лакосамида при отдельном введении. Кривая концентрация-эффект для лакосамида показала, что EC₅₀ по плазме составляет 21,6 мкМ, а EC₅₀ по ткани головного мозга составляет 22,2 мкМ. На основании испытаний зависимости доза-эффект была выбрана доза лакосамида в 10 мг/кг и доза Соединения А 3 мг/кг, которая показала минимальную эффективность при отдельном введении в рамках испытания комбинации на модели AC-MES.

Комбинация Соединения А (3 мг/кг ПО, за 0,5 часа до AC-MES) с лакосамидом (10 мг/кг ПО, за 2 часа до AC-MES) у самцов мышей CF-1 полностью подавляла тонические судороги по сравнению с частичным подавлением, когда Соединение А или лакосамид вводили по отдельности (только Соединение А в дозе 3 мг/кг: судороги у 2/8 животных; только лакосамид в дозе 10 мг/кг: судороги у 6/8 животных; Соединение А + лакосамид: судороги у 0/8 животных; носитель: судороги у 8/8 животных). Концентрации Соединения А (3 мг/кг) и лакосамида (10 мг/кг) в плазме крови были схожими независимо от того, вводили ли их по отдельности или в комбинации, что позволяет предположить, что максимальная эффективность, наблюдаемая в группе комбинированной терапии, не была результатом более высокой экспозиции ни того, ни другого соединения. Средние суммарные достигнутые концентрации в плазме составили: Соединение А при отдельном введении в дозе 3 мг/кг: 0,283 мкМ; Соединение А при введении в комбинации в дозе 3 мг/кг: 0,279 мкМ; лакосамид при введении отдельно в дозе 10 мг/кг: 17,1 мкМ; лакосамид при введении в комбинации в дозе 10 мг/кг: 15,5 мкМ.

5.3. Пример 3. Соединение А отдельно и в комбинации с леветирацетамом при анализе психомоторных приступов, индуцированных частотой 6 Гц

Целью этого испытания была оценка взаимодействия Соединения А с леветирацетамом на мышинной модели судорог, чувствительной к каждому соединению, с

помощью анализа психомоторных приступов, индуцированных частотой 6 Гц (Barton et al., Epilepsy Res. 2001; 47(3):217-227). Оценивали, является ли комбинация обоих соединений благоприятной или неблагоприятной с точки зрения эффективности, путем введения Соединения А и леветирацетама по отдельности и в комбинации, каждое из соединений в дозе, которая сама по себе обеспечивает субмаксимальную эффективность. Соединение А и леветирацетам вводили в дозе для каждого, которая сама по себе обеспечивает субмаксимальную эффективность в анализе с частотой 6 Гц, что позволяет обнаружить изменение эффективности в любом направлении при объединении этих соединений. Были проанализированы образцы плазмы и головного мозга, чтобы получить представление о том, как комбинация Соединения А и леветирацетама может влиять на фармакокинетику и фармакодинамику.

5.3.1 Материалы и методы

Испытуемое соединение – Соединение А

Название	Соединение А
Номер серии	12
Физическое описание	Твердое вещество белого цвета
Чистота (%)	98,8
Поставщик	Olon Recerca Biosciences (серия № 60367-18-002)

Эталонное соединение – Леветирацетам

Название	Леветирацетам
Номер серии	03
Физическое описание	Порошок белого цвета
Чистота (%)	98
Поставщик	Toronto Research Chemicals; Кат.№ L331500, серия № 3-JSH-3-1

Носитель: состав F2 для Соединения А: 5% диметилсульфоксида (ДМСО), 0,5% метилцеллюлозы в деионизированной (ДИ) воде. Состав F1 для леветирацетама: 0,5 масс.% метилцеллюлозы, 0,2 масс.% Твин 80 в ДИ воде.

Вводимый состав: Соответствующее количество Соединения А (без поправки на чистоту) взвешивали и растворяли в ДМСО при 20-кратной предполагаемой конечной концентрации. 20-кратный исходный раствор Соединения А в ДМСО разбавляли в 20 раз 0,5% метилцеллюлозой в ДИ воде для достижения конечной необходимой концентрации. Полученную суспензию Соединения А перемешивали вручную или на вихревой мешалке до получения однородной суспензии. Препарат хранили при комнатной температуре и непрерывно перемешивали вручную или на вихревой мешалке перед введением каждой дозы.

Для получения леветирацетама ДИ воду (0,8 л) нагревали до температуры от 70°C до 80°C. Готовили навеску 5 г метилцеллюлозы и медленно, небольшими порциями

добавляли в подогретую ДИ воду. Смесь перемешивали до тех пор, пока не формировалась однородная молочная суспензия. Суспензию переносили в холодное помещение и перемешивали в течение ночи до получения прозрачного раствора. К прозрачному раствору добавляли 2 мл Tween 80 и разбавляли до 1 л ДИ водой. Раствор носителя хранили при температуре от 2°C до 8°C.

Готовили навеску порошка леветирацетама во флаконах. К порошку добавляли соответствующее количество носителя, затем перемешивали в гомогенизаторе IKA-T18 ULTRA TURRAX для получения однородной суспензии необходимой концентрации. Затем флаконы обертывали алюминиевой фольгой, чтобы защитить их от света, и помещали на пластину для перемешивания до момента введения дозы.

Тест-система

Вид/штамм: Мыши CF-1
 Количество и пол: 104 самца
 Поставщик: Charles River Laboratories

Возраст и масса тела
 в начале введения
 дозы:

ID испытания	Возраст (дни)	Диапазон массы тела (г)
3A	60	32,7-46,0
3B	46	29,0-37,3
3C	48	31,0-40,0

Содержание
 животных:

Животные были размещены группами (по 4 на клетку) в клетках, которые соответствуют применимым законам и нормативным актам в области защиты животных (ССАС). Температура была от 18°C до 25°C, а относительная влажность - от 45% до 65%.

Акклиматизация:

По прибытии животных осматривали, чтобы убедиться в удовлетворительном состоянии их здоровья, и акклиматизировали в учреждении не менее 5 дней, прежде чем отправить на испытание.

Корм/вода:

Животным предоставляли сертифицированный корм для грызунов (Teklad Rodent Chow #2014) в неограниченном количестве.

Водопроводная вода была доступна в неограниченном количестве.

Схема эксперимента: Животные были распределены по экспериментальным группам, как указано в таблице 14. Всем мышам вводили либо носитель, либо Соединение А через пероральный зонд (стандартная операционная процедура (SOP) TECH-006), и либо носитель, либо леветирацетам путем ИП инъекции (TECH-004) за 1 час до индукции приступа. Значение ED₂₀ (4 мг/кг) Соединения А было выбрано для комбинированных экспериментов (на основе эксперимента «доза-эффект», испытание 3A). Доза леветирацетама в 300 мг/кг была выбрана на основе предыдущих экспериментов, которые показали в среднем 35%-ную эффективность при этой дозе

Таблица 14. Обзор экспериментальных групп

Испытание	Соединение	Доза (мг/кг)	Объем дозы (мл/кг)	Концентрация состава (мг/мл)	Носитель	Способ введения	Количество животных (пол)	Время после введения (ч)
3А	Носитель	0	10	n/a	F2	ПО	8 (самцы)	1
	Соед, А	1	10	0,1	F2	ПО	8 (самцы)	1
	Соед, А	3	10	0,3	F2	ПО	8 (самцы)	1
	Соед, А	5	10	0,5	F2	ПО	8 (самцы)	1
	Соед, А	8	10	0,8	F2	ПО	8 (самцы)	1
3В	Носитель Носитель	n/a	10	n/a	F2 F1	ПО ИП	8 (самцы)	1
	Носитель Лев,	0 300	10	n/a 30	F2 F1	ПО ИП	8 (самцы)	1
	Соед, А Носитель	4 0	10	0,4 n/a	F2 F1	ПО ИП	8 (самцы)	1
	Соед, А Лев,	4 300	10	0,4 30	F2 F1	ПО ИП	8 (самцы)	1
3С	Носитель Носитель	n/a	10	n/a	F2 F1	ПО ИП	8 (самцы)	1
	Носитель Лев,	0 300	10	n/a 30	F2 F1	ПО ИП	8 (самцы)	1
	Соед, А Носитель	4 0	10	0,4 n/a	F2 F1	ПО ИП	8 (самцы)	1
	Соед, А Лев,	4 300	10	0,4 30	F2 F1	ПО ИП	8 (самцы)	1

Соед.: соединение; ИП.: интраперитонеально; Лев.: Леветирацетам; n/a: неприменимо; ПО: per os, перорально.

Рандомизация и маскировка: Экспериментатор, введивший соединение, случайным образом распределял каждое животное по экспериментальным группам. Другой экспериментатор, не знающий о распределении в экспериментальные группы, проводил этот тест. Все животные, протестированные в данном эксперименте, имели равные шансы быть отнесенными к любой экспериментальной группе.

Наблюдение за клиническими признаками: всех животных, которым вводили соединение, наблюдали на предмет аномального поведения в течение 10 минут после введения дозы экспериментатором, который вводил препараты дозу, и снова во время стимуляции экспериментатором, который тестировал животных. Фиксировали любые качественные изменения по сравнению с нормальным поведением.

Анализ психомоторных приступов при индукции частотой 6 Гц: Всех животных помещали в экспериментальную комнату по меньшей мере за 1 час до

электростимуляции. Непосредственно перед испытанием на каждый глаз мыши наносили по капле алкаина (пропаракаина гидрохлорида, 0,5%). Затем животное надежно фиксировали, и к глазам прикладывали пару электродов (аппарат для электрошоковой терапии 57800, Ugo Basile). 3-секундный стимул вызывали нажатием ножной педали при 34 миллиамперах, 6 Гц и длительности импульса 0,2 миллисекунды. Сразу после завершения стимула животное помещали в цилиндр из оргстекла и регистрировали судорожное поведение (клонус челюсти, клонус передних конечностей и хвост Штрауба) (согласно ТЕСН 036). Животное считалось защищенным от приступа, если у него не проявлялось ни одного из трех типичных психомоторных проявлений приступа (клонус челюсти, клонус передних конечностей, хвост Штрауба), вызванных этим протоколом стимуляции у контрольных животных.

Сбор и подготовка образцов: Мышей анестезировали ингаляцией изофлурана (ТЕСН-018) до тех пор, пока они не достигали хирургической стадии анестезии. Затем шприц (объемом 1 мл с иглой 22-го калибра) вводили под грудину в сердце (ТЕСН-031). Было собрано приблизительно 0,5 мл крови, которую помещали в пробирку с К₂ЭДТА и хранили на льду. Затем животных подвергали эвтаназии путем цервикальной дислокации (ТЕСН-018). Головной мозг извлекали, помещали в предварительно взвешенный флакон и быстро замораживали на сухом льду. В конце сбора образцов кровь центрифугировали при 4000 об/мин в течение 10 минут при температуре 4°C, и плазму отбирали пипеткой в пробирку с этикеткой. Все образцы хранили в морозильной камере при температуре -80°C до проведения биоанализа (через 8 дней после взятия образцов для испытаний 3А и 3В; через 20 дней после взятия образцов для испытания 3С).

Анализ образцов плазмы и тканей: Полипропиленовые пробирки для бисерной мельницы, содержащие взвешенные ткани головного мозга, размораживали при комнатной температуре и добавляли 3 мл растворителя для гомогенизации (вода: ацетонитрил (1:1, о:о). Пробирки помещали в гомогенизатор типа бисерной мельницы (модель Bead Ruptor Elite, Omni International) и встряхивали со скоростью 3,70 м/с в течение одного цикла продолжительностью 30 секунд. Пробирку с гомогенатом центрифугировали при 4000 об/мин в течение 20 минут, надосадочную жидкость переносили в пробирку Эппендорфа объемом 1,5 мл и хранили в замороженном виде при -80°C до анализа. Все образцы, включая экстракты плазмы и гомогената головного мозга (включая образцы для калибровки и контроля качества (QC), приготовленные в плазме крыс с К₂ЭДТА), экстрагировали путем осаждения белка. На каждые 50 мкл аликвоты образца добавляли 50 мкл внутреннего стандартного раствора (2500 нг/мл (S)-5-хлор)-4-((1-(5-хлор-2-фторфенил)этил)амино)-2-фтор-N-(пиразин-2-ил)бензолсульфонамида и 4-

((2-((7-азабицикло[2.2.1]гептан-7-ил)метил)-6-фторбензил)амино)-2,6-дифтор-N-(изотиазол-3-ил)бензолсульфонамида для Соединения А и леветирацетама, соответственно, в воде/ацетонитриле (1:1)), разводили 50 мкл 6 об.% фосфорной кислоты в воде, а затем добавляли 200 мкл ацетонитрила. Образцы в пробирках объемом 1,5 мл перемешивали вихревым способом, а затем центрифугировали в течение 20 минут при 13 000 об./мин. 50 мкл надосадочной жидкости смешивали со 150 мкл воды/ацетонитрила (1:1) в 96-луночной планшете, который центрифугировали после перемешивания в течение 20 минут при 4000 об./мин, а затем готовили для анализа методом жидкостной хроматографии с помощью тандемной масс-спектрометрией (ЖХ-МС/МС).

Образцы были проанализированы с помощью метода ЖХ-МС/МС высокого разрешения следующим образом:

Прибор: Sciex TQ-5500
 Матрикс: Мышиная плазма (K₂ЭДТА)
 Гомогенат головного мозга мыши
 Анализируемое вещество: Соединение А
 Внутренний стандарт (IS): (S)-5-хлор-4-((1-(5-хлор-2-фторфенил)этил)амино)-2-фтор-N-(пиразин-2-ил)бензолсульфонамид
 Условия МС: ЭРИ (электрораспылительная ионизация): положительная
 Соединение А: [M+H]⁺ m/z 369,2/247,2
 (S)-5-хлор-4-((1-(5-хлор-2-фторфенил)этил)амино)-2-фтор-N-(пиразин-2-ил)бензолсульфонамид (IS): [M+H]⁺ m/z 458,793/157

Условия ультра-высокоэффективной жидкостной хроматографии (УВЭЖХ):

Время (мин)	% В
0,0	10
0,2	10
3,4	86
3,5	100
4,0	100
4,1	10
5,0	10

А: 0,1% муравьиная кислота в воде

В: 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле

Калибровочные стандарты: Были приготовлены стандарты 2,34; 4,69; 9,38; 18,8; 37,5; 75; 150; 300; 600; 1200; 2400 и 4800 нг/мл для испытаний 3А и 3В. Были приготовлены стандарты 0,586; 1,17; 2,34; 4,69; 9,38; 18,8; 36,5; 75,0; 150; 300; 600 и 1200 нг/мл для испытания 3С.

Анализируемое вещество: Леветирацетам
 Внутренний стандарт (IS): 4-((2-((7-азабицикло[2.2.1]гептан-7-ил)метил)-6-фторбензил)амино)-2,6-дифтор-N-(изотиазол-3-ил)бензолсульфонамид
 Условия МС: ЭРИ: положительная
 Леветирацетам: [M+H]⁺ m/z 171/126
 4-((2-((7-азабицикло[2.2.1]гептан-7-ил)метил)-6-

фторбензил)амино)-2,6-дифтор-*N*-(изотиазол-3-ил)бензолсульфонамид (IS): $[M+H]^+$ m/z 509/218

Условия ВЭЖХ:

Время (мин)	% В
0,0	20
0,6	20
1,0	100
1,7	100
1,8	20
3,0	20

А: 0,1% муравьиная кислота в воде

В: 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле

Калибровочные стандарты

Были приготовлены стандарты 4,69; 9,38; 18,8; 37,5; 75; 150; 300; 600; 1200; 2400; 4800 и 9600 нг/мл.

Обработка и анализ данных: Статистический анализ данных был выполнен с использованием GraphPad Prism (версия 8.2.1). Данные о зависимости доза-эффект были проанализированы с использованием теста Краскела-Уоллиса с последующим проведением множественных сравнений по Данну. Значение $p < 0,05$ считали значимым. Кривые зависимости ответа от дозы и концентрации были получены с использованием уравнения Хилла-Ленгмюра:

Уравнение 1

$$Y = B + (T - B) \times x^n / (IC_{50}^n + x^n),$$

где:

- В = нижняя точка, устанавливается равной 0.
- Т = верхняя точка, устанавливается равной 1.
- n = коэффициент Хилла, ограниченный значением меньше нуля.
- IC_{50} = концентрация соединения, необходимая для 50% ингибирования *in vitro*.

Все данные приведены к трем значащим цифрам, и все групповые данные приведены как среднее значение $\pm$ SD, если не указано иное.

5.3.2 Результаты

Биоанализ: Все тесты на пригодность системы, образцы контроля качества, матриксы и холостые пробы для растворителей соответствовали критериям приемлемости. Параметры анализа сведены в таблицу 15. Образцы контроля качества при каждой концентрации анализировали в трех повторностях.

Таблица 15. Параметры биоанализа

Исследование	Соед. A LLOQ (нг/мл)	Соед. A ULOQ (нг/мл)	Соед. A QC (нг/мл)	Lev LLOQ (нг/мл)	Lev ULOQ (нг/мл)	Lev QC (нг/мл)	Образцы ниже LLOQ
3А	2,34	4800	14 225 3600	n/a	n/a	n/a	нет
3В	2,34	4800	14 225	4,69	9600	28 450	2 плазмы 7 мозга

Исследо- вание	Соед. А LLOQ (нг/мл)	Соед. А ULOQ (нг/мл)	Соед. А QC (нг/мл)	Lev LLOQ (нг/мл)	Lev ULOQ (нг/мл)	Lev QC (нг/мл)	Образцы ниже LLOQ
			3600			7200	
ЗС	1,17	1200	3,52 56,25 900	9,38	9600	28 450 7200	1 плазмы 1 мозга

Lev: Леветирацетам; LLOQ: нижний предел количественного определения; n/a: неприменимо; ULOQ: верхний предел количественного определения.

Клинические наблюдения: У одного животного, которому вводили Соединение А в дозе 8 мг/кг (плазма: 1,16 мкМ; мозг: 1,65 мкМ), наблюдался тремор, и оно было холодным на ощупь во время тестирования.

Дозозависимый ответ на Соединение А при анализе психомоторных приступов с индукцией частотой 6 Гц (испытание 3А): Соединение А, введенное ПО в дозе за 1 час до стимуляции роговицы, показало дозозависимую эффективность: у 8/8 животных приступы были при 1 мг/кг и 3 мг/кг, у 5/8 животных приступы были при 5 мг/кг и у 3/8 животных приступы были при дозе 8 мг/кг. Защита от приступов значительно отличалась от носителя при 8 мг/кг Соединения А ($p=0,0081$; фиг. 12А). Кривая доза-эффект показывает, что ED_{50} составляет 6,48 мг/кг, а ED_{20} - 4,13 мг/кг при коэффициенте Хилла $n = -3,09$ (фиг. 12В).

Фармакокинетико-фармакодинамические соотношения плазмы крови и головного мозга отдельных животных показаны на фиг. 12А и фиг. 12В, соответственно. Результаты и экспозиция по группам сведены в таблицу 16. Эффективность Соединения А зависела от концентрации при EC_{50} для плазмы 0,35 мкМ и EC_{50} 0,54 мкМ для головного мозга при коэффициенте Хилла $n = -1,95$ и $n = -2,17$, соответственно (фиг. 12С и фиг. 12Д).

Таблица 16. Эффективность и экспозиция Соединения А после однократного перорального введения различных доз мышам CF-1 (испытание 3А)

Соединение	Доза (мг/кг)	Плазма (мкМ)	SD плазмы (мкМ)	Мозг (мкМ)	SD мозга (мкМ)	Доля мышей с судорогами
Носитель	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	8/8
Соед. А	1	0,04	0,01	0,09	0,06	8/8
Соед. А	3	0,15	0,06	0,26	0,10	8/8
Соед. А	5	0,18	0,07	0,29	0,16	5/8
Соед. А	8	0,47	0,29	0,70	0,41	3/8

n/a: неприменимо.

Комбинация Соединения А и леветирацетама в анализе психомоторных приступов с индукцией частотой 6 Гц (испытания 3В и 3С): Чтобы оценить, является ли комбинация Соединения А и леветирацетама благоприятной или неблагоприятной для эффективности в анализе психомоторных приступов с индукцией частотой 6 Гц, для каждого соединения была выбрана субмаксимальная доза. В приведенном выше эксперименте «доза-эффект»

было определено, что ED₂₀ Соединения А составляет 4 мг/кг. В предыдущих испытаниях эффективность леветирацетама в дозе 300 мг/кг достигалась в среднем на 35%, при значительной вариабельности между испытаниями. В двух идентично спланированных экспериментах (испытания 3В и 3С, см. выше, и таблица 14) комбинация Соединения А в дозе 4 мг/кг и леветирацетама в дозе 300 мг/кг была значительно более эффективной в испытании психомоторных приступов с индукцией частотой 6 Гц, чем любое из этих соединений по отдельности (таблица 16).

Испытание 3В: В испытании 3В дозировка Соединения А или леветирацетама, вводимых по отдельности, не приводила к защите от судорог (концентрации Соединения А в плазме и головном мозге были намного ниже, чем ожидалось), но комбинация обоих соединений защищала 3/8 животных от судорог (фиг. 14А, таблица 12). Преимущество комбинированного введения было значительным по сравнению с носителем и по сравнению с любым из соединений, вводимых отдельно ($p=0,034$). Концентрации Соединения А и леветирацетама, достигаемые в плазме (Соединение А: $0,014\pm0,009$ мкМ; леветирацетам: 1500 ± 320 мкМ) и головном мозге (Соединение А: $0,03\pm0,02$ мкМ; леветирацетам: 861 ± 120 мкМ), были сопоставимы между группами с введением по отдельности, и группами, получавшими комбинацию дозировок (фиг. 14, таблица 17). Таким образом, благоприятный эффект комбинации Соединения А и леветирацетама не может быть объяснен повышенной экспозицией ни того, ни другого соединения (фиг. 15).

Испытание 3С: В испытании 3С был повторен дизайн испытания 3В. На этот раз та же доза Соединения А в 4 мг/кг привела к более чем в 10 раз более высоким концентрациям Соединения А в плазме ($0,17\pm0,09$ мкМ против $0,01\pm0,01$ мкМ) и головном мозге ($0,41\pm0,23$ мкМ против $0,03\pm0,02$ мкМ), чем в испытании 3В (фиг. 15, таблица 17). Концентрации леветирацетама также были несколько выше, чем в испытании 3В (мозг: 1130 ± 130 мкМ против 861 ± 120 мкМ, плазма: 1770 ± 287 мкМ против 1500 ± 320 мкМ; фиг. 15, таблица 17). Повышенная экспозиция привела к повышению эффективности любого соединения, введенного отдельно, по сравнению с испытанием 3В: Соединение А в дозе 4 мг/кг защитило 1/7 животных, а леветирацетам в дозе 300 мг/кг защитил 2/8 животных от судорог (фиг. 14А, таблица 17). Комбинация Соединения А и леветирацетама защищала всех животных, протестированных в этом испытании (фиг. 14А, таблица 17; $n=7$; одно животное было исключено, поскольку у него не было измеримых уровней леветирацетама в плазме или головном мозге). При достижении полной эффективности после комбинированного введения Соединения А и леветирацетама влияние на эффективность значительно отличалось не только от носителя ($p=0,0002$), но и от любого из соединений, вводимых отдельно ($p<0,01$). Аналогично

испытанию ЗВ, концентрации Соединения А и леветирацетама, достигнутые в плазме и головном мозге, были сопоставимы между группами, получавшими однократную дозу и комбинированную дозу (фиг. 15, таблица 17). Таким образом, благоприятный эффект комбинации Соединения А и леветирацетама не может быть объяснен повышенной экспозицией ни того, ни другого соединения (фиг. 16).

Испытания с введением комбинации ЗВ и ЗС: при объединении зависимости доза-эффект в обоих экспериментах максимальная эффективность либо Соединения А, либо леветирацетама, введенных отдельно, достигала 14/16 приступов в случае леветирацетама, в то время как комбинация обоих соединений приводила к 5/15 приступам у животных. Таким образом, комбинация Соединения А и леветирацетама защитила 66,7% животных от судорог, что достоверно отличалось как от носителя ($p < 0,0001$), так и от любого из соединений по отдельности ($p < 0,001$, фиг. 14В, таблица 17).

Таблица 17. Эффективность и экспозиция Соединения А и леветирацетама через 1 час после введения отдельно или в комбинации мышам CD-1

Исследо- вание	Соединение	Доза (мг/кг)	Соединение А				Леветирацетам				Доля с судорогами
			Плазма (мкМ)	Плазма SD (мкМ)	Мозг (мкМ)	Мозг SD (мкМ)	Плазма (мкМ)	Плазма SD (мкМ)	Мозг (мкМ)	Мозг SD (мкМ)	
3В	Носитель	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	8/8
	Соединение А	4	0,01	0,01	0,03	0,02	п/а	п/а	п/а	п/а	8/8
	Лев.	300	п/а	п/а	п/а	п/а	1500	320	861	120	8/8
	Соединение А + Лев.	4 + 300	0,02	0,01	0,04	0,02	1350	128	1010	78,8	5/8
3С	Носитель	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	п/а	8/8
	Соединение А	4	0,17	0,09	0,41	0,23	п/а	п/а	п/а	п/а	5/6*
	Лев.	300	п/а	п/а	п/а	п/а	1770	287	1130	130	6/8
	Соединение А + Лев.	4 + 300	0,17	0,06	0,383	0,19	2160	383	1100	265	0/7**
В комбинации	Соединение А	4	0,10	0,10	0,22	0,25	п/а	п/а	п/а	п/а	13/14*
	Лев.	300	п/а	п/а	п/а	п/а	1640	324	996	185	14/16
	Соединение А + Лев.	4 + 300	0,09	0,09	0,21	0,22	1730	497	1050	188	5/15**

Лев.: Леветирацетам; п/а: неприменимо. *Два животных были исключены из оценки эффективности из-за ошибки стимуляции. Во время стимуляции произошло нарушение (потеря контакта). **Одно животное было исключено, поскольку у него не было измеримой концентрации леветирацетама ни в плазме, ни в головном мозге.

5.3.3 Выводы

Соединение А продемонстрировало дозозависимую эффективность у мышей в анализе психомоторных реакций с индукцией частотой 6 Гц с ED_{50} 6,48 мг/кг. Эффективность хорошо коррелировала с концентрацией Соединения А в плазме и головном мозге при EC_{50} в плазме 0,35 мкМ и EC_{50} в головном мозге 0,54 мкМ.

Комбинация Соединения А в дозе 4 мг/кг и леветирацетама в дозе 300 мг/кг приводила к значительно более высокой эффективности в этом анализе, чем наблюдалась при применении любого соединения по отдельности в двух отдельных, идентично спланированных экспериментах (испытание 3В: $p=0,034$; испытание 3С: $p<0,01$). Введение комбинации не оказывало существенного влияния на экспозицию ни того, ни другого соединения в плазме крови или головном мозге. При сопоставимых концентрациях леветирацетама в головном мозге (1130 ± 130 мкМ против 1100 ± 265 мкМ; испытание 3С) добавление Соединения А к леветирацетаму повышало эффективность с 25% (только леветирацетам) до 100% (Соединение А + леветирацетам).

Сначала было проведено испытание «доза-ответ» (3А) для Соединения А в психомоторном анализе с индукцией частотой 6 Гц, чтобы определить дозу, при которой 20% животных были защищены от судорог (ED_{20}). Соединение А вводили мышам-самцам CF-1 (масса тела: от 32,7 до 46,0 г) в дозах 1, 3, 5 и 8 мг/кг перорально через зонд 8 животным в группе за 1 час до индукции психомоторных приступов посредством 3-секундной стимуляции роговицы при 34 миллиамперах (6 Гц; длительность импульса 0,2 миллисекунды). Эффективность в этом анализе оценивали количественно путем расчета доли животных в каждой группе из 8, которые были защищены от судорожного поведения (клонус челюсти, клонус передних конечностей или хвост Штрауба) после стимуляции частотой 6 Гц. Образцы плазмы и головного мозга были проанализированы для оценки взаимосвязи концентрация-эффект.

В то время как 1 мг/кг и 3 мг/кг Соединения А не приводили к защите от судорог, доля судорог у животных была снижена до 5/8 у животных, получавших дозу 5 мг/кг, и до 3/8 в группе, получавшей 8 мг/кг. При дозе 8 мг/кг (плазма: $0,47\pm0,29$ мкМ; головной мозг: $0,70\pm0,41$ мкМ; среднее значение $\pm$ SD) Соединение А продемонстрировало значительную защиту ($p=0,0081$) по сравнению с группой носителя (судороги у 8/8). Кривые зависимости ответа от дозы и концентрации для Соединения А показывают дозу, при которой 50% животных были защищены от судорог (ED_{50}), равную 6,48 мг/кг, концентрацию в плазме, при которой 50% животных защищены от судорог (EC_{50}), равную 0,35 мкМ, и значение EC_{50} головного мозга, равное 0,54 мкМ. Значение ED_{20} для Соединения А в этом анализе составило 4,13 мг/кг.

У одного животного, получившего дозу Соединения А 8 мг/кг, наблюдался тремор, и оно было холодным на ощупь. При концентрации 1,16 мкМ в плазме и 1,65 мкМ в головном мозге у этого животного отмечена наибольшая экспозиция Соединения А среди всех животных в этом эксперименте.

Комбинация Соединения А и леветирацетама в дозах, которые обеспечивают субмаксимальную эффективность, была оценена в двух отдельных, идентично разработанных экспериментах (испытания 3В и 3С). Предыдущими экспериментами было установлено, что интраперитонеальная (ИП) инъекция леветирацетама в дозе 300 мг/кг за 1 час до стимуляции обеспечивает 35%-ную эффективность при стимуляции током 34 миллиампер 6 Гц. Эксперимент «доза-ответ» с Соединением А (испытание 3А) показал, что ED₂₀ составляет 4 мг/кг, когда Соединение А вводили перорально (ПО) за 1 час до стимуляции. Затем были оценены следующие экспериментальные группы (n=8) в каждом из двух идентично спланированных экспериментов: (1) контрольный носитель (ПО и ИП); (2) Соединение А в дозе 4 мг/кг ПО и носитель ИП; (3) леветирацетам в дозе 300 мг/кг ИП и носитель ПО; (4) Соединение А в дозе 4 мг/кг ПО и леветирацетам в дозе 300 мг/кг ИП. 3-секундную стимуляцию роговицы током 34 мА (6 Гц, длительность импульса 0,2 миллисекунды) проводили через 1 час после введения соединения. Эффективность оценивали на основе доли животных, защищенных от судорожного поведения (клонус челюсти, клонус передних конечностей или хвост Штрауба).

В испытании 3В ни одно из соединений, введенных отдельно самцам мышей CF-1 (масса тела: от 29,0 до 37,3 г), не приводило к защите от судорог, но комбинация обоих соединений защищала 3/8 животных от судорог (p=0,034). Концентрации Соединения А и леветирацетама, достигнутые в плазме (Соединение А: 0,014±0,009 мкМ; леветирацетам: 1500±320 мкМ) и головном мозге (Соединение А: 0,03±0,02 мкМ; леветирацетам: 861±120 мкМ), были сопоставимы между группами с введением по отдельности и в комбинации, но в целом были значительно ниже, чем ожидалось при дозе 4 мг/кг.

В испытании 3С, проведенном на мышах-самцах CF-1 (масса тела: от 31,0 до 40,0 г), доза 4 мг/кг Соединения А приводила к более чем 10-кратному повышению концентрации Соединения А в плазме (0,167±0,0897 мкМ против 0,014±0,009 мкМ) и головном мозге (0,41±0,23 мкМ против 0,03±0,02 мкМ), чем в испытании 3В. Концентрации леветирацетама также были несколько выше, чем в группе 3В (мозг: 1130±130 мкМ против 861±120 мкМ; плазма: 1770±287 мкМ против 1500±320 мкМ). Повышенные экспозиции привели к повышению эффективности любого соединения, вводимого отдельно: Соединение А в дозе 4 мг/кг защищало 1/7 животных, а леветирацетам в дозе 300 мг/кг защищал 2/8 животных от судорог. Комбинация

Соединения А и леветирацетама защищала всех животных, протестированных в этой группе (7/7 защищенных; $p < 0,01$), по сравнению с любым из этих соединений по отдельности. При сопоставимых концентрациях леветирацетама в мозге (1130 ± 130 мкМ против 1100 ± 265 мкМ, испытание 3С) добавление Соединения А к леветирацетаму повышало эффективность с 25% (только леветирацетам) до 100% (Соединение А + леветирацетам).

5.4. Пример 4. Противосудорожный эффект Соединения А отдельно и в комбинации с ценобаматом в анализе АС-MES на мышах CF-1

Эффективность Соединения А и его фармакологическое взаимодействие с ценобаматом оценивали после перорального введения в тесте максимального электрошока у мышей при индукции переменным током (АС-MES) (см. пример 2).

Целью данного испытания была характеристика дозозависимой противосудорожной активности Соединения А и его фармакологического взаимодействия с ценобаматом в анализе АС-MES у мышей после однократного перорального введения соединений. Противосудорожная эффективность Соединения А и ценобамата, а также эффект комбинации Соединения А с ценобаматом были протестированы в анализе АС-MES на мышах-самцах CF-1 после однократного ПО введения. Были получены образцы плазмы и головного мозга, чтобы понять взаимосвязь между концентрацией препарата и эффективностью.

5.4.1 Материалы и методы

Соединение А, носители, составы доз и тест-системы, использованные в примере 4, были идентичны тем, которые использовались в примере 2 с заменой лакосамида ценобаматом.

Испытуемое соединение – Ценобамат

Название	Ценобамат
Номер серии	Серия 01
Физическое описание	Порошок белого цвета
Чистота	99,5%
Поставщик	Неизвестен

Схема эксперимента: Животные были распределены по экспериментальным группам, как указано в таблицах 18 и 19. Было проведено по четыре испытания с Соединением А и ценобаматом в каждом. Соответствующие данные испытания указаны в таблицах 18 и 19.

Таблица 18. Экспериментальные группы – Испытание 4А

Группа	Соединение	Доза (мг/кг)	Путь введения	Число мышей	Время после введения (ч)	Объем дозы (мл/кг)	Состав
1	Носитель	0	ПО	8	0,5	10	F2
2	Соединение А	1	ПО	8	0,5	10	F2
3	Соединение А	5	ПО	8	0,5	10	F2
4	Соединение А	10	ПО	8	0,5	10	F2

ПО: per os, перорально.

Таблица 19. Экспериментальные группы – Испытание 4В

Группа	Соединение	Доза (мг/кг)	Путь введения	Число мышей	Время после введения (ч)	Объем дозы (мл/кг)	Состав
1	Носитель	0	ПО	8	0,5	10	F2
2	Соединение А	5	ПО	8	0,5	10	F2
3	Соединение А	7,5	ПО	7	0,5	10	F2
4	Соединение А	10	ПО	9	0,5	10	F2

ПО: per os, перорально.

Таблица 20. Экспериментальные группы – Испытание 4С

Группа	Соединение	Доза (мг/кг)	Путь введения	Число мышей	Время после введения (ч)	Объем дозы (мл/кг)	Состав
1	Носитель	0	ПО	8	0,5	10	F2
2	Соединение А	3	ПО	8	0,5	10	F2

ПО: per os, перорально.

Таблица 21. Экспериментальные группы – Испытание 4F

Группа	Соединение	Доза (мг/кг)	Путь введения	Число мышей	Время после введения (ч)	Объем дозы (мл/кг)	Состав
1	Носитель	0	ПО	8	2	10	F2 + F1
2	Соединение А	2	ПО	8	0,5	10	F2 + F1
3	Ценобат	5	ПО	8	2	10	F2 + F1
4	Соединение А + Ценобат	2+5	ПО	8	0,5 + 2	10	F2 + F1

ПО: per os, перорально.

Таблица 22. Экспериментальные группы – Испытание 4D

Группа	Соединение	Доза (мг/кг)	Путь введения	Число мышей	Время после введения (ч)	Объем дозы (мл/кг)	Состав
1	Носитель	0	ПО	8	2	10	F1
2	Ценобатат	3	ПО	8	2	10	F1
3	Ценобатат	10	ПО	8	2	10	F1
4	Ценобатат	30	ПО	8	8	10	F1

ПО: per os, перорально.

Таблица 23. Экспериментальные группы – Испытание 4E

Группа	Соединение	Доза (мг/кг)	Путь введения	Число мышей	Время после введения (ч)	Объем дозы (мл/кг)	Состав
1	Носитель	0	ПО	8	2	10	F1
2	Ценобатат	3	ПО	7	2	10	F1
3	Ценобатат	5	ПО	7	2	10	F1
4	Ценобатат	7,5	ПО	8	8	10	F1

ПО: per os, перорально.

Таблица 24. Экспериментальные группы – Испытание 4G

Группа	Соединение	Доза (мг/кг)	Путь введения	Число мышей	Время после введения (ч)	Объем дозы (мл/кг)	Состав
1	Соединение А + Ценобатат	0,5+5	ПО	8	0,5+2	10	F2 + F1
2	Соединение А + Ценобатат	1+5	ПО	8	05+2	10	F2 + F1

ПО: per os, перорально.

Маскировка и рандомизация, клинические наблюдения, анализ AC-MES, сбор и подготовка образцов, анализ образцов плазмы и головного мозга, и методики биоанализа в примере 4 были идентичны тем, которые использовались в примере 2.

Образцы анализировали на Соединение А методом УВЭЖХ-МС/МС-спектроскопии высокого разрешения с использованием условий, перечисленных ниже.

Прибор: Sciex TQ-5500

Матрикс: Мышинная плазма (K₂ЭДТА)

Гомогенат головного мозга мыши

Анализируемое вещество: Соединение А

Внутренний стандарт (IS): (S)-5-хлор-4-((1-(5-хлор-2-фторфенил)этил)амино)-2-фтор-N-(пиразин-2-ил)бензолсульфонамид

Условия МС: ЭРИ: положительная

Соединение А: [M+H]⁺ m/z 369,2/247,2

(S)-5-хлор-4-((1-(5-хлор-2-фторфенил)этил)амино)-2-фтор-N-(пиразин-2-ил)бензолсульфонамид (IS): [M+H]⁺ m/z 458,793/157

Условия УВЭЖХ:

Время (мин)	%B
0,0	10
0,2	10
3,4	6
3,5	100

4,0	100
4,1	10
5,0	10

Подвижная фаза А: 0,1% муравьиная кислота в воде
 Подвижная фаза В: 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле
 Калибровочные стандарты: Готовили стандарты 2,34; 4,69; 9,38; 18,8; 37,5; 75,0; 150; 300; 600; 1200; 2400 и 4800 нг/мл для 4А, 4В и 4С.
 Готовили стандарты 0,586; 1,17; 2,34; 4,69; 9,38; 18,8; 37,5; 75,0; 150; 300; 600 и 1200 нг/мл для 4F.
 Готовили стандарты 0,293; 0,586; 1,17; 2,34; 4,69; 9,38; 18,8; 37,5; 75,0; 150; 300; 600 нг/мл для 4G.
 Образцы QC: Готовили образцы QC 14,0; 225 и 3600 нг/мл, анализировали в трех повторностях для 4А, 4В и 4С.
 Готовили образцы QC 3,5; 56,3 и 900 нг/мл, анализировали в трех повторностях для 4F.
 Готовили образцы QC 1,75; 28,1 и 450 нг/мл, анализировали в трех повторностях для 4G.

Образцы анализировали на наличие ценобамата методом УВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения с использованием условий, перечисленных ниже.

Прибор: Sciex TQ-5500
 Матрикс: Мышиная плазма (K₂ЭДТА)
 Гомогенат головного мозга мыши
 Анализируемое вещество: Ценобамат
 Внутренний стандарт (IS): (2*S*,5*R*)-5-(4-((2-фторбензил)окси)фенил)пирролидин-2-карбоксамид (4F, 4G);
трет-бутил (2-(азетидин-1-илметил)бензил)(3,5-дифтор-4-(*N*-(тиазол-4-ил)сульфамойл)фенил)карбамат (4D, 4E)
 Условия МС: ЭРИ: положительная
 Ценобамат: [M+H]⁺ m/z 267,8/155,1
 (2*S*,5*R*)-5-(4-((2-фторбензил)окси)фенил)пирролидин-2-карбоксамид (IS): [M+H]⁺ m/z 315,1/108,9
трет-бутил (2-(азетидин-1-илметил)бензил)(3,5-дифтор-4-(*N*-(тиазол-4-ил)сульфамойл)фенил)карбамат (IS): [M+H]⁺ m/z 551,1/214

Условия УВЭЖХ:	Время (мин)	% В
	0,0	20
	0,6	20
	1,00	100
	1,50	100
	1,60	20
	2,5	20

А: 0,1% муравьиная кислота в воде
 В: 0,1% муравьиная кислота в ацетонитриле
 Калибровочные стандарты: Готовили стандарты 2,34; 4,69; 9,38; 18,8; 37,5; 75,0; 150; 300; 600; 1200; 2400 и 4800 нг/мл для 4F, 4D, 4E и 4G.
 Образцы QC: Готовили образцы QC 14,0; 225 и 3600 нг/мл, анализировали в трех повторностях для 4F, 4D, 4E и 4G.

Определение концентрации образцов, обработка и анализ данных в примере 4 были идентичны примеру 2.

5.4.2 Результаты

Биоанализ: Все тесты на пригодность системы (SST), контроль качества, матрикс и холостые пробы растворителя соответствовали критериям приемлемости, описанным в SOP MTD-066. Нижний предел количественного определения (LLOQ) и верхний предел количественного определения (ULOQ) для Соединения А и ценобамата приведены в таблице 25.

Таблица 25. LLOQ и ULOQ для Соединения А и ценобамата

Испытание	Соединение	LLOQ	ULOQ
4A	Соединение А	4,68	4800
4B	Соединение А	4,68	4800
4C	Соединение А	2,34	4800
4F	Соединение А	0,586	1200
4F	Ценобамат	2,34	4800
4D	Ценобамат	4,68	4800
4E	Ценобамат	2,34	4800
4G	Соединение А	0,293	600
4G	Ценобамат	2,34	4800

LLOQ: нижний предел количественного определения. ULOQ: верхний предел количественного определения

Эффективность в испытании AC-MES: Результаты испытания судорог, индуцированных AC-MES, у мышей представлены в таблицах с 26 по 32 и на фиг. 17, фиг. 18 и фиг. 19.

Соединение А отдельно: Данные об ответе на дозу и концентрацию Соединения А обобщены на фиг. 17, в таблице 26, таблице 27 и таблице 28. Во всех трех испытаниях эффективности (4A, 4B, 4C и 4F) у 100% мышей CF-1, получавших носитель, наблюдался тонический приступ с разгибанием задних конечностей. В испытании 4A (при дозе 1 мг/кг, n=8; 5 мг/кг, n=8; и 10 мг/кг, n=8) доля животных, у которых наблюдалась тоническая судорожная реакция на стимул AC-MES после предварительного введения Соединения А за 30 минут, снизилась с 8/8 (средняя концентрация в плазме 0,08 мкМ; 1 мг/кг) до 7/8 (средняя концентрация в плазме 0,28 мкМ; 5 мг/кг) и до 3/8 (средняя концентрация в плазме 0,37 мкМ; 10 мг/кг). В испытании 4B (5 мг/кг, n=8; 7,5 мг/кг, n=7 и 10 мг/кг, n=9), дозы Соединения А 5 мг/кг (средняя концентрация в плазме 0,47 мкМ) и 10 мг/кг (средняя концентрация в плазме 0,55 мкМ) показали высокую эффективность (судороги у 0/8 и 1/9 животных, соответственно). В испытании 4C (3 мг/кг, n=8) при введении Соединения А в дозе 3 мг/кг у 2/8 животных наблюдался приступ при концентрации в плазме 0,28 мкМ. В испытании 4F (2 мг/кг, n=8) при дозе 2 мг/кг у 5/8 животных наблюдался приступ при концентрации в плазме 0,11 мкМ. Во всех испытаниях эффективности, за исключением 4F, разница между группами, получавшими Соединение А, и группами, получавшими носитель, достигла статистической значимости (р-значения

показаны на фиг. 17).

У одной мыши из группы, получавшей 10 мг/кг в испытании 4А, и у трех мышей в испытании 4В (две мыши из группы, получавшей 10 мг/кг, и одна мышь из группы, получавшей 7,5 мг/кг) проявлялись поведенческие признаки (тремор, снижение активности и разведенные задние конечности) (концентрации в плазме: 4А: 0,39 мкМ; 4В: 10 мг/кг: 0,61 и 0,52 мкМ; 7,5 мг/кг: 0,75 мкМ).

Составная кривая концентрация-эффект для Соединения А из трех испытаний показала EC_{50} для плазмы 0,30 мкМ и EC_{50} для мозговой ткани 0,47 мкМ (фиг. 17). Концентрации Соединения А, достигаемые в ткани головного мозга и плазме, проявляли линейную зависимость от дозы (фиг. 17).

Ценобамат отдельно: Перед тестированием Соединения А в комбинации с ценобаматом на модели АС-MES (испытания 4F и 4G) мы протестировали ценобамат по отдельности в различных дозах, чтобы установить полный дозозависимый эффект. Данные о зависимости ответа от дозы и концентрации ценобамата обобщены на фиг. 18, в таблице 29 и таблице 30. Каждая из семи доз ценобамата была протестирована на модели АС-MES отдельно (испытание 4D: 3 мг/кг, 10 мг/кг и 30 мг/кг, $n=8$ на группу; испытание 4Е: 3 мг/кг, 5 мг/кг и 7,5 мг/кг, $n=8$; и испытание 4F: 5 мг/кг, $n=8$) и как часть испытаний. Через два часа после введения ценобамата в дозах 3 мг/кг ($n=15$), 5 мг/кг ($n=7$), 7,5 мг/кг ($n=7$), 10 мг/кг ($n=8$) и 30 мг/кг ($n=8$) через пероральный зонд мышей-самцов CF-1 подвергали стимуляции АС-MES. Ценобамат проявлял дозозависимый и зависимый от концентрации эффект против тонических судорог, вызванных АС-MES: у 3/7 животных отмечены судороги при 7,5 мг/кг (средняя концентрация в плазме 78,1 мкМ), у 1/8 животных отмечены судороги при 10 мг/кг (средняя концентрация в плазме 87 мкМ), у 0/8 животных отмечены судороги при 30 мг/кг (средняя концентрация в плазме 24 мкМ) и минимальный эффект при более низких дозах 3 и 5 мг/кг. Данные из всех 3 испытаний (4D, 4Е и 4F) были объединены для анализа кривой концентрация-эффект для ценобамата от дозы при отдельном введении (фиг. 18). Кривая концентрация-эффект для ценобамата показала, что EC_{50} для плазмы составляет 70,5 мкМ, а EC_{50} для ткани головного мозга - 25,2 мкМ.

Комбинация Соединения А и ценобамата: На основании испытаний зависимости доза-эффект была выбрана доза ценобамата 5 мг/кг и дозы 0,5; 1 и 2 мг/кг Соединения А, которые показали минимальную эффективность при отдельном введении для испытания комбинации на модели АС-MES.

Данные испытаний комбинаций обобщены на фиг. 19, в таблице 31 и таблице 32. Мы провели два испытания с комбинациями: 4F (Соединение А в дозе 2 мг/кг в

комбинации с ценобаматом в дозе 5 мг/кг) и 4G (Соединение А в дозах 0,5 и 1 мг/кг в комбинации с ценобаматом в дозе 5 мг/кг). Комбинация Соединения А (0,5; 1 и 2 мг/кг ПО, с введением за 0,5 часа до АС-MES) с ценобаматом (5 мг/кг ПО, введение за 2 часа до АС-MES) у самцов мышей CF-1 показала судороги у 2/8 животных при введении Соединения А в дозе 0,5 мг/кг, у 1/8 животных при введении 1 мг/кг Соединения А и у 0/8 животных при введении 2 мг/кг Соединения А, по сравнению с частичным эффектом или отсутствием эффекта при введении Соединения А (у 5/8 животных, получавших только Соединение А в дозе 2 мг/кг) или ценобамата по отдельности (у 8/8 животных, получавших только ценобамат в дозе 5 мг/кг). В испытании 4F концентрации Соединения А в плазме (средняя концентрация в плазме при 2 мг/кг: 0,11 мкМ при введении отдельно и 0,29 мкМ при введении в комбинации) и ценобамата (средняя концентрация в плазме при 5 мг/кг: 31,3 мкМ при введении отдельно и 38,9 мкМ при введении в комбинации) были немного выше при введении в комбинации по сравнению с введением по отдельности. В испытании 4G достигнутые средние суммарные концентрации в плазме составили: Соединение А в комбинации в дозе 0,5 мг/кг: 0,03 мкМ; Соединение А в комбинации в дозе 1 мг/кг: 0,11 мкМ; ценобамат в комбинации в дозе 5 мг/кг (+0,5 мг/кг Соединения А): 41,1 мкМ; ценобамат в комбинации в дозе 5 мг/кг (+1 мг/кг Соединения А): 39,7 мкМ. Кривая концентрация-эффект для Соединения А и ценобамата, введенных в комбинации, показала экстраполированное значение EC_{50} для плазмы, равное 0,01 мкМ, и для ткани головного мозга, равное 0,03 мкМ для Соединения А.

Таблица 26. Испытание 4А: Краткое описание противосудорожных эффектов Соединения А у мышей в испытании АС-MES после однократного перорального введения

Название и доза соединения	Среднее для плазмы (мкМ)	Среднее для головного мозга (мкМ)	Отношение В/Р	Доля мышей с судорогами	Доля мышей с поведенческими признаками
Носитель	n/a	n/a	n/a	8/8	0/8
Соединение А (1 мг/кг)	0,08	0,15	1,85	8/8	0/8
Соединение А (5 мг/кг)	0,28	0,40	1,45	7/8	0/8
Соединение А (10 мг/кг)	0,37	0,50	1,36	3/8	1/8

В/Р: соотношение в мозге и плазме; n/a: неприменимо.

Таблица 27. Испытание 4В: Краткое описание противосудорожных эффектов Соединения А у мышей в испытании АС-MES после однократного перорального введения

Название и доза соединения	Среднее для плазмы (мкМ)	Среднее для головного мозга (мкМ)	Отношение мозг/плазма	Доля мышей с судорогами	Доля мышей с поведенческими признаками
Носитель	n/a	n/a	n/a	8/8	0/8

Соединение А (5 мг/кг)	1	0,71	1,51	0/8	0/8
Соединение А (7,5 мг/кг)	0,53	0,87	1,64	0/7	1/7
Соединение А (10 мг/кг)	0,55	0,91	1,64	1/9	2/9

В/Р: соотношение в мозге и плазме; n/a: неприменимо.

Таблица 28. Испытание 4С: Краткое описание противосудорожных эффектов Соединения А у мышей в испытании АС-MES после однократного перорального введения

Название и доза соединения	Среднее для плазмы (мкМ)	Среднее для головного мозга (мкМ)	Отношение мозг/плазма	Доля мышей с судорогами	Доля мышей с поведенческими признаками
Носитель	n/a	n/a	n/a	8/8	0/8
Соединение А (3 мг/кг)	0,28	0,51	1,79	2/8	0/8

В/Р: соотношение в мозге и плазме; n/a: неприменимо.

Таблица 29. Испытание 4D: Краткое описание противосудорожных эффектов ценобамата у мышей в испытании АС-MES после однократного перорального введения

Название и доза соединения	Среднее для плазмы (мкМ)	Среднее для головного мозга (мкМ)	Отношение В/Р	Доля мышей с судорогами	Доля мышей с поведенческими признаками
Носитель	n/a	n/a	n/a	8/8	0/8
Соединение А (3 мг/кг)	29,6	8,70	0,29	8/8	0/8
Соединение А (10 мг/кг)	87,0	26,8	0,31	1/8	0/8
Соединение А (30 мг/кг)	237	71,3	0,30	0/8	0/8

В/Р: соотношение в мозге и плазме; n/a: неприменимо.

Таблица 30. Испытание 4Е: Краткое описание противосудорожных эффектов ценобамата у мышей в испытании АС-MES после однократного перорального введения

Название и доза соединения	Среднее для плазмы (мкМ)	Среднее для головного мозга (мкМ)	Отношение В/Р	Доля мышей с судорогами	Доля мышей с поведенческими признаками
Носитель	n/a	n/a	n/a	8/8	0/8
Ценобамат (3 мг/кг)	27,7	12,2	0,44	6/7	0/8
Ценобамат (5 мг/кг)	53,6	22,1	0,41	6/7	0/8
Ценобамат (7,5 мг/кг)	78,1	34,5	0,44	3/8	0/8

В/Р: соотношение в мозге и плазме; n/a: неприменимо.

Таблица 31. Испытание 4F: Краткое описание противосудорожных эффектов Соединения А в комбинации с ценобаматом у мышей в испытании АС-MES после однократного перорального введения

Название и доза соединения	Среднее для плазмы (мкМ)	Среднее для головного мозга (мкМ)	Отношение В/Р	Доля мышей с судорогами	Доля мышей с поведенческими признаками
Носитель	п/а	п/а	п/а	8/8	0/8
Соединение А (2 мг/кг)	0,11	0,25	2,32	5/8	0/8
Ценобамат (5 мг/кг)	31,3	12,0	0,38	8/8	0/8
Соединение А + Ценобамат (2+5)	0,29 + 38,9	0,67 + 14,7	2,34 + 0,38	0/8	0/8

В/Р: соотношение в мозге и плазме; п/а: неприменимо.

Таблица 32. Испытание 4G: Краткое описание противосудорожных эффектов Соединения А в комбинации с ценобаматом у мышей в испытании АС-MES после однократного перорального введения

Название и доза соединения	Среднее для плазмы (мкМ)	Среднее для головного мозга (мкМ)	Отношение В/Р	Доля мышей с судорогами	Доля мышей с поведенческими признаками
Соединение А + Ценобамат (0,5 мг/кг + 5 мг/кг)	0,03 + 41,1	0,09 + 18,1	3,22 + 0,44	2/8	0/8
Соединение А + Ценобамат (1 мг/кг + 5 мг/кг)	0,11 + 39,7	0,30 + 17,0	2,76 + 0,43	1/8	0/8

5.4.3 Выводы

Соединение А и ценобамат продемонстрировали эффективность, зависящую от концентрации, в анализе АС-MES на мышах CF-1. Значения EC_{50} Соединения А в плазме и головном мозге, полученные на основе анализа кривой концентрация-эффект, составили 0,30 мкМ и 0,47 мкМ, соответственно. Составная кривая концентрация-эффект для Соединения А и ценобамата, введенных в комбинации, показала, что EC_{50} для плазмы составляет 0,01 мкМ, а для мозговой ткани - 0,03 мкМ для Соединения А. Результаты показывают увеличение активности Соединения А в 33,3 раза и в 14,2 раза для плазмы и ткани головного мозга, соответственно, при введении в комбинации с ценобаматом.

Каждая из шести пероральных доз Соединения А была протестирована в анализе АС-MES. Через тридцать минут после введения Соединения А в дозах 1 мг/кг (n=8), 2 мг/кг (n=8), 3 мг/кг (n=8), 5 мг/кг (n=16), 7,5 мг/кг (n=7) и 10 мг/кг (n=17) через пероральный зонд самцов мышей CF-1 подвергали электрическому стимулу роговицы частотой 60 Гц (продолжительность 0,2 секунды, 40 мА). Этот стимул вызывал

тоническое разгибание задних конечностей у всех животных, получавших дозу носителя. Любое животное, которое не демонстрировало разгибания задних конечностей в ответ на электрический стимул, считалось защищенным. Наблюдательная неврологическая оценка (качественный тест) также была проведена во время тестирования в качестве проверки переносимости. У всех животных были взяты конечные образцы плазмы и головного мозга, чтобы определить уровни концентраций Соединения А и ценобамата, а также понять взаимосвязь между эффективностью и концентрацией лекарственного средства.

После однократного ПО введения Соединение А продемонстрировало зависящий от концентрации эффект против тонических судорог, индуцированных АС-MES, с максимальным эффектом у 0/8 животных при концентрации в плазме 0,470 мкМ (из испытания 4В при 5 мг/кг). В испытании 4А (при дозе 1 мг/кг, n=8; 5 мг/кг, n=8; и 10 мг/кг, n=8) доля животных, у которых наблюдалась тоническая судорожная реакция на стимул АС-MES спустя 30 минут после введения Соединения А, снизилась с 8/8 (средняя концентрация в плазме 0,08 мкМ; 1 мг/кг) до 7/8 (средняя концентрация в плазме 0,28 мкМ; 5 мг/кг) и до 3/8 (средняя концентрация в плазме 0,37 мкМ; 10 мг/кг). В испытании 4В (5 мг/кг, n=8; 7,5 мг/кг, n=7 и 10 мг/кг, n=9), 5 мг/кг (средняя концентрация в плазме 0,47 мкМ) и 10 мг/кг (средняя концентрация в плазме 0,55 мкМ) Соединение А показало высокую эффективность (судороги у 0/8 и 1/9 животных, соответственно). В испытании 4С (3 мг/кг, n=8) при введении Соединения А в дозе 3 мг/кг у 2/8 животных наблюдался приступ при концентрации в плазме 0,28 мкМ. В испытании 4F (2 мг/кг, n=8) при дозе 2 мг/кг у 5/8 животных наблюдался приступ при концентрации в плазме 0,11 мкМ. Во всех испытаниях эффективности, за исключением 4F, разница между группами, получавшими Соединение А, и группами, получавшими носитель, достигала статистической значимости (значения p показаны на фиг. 17). Данные всех четырех испытаний были объединены для анализа кривой концентрация-ответ для Соединения А при отдельном введении. Кривая зависимости концентрация-ответ для Соединения А показала полумаксимальную эффективную концентрацию (EC₅₀) для плазмы, равную 0,30 мкМ, и EC₅₀ для ткани головного мозга, равную 0,47 мкМ.

У одной мыши из группы, получавшей 10 мг/кг в испытании 4А, и у трех мышей в испытании 4В (две мыши из группы, получавшей 10 мг/кг, и у одной мыши из группы, получавшей 7,5 мг/кг) проявлялись поведенческие признаки (тремор, снижение активности и разведенные задние конечности) (концентрации в плазме: 4А: 0,39 мкМ; 4В: 10 мг/кг: 0,61 и 0,52 мкМ, 7,5 мг/кг: 0,75 мкМ).

Перед тестированием Соединения А в комбинации с ценобаматом на модели АС-MES ценобамат тестировали отдельно в различных дозах для установления полного

дозозависимого эффекта. Каждая из семи доз ценобамата была протестирована на модели АС-MES отдельно (испытание 4D: 3 мг/кг, 10 мг/кг и 30 мг/кг, $n=8$ на группу; испытание 4E: 3 мг/кг, 5 мг/кг и 7,5 мг/кг, $n=8$; и испытание 4F: 5 мг/кг, $n=8$) и как часть испытаний. Через два часа после введения ценобамата в дозах 3 мг/кг ($n=15$), 5 мг/кг ($n=7$), 7,5 мг/кг ($n=7$), 10 мг/кг ($n=8$) и 30 мг/кг ($n=8$) через пероральный зонд мышей-самцов CF-1 подвергали стимуляции АС-MES. Ценобамат продемонстрировал зависящую от дозы и концентрации эффективность против тонических судорог, индуцированных АС-MES: у 3/7 животных судороги отмечены при дозе 7,5 мг/кг (средняя концентрация в плазме 78,1 мкМ), у 1/8 животных судороги отмечены при дозе 10 мг/кг (средняя концентрация в плазме 87 мкМ), у 0/8 животных судороги отмечены при дозе 30 мг/кг (средняя концентрация в плазме крови 237 мкМ). Более низкие дозы 3 и 5 мг/кг оказывали минимальный эффект при судорогах у 7/8 животных. Доля животных с судорогами в группе, получавшей ценобамат, в 2/3 испытаний значительно отличалась от группы, получавшей носитель (значения p показаны на фиг. 18). Данные из всех 3 испытаний (4D, 4E и 4F) были объединены для анализа кривой концентрация-эффект для ценобамата при отдельном введении. Кривая концентрация-эффект для ценобамата показала, что EC_{50} для плазмы составляет 70,5 мкМ, а EC_{50} для ткани головного мозга - 25,2 мкМ.

На основании испытаний зависимости доза-эффект была выбрана доза 5 мг/кг ценобамата и 0,5; 1 и 2 мг/кг Соединения А, которая показала минимальную эффективность при дозировании по отдельности для испытания комбинаций на модели АС-MES.

Были проведены два испытания с комбинациями: 4F (Соединение А в дозе 2 мг/кг в комбинации с ценобаматом в дозе 5 мг/кг) и 4G (Соединение А в дозах 0,5 и 1 мг/кг в комбинации с ценобаматом в дозе 5 мг/кг). При введении комбинации Соединения А (0,5; 1 и 2 мг/кг ПО, за 0,5 часа до индукции АС-MES) с ценобаматом (5 мг/кг ПО, за 2 часа до индукции АС-MES) у самцов мышей CF-1 судороги отмечены у 2/8 животных при введении Соединения А в дозе 0,5 мг/кг, у 1/8 животных при введении 1 мг/кг Соединения А и у 0/8 животных при введении 2 мг/кг Соединения А, по сравнению с 5/8 животных, получавших только Соединение А в дозе 2 мг/кг, или у 8/8 животных, получавших только ценобамат в дозе 5 мг/кг. В испытании 4F разница между группой, получавшей ценобамат, и группой с введением комбинации была статистически значимой, тогда как разница между группой, получавшей Соединение А, и группой с введением комбинации не была статистически значимой. В испытании 4G разница между группой носителя и группами с введением комбинации была статистически значимой (примечание: контрольная группа носителя и контрольные группы с однократной дозой Соединения А и

ценобамата в этом испытании не использовались; значения p показаны на фиг. 19). В испытании 4F концентрации Соединения А в плазме (средняя концентрация в плазме при 2 мг/кг: 0,11 мкМ при отдельном введении и 0,29 мкМ при введении в комбинации) и ценобамата (средняя концентрация в плазме при 5 мг/кг: 31,3 мкМ при отдельном введении и 38,9 мкМ при введении в комбинации) были немного выше при введении в комбинации по сравнению с введением по отдельности. В испытании 4G достигнутые средние суммарные концентрации в плазме составили: Соединение А при введении комбинации в 0,5 мг/кг: 0,03 мкМ; Соединение А при введении комбинации в 1 мг/кг: 0,11 мкМ; ценобамат при введении в комбинации в 5 мг/кг (Соединение А в дозировке 0,5 мг/кг): 41,1 мкМ; ценобамат в комбинации в дозе 5 мг/кг (1 мг/кг Соединения А): 39,7 мкМ.

Составная кривая концентрация-эффект для Соединения А и ценобамата, введенных в комбинации, показала экстраполированное значение EC_{50} Соединения А для плазмы, равное 0,01 мкМ, и для ткани головного мозга, равное 0,03 мкМ. Результаты показывают увеличение активности Соединения А в 33,3 раза и в 14,2 раза для плазмы и ткани головного мозга, соответственно, при введении в комбинации с ценобаматом.

Все патенты США, публикации по заявкам на патенты США, заявки на патенты США, иностранные патенты, иностранные патентные заявки и непатентные публикации, упомянутые в настоящем описании, включая непатентную заявку США № 63/147,736, поданную 9 февраля 2021, включены в настоящий документ путем ссылки во всей полноте.

Хотя вышеупомянутые композиции, способы и применения были описаны довольно подробно для облегчения понимания, будет очевидно, что определенные изменения и модификации могут быть осуществлены в рамках прилагаемой формулы изобретения. Соответственно, описанные варианты осуществления следует рассматривать как иллюстративные, а не ограничительные, и заявленное изобретение не должно ограничиваться приведенными здесь деталями, но может быть изменено в пределах объема и эквивалентов прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение А для применения при лечении судорожного расстройства у нуждающегося в этом человека, включающее совместное введение Соединения А и противосудорожного лекарственного средства (ASM) человеку в количествах, которые являются терапевтически эффективными при совместном введении;

где Соединение А представляет собой N-[4-(6-фтор-3,4-дигидро-1Н-изохинолин-2-ил)-2,6-диметилфенил]-3,3-диметилбутанамид.

2. Соединение А для применения с целью уменьшения количества противосудорожного лекарственного средства (ASM), которое требуется для терапевтической эффективности у человека, страдающего судорожным расстройством, включающее введение человеку, совместно с ASM, количества Соединения А, которое является эффективным для достижения такого уменьшения при введении вместе с ASM;

где Соединение А представляет собой N-[4-(6-фтор-3,4-дигидро-1Н-изохинолин-2-ил)-2,6-диметилфенил]-3,3-диметилбутанамид.

3. Соединение А для применения с целью снижения количества Соединения А, которое требуется для терапевтической эффективности у человека, страдающего судорожным расстройством, включающее введение человеку совместно с Соединением А количества противосудорожного лекарственного средства (ASM), которое является эффективным для достижения такого снижения при введении с Соединением А;

где Соединение А представляет собой N-[4-(6-фтор-3,4-дигидро-1Н-изохинолин-2-ил)-2,6-диметилфенил]-3,3-диметилбутанамид.

4. Соединение А для применения по любому из пп. 1-3, которое включает усиление открытия калиевого канала Kv7 у человека.

5. Соединение А для применения с целью усиления открытия калиевого канала Kv7 у человека, включающего совместное введение Соединения А и противосудорожного лекарственного средства (ASM) человеку в количествах, которые являются терапевтически эффективными при совместном введении;

где Соединение А представляет собой N-[4-(6-фтор-3,4-дигидро-1Н-изохинолин-2-ил)-2,6-диметилфенил]-3,3-диметилбутанамид; и

где у человека имеется судорожное расстройство.

6. Соединение А для применения по п. 4 или п. 5, где калиевый канал Kv7 представляет собой один или несколько из Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4 или Kv7.5.

7. Соединение А для применения по п. 6, которое является селективным для усиления открытия одного или нескольких из Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4 или Kv7.5 по сравнению с Kv7.1.

8. Соединение А для применения по п. 4 или п. 5, которое включает открытие калиевого канала Kv7.2/Kv7.3 (KCNQ2/3).

9. Соединение А для применения по любому из пп. 1-8, где ASM представляет собой бензодиазепин, карбамазепин, ценобамат, фелбамат, габапентин, лакосамид, ламотриджин, леветирацетам, окскарбазепин, фенобарбитал, фенитоин, прегабалин, руфинамид, тиагабин, топирамат, вальпроевую кислоту, вигабатрин, зонисамид или их комбинацию.

10. Соединение А для применения по любому из пп. 1-9, где ASM представляет собой вальпроевую кислоту, леветирацетам, фенитоин, лакосамид или ценобамат.

11. Соединение А для применения по любому из пп. 1-10, где ASM не усиливает открытие калиевого канала Kv7 у человека.

12. Соединение А для применения по любому из пп. 1-11, где ASM уменьшает возбуждение нейронов у человека.

13. Соединение А для применения по п. 12, где ASM уменьшает возбуждение нейронов путем блокирования натриевого канала у человека.

14. Соединение А для применения по п. 12, где ASM уменьшает возбуждение нейронов путем блокирования кальциевого канала у человека.

15. Соединение А для применения по п. 12, где ASM уменьшает возбуждение нейронов путем связывания с гликопротеином 2A синаптических везикул (SV2A) у человека.

16. Соединение А для применения по любому из пп. 1-11, где ASM усиливает нейрональное торможение у человека.

17. Соединение А для применения по любому из пп. 1-11, где ASM является глутаматергическим агентом.

18. Соединение А для применения по любому из пп. 1-11, где ASM является ГАМКергическим агентом.

19. Соединение А для применения по любому из пп. 1-18, где судорожное расстройство связано с дисфункцией калиевого канала Kv7.

20. Соединение А для применения по любому из пп. 1-19, где судорожным расстройством является эпилепсия с фокальным началом.

21. Соединение А для применения по любому из пп. 1-20, где Соединение А перорально вводят человеку.

22. Соединение А для применения по любому из пп. 1-21, где ASM перорально вводят человеку.

23. Соединение А для применения по любому из пп. 1-22, где Соединение А вводят

человеку в дозе от 1 до 200 мг.

24. Соединение А для применения по любому из пп. 1-23, где Соединение А вводят человеку в дозе от 2 до 100 мг.

25. Соединение А для применения по любому из пп. 1-24, где Соединение А вводят человеку в дозе от 5 до 50 мг.

26. Соединение А для применения по любому из пп. 1-25, где Соединение А вводят человеку в дозе 5, 10, 15, 20 или 25 мг.

27. Соединение А для применения по любому из пп. 1-26, где Соединение А вводят человеку в дозе 20 мг.

28. Соединение А для применения по любому из пп. 1-22, где Соединение А вводят человеку в дозе по меньшей мере 10 мг.

29. Соединение А для применения по п. 28, где Соединение А вводят человеку в дозе по меньшей мере 20 мг.

30. Соединение А для применения по п. 28, где Соединение А вводят человеку в дозе по меньшей мере 50 мг.

31. Соединение А для применения по любому из пп. 1-22, где Соединение А вводят человеку в дозе 5-1000 мг в сутки.

32. Соединение А для применения по п. 31, где Соединение А вводят человеку в дозе 5-500 мг в сутки.

33. Соединение А для применения по п. 31, где Соединение А вводят человеку в дозе 5-250 мг в сутки.

34. Соединение А для применения по п. 31, где Соединение А вводят человеку в дозе 20-150 мг в сутки.

35. Соединение А для применения по п. 31, где Соединение А вводят человеку в дозе 100 мг в сутки.

36. Соединение А для применения по любому из пп. 1-22, где Соединение А вводят человеку в дозе 0,01-2,0 мг/кг.

37. Соединение А для применения по п. 36, где Соединение А вводят человеку в дозе 0,03-1,0 мг/кг.

38. Соединение А для применения по п. 36, где Соединение А вводят человеку в дозе 0,05-0,5 мг/кг.

39. Соединение А для применения по любому из пп. 1-38, где Соединение А перорально вводят человеку в интервале примерно от 30 минут до приема пищи и до примерно 2 часов после приема пищи.

40. Соединение А для применения по п. 39, где Соединение А перорально вводят

человеку во время приема пищи или в течение 15 минут после приема пищи.

41. Соединение А для применения по любому из пп. 1-40, где ASM представляет собой вальпроевую кислоту.

42. Соединение А для применения по п. 41, где вальпроевую кислоту вводят человеку в дозе 2-16 мг/кг.

43. Соединение А для применения по п. 41, где вальпроевую кислоту вводят человеку в дозе 4-12 мг/кг.

44. Соединение А для применения по любому из пп. 1-40, где ASM представляет собой фенитоин.

45. Соединение А для применения по п. 44, где фенитоин вводят человеку в дозе 0,05-5 мг/кг.

46. Соединение А для применения по п. 44, где фенитоин вводят человеку в дозе 0,1-1 мг/кг.

47. Соединение А для применения по любому из пп. 1-40, где ASM представляет собой лакосамид.

48. Соединение А для применения по п. 47, где лакосамид вводят человеку в дозе 0,1-5 мг/кг.

49. Соединение А для применения по п. 47, где лакосамид вводят человеку в дозе 0,5-1 мг/кг.

50. Соединение А для применения по любому из пп. 1-40, где ASM представляет собой ценобамат.

51. Соединение А для применения по п. 50, где ценобамат вводят человеку в дозе 0,05-5 мг/кг.

52. Соединение А для применения по п. 50, где ценобамат вводят человеку в дозе 0,1-1 мг/кг.

53. Соединение А для применения по любому из пп. 1-52, где совместное введение Соединения А и ASM обеспечивает повышенную эффективность по сравнению с отдельным введением Соединения А или ASM.

54. Фармацевтическая композиция, содержащая Соединение А, противосудорожное лекарственное средство (ASM) и фармацевтически приемлемый носитель;

где Соединение А представляет собой N-[4-(6-фтор-3,4-дигидро-1H-изохинолин-2-ил)-2,6-диметилфенил]-3,3-диметилбутанамид.

55. Фармацевтическая композиция по п. 54, где ASM представляет собой бензодиазепин, карбамазепин, ценобамат, фелбамат, габапентин, лакосамид,

ламотриджин, леветирацетам, окскарбазепин, фенобарбитал, фенитоин, прегабалин, руфинамид, тиагабин, топирамат, вальпроевую кислоту, вигабатрин, зонисамид или их комбинацию.

56. Фармацевтическая композиция по п. 55, где ASM представляет собой вальпроевую кислоту, фенитоин, леветирацетам, лакосамид или ценобамат.

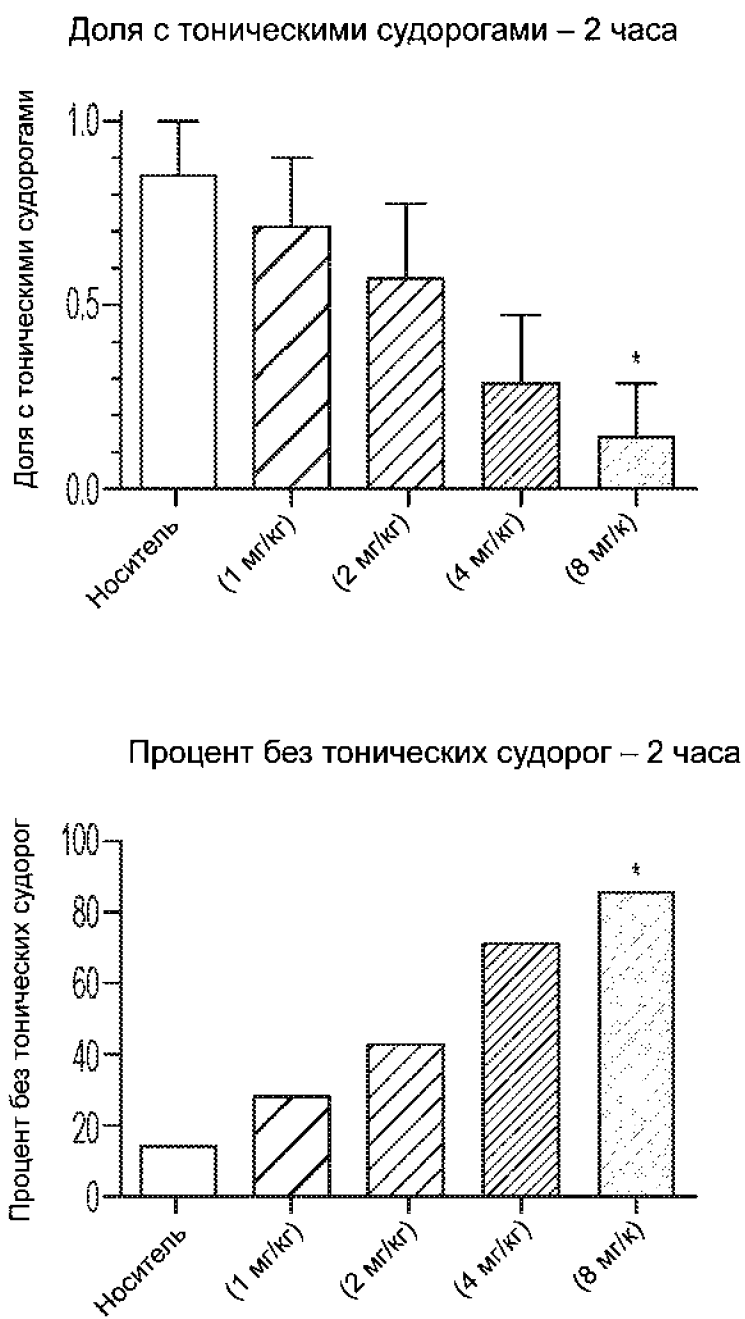
57. Фармацевтическая композиция по п. 56, где ASM представляет собой вальпроевую кислоту.

58. Фармацевтическая композиция по п. 56, где ASM представляет собой фенитоин.

59. Фармацевтическая композиция по п. 56, где ASM представляет собой леветирацетам.

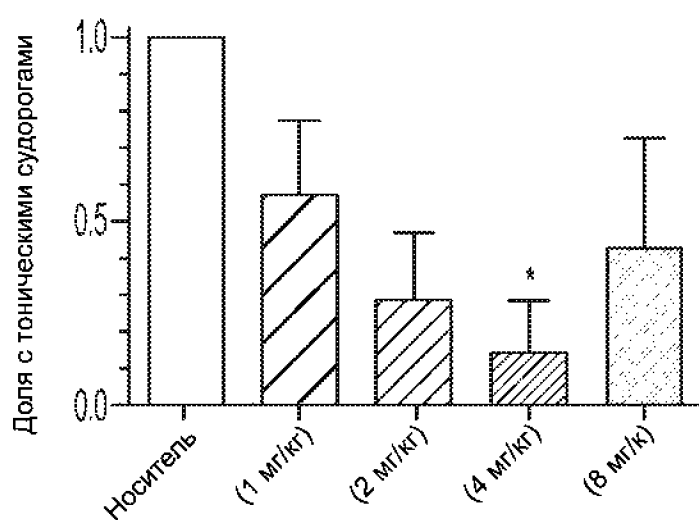
60. Фармацевтическая композиция по п. 56, где ASM представляет собой лакосамид.

61. Фармацевтическая композиция по п. 56, где ASM представляет собой ценобамат.

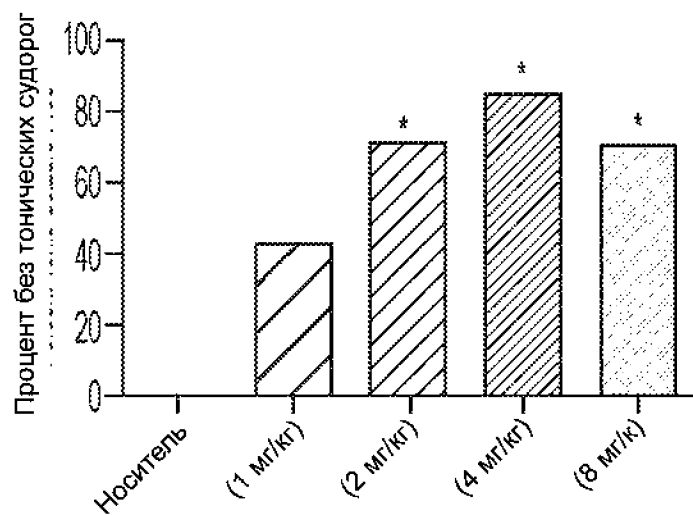


Фиг. 1

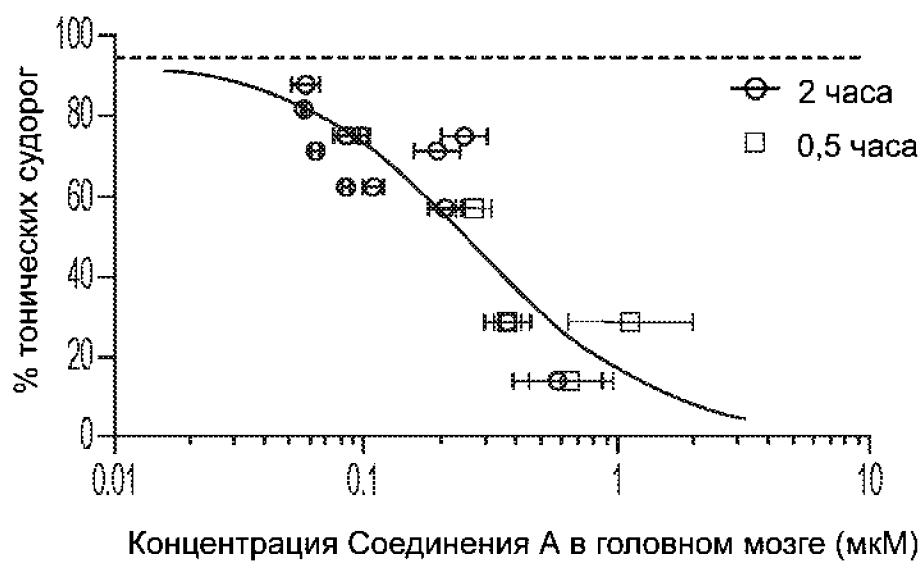
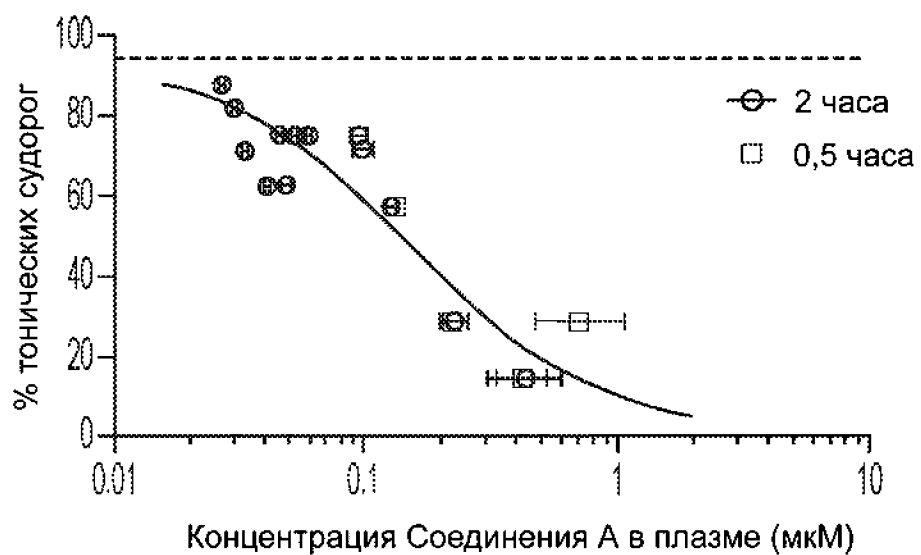
Количество с тоническими судорогами – 0,5 часа



Процент без тонических судорог – 0,5 часа

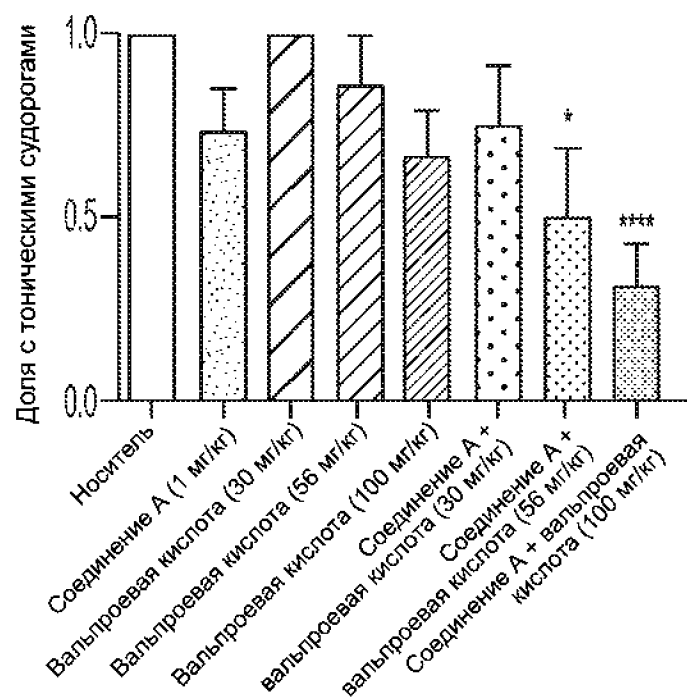


Фиг. 2

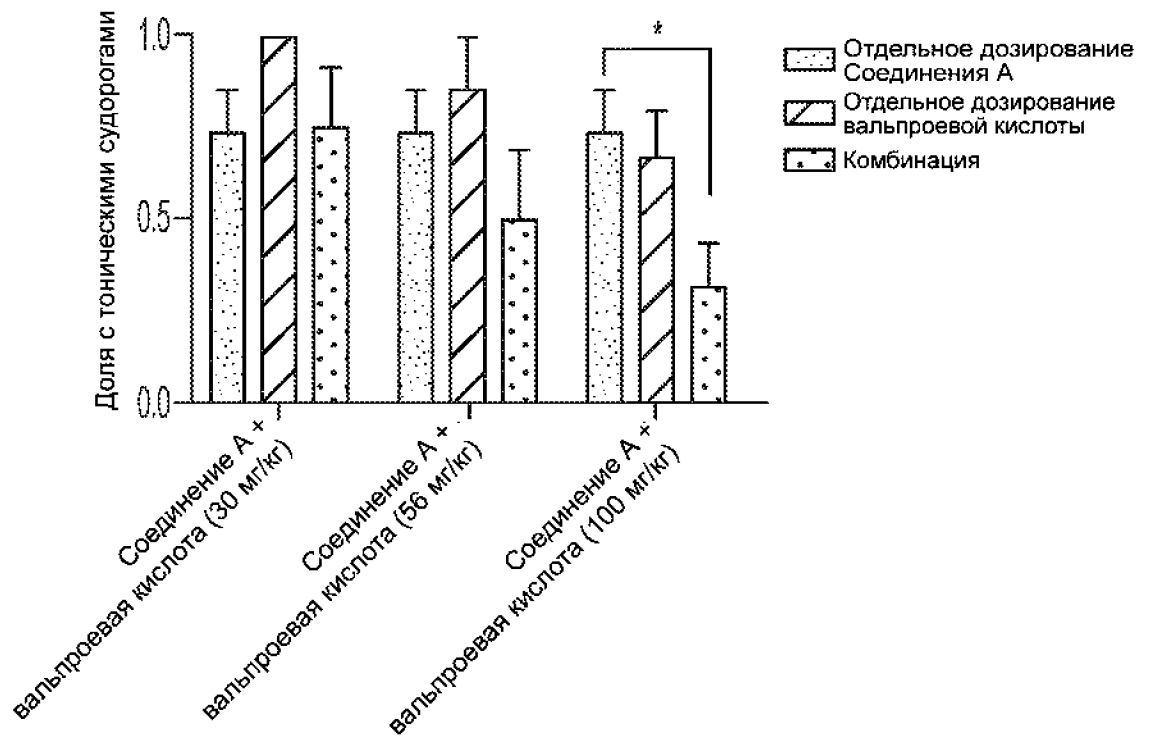


Фиг. 3

Доля с тоническими судорогами

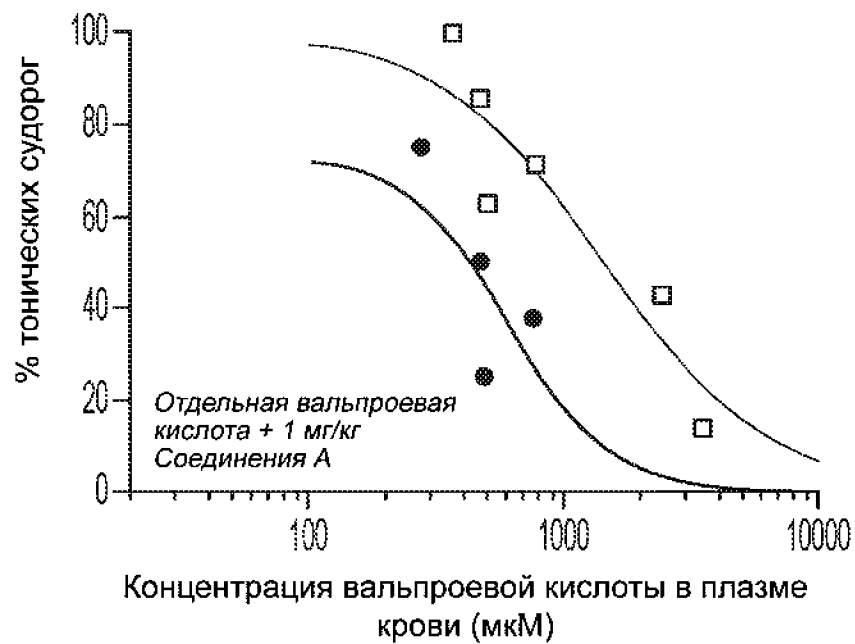


Раздельное дозирование по сравнению с комбинированным

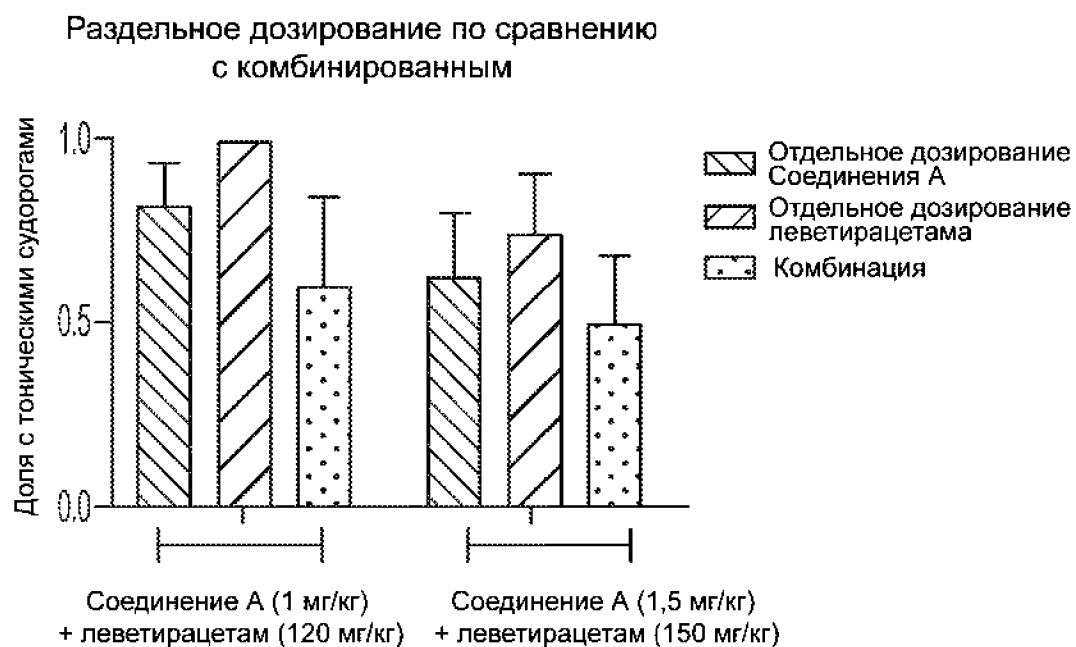
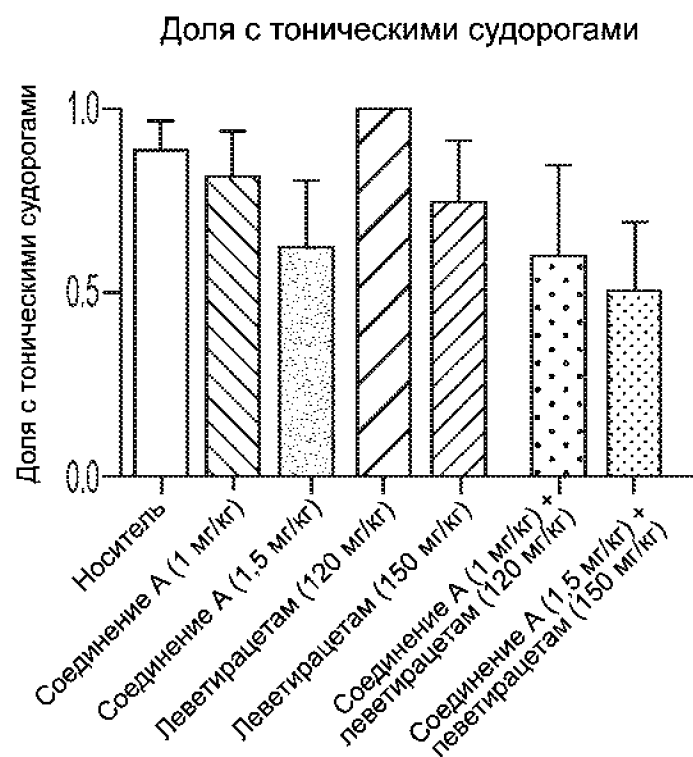


Фиг. 4

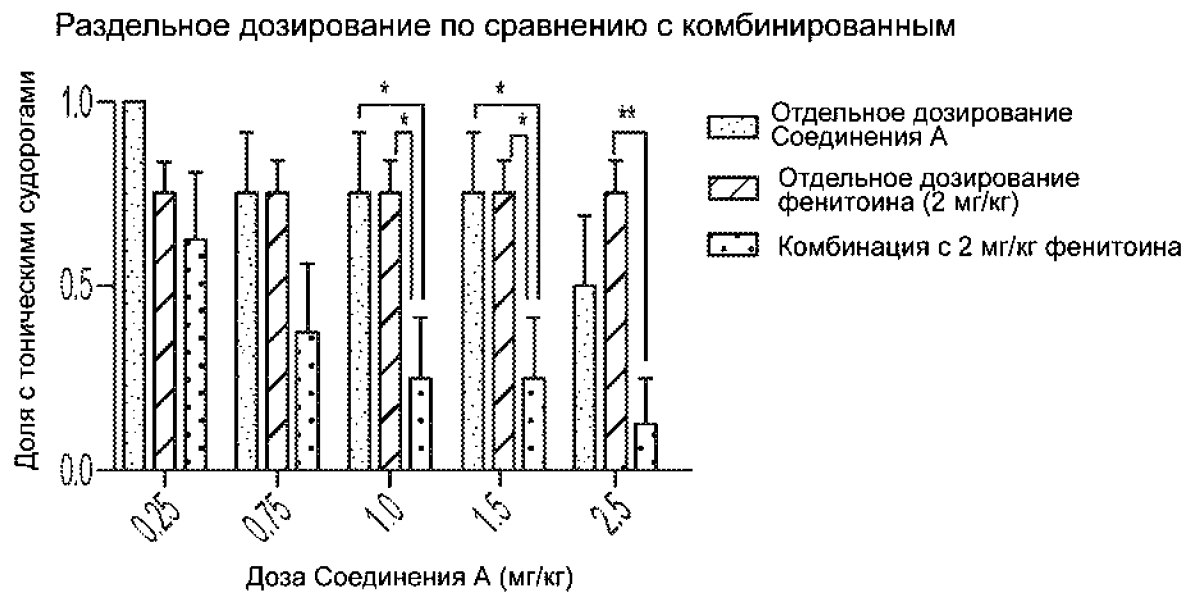
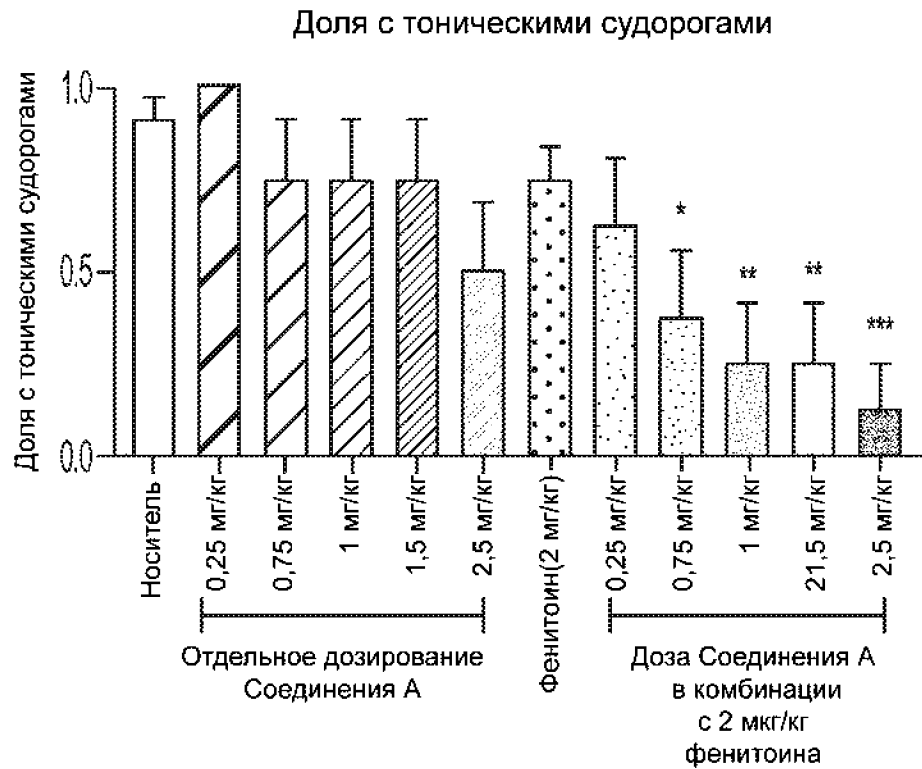
Комбинация Соединения А и вальпроевой кислоты в испытании MES



Фиг. 5

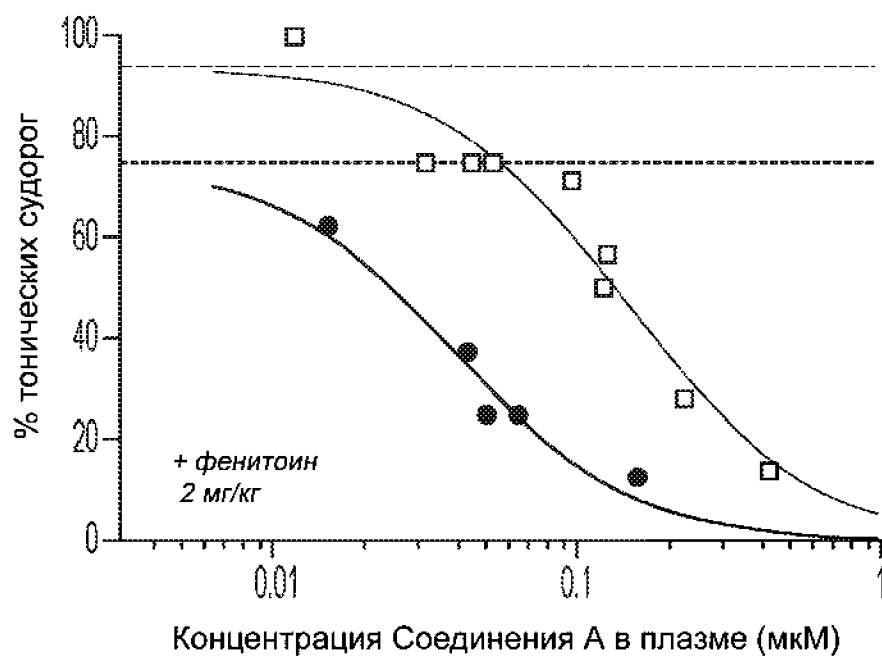


Фиг. 6

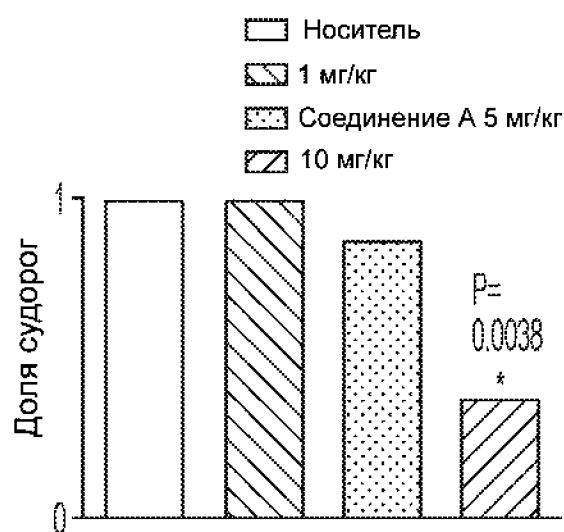


Фиг. 7

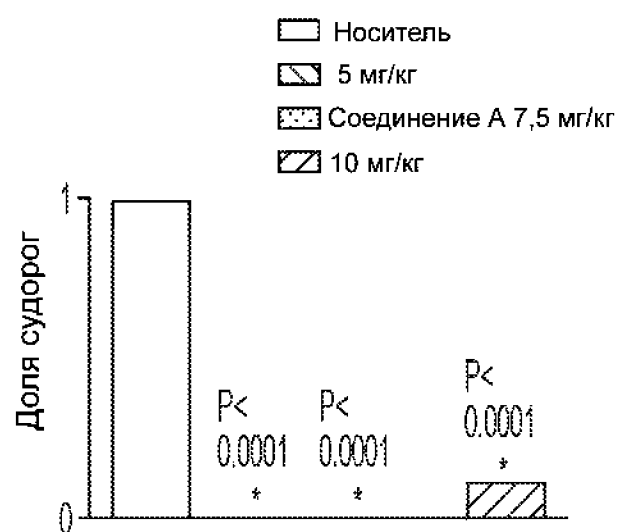
Комбинация Соединения А и фенитоина в испытании MES



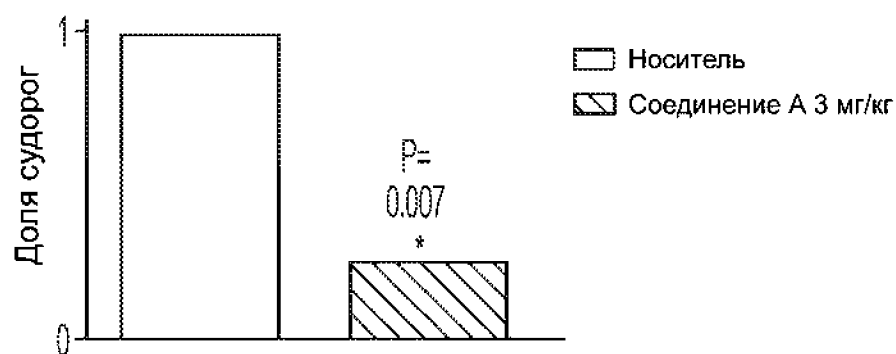
Фиг. 8



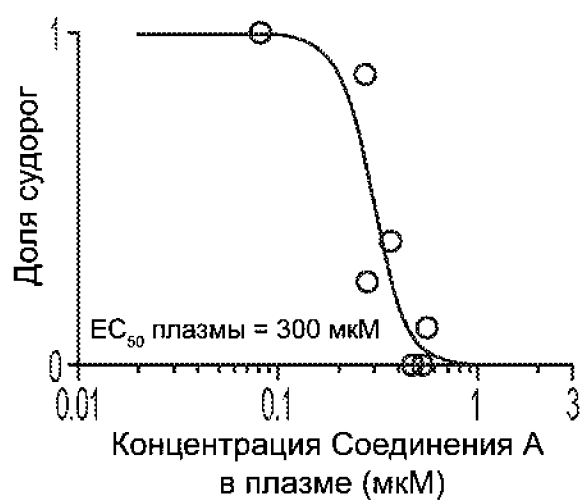
Фиг. 9А



Фиг. 9В



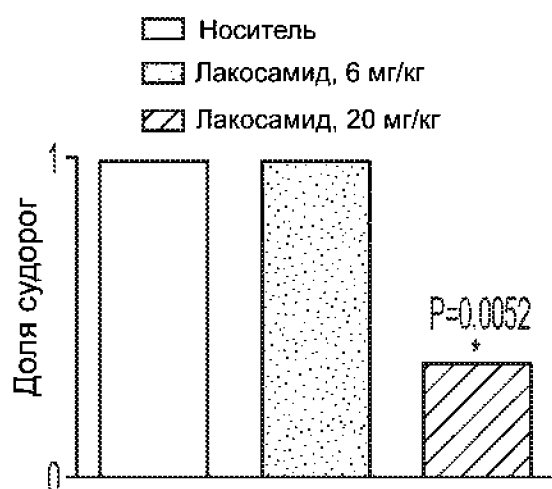
Фиг. 9С



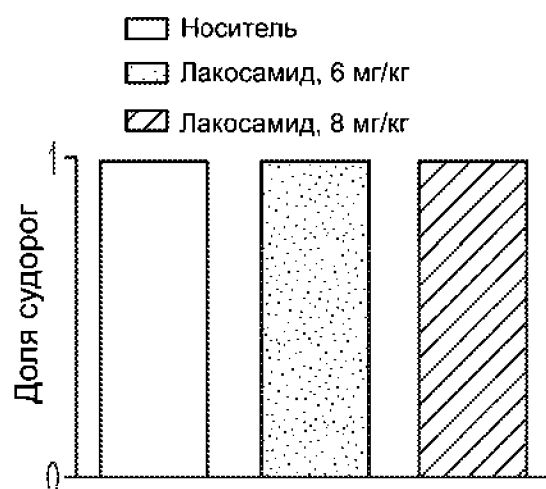
Фиг. 9D



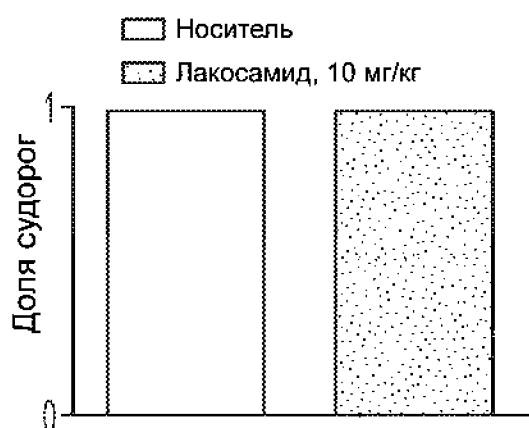
Фиг. 9Е



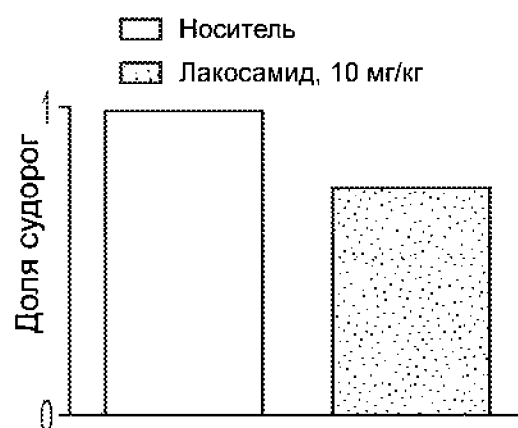
Фиг. 10А



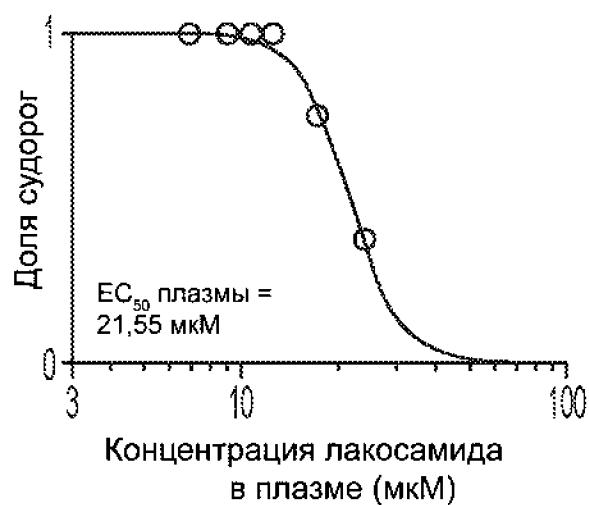
Фиг. 10В



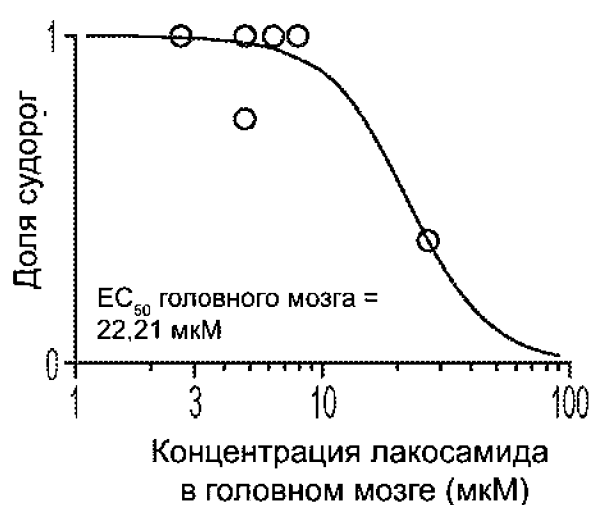
Фиг. 10С



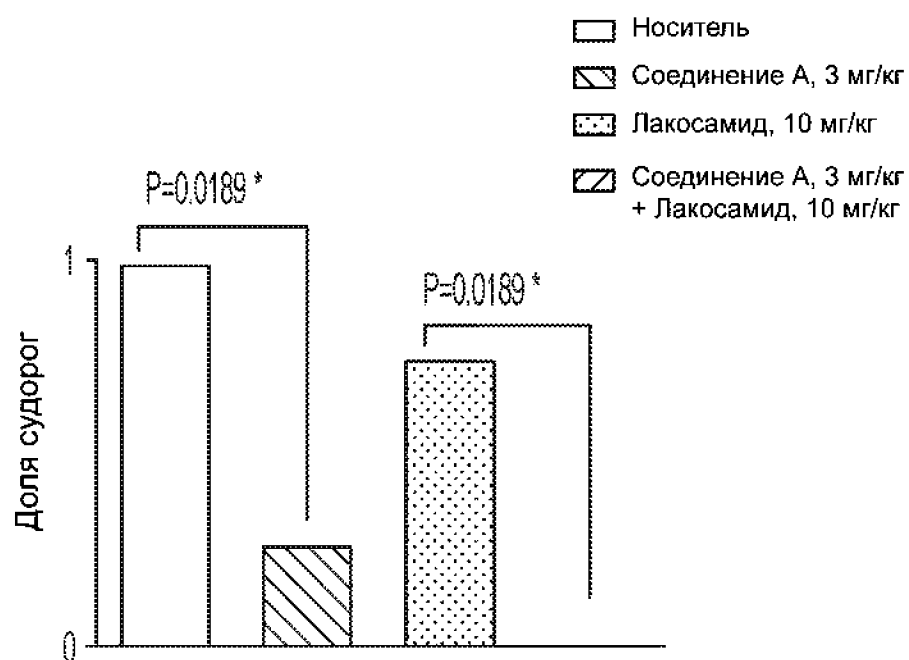
Фиг. 10D



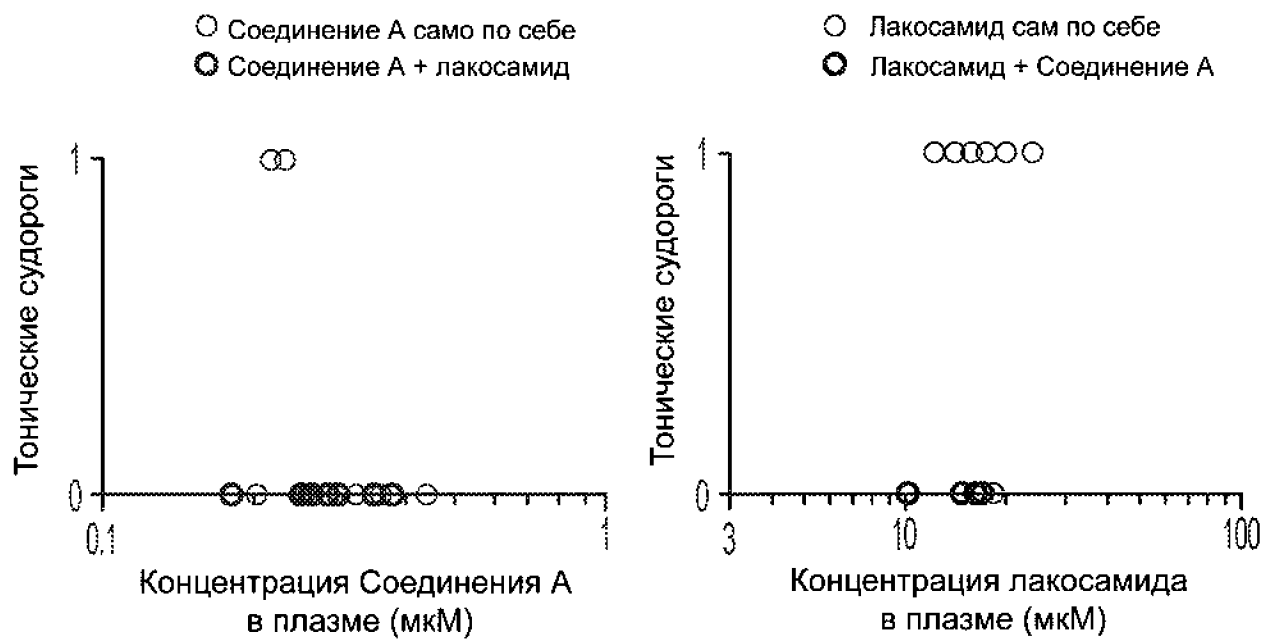
Фиг. 10Е



Фиг. 10F

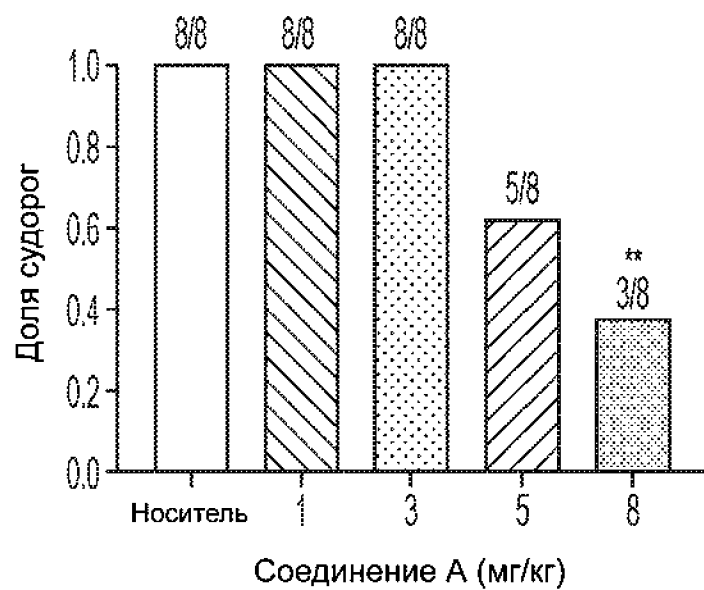


Фиг. 11А

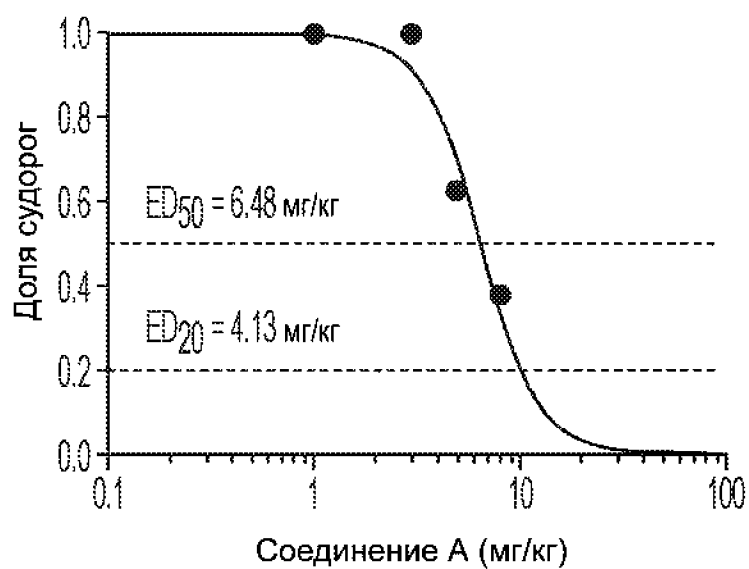


Фиг. 11В

Фиг. 11С



Фиг. 12А



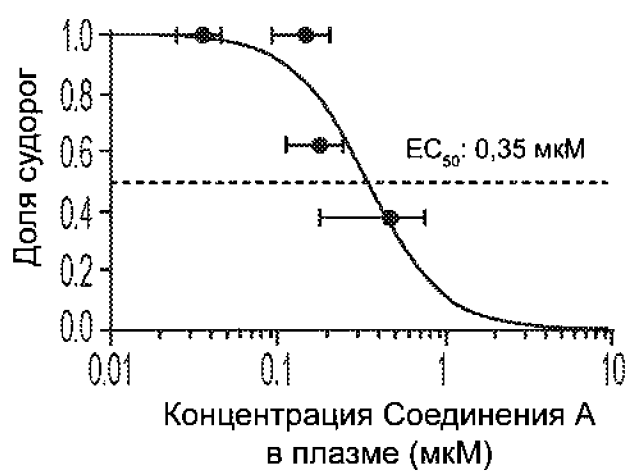
Фиг. 12В



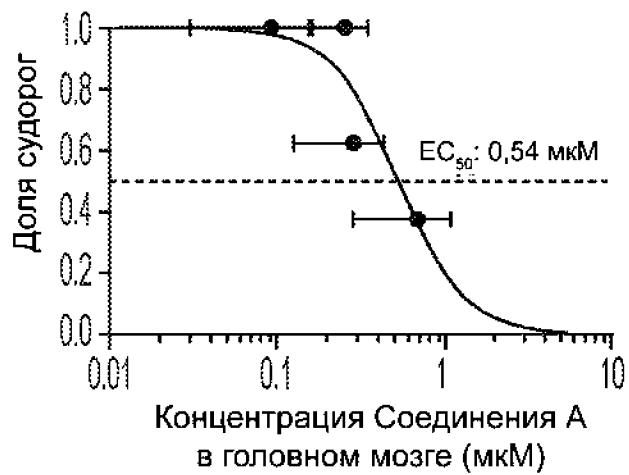
Фиг. 13А



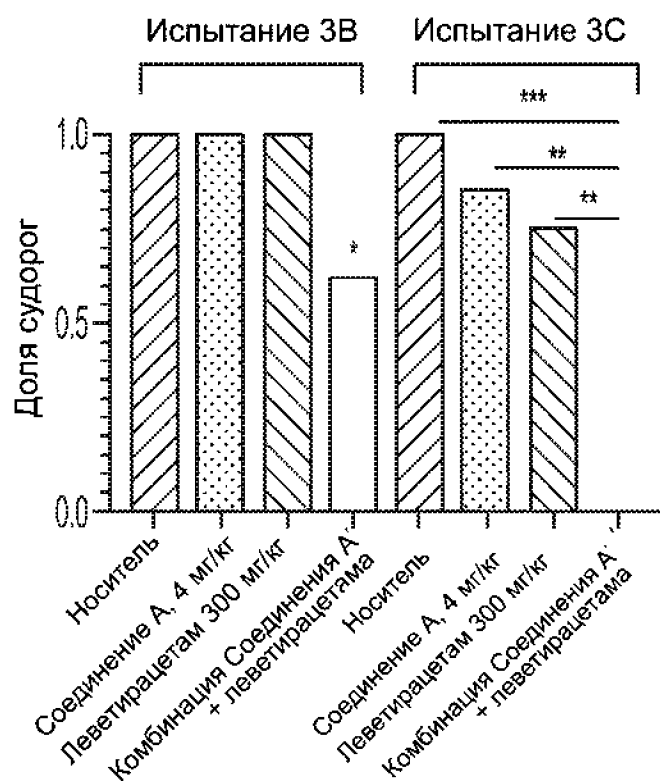
Фиг. 13В



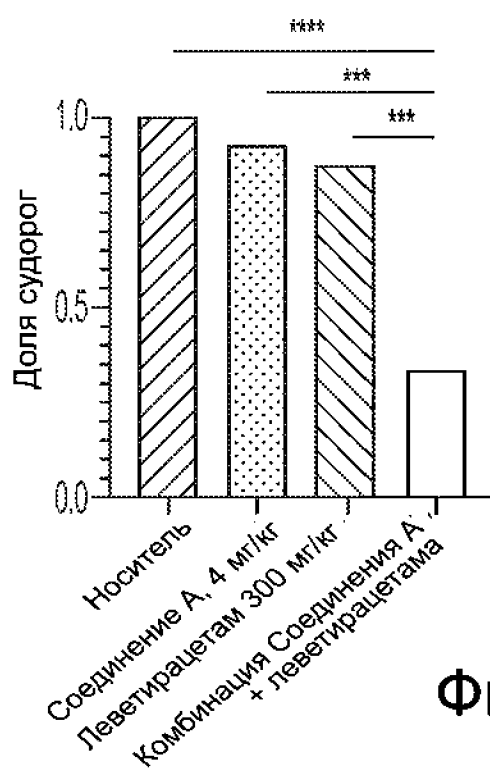
Фиг. 13С



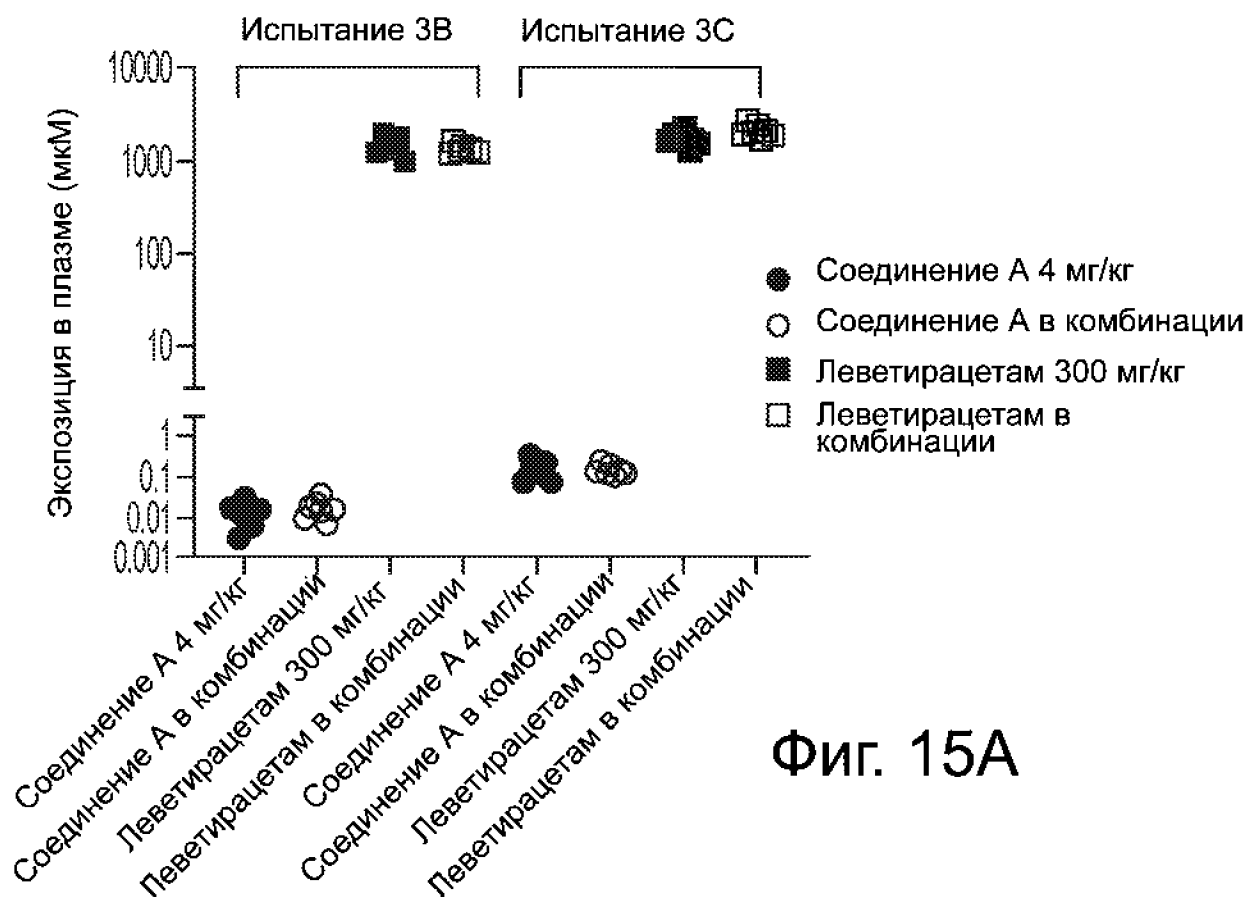
Фиг. 13D



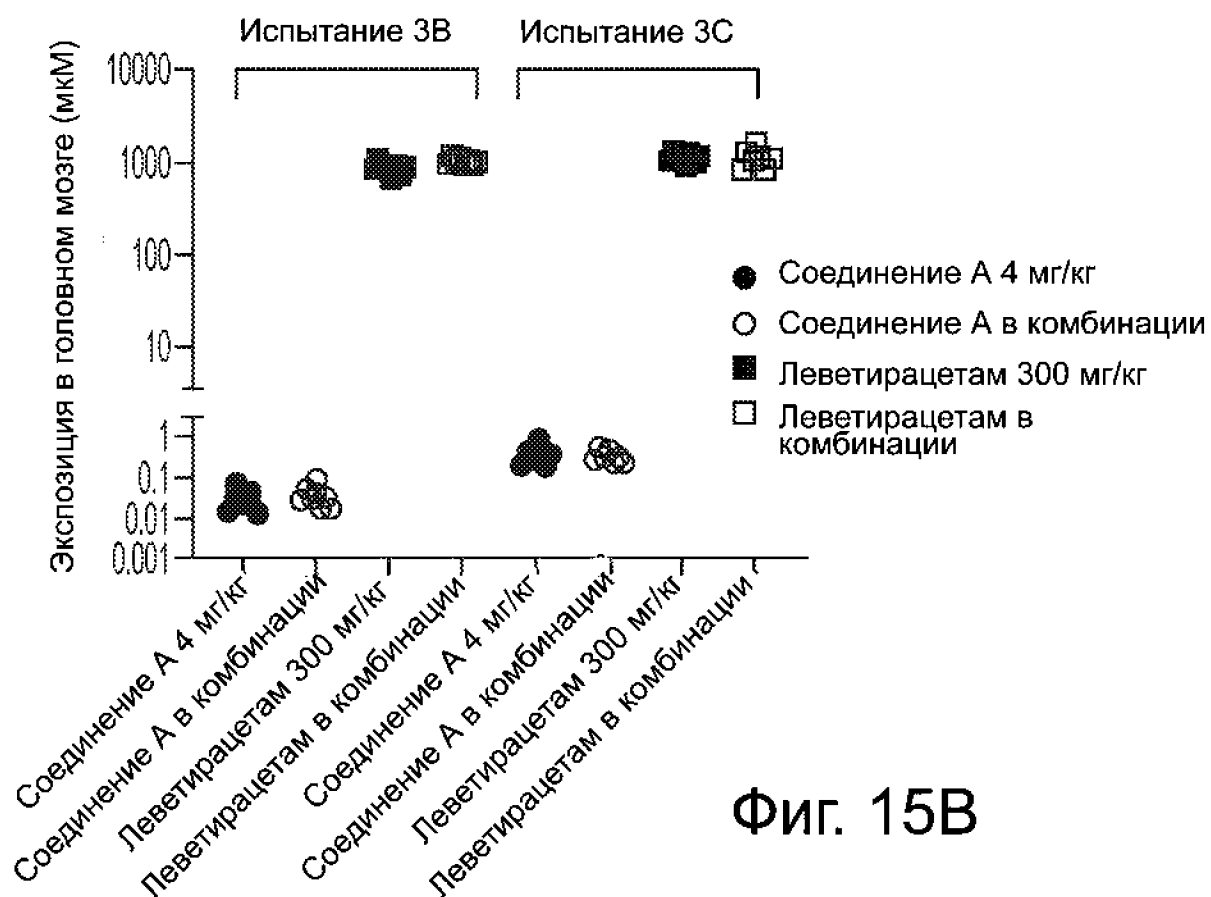
Фиг. 14А



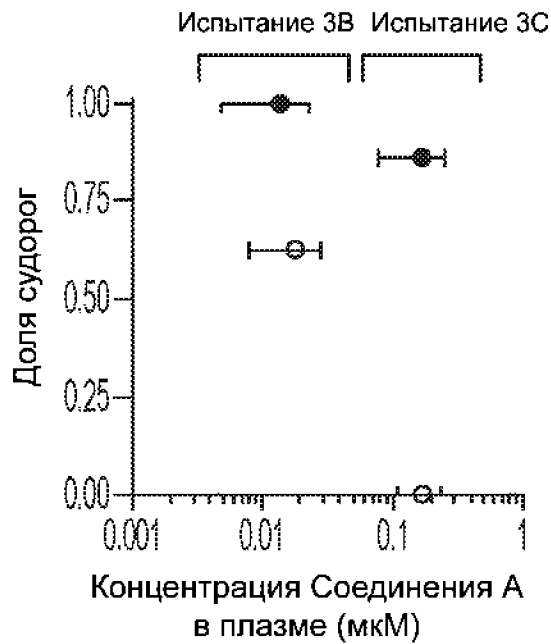
Фиг. 14В



Фиг. 15А

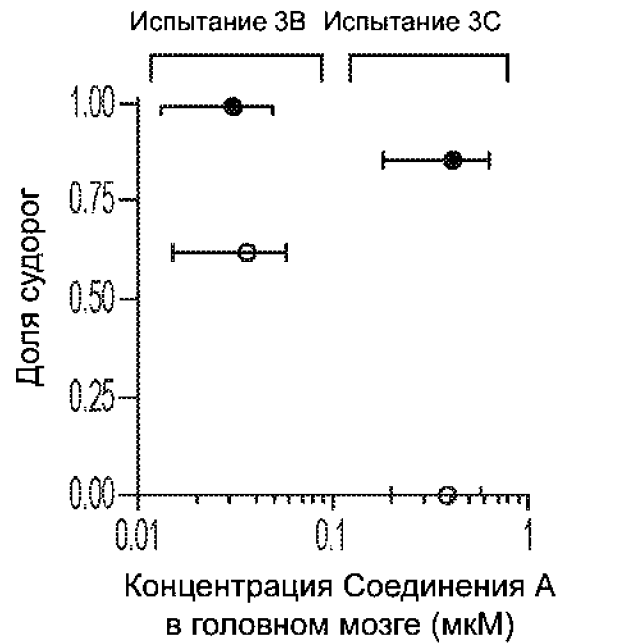


Фиг. 15В



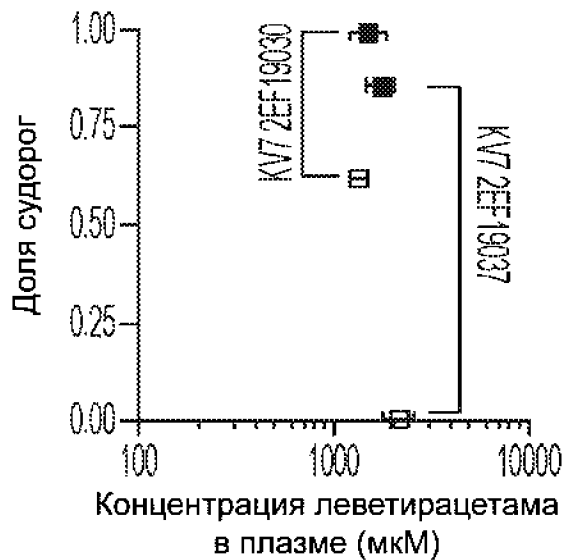
- Соединение А само по себе
- Соединение А в комбинации

Фиг. 16А



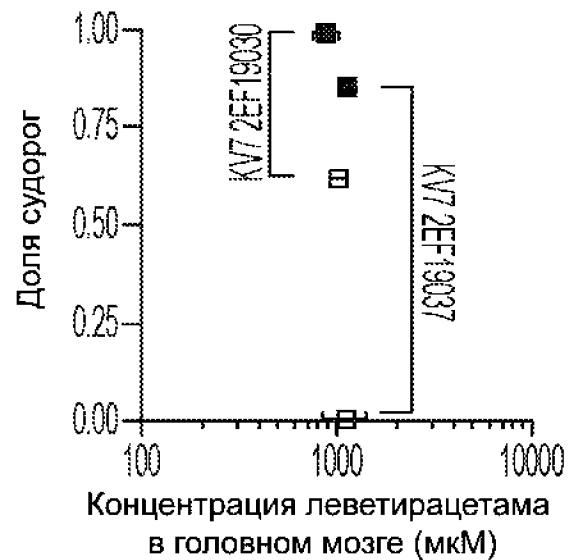
- Соединение А само по себе
- Соединение А в комбинации

Фиг. 16В



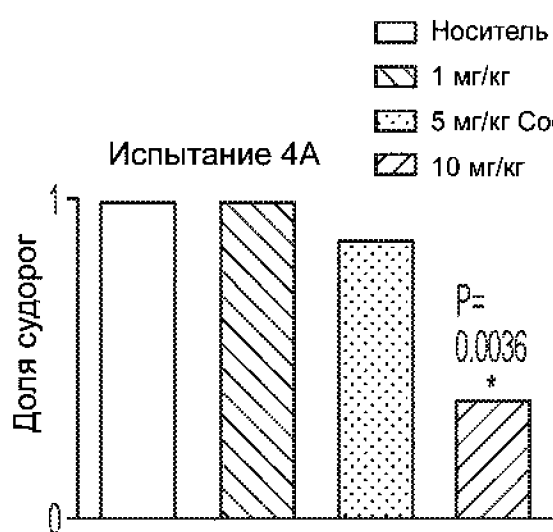
- Леветирацетам сам по себе
- Леветирацетам в комбинации

Фиг. 16С

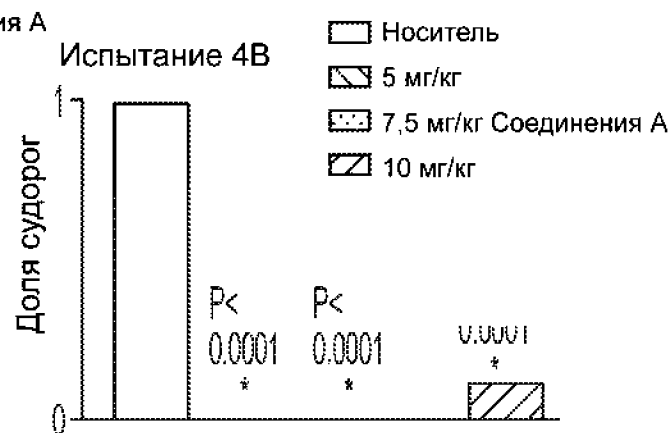


- Леветирацетам сам по себе
- Леветирацетам в комбинации

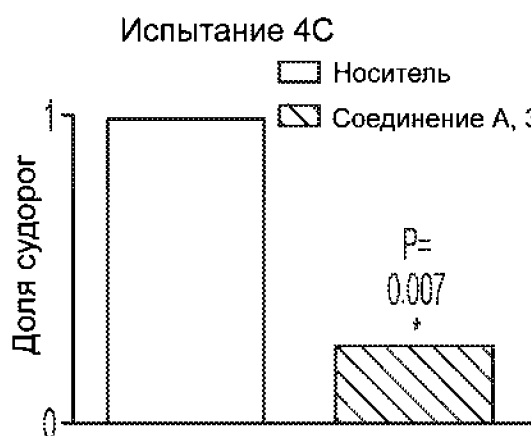
Фиг. 16D



Фиг. 17А



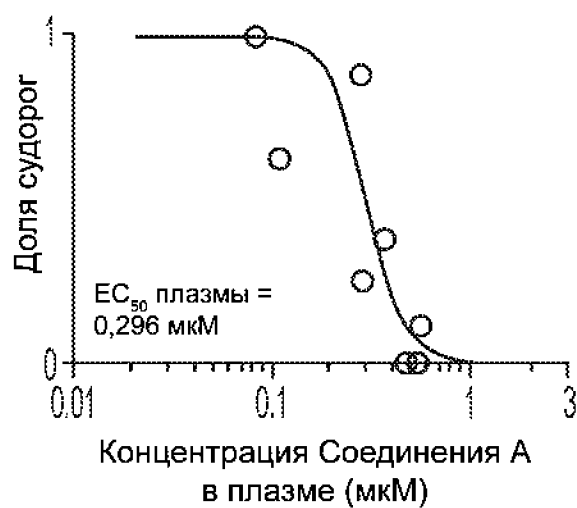
Фиг. 17В



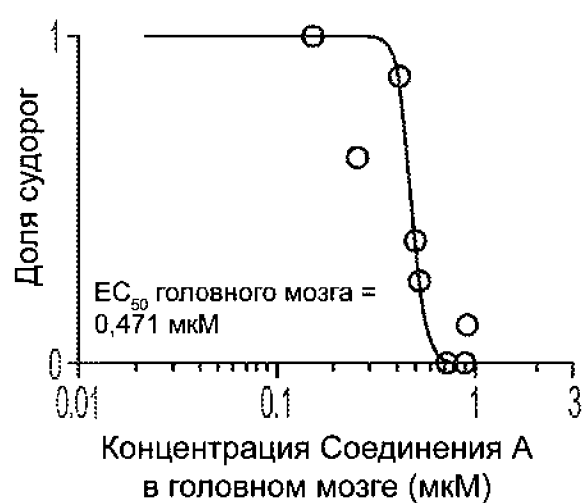
Фиг. 17С



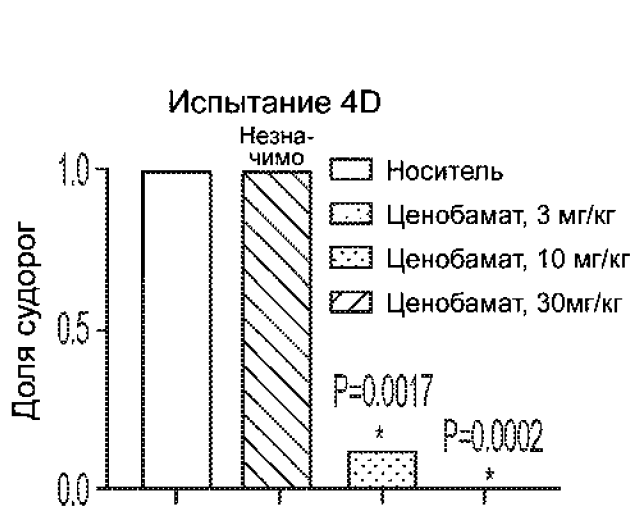
Фиг. 17D



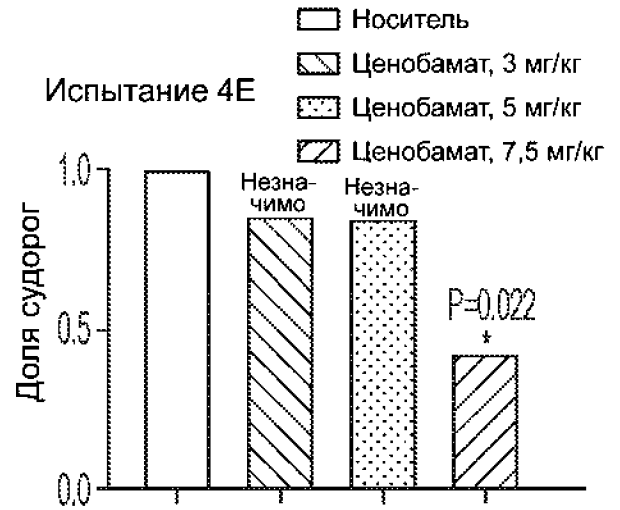
Фиг. 17Е



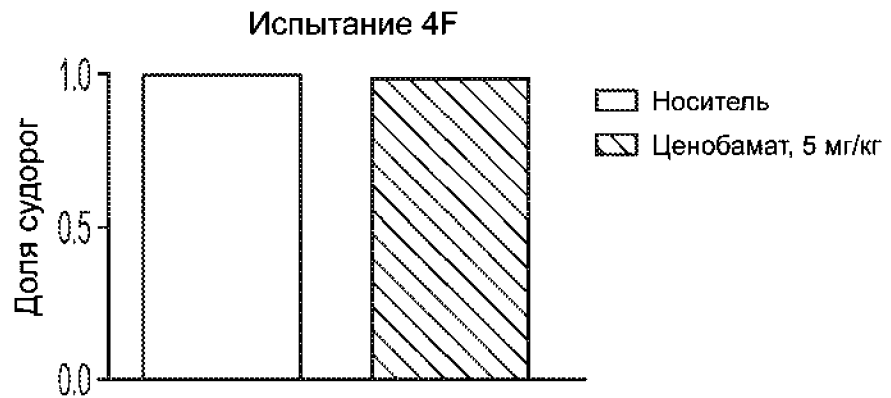
Фиг. 17F



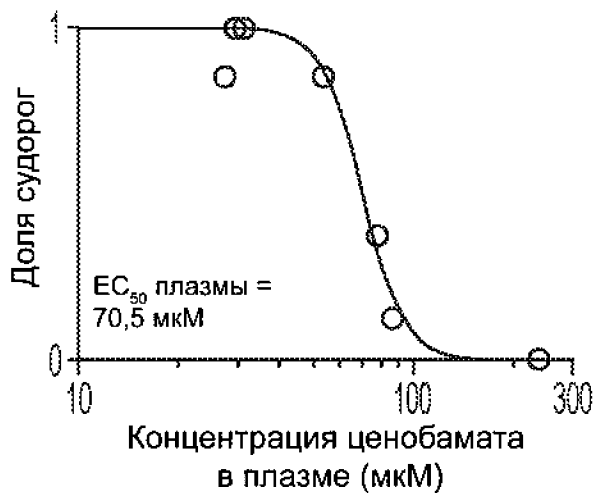
Фиг. 18А



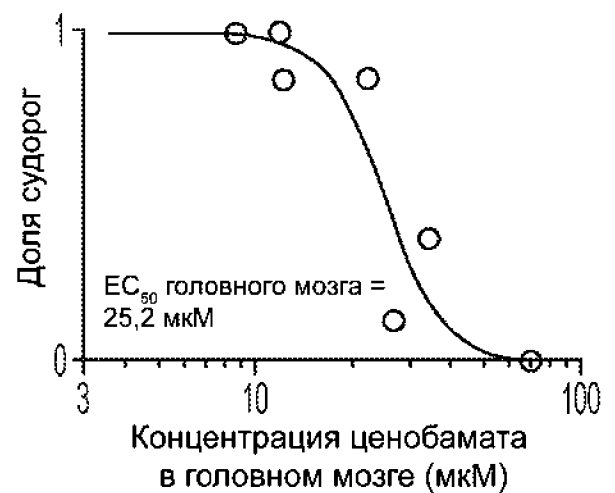
Фиг. 18В



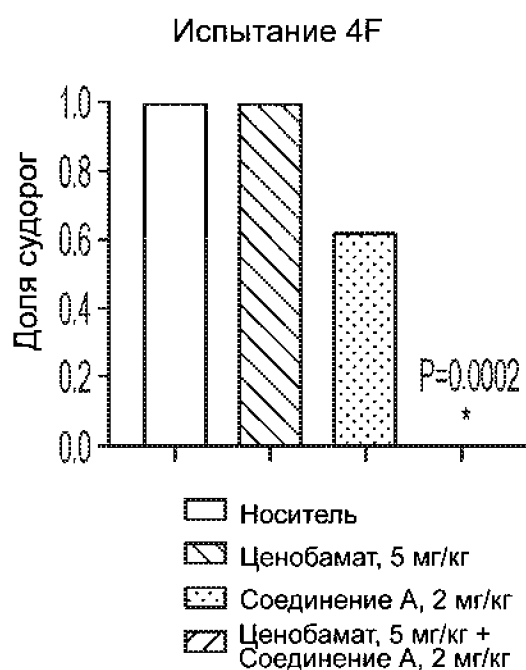
Фиг. 18С



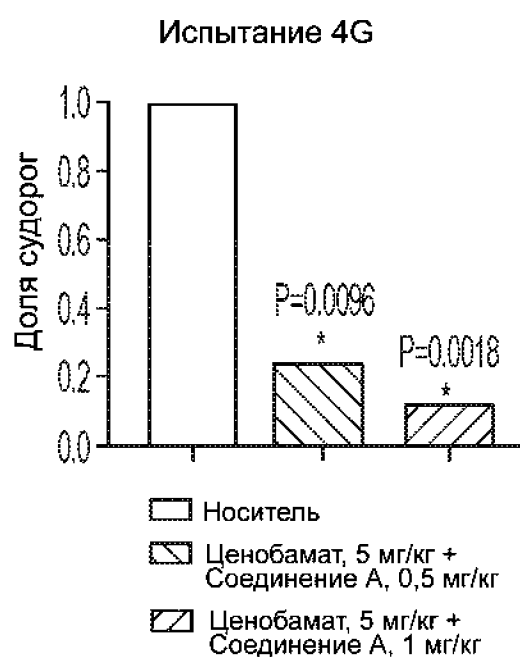
Фиг. 18D



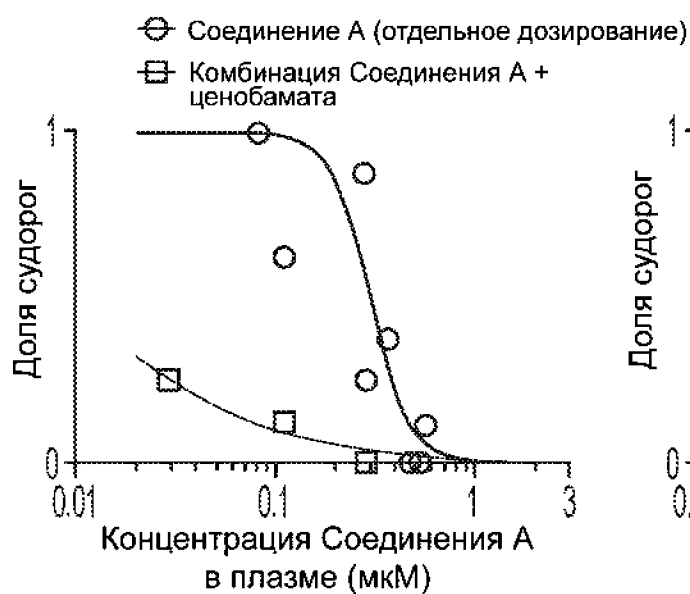
Фиг. 18Е



Фиг. 19А

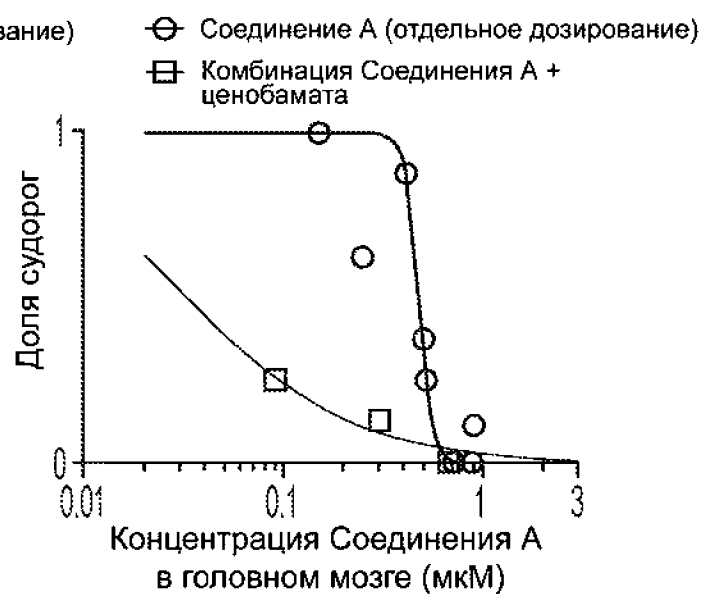


Фиг. 19В



EC_{50} плазмы при отдельном введении Соединения А = 0,296 мкМ	EC_{50} плазмы при введении Соединения А в комбинации = 0,0089 мкМ
--	--

Фиг. 19С



EC_{50} головного мозга при отдельном введении Соединения А = 0,471 мкМ	EC_{50} головного мозга при введении Соединения А в комбинации = 0,0331 мкМ
---	---

Фиг. 19D