

TERAPIA CONJUNTA PARA EL TRATAMIENTO DE TRASTORNOS CONVULSIVOS

ANTECEDENTES

La epilepsia es un trastorno neurológico común, con una prevalencia mundial estimada del 0.7% de la población (es decir, alrededor de 50 millones de personas) (ver Hirtz, D. *et al.*, *Neurology*, (2007), 68:326-337). Se caracteriza por actividades eléctricas anormales en el cerebro que conducen a convulsiones. Para fines epidemiológicos, la definición requiere más de una convulsión no provocada de cualquier tipo.

Los pacientes con epilepsia tienen un mayor riesgo de mortalidad en comparación con la población general debido principalmente a la etiología de la enfermedad. Sin embargo, en pacientes con epilepsia no controlada, el mayor riesgo de mortalidad relacionado con las convulsiones se debe a la muerte súbita e inesperada en la epilepsia (SUDEP) (ver, Hitiris, N. *et al.*, *Epilepsy and Behavior* (2007), 10:363-376). Los pacientes que participan en ensayos clínicos de medicamentos anticonvulsivos en investigación (ASMs) generalmente han tenido epilepsia durante más de 10 años y han fracasado en múltiples terapias de ASM.

La fisiopatología de la mayoría de las formas de epilepsia sigue sin comprenderse bien, pero se sabe que las convulsiones epilépticas surgen de una activación excesivamente sincrónica y sostenida de un grupo de neuronas. El aumento persistente de la excitabilidad neuronal es común a todos los síndromes epilépticos. La estrategia terapéutica en el tratamiento de la epilepsia consiste en reducir la excitabilidad neuronal a través de varias vías mecánicas. Durante las últimas dos décadas, se desarrollaron y comercializaron varios ASMs nuevos para expandir el espectro terapéutico al enfocarse en diferentes mecanismos de acción y mejorar el perfil de riesgo/beneficio. Se considera que los ASMs actualmente disponibles actúan mediante la inhibición de la glicoproteína de la vesícula sináptica, la potenciación de la neurotransmisión inhibitoria GABAérgica, la reducción de la

neurotransmisión excitatoria mediada por glutamato o la inhibición de los canales de sodio o calcio dependientes de voltaje. A pesar de esto, hasta el 30 % de los pacientes siguen siendo refractarios al tratamiento convencional y continúan teniendo convulsiones no controladas (ver Brown, D.A. *et al.*, *Nature* (1980), 283:673-676, y Elger, C.E. *et al.*, *Epilepsy Behav.* (2008), 12:501-539). La calidad de vida de los pacientes refractarios es pobre; no pueden conducir un automóvil y tienen dificultades para trabajar o vivir de manera independiente. Además, muchos pacientes tienen trastornos conductuales, neurológicos y/o intelectuales como secuelas de su trastorno convulsivo. Los agentes actuales tienen efectos mínimos o nulos sobre los canales activados por potasio neuronales, a pesar de que estos canales tienen un papel importante en el control de la excitabilidad neuronal. Por lo tanto, se necesitan medicamentos con nuevos mecanismos de acción o medicamentos que mejoren los ASMs ya comercializados para abordar la importante necesidad clínica no satisfecha de control de las convulsiones en pacientes con epilepsia resistente al tratamiento.

Los canales de potasio activados por voltaje Kv7.2 y Kv7.3 (Kv7.2/Kv7.3) son importantes para controlar la excitabilidad neuronal. Kv7.2/Kv7.3 subyacen a la “corriente M” neuronal, denominada de acuerdo con su caracterización inicial como una corriente neuronal disminuida en respuesta a agonistas muscarínicos/colinérgicos (ver Brown, D.A. *et al.*, *Nature* (1980), 283:673-676). La corriente M es una corriente hiperpolarizante no inactivante conocida por actuar como un freno en la hiperexcitabilidad neuronal. En consecuencia, una disminución en la corriente M mediada por Kv7.2, por ejemplo, a través de la pérdida de función genética, puede causar despolarización neuronal y un aumento en la excitabilidad de la membrana y neuronal que puede conducir a explosiones potenciales de acción que se manifiestan como convulsiones epilépticas. Por el contrario, un aumento en la corriente M mediada por Kv7.2 puede hiperpolarizar la membrana celular y, por lo tanto, reducir la excitabilidad neuronal y prevenir la iniciación y propagación de las explosiones potenciales de acción y las convulsiones resultantes. Mejorar el estado abierto de los canales Kv7.2/Kv7.3 en las neuronas favorece un estado de reposo

hiperpolarizado, lo que reduce el aumento rápido del potencial de acción (es decir, activación de explosiones). Tal potenciación puede proporcionar un efecto estabilizador sobre las neuronas excitables, particularmente hiperexcitables, y por lo tanto ser útil en el tratamiento de ciertos trastornos convulsivos. Se ha demostrado clínicamente que esta mejora es eficaz para el tratamiento de trastornos convulsivos, como las convulsiones de inicio parcial en adultos con epilepsia, con retigabina (ezogabina), un conocido abridor Kv7.2/Kv7.3.

Aunque se han realizado avances significativos en este campo, particularmente en el contexto del Compuesto A, definido a continuación, y su uso en el tratamiento de trastornos convulsivos, sigue existiendo una necesidad sustancial de proporcionar a los pacientes opciones adicionales para tratar trastornos convulsivos.

2. RESUMEN

La presente divulgación describe ciertos métodos y usos para la molécula pequeña *N*-[4-(6-Fluoro-3,4-dihidro-1*H*-isoquinolin-2-il)-2,6-dimetilfenil]-3,3-dimetilbutanamida (denominado en el presente documento como “Compuesto A”).

En una modalidad, la presente divulgación se refiere a un método para tratar un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesite, que comprende administrar conjuntamente el Compuesto A y un ASM al ser humano en cantidades que son terapéuticamente eficaces cuando se administran conjuntamente. Asimismo, en algunas modalidades, la presente divulgación está dirigida al uso de un Compuesto A y un ASM, en cantidades que son terapéuticamente eficaces cuando se administran conjuntamente, en el tratamiento de un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesite.

En otra modalidad, la presente divulgación está dirigida a un método para reducir la cantidad de un ASM que se requiere para la eficacia terapéutica en

un ser humano que padece un trastorno convulsivo, que comprende administrar al ser humano, junto con el ASM, una cantidad del Compuesto A que es eficaz para lograr dicha reducción cuando se administra con el ASM. Asimismo, en algunas modalidades, la presente divulgación está dirigida al uso de un Compuesto A para reducir la cantidad de un ASM que se requiere para la eficacia terapéutica en un ser humano que padece un trastorno convulsivo, como por ejemplo mediante la administración al ser humano, junto con el ASM, de una cantidad de Compuesto A que es eficaz para lograr dicha reducción cuando se administra con el ASM. En determinados casos de estas modalidades, el ASM es ácido valproico, levetiracetam, fenitoína, lacosamida, cenobamato o una combinación de los mismos, particularmente ácido valproico.

En una modalidad, la presente divulgación está dirigida a un método para reducir la cantidad de Compuesto A que se requiere para la eficacia terapéutica en un ser humano que padece un trastorno convulsivo, que comprende administrar al ser humano, junto con el Compuesto A, una cantidad de ASM que es eficaz para lograr dicha reducción cuando se administra con el Compuesto A. Del mismo modo, en algunas modalidades, la presente divulgación está dirigida al uso de un ASM para reducir la cantidad de Compuesto A que se requiere para la eficacia terapéutica en un ser humano que padece un trastorno convulsivo, como administrar al ser humano, junto con el Compuesto A, una cantidad de ASM que es eficaz para lograr dicha reducción cuando se administra con el Compuesto A. En ciertos casos de estas modalidades, el ASM es ácido valproico, levetiracetam, fenitoína, lacosamida, cenobamato o una combinación de los mismos, particularmente fenitoína.

En algunos aspectos, los métodos y usos descritos en el presente documento para tratar un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesite, para reducir la cantidad de ASM requerida para la eficacia terapéutica, para reducir la cantidad de Compuesto A requerida para la eficacia terapéutica, o para reducir la absorción de una cantidad administrada de Compuesto A en plasma o cerebro en un ser humano mientras se trata eficazmente un trastorno

convulsivo, comprenden mejorar la abertura de un canal de potasio Kv7 en el ser humano.

En una modalidad, la presente divulgación está dirigida a un método para mejorar la abertura de un canal de potasio Kv7 en un ser humano, que comprende la administración conjunta del Compuesto A y un ASM al ser humano en cantidades que son terapéuticamente eficaces cuando se administran conjuntamente, como cuando el ser humano tiene un trastorno convulsivo. Asimismo, en algunas modalidades, la presente divulgación está dirigida al uso del Compuesto A y un ASM, en cantidades que son terapéuticamente efectivas cuando se administran conjuntamente, para mejorar la abertura de un canal de potasio Kv7 en un ser humano, por ejemplo, cuando el ser humano tiene un trastorno convulsivo.

En algunos aspectos, el canal de potasio Kv7 es uno o más de Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4 o Kv7.5. En ciertos casos, la abertura o abertura mejorada de uno o más de los canales de potasio Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4 o Kv7.5 es selectiva sobre Kv7.1. En otros casos, el método comprende la abertura o abertura mejorada del canal de potasio Kv7.2/Kv7.3 (KCNQ2/3).

En algunos aspectos de los presentes métodos y usos, el ASM es una benzodiazepina, carbamazepina, cenobamato, felbamato, gabapentina, lacosamida, lamotrigina, levetiracetam, oxcarbazepina, fenobarbital, fenitoína, pregabalina, rufinamida, tiagabina, topiramato, ácido valproico, vigabatrina, zonisamida o una combinación de los mismos. En aspectos particulares, la medicación anticonvulsiva es ácido valproico, levetiracetam, fenitoína, lacosamida, cenobamato o una combinación de los mismos. En ciertos casos, el medicamento anticonvulsivo no mejora la abertura de un canal de potasio Kv7 en el ser humano.

En algunas modalidades, el ASM disminuye la excitación neuronal al bloquear un canal de sodio en el ser humano, disminuye la excitación neuronal al bloquear un canal de calcio en el ser humano, disminuye la excitación neuronal

al unirse a la glicoproteína de vesícula sináptica 2A (SV2A) en el ser humano o aumenta la inhibición neuronal en el ser humano.

En algunos aspectos, el ASM es un agente glutamatérgico. En otros aspectos, el ASM es un agente GABAérgico.

En algunos casos, el trastorno convulsivo tratado por o asociado con los presentes métodos está asociado con la disfunción del canal de potasio Kv7. En otros casos, el trastorno convulsivo es epilepsia de inicio focal.

En algunas modalidades de los presentes métodos y usos, el Compuesto A se administra por vía oral al ser humano. En ciertas modalidades de los presentes métodos y usos, el ASM se administra por vía oral al ser humano. En modalidades adicionales de los presentes métodos y usos, tanto el Compuesto A como el ASM se administran por vía oral al ser humano.

En algunos aspectos de los presentes métodos y usos, el Compuesto A se administra, por ejemplo, por vía oral, conjuntamente con un ASM, a una dosis de Compuesto A de 1 a 200 mg para humanos, a una dosis de Compuesto A de 2 a 100 mg para humanos, a una dosis de Compuesto A de 5 a 50 mg para humanos, a una dosis de Compuesto A de 5, 10, 15, 20 o 25 mg para humanos, o a una dosis de Compuesto A de 20 mg para humanos. En otros aspectos, el Compuesto A se administra, por ejemplo, por vía oral, junto con un ASM, a una dosis de Compuesto A de por lo menos 10 mg al ser humano, a una dosis de Compuesto A de por lo menos 20 mg al ser humano, o a una dosis de Compuesto A de por lo menos 50 mg al ser humano. En otros aspectos, el Compuesto A se administra, por ejemplo, por vía oral, junto con un ASM, a una dosis de Compuesto A de 5-1000 mg por día al ser humano, a una dosis de Compuesto A de 5-500 mg por día al ser humano, a una dosis de Compuesto A de 5-250 mg por día al ser humano, a una dosis de Compuesto A de 20-150 mg por día al ser humano, o a una dosis de Compuesto A de 100 mg por día al ser humano. En otros casos, el Compuesto A se administra, por ejemplo, por vía oral, junto con un ASM, a una dosis del Compuesto A de 0.01-

2.0 mg/kg al ser humano, a una dosis del Compuesto A de 0.03-1.0 mg/kg al ser humano, o a una dosis del Compuesto A de 0.05-0.5 mg/kg al ser humano.

En algunas modalidades de los presentes métodos y usos, el Compuesto A se administra por vía oral al ser humano entre aproximadamente 30 minutos antes y aproximadamente 2 horas después de comer una comida, por ejemplo, el Compuesto A se puede administrar por vía oral al ser humano durante una comida o dentro de los 15 minutos después de comer.

En otra modalidad de los presentes métodos y usos, el ASM es ácido valproico. En algunos aspectos, el ácido valproico se administra conjuntamente con el Compuesto A a una dosis de ácido valproico de 2-16 mg/kg al ser humano, por ejemplo, el ácido valproico puede administrarse a una dosis de 4-12 mg/kg al ser humano.

En otra modalidad de los presentes métodos y usos, el ASM es fenitoína. En algunos aspectos, la fenitoína se administra conjuntamente con el Compuesto A a una dosis de fenitoína de 0.05-5 mg/kg al ser humano, por ejemplo, la fenitoína puede administrarse a una dosis de 0.1-1 mg/kg al ser humano.

En otra modalidad de los presentes métodos y usos, el ASM es lacosamida. En algunos aspectos, la lacosamida se administra conjuntamente con el Compuesto A a una dosis de lacosamida de 0.1-5 mg/kg al ser humano, por ejemplo, la lacosamida se administra a una dosis de 0.5-1 mg/kg al ser humano.

En otra modalidad de los presentes métodos y usos, el ASM es cenobamato. En algunos aspectos, el cenobamato se administra conjuntamente con el Compuesto A a una dosis de cenobamato de 0.05-5 mg/kg al humano, por ejemplo, el cenobamato se administra a una dosis de 0.1-1 mg/kg al humano.

En ciertas modalidades de los presentes métodos y usos, la administración conjunta del Compuesto A y el ASM (por ejemplo, ácido valproico, fenitoína,

levetiracetam, lacosamida, cenobamato o una combinación de los mismos) proporciona una eficacia mejorada (por ejemplo, aumenta la reducción en el número de episodios de convulsiones o la reducción de la gravedad de los episodios de convulsiones en humanos) en relación con la administración individual del Compuesto A o el ASM solo. En ciertas modalidades de este tipo, la administración conjunta proporciona un efecto aditivo, en el que un efecto aditivo se refiere a la suma de los efectos individuales de administrar el Compuesto A y un ASM. En algunas modalidades, la administración conjunta proporciona un efecto sinérgico, en el que un efecto sinérgico se refiere a un efecto que es mayor que la suma de los efectos individuales de administrar el Compuesto A y un ASM.

En otras modalidades, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende el Compuesto A, un medicamento anticonvulsivo (ASM) y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunos aspectos de la composición farmacéutica, el ASM es una benzodiazepina, carbamazepina, cenobamato, felbamato, gabapentina, lacosamida, lamotrigina, levetiracetam, oxcarbazepina, fenobarbital, fenitoína, pregabalina, rufinamida, tiagabina, topiramato, ácido valproico, vigabatrina, zonisamida o una combinación de los mismos.

El Compuesto A es una molécula pequeña que se está desarrollando actualmente para el tratamiento de trastornos convulsivos, y su uso como modulador de los canales de potasio se divulga en las patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Nos. 8,293,911 y 8,993,593, así como en las solicitudes de los Estados Unidos de Norteamérica de números de serie 16/409,684 y 16/410,851, cuyas divulgaciones se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

Estos y otros aspectos de esta divulgación serán evidentes con referencia a la siguiente descripción detallada. Con este fin, se establecen varias referencias en el presente documento que describen con más detalle cierta información y

procedimientos de antecedentes y cada uno de ellos se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

3. BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra los resultados de la administración PO del Compuesto A a 1, 2, 4, 8 mg/kg o vehículo 2 horas antes del ensayo en ratones CF-1 (n=7 por grupo). Gráfico superior: fracción de ratones que muestran un componente extensor tónico de las patas traseras durante la prueba MES. Cada barra indica la respuesta media $\pm$ S.E.M. Gráfico inferior: porcentaje de ratones protegidos de la convulsión tónica. Un solo asterisco en esta y todas las demás figuras indica $0.01 < p < 0.05$. “Mpk” recitado es este y todas las demás cifras son mg/kg.

La Figura 2 muestra los resultados de la administración PO del Compuesto A a 1, 2, 4, 8 mg/kg o vehículo 0.5 horas antes del ensayo en ratones CF-1 (n=7 por grupo de dosis, n=5 para vehículo solo). Gráfico superior: presencia o ausencia del componente extensor tónico de las patas traseras durante la convulsión tónica por animal. Gráfico inferior: porcentaje de ratones protegidos.

La Figura 3 muestra las propiedades farmacocinéticas (PK) y farmacodinámicas (PD) del Compuesto A en el ensayo MES de ratón. Las barras de error horizontales indican el S.E.M. de la concentración plasmática o cerebral. Cuando no son visibles es porque son más pequeños que el símbolo que indica el valor medio. La curva sólida a través de cada conjunto de datos recopilados 2 horas después de la dosificación es la que mejor se ajusta a una curva de concentración-respuesta. La IC_{50} basada en las concentraciones en cerebro y plasma fue de 275 nM y 154 nM, respectivamente. La eficacia medida 0.5 horas después de la dosificación fue consistente con la relación PK-PD determinada 2 horas después de la dosificación.

La Figura 4 muestra los resultados de la administración PO del Compuesto A a 1 mg/kg 2 horas antes del ensayo y la administración IP de Ácido Valproico a 30, 56 o 100 mg/kg 0.5 horas antes del ensayo en ratones CF-1 (grupos de

dosis única: n=15 Compuesto A a 1 mg/kg, n=15 Ácido Valproico a 100 mg/kg, n=7 Ácido Valproico a 30 y 56 mg/kg; Grupos de dosis combinadas: n=15 Compuesto A + Ácido Valproico 100 mg/kg, n=8 Compuesto A + Ácido Valproico 30 y 56 mg/kg, n=15 vehículo). Gráfico superior: presencia o ausencia del componente extensor tónico de las patas traseras durante la convulsión tónica por animal. Gráfico inferior: comparación de dosis única o dosis combinada de Compuesto A y Ácido Valproico. Cuatro asteriscos indican $p < 0.0001$.

La Figura 5 muestra la PK/PD del ácido valproico con y sin 1 mg/kg de Compuesto A en el ensayo MES de ratón. Las curvas sólidas indican el mejor ajuste a las curvas de concentración-respuesta para el ácido valproico con y sin 1 mg/kg de Compuesto A. La curva se ajustó con un máximo de 100 % de convulsiones para ácido valproico solo y 73.3 % con 1 mg/kg de Compuesto A para reflejar la eficacia del Compuesto A solo a esta dosis. El efecto de la dosificación conjunta con el Compuesto A fue reducir la IC_{50} para el ácido valproico de 1440 μ M a 608 μ M.

La Figura 6 muestra los resultados de la administración PO del Compuesto A a 1 o 1.5 mg/kg 2 horas antes del ensayo y la administración IP de Levetiracetam a 120 o 150 mg/kg 2 horas antes del ensayo en ratones. Gráfico superior: presencia o ausencia del componente extensor tónico de las patas traseras durante la convulsión tónica por animal. Gráfico inferior: comparación de dosis única o dosis combinada de Compuesto A y Levetiracetam.

La Figura 7 muestra los resultados de la administración PO del Compuesto A a 0.25, 0.75, 1, 1.5 o 2.5 mg/kg 2 horas antes del ensayo y la administración IP de Fenitoína a 2 mg/kg 2 horas antes del ensayo. Dosis única: Compuesto A, n=8 por dosis, Fenitoína 2 mg/kg, n=24; Dosis combinada: n=8 por grupo, n=24 vehículo. Gráfico superior: presencia o ausencia del componente extensor tónico de las patas traseras durante la convulsión tónica por animal. Gráfico inferior: comparación de dosis única o dosis combinada de Compuesto A y Fenitoína. Dos asteriscos indican $0.001 < p < 0.01$.

La Figura 8 muestra la PK/PD del Compuesto A con y sin 2 mg/kg de Fenitoína en el ensayo MES de ratón. Las curvas continuas indican el mejor ajuste a las curvas de concentración-respuesta para el Compuesto A con y sin 2 mg/kg de Fenitoína. La curva se ajustó con un máximo de 94.1 % de convulsiones para el Compuesto A solo y 75 % con 2 mg/kg de Fenitoína para reflejar la eficacia de Fenitoína sola a 2 mg/kg. Estos valores superiores se indican mediante líneas discontinuas horizontales. El efecto de la dosificación conjunta de Fenitoína con el Compuesto A es reducir la IC_{50} para el Compuesto A de 147 nM a 39.7 nM.

La Figura 9 muestra la fracción de ratones convulsivos frente a diversas dosis del Compuesto A y que el Compuesto A proporciona una eficacia dependiente de la dosis en el ensayo AC-MES de ratón (A, B y C). El compuesto A se administró por vía oral PO a 1, 3, 5, 7.5 y 10 mg/kg 0.5 horas antes del ensayo en ratones CF-1 (grupos: n=8 Compuesto A a 1 mg/kg, n=8 Compuesto A a 3 mg/kg, n=16 Compuesto A a 5 mg/kg, n=7 Compuesto A a 7.5 mg/kg, n=17 Compuesto A a 10 mg/kg; n = 24 vehículos). Los resultados se expresan como la fracción de animales con convulsiones en cualquier grupo de dosis dado. La fracción de animales con convulsiones en los grupos tratados con el Compuesto A fue significativamente diferente del grupo tratado con el vehículo en los tres estudios (los valores de p respectivos se muestran en la Figura 9A-C). Las curvas de concentración-respuesta en plasma (D) y tejido cerebral (E) del Compuesto A basadas en la ecuación de Hill Langmuir muestran que la eficacia depende de la concentración. El análisis de la curva de respuesta a la concentración del Compuesto A mostró una EC_{50} de 0.30 μ M para plasma y una EC_{50} de 0.47 μ M para tejido cerebral. Se obtuvieron muestras terminales de cerebro y plasma 0.5 horas después de la dosificación del Compuesto A. Cada punto de datos en D y E representa la fracción de animales con convulsiones al nivel de concentración medio para cada grupo de dosis.

La Figura 10 muestra que la Lacosamida proporciona una eficacia dependiente de la dosis en el ensayo AC-MES de ratón (A, B, C y D). Lacosamida se administró por vía oral a 6, 8, 10 y 20 mg/kg 2 horas antes del ensayo en

ratones CF-1 (grupos: n=16 Lacosamida a 6 mg/kg; n=8 Lacosamida a 8 mg/kg; n=16 Lacosamida a 10 mg/kg; n=8 Lacosamida a 20 mg/kg; n=32 vehículo). Los resultados se expresan como la fracción de animales con convulsiones en cualquier grupo de dosis dado (n=8). En el Estudio 2D, la fracción de animales con convulsiones en el grupo tratado con 20 mg/kg de Lacosamida fue significativamente diferente del grupo tratado con vehículo (el valor de p se muestra en la Figura 10A). Las curvas de concentración-respuesta en plasma (E) y tejido cerebral (F) de Lacosamida basadas en la ecuación de Hill Langmuir muestran que la eficacia depende de la concentración. El análisis de la curva de respuesta a la concentración de Lacosamida mostró una EC_{50} para plasma de 21.6 μ M y una EC_{50} para tejido cerebral de 22.2 μ M. Se obtuvieron muestras terminales de plasma y cerebro 2 horas después de la administración de Lacosamida. Cada punto de datos en E y F representa la fracción de animales con convulsiones al nivel de concentración medio para cada grupo de dosis (n=8).

La Figura 11 muestra los resultados de una combinación de Compuesto A y Lacosamida en el ensayo AC-MES de ratón (A). El Compuesto A se administró PO a 3 mg/kg 0.5 horas antes del ensayo; Lacosamida se administró por vía oral a 10 mg/kg 2 horas antes del ensayo en ratones CF-1 (grupos de dosis única: n=8 Compuesto A a 3 mg/kg, n=8 Lacosamida a 10 mg/kg; grupo de dosis combinada: n=8 Compuesto A a 3 mg/kg + Lacosamida a 10 mg/kg; n=8 vehículo). Los resultados se expresan como la fracción de animales con convulsiones en cualquier grupo de dosis dado (n=8). La diferencia entre el grupo tratado con Lacosamida y el grupo de combinación fue estadísticamente significativa (los valores de p se muestran en la Figura 11A). La relación farmacocinética-farmacodinámica (PK/PD) del Compuesto A con y sin 10 mg/kg de Lacosamida y PK/PD de Lacosamida con y sin 3 mg/kg de Compuesto A en el ensayo AC-MES de ratón se muestra en B y C. Cada punto de datos en B y C representa una concentración individual obtenida de un solo animal y si se observaron convulsiones tónicas en el animal. Se obtuvieron muestras terminales de cerebro y plasma 0.5 horas después de la dosificación

PO con el Compuesto A y 2 horas después de la dosificación PO con Lacosamida.

La Figura 12 muestra las respuestas a la dosis del Compuesto A en el ensayo psicomotor de 6 Hz en ratones 1 hora después de una dosis oral única. La dosificación PO del Compuesto A 1 hora antes del ensayo de convulsiones mostró una eficacia dependiente de la dosis (A) con un efecto significativo alcanzado a una dosis de 8 mg/kg (** $p=0.0081$ frente al vehículo). La curva de respuesta a la dosis (B) basada en la ecuación de Langmuir Hill proyecta una ED_{50} de 6.48 mg/kg y una ED_{20} de 4.13 mg/kg con un coeficiente de Hill $n = -3.09$.

La Figura 13 muestra la respuesta a la concentración del Compuesto A en el ensayo psicomotor de 6 Hz en ratón 1 hora después de una dosis oral única. Las exposiciones de plasma (A) y cerebro (B) de animales individuales 1 hora después de una sola dosis oral del Compuesto A demuestran una clara relación entre la concentración tisular del Compuesto A y la eficacia en el ensayo de convulsiones de 6 Hz. El animal que experimentó temblor y estaba frío al tacto tuvo la mayor exposición y está marcado con un círculo. Las curvas de respuesta a la concentración de plasma (C) y cerebro (D) basadas en la ecuación de Hill Langmuir proyectan una EC_{50} de plasma de 0.35 μM con un coeficiente de Hill de $n = -1.95$, y una EC_{50} cerebral de 0.54 μM con un coeficiente de Hill de $n = -2.17$.

La Figura 14 muestra la eficacia del Compuesto A y el Levetiracetam solos y combinados en el ensayo de convulsiones psicomotoras de 6 Hz 1 hora después de la dosificación. (A) El Compuesto A (dosificado por vía oral) y el Levetiracetam (dosificado por vía intraperitoneal) solos demostraron diferentes niveles de eficacia en cada uno de los dos estudios (ninguna protección en el Estudio 3B y hasta un 25 % de protección en el Estudio 3C). En cada estudio, la combinación del Compuesto A y el Levetiracetam dio como resultado una protección significativamente mayor contra las convulsiones en comparación con cualquiera de los compuestos solos y con el vehículo (* $p=0.034$; ** $p<0.01$;

*** $p=0.0002$). (B) Cuando se combinan ambos estudios, la eficacia máxima con cualquiera de los compuestos solos se alcanzó con Levetiracetam en 14/16 convulsiones, mientras que la combinación de ambos compuestos resultó en 5/15 animales con convulsiones. La combinación de Compuesto A y Levetiracetam protegió así al 66.7 % de los animales de la convulsión, lo que fue significativamente diferente del vehículo (**** $p<0.0001$) y de cualquiera de los compuestos solos (** $p<0.001$).

La Figura 15 muestra la farmacocinética del Compuesto A y Levetiracetam solos y combinados 1 hora después de la dosificación en ratones CD-1. (A) La comparación de las concentraciones plasmáticas del Compuesto A (dosificado por vía oral) y el Levetiracetam (dosificado por vía intraperitoneal) en todos los grupos experimentales revela que se alcanzó una concentración plasmática 12 veces mayor del Compuesto A 1 hora después de la dosificación en el Estudio 3C en comparación con el Estudio 3B. Las concentraciones plasmáticas de Levetiracetam fueron comparables entre los dos estudios. La administración del Compuesto A y Levetiracetam en combinación (Combo) no cambió significativamente la exposición de ninguno de los compuestos. Un animal en el grupo de combinación en el Estudio 3C no tenía una concentración medible de Levetiracetam en el plasma y fue excluido (no se muestra). (B) La comparación de las concentraciones cerebrales del Compuesto A (dosificado por vía oral) y Levetiracetam (dosificado por vía intraperitoneal) en todos los grupos experimentales revela que se alcanzó una concentración cerebral 11 veces mayor del Compuesto A 1 hora después de la dosificación en el Estudio 3C en comparación con el Estudio 3B. Las concentraciones cerebrales de Levetiracetam fueron comparables entre los dos estudios. La administración del Compuesto A y Levetiracetam en combinación (Combo) no cambió significativamente la exposición de ninguno de los compuestos. Un animal del grupo de combinación en el Estudio 3C no tenía una concentración medible de Levetiracetam en el cerebro y fue excluido (no se muestra).

La Figura 16 muestra los cambios farmacocinéticos-farmacodinámicos en la eficacia del Compuesto A y el Levetiracetam después de la dosificación

combinada. LEV: Levetiracetam. Cuando el Compuesto A (dosificado por vía oral) se administra en combinación con Levetiracetam (dosificado por vía intraperitoneal; círculos abiertos), la fracción de animales con convulsiones se reduce en comparación con el Compuesto A administrado solo (círculos rellenos), aunque ambos grupos tienen concentraciones similares de Compuesto A en plasma (A) y cerebro (B). Asimismo, la fracción de animales con convulsiones se reduce en el grupo de dosis combinada (cuadrados abiertos) en comparación con la administración de Levetiracetam solo (cuadrados rellenos), aunque ambos grupos tienen concentraciones similares de Levetiracetam en plasma (C) y cerebro (D).

La Figura 17 muestra la respuesta a la dosis y la concentración del Compuesto A después de una única dosis oral en el ensayo AC-MES de ratón. Los datos del grupo del Compuesto A y el vehículo se muestran a partir de los estudios indicados. El compuesto A muestra una eficacia dependiente de la dosis en el ensayo AC-MES de ratón (A, B, C y D). El compuesto A se administró por vía oral a 1, 2, 3, 5, 7.5 y 10 mg/kg 0.5 horas antes del ensayo en ratones CF-1 (grupos: n=8 Compuesto A a 1 mg/kg, n=8 Compuesto A a 2 mg/kg, n=8 Compuesto A a 3 mg/kg, n=16 Compuesto A a 5 mg/kg, n=7 Compuesto A a 7.5 mg/kg, n=17 Compuesto A a 10 mg/kg, n=24 vehículo). Los resultados se expresan como la fracción de animales con convulsiones en cualquier grupo de dosis dado. La fracción de animales con convulsiones en los grupos tratados con el Compuesto A fue significativamente diferente del grupo tratado con el vehículo en 3/4 estudios (se muestran los valores de p respectivos). Las curvas de concentración-respuesta en plasma (E) y tejido cerebral (F) del Compuesto A basadas en la ecuación de Hill Langmuir muestran que la eficacia dependía de la concentración. El análisis de la curva de respuesta a la concentración del Compuesto A mostró una EC_{50} de 0.296 μ M para plasma y una EC_{50} de 0.471 μ M para tejido cerebral. Se obtuvieron muestras terminales de cerebro y plasma 0.5 horas después de la dosificación del Compuesto A. Cada punto de datos en E y F representa la fracción de animales con convulsiones al nivel de concentración medio para cada grupo de dosis.

La Figura 18 muestra la respuesta a la dosis y la concentración de Cenobamato después de una dosis oral única en el ensayo AC-MES de ratón. Los datos del grupo de Cenobamato y vehículo se muestran a partir de los estudios indicados. El Cenobamato muestra una eficacia dependiente de la dosis en el ensayo AC-MES de ratón (A, B y C). Se administró Cenobamato PO a 3, 5, 7.5, 10 y 30 mg/kg 2 horas antes del ensayo en ratones CF-1 (grupos: n=15 Cenobamato a 3 mg/kg; n=15 Cenobamato a 5 mg/kg; n=8 Cenobamato a 7.5 mg/kg; n=8 Cenobamato a 10 mg/kg; n=8 Cenobamato a 30 mg/kg; n=24 vehículo). Los resultados se expresan como la fracción de animales con convulsiones en cualquier grupo de dosis dado. La fracción de animales con convulsiones en el grupo tratado con Cenobamato fue significativamente diferente en 2/3 de los estudios del grupo tratado con vehículo (se muestra el valor de p). Las curvas de concentración-respuesta en plasma (D) y tejido cerebral (E) de Cenobamato basadas en la ecuación de Hill Langmuir muestran que la eficacia depende de la concentración. El análisis de la curva de respuesta a la concentración de Cenobamato mostró una EC_{50} para plasma de 70.5 μ M y una EC_{50} para tejido cerebral de 25.2 μ M. Se obtuvieron muestras terminales de cerebro y plasma 2 horas después de la dosificación con Cenobamato. Cada punto de datos en D y E representa la fracción de animales con convulsiones al nivel de concentración medio para cada grupo de dosis.

La Figura 19 muestra los efectos anticonvulsivos del Compuesto A y Cenobamato en combinación en el ensayo AC-MES de ratón. Una combinación de Compuesto A y Cenobamato en el ensayo AC-MES de ratón (A y B). El Compuesto A se administró PO a 0.5, 1 y 2 mg/kg 0.5 horas antes del ensayo; Se administró Cenobamato PO a 5 mg/kg 2 horas antes del ensayo en ratones CF-1 (grupos de dosis única: n=8 Compuesto A a 2 mg/kg, n=8 Cenobamato a 5 mg/kg; grupo de dosis combinada: n=8 Compuesto A a 2 mg/kg + Cenobamato a 5 mg/kg; n=8 Compuesto A a 1 mg/kg + Cenobamato a 5 mg/kg; n=8 Compuesto A a 0.5 mg/kg + Cenobamato a 5 mg/kg; n=8 vehículo). Los resultados se expresan como la fracción de animales con convulsiones en cualquier grupo de dosis dado. En el estudio 4F, la diferencia entre el grupo tratado con Cenobamato y el grupo de combinación fue estadísticamente

significativa, mientras que la diferencia entre el grupo tratado con el Compuesto A y el grupo de combinación no fue estadísticamente significativa. En el estudio 4G, la diferencia entre el grupo del vehículo y los grupos de combinación fue estadísticamente significativa. Se muestran los valores de p. La relación farmacocinética-farmacodinámica (PK/PD) del compuesto A con y sin Cenobamato por concentración plasmática y cerebral se muestra en C y D. Cada punto de datos en C y D representa la fracción de animales con convulsiones al nivel de concentración medio para cada grupo de dosis. Se obtuvieron muestras terminales de cerebro y plasma 0.5 horas después de la dosificación PO con el Compuesto A y 2 horas después de la dosificación PO con Cenobamato.

4. DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente divulgación se refiere, entre otras cosas, a métodos y usos novedosos y mejorados para tratar un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesite, que comprende la administración conjunta del Compuesto A y un medicamento anticonvulsivo (ASM) al ser humano, incluso por administración oral.

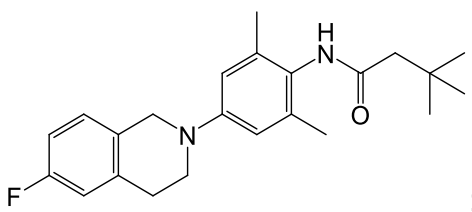
En la siguiente divulgación, se exponen ciertos detalles específicos para proporcionar una comprensión completa de varias modalidades. Sin embargo, un experto en la técnica comprenderá que los métodos y usos descritos en el presente documento pueden practicarse sin estos detalles. En otros casos, las estructuras bien conocidas no se han mostrado ni descrito en detalle para evitar oscurecer innecesariamente las descripciones de las modalidades. A menos que el contexto requiera lo contrario, a lo largo de la especificación y las reivindicaciones que siguen, la palabra “comprender” y sus variaciones, como “comprende” y “que comprende” deben interpretarse en un sentido abierto e inclusivo, es decir, como “que incluye, pero no se limita a”. Además, los encabezados proporcionados en este documento son solo por conveniencia y no interpretan el alcance o el significado de la invención reivindicada.

La referencia a lo largo de esta especificación a “una modalidad” o “una modalidad” significa que una característica, estructura o característica particular descrita en relación con la modalidad está incluida en por lo menos una modalidad. Por lo tanto, las apariciones de las frases “en una modalidad” o “en una modalidad” en varios lugares a lo largo de esta especificación no necesariamente se refieren todas a la misma realización. Además, las características, estructuras o características particulares pueden combinarse de cualquier manera adecuada en una o más modalidades. Además, como se usa en esta especificación y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen referentes plurales a menos que el contenido dicte claramente lo contrario. También se debe tener en cuenta que el término “o” generalmente se emplea en su sentido que incluye “y/o” a menos que el contenido indique claramente lo contrario.

4.1. Definiciones

Como se usa en la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, a menos que se especifique lo contrario, los siguientes términos y abreviaturas tienen el significado que se indica:

“Compuesto A” se refiere al compuesto que tiene la siguiente fórmula:



y que tiene un nombre químico de *N*-[4-(6-fluoro-3,4-dihidro-1*H*-isoquinolin-2-il)-2,6-dimetilfenil]-3,3-dimetilbutanamida. La preparación del Compuesto A y su uso como abridor Kv7.2/Kv7.3 (KCNQ2/3) se divulga en las patentes estadounidenses números 8,293,911 y 8,993,593, así como en las solicitudes estadounidenses números de serie 16/409,684 y 16/410,851. El compuesto A es diferente de la mayoría de los medicamentos anticonvulsivos conocidos en que potencia y mejora la abertura de los canales de potasio activados por voltaje Kv7.2 y Kv7.3 (Kv7.2/Kv7.3), que son importantes para controlar la

excitabilidad neuronal. El Compuesto A se usa en los métodos y usos descritos en este documento. Se entenderá que cualquier referencia al Compuesto A o cualquiera de los ASMs mencionados en la divulgación también incluye sus sales farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, el ácido valproico también puede ser valproato de sodio o formas semisódicas de valproato).

“Administración conjunta” se refiere en este documento a cualquier forma de administración de dos o más compuestos terapéuticos diferentes de manera que el segundo compuesto administrado se administre mientras el primer compuesto terapéutico administrado todavía es efectivo en el cuerpo (por ejemplo, los dos compuestos son simultáneamente efectivos en el paciente, lo que puede incluir efectos aditivos o sinérgicos de los dos compuestos). Por ejemplo, el Compuesto A y los medicamentos anticonvulsivos descritos en el presente documento pueden administrarse en la misma formulación o en una formulación separada, ya sea de forma concomitante o secuencial. En ciertas modalidades, el Compuesto A y los medicamentos anticonvulsivos descritos en el presente documento pueden administrarse dentro de una hora, 12 horas, 24 horas, 36 horas, 48 horas, 72 horas o una semana entre sí. Así, un individuo que recibe tal tratamiento puede beneficiarse de un efecto combinado de los diferentes compuestos terapéuticos.

“Excitación neuronal disminuida” o “excitabilidad neuronal disminuida” como se usa en el presente documento se refiere a un nivel de actividad de las células neuronales que se reduce hasta cierto punto hacia un estado fisiológico normal que se observaría en ausencia del trastorno convulsivo en un paciente. Agentes particulares que disminuyen la excitabilidad neuronal incluyen agentes que actúan sobre canales y receptores expresados en células neuronales para disminuir directamente el nivel de excitabilidad de la neurona. Por el contrario, el agente puede actuar indirectamente para disminuir el nivel de excitabilidad de la neurona al iniciar una cascada de eventos celulares, cuyos efectos, corriente abajo, dan como resultado una excitabilidad neuronal disminuida. En el presente documento se describen ciertos medicamentos anticonvulsivos que

disminuyen la excitabilidad neuronal para restaurar los niveles fisiológicos de actividad neuronal.

“Inhibición neuronal aumentada”, como se usa en el presente documento, se refiere a un nivel de inhibición neuronal que aumenta hasta cierto punto hacia un estado fisiológico normal que se observaría en ausencia del trastorno convulsivo en un paciente. Ciertos medicamentos anticonvulsivos, como los agentes GABAérgicos, que aumentan la inhibición neuronal para restaurar los niveles fisiológicos de actividad neuronal se describen en el presente documento.

El/los “trastorno(s) convulsivo(s)” se refiere(n) a convulsiones y trastornos asociados con convulsiones tales como convulsiones de inicio parcial (focales), epilepsia fotosensible, síncope autoinducido, epilepsia intratable, síndrome de Angelman, epilepsia rolándica benigna, trastorno CDKL5, epilepsia de ausencia infantil y juvenil, síndrome de Dravet, epilepsia del lóbulo frontal, síndrome de deficiencia de Glut1, hamartoma hipotalámico, espasmos infantiles/síndrome de West, epilepsia mioclónica juvenil, síndrome de Landau-Kleffner, síndrome de Lennox-Gastaut (LGS), epilepsia con ausencias mioclónicas, síndrome de Ohtahara, síndrome de Panayiotopoulos, epilepsia PCDH19, epilepsias mioclónicas progresivas, síndrome de Rasmussen, síndrome del cromosoma 20 en anillo, epilepsias reflejas, epilepsia del lóbulo temporal, epilepsia mioclónica progresiva de Lafora, síndromes neurocutáneos, complejo de esclerosis tuberosa, encefalopatía epiléptica infantil temprana, encefalopatía epiléptica de inicio temprano, epilepsia generalizada con convulsiones febriles +, síndrome de Rett, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, autismo, ataxia, hipotonía y discinesia paroxística. En ciertas modalidades, el término “trastorno convulsivo” se refiere a la epilepsia de inicio focal, también conocida como epilepsia de inicio parcial (focal).

La “cantidad terapéuticamente eficaz”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad de Compuesto A, una cantidad de ASM, o tanto una cantidad de Compuesto A como una cantidad de ASM que es

suficiente para tratar la enfermedad, el trastorno o la afección indicados o tener el efecto declarado deseado sobre la enfermedad, el trastorno o la afección o uno o más mecanismos subyacentes a la enfermedad, el trastorno o la afección en un sujeto humano. En determinadas modalidades, cuando el Compuesto A se administra conjuntamente con un ASM para el tratamiento de un trastorno convulsivo, la cantidad terapéuticamente eficaz se refiere tanto a una cantidad de Compuesto A como a una cantidad de ASM que, tras la administración conjunta a un ser humano, trata o mejora un trastorno convulsivo en el ser humano, o muestra un efecto terapéutico detectable en el ser humano que tiene un trastorno convulsivo. El efecto puede detectarse, por ejemplo, mediante una reducción del número de episodios de convulsiones o mediante la reducción de la gravedad de los episodios de convulsiones.

El "tratamiento", como se usa en el presente documento, se refiere a las aplicaciones terapéuticas asociadas con la administración conjunta del Compuesto A y un ASM que mejoran la enfermedad, el trastorno o la afección indicados o uno o más mecanismos subyacentes de dicha enfermedad, trastorno o afección, incluyendo la desaceleración o la detención de la progresión de la enfermedad, el trastorno o la afección o uno o más de los mecanismos subyacentes en un sujeto humano. En ciertas modalidades, cuando el Compuesto A y un ASM se administran conjuntamente para el tratamiento de un trastorno convulsivo, el tratamiento se refiere a aplicaciones terapéuticas para retrasar o detener la progresión de un trastorno convulsivo y/o revertir un trastorno convulsivo. La reversión de un trastorno convulsivo difiere de una aplicación terapéutica que retarda o detiene un trastorno convulsivo en que, con un método de reversión, no solo se detiene la progresión de un trastorno convulsivo, sino que el comportamiento celular se mueve hasta cierto punto hacia un estado normal que se observaría en ausencia del trastorno convulsivo. En algunas modalidades, el tratamiento de un trastorno convulsivo que comprende la administración conjunta del Compuesto A con un ASM se acompaña de una alteración de la actividad celular de uno o más canales de potasio Kv7 (por ejemplo, Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4

y/o Kv7.5, particularmente Kv7.2 y/o Kv7.3, opcionalmente sobre Kv7.1) hacia un nivel normal que se observaría en ausencia del trastorno convulsivo.

“En condiciones de alimentación” se refiere a la condición de haber consumido alimentos durante el período de tiempo entre aproximadamente 4 horas antes de la administración oral de una cantidad efectiva (por ejemplo, dentro del rango de dosis terapéuticamente efectiva) del Compuesto A hasta aproximadamente 4 horas después de la administración del Compuesto A. El alimento puede ser un alimento sólido, líquido o una mezcla de alimentos sólidos y líquidos con suficiente volumen y contenido de grasa para que no se disuelva y absorba rápidamente en el estómago. En algunos casos, el alimento es una comida, como el desayuno, el almuerzo, la cena o, alternativamente, alimentos para bebés (por ejemplo, fórmula o leche materna). La cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto A se puede administrar por vía oral al sujeto, por ejemplo, entre aproximadamente 30 minutos antes y aproximadamente 2 horas después de comer, lo más ventajoso es que la unidad de dosificación del Compuesto A se administre por vía oral durante una comida o dentro de los 15 minutos después de comer.

“En ayunas” se refiere a la condición de no haber consumido alimentos durante el período de tiempo entre por lo menos 4 horas antes de la administración oral de una cantidad terapéuticamente eficaz del Compuesto A hasta aproximadamente 4 horas después de la administración del Compuesto A.

4.2. Modalidades

En algunas modalidades, la presente divulgación se refiere a un método para tratar un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesita, que comprende la administración conjunta (por ejemplo, por vía oral) del Compuesto A y un medicamento anticonvulsivo (ASM) al ser humano en cantidades que son terapéuticamente eficaces cuando se administran conjuntamente. Asimismo, en algunas modalidades, la presente divulgación está dirigida al uso del Compuesto A y un ASM, en cantidades que son

terapéuticamente eficaces cuando se administran conjuntamente, en el tratamiento de un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesite. La administración conjunta contempla que el Compuesto A puede administrarse simultáneamente, antes o después de la administración del ASM. En ciertos casos, el trastorno convulsivo tratado que comprende la administración conjunta del Compuesto A y un ASM es epilepsia de inicio focal.

En otras modalidades cuando se trata un trastorno convulsivo en el presente documento, el trastorno convulsivo se selecciona de epilepsia de inicio focal, epilepsia fotosensible, síncope autoinducido, epilepsia intratable, síndrome de Angelman, epilepsia rolándica benigna, trastorno CDKL5, epilepsia de ausencia infantil y juvenil, síndrome de Dravet, epilepsia del lóbulo frontal, síndrome de deficiencia de Glut1, hamartoma hipotalámico, espasmos infantiles/síndrome de West, epilepsia mioclónica juvenil, síndrome de Landau-Kleffner, síndrome de Lennox-Gastaut (LGS), epilepsia con ausencias mioclónicas, síndrome de Ohtahara, síndrome de Panayiotopoulos, epilepsia PCDH19, epilepsias mioclónicas progresivas, síndrome de Rasmussen, síndrome del cromosoma 20 en anillo, epilepsias reflejas, epilepsia del lóbulo temporal, epilepsia mioclónica progresiva de Lafora, síndromes neurocutáneos, complejo de esclerosis tuberosa, encefalopatía epiléptica infantil temprana, encefalopatía epiléptica de inicio temprano, epilepsia generalizada con convulsiones febriles +, síndrome de Rett, esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, autismo, ataxia, hipotonía y discinesia paroxística. En ciertas modalidades, el trastorno convulsivo es epilepsia de inicio focal, también conocida como epilepsia de inicio parcial (focal).

En algunas modalidades, la presente divulgación está dirigida a un método para reducir la cantidad de un ASM que se requiere para la eficacia terapéutica en un ser humano que padece un trastorno convulsivo, que comprende administrar (por ejemplo, por vía oral) al ser humano, junto con el ASM, una cantidad de Compuesto A que es eficaz para lograr dicha reducción cuando se administra con el ASM. Asimismo, en algunas modalidades, la presente divulgación está dirigida al uso del Compuesto A para reducir la cantidad de un

ASM que se requiere para la eficacia terapéutica en un ser humano que padece un trastorno convulsivo, como por ejemplo mediante la administración al ser humano, junto con el ASM, de una cantidad de Compuesto A que es eficaz para lograr dicha reducción cuando se administra con el ASM. Por ejemplo, en algunas modalidades, la presente divulgación proporciona un método para tratar un trastorno convulsivo en un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que lo necesita, que comprende la administración conjunta (por ejemplo, por vía oral) del Compuesto A y un ASM, en el que la cantidad de ASM administrada es menor que la cantidad de ASM que se necesitaría para lograr la misma o una reducción similar en el número de episodios de convulsiones o una reducción de la gravedad de los episodios de convulsiones en ausencia de la administración del Compuesto A. En algunas modalidades, el ASM es ácido valproico, levetiracetam, fenitoína, lacosamida, cenobamato o una combinación de los mismos, particularmente ácido valproico.

En algunas modalidades, la presente divulgación se refiere a un método para reducir la cantidad de Compuesto A que se requiere para la eficacia terapéutica en un ser humano que padece un trastorno convulsivo, que comprende administrar (por ejemplo, por vía oral) al ser humano, junto con el Compuesto A, una cantidad de un ASM que es eficaz para lograr dicha reducción cuando se administra con el Compuesto A. Asimismo, en algunas modalidades, la presente divulgación está dirigida al uso de un ASM para reducir la cantidad de Compuesto A que se requiere para la eficacia terapéutica en un humano que padece un trastorno convulsivo, como administrar al ser humano, junto con el Compuesto A, una cantidad de ASM que es eficaz para lograr dicha reducción cuando se administra con el Compuesto A. Por ejemplo, en algunas modalidades, la presente divulgación proporciona un método para tratar un trastorno convulsivo en un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que lo necesita, que comprende la administración conjunta (por ejemplo, por vía oral) del Compuesto A y un ASM, en la que la cantidad de Compuesto A administrado es menor que la cantidad de Compuesto A que sería necesario para lograr la misma o una reducción similar en el número de episodios de convulsiones o una reducción de la gravedad de los episodios de convulsiones en ausencia de

la administración del ASM. En algunas modalidades, el ASM es ácido valproico, levetiracetam, fenitoína, lacosamida, cenobamato o una combinación de los mismos, particularmente fenitoína.

En algunas modalidades, los métodos y usos descritos en el presente documento para tratar una convulsión en un ser humano que lo necesite, para reducir la cantidad de ASM requerida para la eficacia terapéutica o para reducir la cantidad de Compuesto A requerido para la eficacia terapéutica, comprenden mejorar la abertura de un canal de potasio Kv7 en el ser humano.

En ciertas modalidades, la presente divulgación proporciona un método o uso que comprende abrir o mejorar la abertura de un canal de potasio Kv7, como el canal de potasio Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4 y/o Kv7.5, particularmente el canal de potasio Kv7.2/Kv7.3 (KCNQ2/3) en un ser humano que lo necesita mediante la administración de una cantidad eficaz del Compuesto A junto con un ASM. En algunas de tales modalidades, el ser humano tiene un trastorno convulsivo, como los descritos en el presente documento.

En ciertos casos, el método o uso descrito en este documento comprende abrir o mejorar selectivamente la abertura de un canal de potasio Kv7, como uno o más de Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4 o Kv7.5 sobre Kv7.1. En algunas modalidades, el método o uso es selectivo para Kv7.2, sobre Kv7.1. En otras modalidades, el método o uso es selectivo para Kv7.3, sobre Kv7.1. En aún otras modalidades, el método o uso es selectivo para Kv7.4, sobre Kv7.1. En aún otras modalidades adicionales, el método o uso es selectivo para Kv7.5, sobre Kv7.1. En ciertas modalidades, el método o uso es selectivo para Kv7.2 y Kv7.3, sobre Kv7.1. En ciertas modalidades, el método o uso es selectivo para Kv7.2 y Kv7.3 sobre otros canales de potasio Kv7. En ciertas modalidades, el método o uso es selectivo para Kv7.2 y Kv7.3 sobre Kv7.4 y Kv7.5.

En una modalidad, los métodos y usos descritos en el presente documento, como el método o el uso en el tratamiento de un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesita, se logra mediante la administración (por ejemplo, por

vía oral) de una cantidad de Compuesto A junto con un ASM, como de aproximadamente 0.01 mg/kg a aproximadamente 2.0 mg/kg de Compuesto A. Cantidades representativas más específicas de Compuesto A incluyen 0.05 mg/kg, 0.10 mg/kg, 0.20 mg/kg, 0.30 mg/kg, 0.40 mg/kg, 0.5 mg/kg, 0.6 mg/kg, 0.7 mg/kg, 0.80 mg/kg, 0.90 mg/kg, 1.0 mg/kg, 1.1 mg/kg, 1.2 mg/kg, 1.3 mg/kg, 1.4 mg/kg, 1.5 mg/kg, 1.6 mg/kg, 1.7 mg/kg, 1.8 mg/kg, 1.9 mg/kg y 2.0 mg/kg, o cualquier rango de cantidades creado mediante el uso de dos de las cantidades antes mencionadas como puntos finales. En algunos aspectos, el método o uso incluye la administración (por ejemplo, por vía oral) de 0.03 a 1.0 mg/kg del Compuesto A junto con una cantidad descrita de un ASM. En algunos aspectos, el método incluye la administración (por ejemplo, por vía oral) de 0.05 a 0.5 mg/kg del Compuesto A junto con una cantidad divulgada de un ASM.

En algunas modalidades, los métodos y usos descritos en el presente documento, como el método o el uso en el tratamiento de un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesita, se logra mediante la administración (por ejemplo, por vía oral) de una cantidad de Compuesto A junto con un ASM, como de 2 a 200 mg de Compuesto A en dosis únicas o divididas. Por ejemplo, el método puede incluir la administración del Compuesto A (por ejemplo, por vía oral), en dosis únicas o divididas de, aproximadamente 2 mg, aproximadamente 3 mg, aproximadamente 4 mg, aproximadamente 5 mg, aproximadamente 6 mg, aproximadamente 7 mg, aproximadamente 8 mg, aproximadamente 9 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 11 mg, aproximadamente 12 mg, aproximadamente 13 mg, aproximadamente 14 mg, aproximadamente 15 mg, aproximadamente 16 mg, aproximadamente 17 mg, aproximadamente 18 mg , aproximadamente 19 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 21 mg, aproximadamente 22 mg, aproximadamente 23 mg, aproximadamente 24 mg, aproximadamente 25 mg, aproximadamente 26 mg, aproximadamente 27 mg, aproximadamente 29 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 31 mg, aproximadamente 32 mg, aproximadamente 33 mg, aproximadamente 34 mg, aproximadamente 35 mg, aproximadamente 36 mg, aproximadamente 37 mg, aproximadamente 38 mg,

aproximadamente 39 mg, aproximadamente 40 mg, aproximadamente 41 mg, aproximadamente 42 mg, aproximadamente 43 mg, aproximadamente 44 mg, aproximadamente 45 mg, aproximadamente 46 mg, aproximadamente 47 mg, aproximadamente 48 mg, aproximadamente 49 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 51 mg, aproximadamente 52 mg, aproximadamente 53 mg, aproximadamente 54 mg, aproximadamente 55 mg, aproximadamente 56 mg, aproximadamente 57 mg, aproximadamente 58 mg, aproximadamente 59 mg, aproximadamente 60 mg , aproximadamente 61 mg, aproximadamente 62 mg, aproximadamente 63 mg, aproximadamente 64 mg, aproximadamente 65 mg, aproximadamente 66 mg, aproximadamente 67 mg, aproximadamente 68 mg, aproximadamente 69 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 71 mg, aproximadamente 72 mg, aproximadamente 73 mg, aproximadamente 74 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 76 mg, aproximadamente 77 mg, aproximadamente 78 mg, aproximadamente 79 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 81 mg, 82 mg, 83 mg, 84 mg, 85 mg, 86 mg, 87 mg, 88 mg, 89 mg, 90 mg, 91 mg, 92 mg, 93 mg, 94 mg, 95 mg, 96 mg, 97 mg, 98 mg, 99 mg, 100 mg, 101 mg, aproximadamente 102 mg, aproximadamente 103 mg, aproximadamente 104 mg, aproximadamente 105 mg, aproximadamente 106 mg, aproximadamente 107 mg, aproximadamente 108 mg, aproximadamente 109 mg, aproximadamente 110 mg, aproximadamente 111 mg, aproximadamente 112 mg, aproximadamente 113 mg, aproximadamente 114 mg, aproximadamente 115 mg, aproximadamente 116 mg, aproximadamente 117 mg, aproximadamente 118 mg, aproximadamente 119 mg, aproximadamente 120 mg, aproximadamente 121 mg, aproximadamente 122 mg, aproximadamente 123 mg, aproximadamente 124 mg, aproximadamente 125 mg, aproximadamente 126 mg, aproximadamente 127 mg, aproximadamente 129 mg, aproximadamente 130 mg, aproximadamente 131 mg, aproximadamente 132 mg, aproximadamente 133 mg, aproximadamente 134 mg, aproximadamente 135 mg, aproximadamente 136 mg, aproximadamente 137 mg, aproximadamente 138 mg, aproximadamente 139 mg, aproximadamente 140 mg, aproximadamente 141 mg, aproximadamente 142 mg, aproximadamente 143 mg, aproximadamente 144 mg, aproximadamente 145 mg, aproximadamente 146 mg, aproximadamente 147

mg, aproximadamente 148 mg, aproximadamente 149 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 151 mg, aproximadamente 152 mg, aproximadamente 153 mg, aproximadamente 154 mg, aproximadamente 155 mg, aproximadamente 156 mg, aproximadamente 157 mg, aproximadamente 158 mg, aproximadamente 159 mg, aproximadamente 160 mg, aproximadamente 161 mg, aproximadamente 162 mg, aproximadamente 163 mg, aproximadamente 164 mg, aproximadamente 165 mg, aproximadamente 166 mg, aproximadamente 167 mg, aproximadamente 168 mg, aproximadamente 169 mg, aproximadamente 170 mg, aproximadamente 171 mg, aproximadamente 172 mg, aproximadamente 173 mg, aproximadamente 174 mg, aproximadamente 175 mg, aproximadamente 176 mg, aproximadamente 177 mg, aproximadamente 178 mg, aproximadamente 179 mg, aproximadamente 180 mg, aproximadamente 181 mg, aproximadamente 182 mg, aproximadamente 183 mg, aproximadamente 184 mg, aproximadamente 185 mg, aproximadamente 186 mg, aproximadamente 187 mg, aproximadamente 188 mg, aproximadamente 189 mg, aproximadamente 190 mg, aproximadamente 191 mg, aproximadamente 192 mg, aproximadamente 193 mg, aproximadamente 194 mg, aproximadamente 195 mg, aproximadamente 196 mg, aproximadamente 197 mg, aproximadamente 198 mg, aproximadamente 199 mg o aproximadamente 200 mg o la administración (por ejemplo, por vía oral) de cualquier rango de cantidades creadas por el uso de dos de las mencionadas cantidades en puntos finales. En algunos aspectos, el método o uso incluye la administración oral de 2 a 100 o de 5 a 50 mg del Compuesto A en dosis únicas o divididas junto con una cantidad divulgada de un ASM. En algunos aspectos, el método o uso incluye la administración oral de una dosis única o dividida de 5, 10, 15, 20 o 25 mg del Compuesto A junto con una cantidad divulgada de un ASM. En algunos aspectos, el método o uso incluye la administración oral de una dosis única o dividida de 20 mg del Compuesto A junto con una cantidad descrita de un ASM.

En algunos aspectos, los métodos y usos descritos en el presente documento, como el método o el uso en el tratamiento de un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesita, se logra mediante la administración (por ejemplo, por

vía oral) de por lo menos 10 mg del Compuesto A, como por lo menos 20, 30, 40, 50, 75 o 100 mg del Compuesto A junto con una cantidad divulgada de un ASM. En algunas modalidades, los métodos y usos descritos en el presente documento, como el método o el uso para tratar un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesita, se logra mediante la administración (por ejemplo, por vía oral) de por lo menos 50 mg del Compuesto A, como por lo menos 75, 100, 125, 150, 175 o 200 mg del Compuesto A junto con una cantidad divulgada de un ASM.

En algunas modalidades, los métodos y usos descritos en el presente documento, como el método o el uso en el tratamiento de un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesita, se logra mediante la administración (por ejemplo, por vía oral) de una cantidad de Compuesto A por día, como de 5 a 1000 mg de Compuesto A por día, como de 5 a 500 mg o de 5 a 250 mg de Compuesto A por día junto con un ASM. Por ejemplo, el método o uso puede incluir la administración (por ejemplo, por vía oral) de aproximadamente 5 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 15 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 25 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 35 mg, aproximadamente 40 mg, aproximadamente 45 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 55 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 65 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 85 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 95 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 105 mg, aproximadamente 110 mg, aproximadamente 115 mg, aproximadamente 120 mg, aproximadamente 125 mg, aproximadamente 130 mg, aproximadamente 135 mg, aproximadamente 140 mg, aproximadamente 145 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 155 mg, aproximadamente 160 mg, aproximadamente 165 mg, aproximadamente 170 mg, aproximadamente 175 mg, aproximadamente 180 mg, aproximadamente 185 mg, aproximadamente 190 mg, aproximadamente 195 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 205 mg, aproximadamente 210 mg, aproximadamente 215 mg, aproximadamente 220 mg, aproximadamente 225 mg, aproximadamente 230 mg, aproximadamente 235 mg, aproximadamente

240 mg, aproximadamente 245 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 255 mg, aproximadamente 260 mg, aproximadamente 265 mg, aproximadamente 270 mg, aproximadamente 275 mg, aproximadamente 280 mg, aproximadamente 285 mg, aproximadamente 290 mg, aproximadamente 295 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 305 mg, aproximadamente 310 mg, aproximadamente 315 mg, aproximadamente 320 mg, aproximadamente 325 mg, aproximadamente 330 mg, aproximadamente 335 mg, aproximadamente 340 mg, aproximadamente 345 mg, aproximadamente 350 mg, aproximadamente 355 mg, aproximadamente 360 mg, aproximadamente 365 mg, aproximadamente 370 mg, aproximadamente 375 mg, aproximadamente 380 mg, aproximadamente 385 mg, aproximadamente 390 mg, aproximadamente 395 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 405 mg, aproximadamente 410 mg, aproximadamente 415 mg, aproximadamente 420 mg, aproximadamente 425 mg, aproximadamente 430 mg, aproximadamente 435 mg, aproximadamente 440 mg, aproximadamente 445 mg, aproximadamente 450 mg, aproximadamente 455 mg, aproximadamente 460 mg, aproximadamente 465 mg, aproximadamente 470 mg, aproximadamente 475 mg, aproximadamente 480 mg, aproximadamente 485 mg, aproximadamente 490 mg, aproximadamente 495 mg, aproximadamente 500 mg o aproximadamente 1000 mg del Compuesto A por día, o administrando (por ejemplo, por vía oral) por día un rango de cantidades creadas usando dos de las cantidades antes mencionadas como puntos finales. En algunos aspectos, el método o uso incluye administrar oralmente de 5 a 250 mg de compuesto A por día, como 10, 15, 20, 25, 30, 35 o 40 mg a 75, 100, 125, 150, 175 o 200 mg de compuesto A por día, incluyendo 20 a 150 mg por día conjuntamente con una cantidad divulgada de un ASM. En algunos aspectos, la administración oral incluye 50, 75, 100 o 125 mg del Compuesto A por día, tal como 100 mg por día junto con una cantidad divulgada de un ASM.

En ciertos casos, las dosis diarias anteriores del Compuesto A se administran (por ejemplo, por vía oral) como dosis múltiples por día, como en dos, tres, cuatro o cinco dosis por día. Por ejemplo, una dosis diaria de 100 mg puede

administrarse en cinco dosis de 20 mg, cuatro de 25 mg, tres de 33.3 mg o dos de 50 mg a lo largo del día junto con una cantidad divulgada de un ASM.

En algunas modalidades, las dosis diarias anteriores del Compuesto A se administran (por ejemplo, por vía oral) como una dosis única del Compuesto A o como una dosis única del Compuesto A junto con una dosis única de un ASM. Por ejemplo, aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25 o 30 mg a aproximadamente 50, 65, 75, 100, 125, o 150 mg de Compuesto A por día pueden administrarse oralmente como una dosis única, incluyendo 10-25 mg, 10-30 mg y 10-40 mg por día como dosis única, como 10-25 mg por día como una sola dosis. De manera relacionada, cualquiera de las dosis del Compuesto A discutidas en los párrafos anteriores puede incluirse en una forma de dosificación unitaria.

En algunas modalidades, las dosis anteriores del Compuesto A se administran (por ejemplo, por vía oral) como dosis múltiples por semana, como en dos, tres, cuatro, cinco, diez, quince o veinte dosis por semana. Por ejemplo, una dosis semanal de 100 mg puede administrarse en cinco dosis de 20 mg, cuatro de 25 mg o dos de 50 mg a lo largo de la semana junto con una cantidad divulgada de un ASM.

En algunas modalidades, los métodos y usos descritos en este documento, cuando se usa la dosificación diaria divulgada en este documento, logran un estado estacionario para el Compuesto A dentro de 6 a 9 días, como en aproximadamente 1 semana.

En algunas modalidades, los métodos y usos descritos en el presente documento, como el método o el uso en el tratamiento de un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesita, se logra mediante la administración (por ejemplo, por vía oral) de una cantidad de ASM junto con el Compuesto A, como de aproximadamente 0.01 mg/kg a aproximadamente 2.0 mg/kg de ASM. Las cantidades representativas más específicas de ASM incluyen 0.05 mg/kg, 0.10 mg/kg, 0.20 mg/kg, 0.30 mg/kg, 0.40 mg/kg, 0.5

mg/kg, 0.6 mg/kg, 0.7 mg/kg, 0.80 mg/kg, 0.90 mg/kg, 1.0 mg/kg, 1.1 mg/kg, 1.2 mg/kg, 1.3 mg/kg, 1.4 mg/kg, 1.5 mg/kg, 1.6 mg/kg, 1.7 mg/kg, 1.8 mg/kg, 1.9 mg/kg y 2.0 mg/kg, o cualquier rango de cantidades creado mediante el uso de dos de las cantidades antes mencionadas como puntos finales. En algunos aspectos, el método o uso incluye la administración (por ejemplo, por vía oral) de 0.03 a 1.0 mg/kg de un ASM junto con el Compuesto A. En algunos aspectos, el método incluye la administración (por ejemplo, por vía oral) de 0.05 a 0.5 mg/kg de un ASM junto con el Compuesto A.

En algunas modalidades, los métodos y usos descritos en el presente documento, como el método o el uso en el tratamiento de un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesita, se logra mediante la administración (por ejemplo, por vía oral) de una cantidad de un ASM junto con el Compuesto A, como de 2 a 200 mg de un ASM en dosis únicas o divididas. Por ejemplo, el método puede incluir la administración de un ASM (por ejemplo, por vía oral), en dosis únicas o divididas de, aproximadamente 2 mg, aproximadamente 3 mg, aproximadamente 4 mg, aproximadamente 5 mg, aproximadamente 6 mg, aproximadamente 7 mg, aproximadamente 8 mg, aproximadamente 9 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 11 mg, aproximadamente 12 mg, aproximadamente 13 mg, aproximadamente 14 mg, aproximadamente 15 mg, aproximadamente 16 mg, aproximadamente 17 mg, aproximadamente 18 mg, aproximadamente 19 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 21 mg, aproximadamente 22 mg, aproximadamente 23 mg, aproximadamente 24 mg, aproximadamente 25 mg, aproximadamente 26 mg, aproximadamente 27 mg, aproximadamente 29 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 31 mg, aproximadamente 32 mg, aproximadamente 33 mg, aproximadamente 34 mg, aproximadamente 35 mg, aproximadamente 36 mg, aproximadamente 37 mg, aproximadamente 38 mg, aproximadamente 39 mg, aproximadamente 40 mg, aproximadamente 41 mg, aproximadamente 42 mg, aproximadamente 43 mg, aproximadamente 44 mg, aproximadamente 45 mg, aproximadamente 46 mg, aproximadamente 47 mg, aproximadamente 48 mg, aproximadamente 49 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 51 mg, aproximadamente 52 mg, aproximadamente 53 mg, aproximadamente 54 mg,

aproximadamente 55 mg, aproximadamente 56 mg, aproximadamente 57 mg, aproximadamente 58 mg, aproximadamente 59 mg, aproximadamente 60 mg , aproximadamente 61 mg, aproximadamente 62 mg, aproximadamente 63 mg, aproximadamente 64 mg, aproximadamente 65 mg, aproximadamente 66 mg, aproximadamente 67 mg, aproximadamente 68 mg, aproximadamente 69 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 71 mg, aproximadamente 72 mg, aproximadamente 73 mg, aproximadamente 74 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 76 mg, aproximadamente 77 mg, aproximadamente 78 mg, aproximadamente 79 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 81 mg, aproximadamente 82 mg, aproximadamente 83 mg, aproximadamente 84 mg, aproximadamente 85 mg, aproximadamente 86 mg, aproximadamente 87 mg, aproximadamente 88 mg, aproximadamente 89 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 91 mg, aproximadamente 92 mg, aproximadamente 93 mg, 94 mg, aproximadamente 95 mg, aproximadamente 96 mg, aproximadamente 97 mg, aproximadamente 98 mg, aproximadamente 99 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 101 mg, aproximadamente 102 mg, aproximadamente 103 mg, aproximadamente 104 mg, aproximadamente 105 mg, aproximadamente 106 mg, aproximadamente 107 mg, aproximadamente 108 mg, aproximadamente 109 mg, aproximadamente 110 mg, aproximadamente 111 mg, aproximadamente 112 mg, aproximadamente 113 mg, aproximadamente 114 mg, aproximadamente 115 mg, aproximadamente 116 mg, aproximadamente 117 mg, aproximadamente 118 mg, aproximadamente 119 mg, aproximadamente 120 mg, aproximadamente 121 mg, aproximadamente 122 mg, aproximadamente 123 mg, aproximadamente 124 mg, aproximadamente 125 mg, aproximadamente 126 mg, aproximadamente 127 mg, aproximadamente 129 mg, aproximadamente 130 mg, aproximadamente 131 mg, aproximadamente 132 mg, aproximadamente 133 mg, aproximadamente 134 mg, aproximadamente 135 mg, aproximadamente 136 mg, aproximadamente 137 mg, aproximadamente 138 mg, aproximadamente 139 mg, aproximadamente 140 mg, aproximadamente 141 mg, aproximadamente 142 mg, aproximadamente 143 mg, aproximadamente 144 mg, aproximadamente 145 mg, aproximadamente 146 mg, aproximadamente 147 mg, aproximadamente 148 mg, aproximadamente

149 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 151 mg, aproximadamente 152 mg, aproximadamente 153 mg, aproximadamente 154 mg, aproximadamente 155 mg, aproximadamente 156 mg, aproximadamente 157 mg, aproximadamente 158 mg, aproximadamente 159 mg, aproximadamente 160 mg, aproximadamente 161 mg, aproximadamente 162 mg, aproximadamente 163 mg, aproximadamente 164 mg, aproximadamente 165 mg, aproximadamente 166 mg, aproximadamente 167 mg, aproximadamente 168 mg, aproximadamente 169 mg, aproximadamente 170 mg, aproximadamente 171 mg, aproximadamente 172 mg, aproximadamente 173 mg, aproximadamente 174 mg, aproximadamente 175 mg, aproximadamente 176 mg, aproximadamente 177 mg, aproximadamente 178 mg, aproximadamente 179 mg, aproximadamente 180 mg, aproximadamente 181 mg, aproximadamente 182 mg, aproximadamente 183 mg, aproximadamente 184 mg, aproximadamente 185 mg, aproximadamente 186 mg, aproximadamente 187 mg, aproximadamente 188 mg, aproximadamente 189 mg, aproximadamente 190 mg, aproximadamente 191 mg, aproximadamente 192 mg, aproximadamente 193 mg, aproximadamente 194 mg, aproximadamente 195 mg, aproximadamente 196 mg, aproximadamente 197 mg, aproximadamente 198 mg, aproximadamente 199 mg o aproximadamente 200 mg o la administración (por ejemplo, por vía oral) de cualquier rango de cantidades creadas usando dos de las cantidades mencionadas como puntos finales. En algunos aspectos, el método o uso incluye la administración oral de 2 a 100 o 5 a 50 mg de un ASM en dosis únicas o divididas junto con el Compuesto A. En algunos aspectos, el método o uso incluye la administración oral de una dosis única o dividida de 5, 10, 15, 20 o 25 mg de un ASM junto con el Compuesto A. En algunos aspectos, el método o uso incluye la administración oral de una dosis única o dividida de 20 mg de un ASM conjuntamente con una cantidad divulgada del Compuesto A.

En algunos aspectos, los métodos y usos descritos en el presente documento, como el método o el uso en el tratamiento de un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesita, se logra mediante la administración (por ejemplo, por vía oral) de por lo menos 10 mg de un ASM, como por lo menos 20, 30, 40, 50,

75 o 100 mg de un ASM junto con el Compuesto A. En algunas modalidades, los métodos y usos descritos en el presente documento, como el método o su uso en el tratamiento de un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesite, se logra mediante la administración (por ejemplo, por vía oral) de por lo menos 50 mg de un ASM, tal como por lo menos 75, 100, 125, 150, 175 o 200 mg de un ASM junto con el Compuesto A.

En algunas modalidades, los métodos y usos descritos en el presente documento, como el método o el uso en el tratamiento de un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesita, se logra mediante la administración (por ejemplo, por vía oral) de una cantidad de un ASM por día, como de 5 a 1000 mg de un ASM por día, como de 5 a 500 mg o de 5 a 250 mg de un ASM por día junto con el Compuesto A. Por ejemplo, el método o uso puede incluir la administración (por ejemplo, por vía oral) de aproximadamente 5 mg, aproximadamente 10 mg, aproximadamente 15 mg, aproximadamente 20 mg, aproximadamente 25 mg, aproximadamente 30 mg, aproximadamente 35 mg, aproximadamente 40 mg, aproximadamente 45 mg, aproximadamente 50 mg, aproximadamente 55 mg, aproximadamente 60 mg, aproximadamente 65 mg, aproximadamente 70 mg, aproximadamente 75 mg, aproximadamente 80 mg, aproximadamente 85 mg, aproximadamente 90 mg, aproximadamente 95 mg, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 105 mg, aproximadamente 110 mg, aproximadamente 115 mg, aproximadamente 120 mg, aproximadamente 125 mg, aproximadamente 130 mg, aproximadamente 135 mg, aproximadamente 140 mg, aproximadamente 145 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 155 mg, aproximadamente 160 mg, aproximadamente 165 mg, aproximadamente 170 mg, aproximadamente 175 mg, aproximadamente 180 mg, aproximadamente 185 mg, aproximadamente 190 mg, aproximadamente 195 mg, aproximadamente 200 mg, aproximadamente 205 mg, aproximadamente 210 mg, aproximadamente 215 mg, aproximadamente 220 mg, aproximadamente 225 mg, aproximadamente 230 mg, aproximadamente 235 mg, aproximadamente 240 mg, aproximadamente 245 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 255 mg, aproximadamente 260 mg, aproximadamente 265 mg, aproximadamente

270 mg, aproximadamente 275 mg, aproximadamente 280 mg, aproximadamente 285 mg, aproximadamente 290 mg, aproximadamente 295 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 305 mg, aproximadamente 310 mg, aproximadamente 315 mg, aproximadamente 320 mg, aproximadamente 325 mg, aproximadamente 330 mg, aproximadamente 335 mg, aproximadamente 340 mg, aproximadamente 345 mg, aproximadamente 350 mg, aproximadamente 355 mg, aproximadamente 360 mg, aproximadamente 365 mg, aproximadamente 370 mg, aproximadamente 375 mg, aproximadamente 380 mg, aproximadamente 385 mg, aproximadamente 390 mg, aproximadamente 395 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 405 mg, aproximadamente 410 mg, aproximadamente 415 mg, aproximadamente 420 mg, aproximadamente 425 mg, aproximadamente 430 mg, aproximadamente 435 mg, aproximadamente 440 mg, aproximadamente 445 mg, aproximadamente 450 mg, aproximadamente 455 mg, aproximadamente 460 mg, aproximadamente 465 mg, aproximadamente 470 mg, aproximadamente 475 mg, aproximadamente 480 mg, aproximadamente 485 mg, aproximadamente 490 mg, aproximadamente 495 mg, aproximadamente 500 mg o aproximadamente 1000 mg de un ASM por día, o la administración (por ejemplo, por vía oral) por día de un rango de cantidades creadas usando dos de las cantidades antes mencionadas como puntos finales. En algunos aspectos, el método o uso incluye la administración oral de 5 a 250 mg de un ASM por día, como 10, 15, 20, 25, 30, 35 o 40 mg a 75, 100, 125, 150, 175 o 200 mg de un ASM por día, incluyendo 20 a 150 mg por día junto con el Compuesto A. En algunos aspectos, la administración oral incluye 50, 75, 100 o 125 mg de un ASM por día, tal como 100 mg por día junto con el Compuesto A.

En ciertos casos, las dosis diarias anteriores de un ASM se administran (por ejemplo, por vía oral) como dosis múltiples por día, como en dos, tres, cuatro o cinco dosis por día. Por ejemplo, una dosis diaria de 100 mg puede administrarse en cinco dosis de 20 mg, cuatro de 25 mg, tres de 33.3 mg o dos de 50 mg a lo largo del día junto con el Compuesto A.

En algunas modalidades, las dosis diarias anteriores de un ASM se administran (por ejemplo, por vía oral) como una dosis única junto con el Compuesto A. Por ejemplo, aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25 o 30 mg a aproximadamente 50, 65, 75, 100, 125 o 150 mg de un ASM por día pueden administrarse por vía oral como una dosis única, incluyendo 10 -25 mg, 10-30 mg y 10-40 mg por día como una dosis única, tal como 10-25 mg por día como una dosis única junto con el Compuesto A. De manera relacionada, cualquiera de las dosis del ASM discutida en los párrafos anteriores puede incluirse en una forma de dosificación unitaria.

En algunas modalidades de los presentes métodos y usos descritos en el presente documento, el ASM se administra conjuntamente con el Compuesto A y es una o más benzodiazepinas (por ejemplo, clorazepato, clobazam, clonazepam, diazepam, lorazepam, nitrazepam, etc.), carbamazepina, cenobamato, felbamato, gabapentina, lacosamida, lamotrigina, levetiracetam, oxcarbazepina, fenobarbital, fenitoína, pregabalina, rufinamida, tiagabina, topiramato, ácido valproico, vigabatrina o zonisamida. En algunas modalidades, el ASM administrado conjuntamente con el Compuesto A es ácido valproico, levetiracetam, fenitoína, lacosamida, cenobamato o una combinación de los mismos.

En algunas modalidades de los presentes métodos y usos descritos en el presente documento, el ASM trata el trastorno convulsivo en un paciente al no mejorar la abertura de un canal de potasio Kv7 en el ser humano (por ejemplo, trata un trastorno convulsivo en un paciente mediante un mecanismo diferente al del Compuesto A). En algunas modalidades, el ASM disminuye la excitación neuronal al bloquear un canal de sodio en el ser humano. Los ASMs que se sabe que son bloqueadores de canal de sodio incluyen, por ejemplo, carbamazepina, lacosamida, lamotrigina, oxcarbazepina, fenitoína, rufinamida, topiramato y zonisamida. En algunas modalidades, el bloqueador de los canales de sodio inhibe la activación y transmisión del potencial de acción neuronal promoviendo la inactivación y reduciendo las contribuciones a la

actividad eléctrica en el segmento inicial del axón (AIS) así como en el propio axón.

En algunas modalidades, la presente divulgación se refiere a un método para tratar un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesita, que comprende la administración conjunta (por ejemplo, por vía oral) del Compuesto A y la carbamazepina al ser humano en cantidades que son terapéuticamente eficaces cuando se administran conjuntamente.

En algunas modalidades, la presente divulgación se refiere a un método para tratar un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesita, que comprende la administración conjunta (por ejemplo, por vía oral) del Compuesto A y lacosamida al ser humano en cantidades que son terapéuticamente eficaces cuando se administran conjuntamente.

En algunas modalidades, la presente divulgación se refiere a un método para tratar un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesita, que comprende la administración conjunta (por ejemplo, por vía oral) del Compuesto A y lamotrigina al ser humano en cantidades que son terapéuticamente eficaces cuando se administran conjuntamente.

En algunas modalidades, la presente divulgación se refiere a un método para tratar un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesita, que comprende la administración conjunta (por ejemplo, por vía oral) del Compuesto A y la oxcarbazepina al ser humano en cantidades que son terapéuticamente eficaces cuando se administran conjuntamente.

En algunas modalidades, la presente divulgación se refiere a un método para tratar un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesita, que comprende la administración conjunta (por ejemplo, por vía oral) de A y fenitoína al ser humano en cantidades que son terapéuticamente eficaces cuando se administran conjuntamente.

En algunas modalidades, la presente divulgación se refiere a un método para tratar un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesita, que comprende la administración conjunta (por ejemplo, por vía oral) del Compuesto A y la rufinamida al ser humano en cantidades que son terapéuticamente eficaces cuando se administran conjuntamente.

En algunas modalidades, la presente divulgación se refiere a un método para tratar un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesita, que comprende la administración conjunta (por ejemplo, por vía oral) del Compuesto A y topiramato al ser humano en cantidades que son terapéuticamente eficaces cuando se administran conjuntamente.

En algunas modalidades, la presente divulgación se refiere a un método para tratar un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesita, que comprende la administración conjunta (por ejemplo, por vía oral) del Compuesto A y zonisamida al ser humano en cantidades que son terapéuticamente eficaces cuando se administran conjuntamente.

En algunas modalidades de los presentes métodos y usos descritos en el presente documento, el ASM disminuye la excitación neuronal bloqueando un canal de calcio en el ser humano. Los ASMs que se sabe que son bloqueadores del canal de calcio incluyen, por ejemplo, gabapentina, fenobarbital, pregabalina y zonisamida. En algunas modalidades, el bloqueador de los canales de calcio reduce la transmisión excitatoria al reducir la liberación de neurotransmisores presinápticos, un proceso dependiente del calcio.

En algunas modalidades, la presente divulgación se refiere a un método para tratar un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesita, que comprende la administración conjunta (por ejemplo, por vía oral) del Compuesto A y la gabapentina al ser humano en cantidades que son terapéuticamente eficaces cuando se administran conjuntamente.

En algunas modalidades, la presente divulgación se refiere a un método para tratar un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesita, que comprende la administración conjunta (por ejemplo, por vía oral) del Compuesto A y fenobarbital al ser humano en cantidades que son terapéuticamente eficaces cuando se administran conjuntamente.

En algunas modalidades, la presente divulgación se refiere a un método para tratar un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesita, que comprende la administración conjunta (por ejemplo, por vía oral) del Compuesto A y la pregabalina al ser humano en cantidades que son terapéuticamente eficaces cuando se administran conjuntamente.

En algunas modalidades, la presente divulgación se refiere a un método para tratar un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesita, que comprende la administración conjunta (por ejemplo, por vía oral) del Compuesto A y la gabapentina al ser humano en cantidades que son terapéuticamente eficaces cuando se administran conjuntamente.

En algunas modalidades de los presentes métodos y usos descritos en el presente documento, el ASM disminuye la excitación neuronal al unirse a la glicoproteína 2A de la vesícula sináptica (SV2A) en el ser humano. Los ASMs que se sabe que se unen a SV2A incluyen, por ejemplo, levetiracetam. En algunas modalidades, el aglutinante de SV2A reduce la transmisión excitatoria al reducir la liberación de neurotransmisores presinápticos.

En algunas modalidades, la presente divulgación se refiere a un método para tratar un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesita, que comprende la administración conjunta (por ejemplo, por vía oral) del Compuesto A y levetiracetam al ser humano en cantidades que son terapéuticamente eficaces cuando se administran conjuntamente.

En algunas modalidades de los presentes métodos y usos descritos en el presente documento, el ASM aumenta la inhibición neuronal en el ser humano.

Los ASMs que se sabe que aumentan la inhibición neuronal incluyen, por ejemplo, benzodiazepinas (por ejemplo, clorazepato, clobazam, clonazepam, diazepam, lorazepam, nitrazepam, etc.), felbamato, fenobarbital, tiagabina, topiramato, ácido valproico y vigabatrina. En algunas modalidades, la ASM es un agente glutamatérgico. En algunos aspectos, el agente glutamatérgico reduce los efectos de este neurotransmisor sobre los receptores AMPA o NMDA en la membrana postsináptica. En algunas modalidades, el agente glutamatérgico es carbamazepina, felbamato, lamotrigina, pregabalina, fenitoína, pregabalina, tiagabina o topiramato. En otras modalidades, el ASM es un agente GABAérgico. En algunos aspectos, el agente GABAérgico es una benzodiazepina (por ejemplo, clorazepato, clobazam, clonazepam, diazepam, lorazepam, nitrazepam, etc.), felbamato, fenobarbital, tiagabina, topiramato, ácido valproico o vigabatrina. En algunos casos, el agente GABAérgico puede afectar a los receptores GABA por modulación alostérica positiva directa de la actividad del receptor GABA (por ejemplo, benzodiazepinas). En otros casos, el agente GABAérgico puede afectar los receptores GABA al aumentar indirectamente los niveles de GABA a través de la inhibición de la transaminasa GABA (por ejemplo, vigabatrina) o el transportador GABA-1 (GAT1, por ejemplo, tiagabina).

En algunas modalidades, la presente divulgación se refiere a un método para tratar un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesita, que comprende la administración conjunta (por ejemplo, por vía oral) del Compuesto A y una benzodiazepina (por ejemplo, clorazepato, clobazam, clonazepam, diazepam, lorazepam, nitrazepam, etc.) al ser humano en cantidades que son terapéuticamente eficaces cuando se administran conjuntamente.

En algunas modalidades, la presente divulgación se refiere a un método para tratar un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesita, que comprende la administración conjunta (por ejemplo, por vía oral, del Compuesto A y felbamato al ser humano en cantidades que son terapéuticamente eficaces cuando se administran conjuntamente.

En algunas modalidades, la presente divulgación se refiere a un método para tratar un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesita, que comprende la administración conjunta (por ejemplo, por vía oral) del Compuesto A y fenobarbital al ser humano en cantidades que son terapéuticamente eficaces cuando se administran conjuntamente.

En algunas modalidades, la presente divulgación se refiere a un método para tratar un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesita, que comprende la administración conjunta (por ejemplo, por vía oral) del Compuesto A y la tiagabina al ser humano en cantidades que son terapéuticamente eficaces cuando se administran conjuntamente.

En algunas modalidades, la presente divulgación se refiere a un método para tratar un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesita, que comprende la administración conjunta (por ejemplo, por vía oral) del Compuesto A y topiramato al ser humano en cantidades que son terapéuticamente eficaces cuando se administran conjuntamente.

En algunas modalidades, la presente divulgación se refiere a un método para tratar un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesita, que comprende la administración conjunta (por ejemplo, por vía oral) del Compuesto A y el ácido valproico al ser humano en cantidades que son terapéuticamente eficaces cuando se administran conjuntamente.

En algunas modalidades, la presente divulgación se refiere a un método para tratar un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesita, que comprende la administración conjunta (por ejemplo, por vía oral) del Compuesto A y la vigabatrina al ser humano en cantidades que son terapéuticamente eficaces cuando se administran conjuntamente.

En algunas modalidades de los presentes métodos y usos, el ASM administrado conjuntamente con el Compuesto A es ácido valproico. En algunos aspectos, el ácido valproico se administra conjuntamente con el

Compuesto A en cualquiera de las dosis de ASM discutidas en los párrafos anteriores. En algunas modalidades, el ácido valproico se administra junto con el Compuesto A a una dosis de 2-16 mg/kg al ser humano, por ejemplo, el ácido valproico puede administrarse a una dosis de 4-12 mg/kg al ser humano.

En algunas modalidades de los presentes métodos y usos, el ASM administrado conjuntamente con el Compuesto A es fenitoína. En algunos aspectos, la fenitoína se administra conjuntamente con el Compuesto A en cualquiera de las dosis de ASM discutidas en los párrafos anteriores. En algunas modalidades, la fenitoína se administra junto con el Compuesto A a una dosis de 0.05-5 mg/kg al ser humano, por ejemplo, la fenitoína se puede administrar (por ejemplo, por vía oral) a una dosis de 0.1-1 mg/kg al ser humano.

En algunas modalidades de los presentes métodos y usos, el ASM administrado conjuntamente con el Compuesto A es lacosamida. En algunos aspectos, la lacosamida se administra conjuntamente con el Compuesto A en cualquiera de las dosis de ASM discutidas en los párrafos anteriores. En algunas modalidades, la lacosamida se administra junto con el Compuesto A a una dosis de 0.1-5 mg/kg al ser humano, por ejemplo, la lacosamida se administra (por ejemplo, por vía oral) a una dosis de 0.5-1 mg/kg al ser humano.

En otras modalidades de los presentes métodos y usos, el ASM administrado conjuntamente con el Compuesto A es cenobamato. En algunos aspectos, el cenobamato se administra conjuntamente con el Compuesto A en cualquiera de las dosis de ASM discutidas en los párrafos anteriores. En algunas modalidades, el cenobamato se administra junto con el Compuesto A a una dosis de 0.05-5 mg/kg al ser humano, por ejemplo, el cenobamato se administra (por ejemplo, por vía oral) a una dosis de 0.1-1 mg/kg al ser humano.

En ciertas modalidades de los presentes métodos y usos, la administración conjunta del Compuesto A y el ASM (por ejemplo, ácido valproico, fenitoína, levetiracetam, lacosamida o cenobamato) proporciona una eficacia mejorada (por ejemplo, aumenta la reducción en el número de episodios de convulsiones o la reducción de la gravedad de los episodios de convulsiones en humanos) en relación con la administración individual del Compuesto A o el ASM solo. En ciertas modalidades de este tipo, la administración conjunta proporciona un efecto aditivo, en el que un efecto aditivo se refiere a la suma de los efectos individuales de administrar el Compuesto A y administrar uno o más ASMs. En algunas modalidades, la administración conjunta proporciona un efecto sinérgico, en el que un efecto sinérgico se refiere a un efecto que es mayor que la suma de los efectos individuales de administrar el Compuesto A y administrar uno o más ASMs.

En modalidades adicionales, los métodos y usos discutidos anteriormente para tratar un trastorno convulsivo mediante la administración (por ejemplo, por vía oral) del Compuesto A comprenden la administración del Compuesto A al ser humano en condiciones de alimentación. En algunas modalidades, la administración oral del Compuesto A a un ser humano en condiciones de alimentación (es decir, con alimentos o en proximidad temporal a la ingestión de alimentos) mejora significativamente la biodisponibilidad y exposición del Compuesto A en comparación con la administración oral del Compuesto A al ser humano en condiciones de ayuno (es decir, sin alimentos o sin proximidad temporal a la ingestión de alimentos). En algunas modalidades, la administración oral del Compuesto A a un ser humano en condiciones de alimentación aumenta uno o más parámetros farmacocinéticos para el Compuesto A (por ejemplo, C_{max} , AUC_{inf} , T_{max} , $t_{1/2\lambda z}$, etc.) en comparación a cuando se administra por vía oral la misma cantidad de Compuesto A al ser humano en ayunas.

En ciertas modalidades, los métodos y usos descritos en el presente documento administran el Compuesto A, un ASM, o tanto el Compuesto A como el ASM en forma de una composición oral farmacéuticamente aceptable

que comprende el Compuesto A, un ASM, o tanto el Compuesto A como el ASM, según sea el caso, y uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables. La(s) cantidad(es) del Compuesto A, un ASM, o tanto el Compuesto A como el ASM incluidos en estas composiciones pueden corresponder a una o más de las cantidades descritas en el presente documento. En algunas modalidades, las composiciones son una dosis unitaria.

Los ejemplos de composiciones orales farmacéuticamente aceptables que comprenden el Compuesto A, un ASM, o tanto el Compuesto A como un ASM incluyen formulaciones sólidas (tales como tabletas, cápsulas, pastillas, grageas, gránulos, polvos, rociados, obleas, multipartículas y películas), formulaciones líquidas (tales como soluciones acuosas, elixires, tinturas, tónicos, pasta aguada, suspensiones y dispersiones) y formulaciones en aerosol (tales como nieblas y aerosoles). En una modalidad, una composición oral farmacéuticamente aceptable del Compuesto A incluye una suspensión o granulado pediátrico. Todas las cantidades mencionadas anteriormente del Compuesto A, un ASM o tanto el Compuesto A como el ASM pueden incluirse en dichas formulaciones, por ejemplo, una cápsula que comprende 5, 10, 15, 10, 25, 30 o 35 mg del Compuesto A, una cápsula que comprende 5, 10, 15, 10, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 75, 85, 90, 95 o 100 mg de un ASM, o una cápsula que comprende 5, 10, 15, 10, 25, 30 o 35 mg del Compuesto A y 5, 10, 15, 10, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 75, 85, 90, 95 o 100 mg de un ASM.

Otras vías de administración adecuadas para la administración del Compuesto A, un ASM, o tanto el Compuesto A como un ASM de acuerdo con los métodos y usos descritos en el presente documento incluyen sublingual y bucal (por ejemplo, con una película u otra composición que se disuelve en la boca debajo de la lengua o en el interior de la mejilla), ocular (por ejemplo, gotas para los ojos), ótica (por ejemplo, mediante gotas para los oídos), inhalación oral o nasal (por ejemplo, mediante insuflación o nebulización), cutánea o tópica (por ejemplo, mediante cremas o lociones), o transdérmico (por ejemplo, mediante

parches para la piel). Además de la administración oral, se pueden usar otras vías de administración enteral para el Compuesto A, un ASM, o tanto el Compuesto A como el ASM, incluyendo la vía vaginal y rectal (por ejemplo, mediante ungüento, supositorio, enema).

Los ejemplos de composiciones adecuadas para la administración parenteral del Compuesto A, un ASM, o tanto el Compuesto A como un ASM, incluyen soluciones, suspensiones o dispersiones inyectables estériles, que incluyen preparaciones acuosas u oleaginosas, particularmente acuosas. En algunas modalidades, el Compuesto A, un ASM, o tanto el Compuesto A como el ASM se administran de acuerdo con un método o uso descrito en el presente documento en una formulación acuosa estéril inyectable que incluye un diluyente o solvente aceptable por vía parenteral, como agua, solución de Ringer, solución isotónica de cloruro de sodio, soluciones acuosas tamponadas y soluciones acuosas que contienen un alcohol miscible, como 1,3-butanodiol. Los excipientes adecuados adicionales para las formulaciones parenterales del Compuesto A, un ASM, o tanto el Compuesto A como el ASM incluyen monoglicéridos o diglicéridos; ácidos grasos, como el ácido oleico y sus derivados glicéridos; aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como aceite de oliva o aceite de ricino, incluyendo sus versiones polioxietiladas; diluyentes o dispersantes de alcohol de cadena larga, tales como alquilcelulosas, incluyendo la carboximetilcelulosa; y tensioactivos, tales como Tweens, Spans y otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad.

En otra modalidad, se proporcionan kits para la administración oral del Compuesto A y un ASM conjuntamente para el tratamiento de un trastorno depresivo tras la administración oral. Dichos kits comprenden una pluralidad de formas unitarias de dosificación oral del Compuesto A, un ASM, o tanto el Compuesto A como un ASM, además de instrucciones para la administración oral del Compuesto A y un ASM conjuntamente.

En el presente documento se describen modalidades y ejemplos adicionales de la presente divulgación. Estas modalidades y ejemplos son ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención reivindicada.

4.3. Modalidades Numeradas

Modalidad 1. Un método para tratar un trastorno convulsivo en un ser humano que lo necesita, que comprende administrar conjuntamente el Compuesto A y un medicamento anticonvulsivo (ASM) al ser humano en cantidades que son terapéuticamente eficaces cuando se administran conjuntamente; donde el Compuesto A es *N*-[4-(6-fluoro-3,4-dihidro-1*H*-isoquinolin-2-il)-2,6-dimetilfenil]-3,3-dimetilbutanamida.

Modalidad 2. Un método para reducir la cantidad de un medicamento anticonvulsivo (ASM) que se requiere para la eficacia terapéutica en un ser humano que padece un trastorno convulsivo, que comprende administrar al ser humano, junto con el ASM, una cantidad de Compuesto A que es eficaz para lograr dicha reducción cuando se administra con el ASM; donde el Compuesto A es *N*-[4-(6-fluoro-3,4-dihidro-1*H*-isoquinolin-2-il)-2,6-dimetilfenil]-3,3-dimetilbutanamida.

Modalidad 3. Un método para reducir la cantidad de Compuesto A que se requiere para la eficacia terapéutica en un ser humano que padece un trastorno convulsivo, que comprende administrar al ser humano, junto con el Compuesto A, una cantidad de un medicamento anticonvulsivo (ASM) que es eficaz para lograr dicha reducción cuando se administra con el Compuesto A; donde el Compuesto A es *N*-[4-(6-fluoro-3,4-dihidro-1*H*-isoquinolin-2-il)-2,6-dimetilfenil]-3,3-dimetilbutanamida.

Modalidad 4. El método de cualquiera de las modalidades 1-3, en el que el método comprende potenciar la abertura de un canal de potasio Kv7 en el ser humano.

Modalidad 5. Un método para mejorar la abertura de un canal de potasio Kv7 en un ser humano, que comprende administrar conjuntamente el Compuesto A y un medicamento anticonvulsivo (ASM) al ser humano en cantidades que son terapéuticamente eficaces cuando se administran conjuntamente; donde el compuesto A es *N*-[4-(6-fluoro-3,4-dihidro-1*H*-isoquinolin-2-il)-2,6-dimetilfenil]-3,3-dimetilbutanamida; y en el que el ser humano tiene un trastorno convulsivo.

Modalidad 6. El método de la modalidad 4 o la modalidad 5, en el que el canal de potasio Kv7 es uno o más de Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4 o Kv7.5.

Modalidad 7. El método de la modalidad 6, en el que el método es selectivo para potenciar la abertura de uno o más de Kv7.2, Kv7.3, Kv7.4 o Kv7.5 sobre Kv7.1.

Modalidad 8. El método de la modalidad 4 o 5, en el que el método comprende la abertura del canal de potasio Kv7.2/Kv7.3 (KCNQ2/3).

Modalidad 9. El método de cualquiera de las modalidades 1-8, en el que el ASM es una benzodiazepina, carbamazepina, cenobamato, felbamato, gabapentina, lacosamida, lamotrigina, levetiracetam, oxcarbazepina, fenobarbital, fenitoína, pregabalina, rufinamida, tiagabina, topiramato, ácido valproico, vigabatrina, zonisamida, o una combinación de los mismos.

Modalidad 10. El método de una cualquiera de las modalidades 1-9, en el que el ASM es ácido valproico, levetiracetam, fenitoína, lacosamida o cenobamato.

Modalidad 11. El método de cualquiera de las modalidades 1-10, en el que el ASM no potencia la abertura de un canal de potasio Kv7 en el ser humano.

Modalidad 12. El método de cualquiera de las modalidades 1-11, en el que el ASM disminuye la excitación neuronal en el ser humano.

Modalidad 13. El método de la modalidad 12, en el que el ASM disminuye la excitación neuronal bloqueando un canal de sodio en el ser humano.

Modalidad 14. El método de la modalidad 12, en el que el ASM disminuye la excitación neuronal bloqueando un canal de calcio en el ser humano.

Modalidad 15. El método de la modalidad 12, en el que el ASM disminuye la excitación neuronal al unirse a la glicoproteína 2A de vesícula sináptica (SV2A) en el ser humano.

Modalidad 16. El método de cualquiera de las modalidades 1-11, en el que el ASM aumenta la inhibición neuronal en el ser humano.

Modalidad 17. El método de cualquiera de las modalidades 1-11, en el que el ASM es un agente glutamatérgico.

Modalidad 18. El método de cualquiera de las modalidades 1-11, en el que el ASM es un agente GABAérgico.

Modalidad 19. El método de cualquiera de las modalidades 1-18, en el que el trastorno convulsivo está asociado con la disfunción del canal de potasio Kv7.

Modalidad 20. El método de cualquiera de las modalidades 1-19, en el que el trastorno convulsivo es epilepsia de inicio focal.

Modalidad 21. El método de cualquiera de las modalidades 1-20, en el que el Compuesto A se administra por vía oral al ser humano.

Modalidad 22. El método de una cualquiera de las modalidades 1-21, en el que el ASM se administra por vía oral al ser humano.

Modalidad 23. El método de cualquiera de las modalidades 1-22, en el que el Compuesto A se administra a una dosis de 1 a 200 mg al ser humano.

Modalidad 24. El método de cualquiera de las modalidades 1-23, en el que el Compuesto A se administra a una dosis de 2 a 100 mg al ser humano.

Modalidad 25. El método de cualquiera de las modalidades 1-24, en el que el Compuesto A se administra a una dosis de 5 a 50 mg al ser humano.

Modalidad 26. El método de cualquiera de las modalidades 1-25, en el que el Compuesto A se administra a una dosis de 5, 10, 15, 20 o 25 mg al ser humano.

Modalidad 27. El método de cualquiera de las modalidades 1-26, en el que el Compuesto A se administra a una dosis de 20 mg al ser humano.

Modalidad 28. El método de cualquiera de las modalidades 1-22, en el que el Compuesto A se administra a una dosis de por lo menos 10 mg al ser humano.

Modalidad 29. El método de la modalidad 28, en el que el Compuesto A se administra a una dosis de por lo menos 20 mg al ser humano.

Modalidad 30. El método de la modalidad 28, en el que el Compuesto A se administra a una dosis de por lo menos 50 mg al ser humano.

Modalidad 31. El método de cualquiera de las modalidades 1-22, en el que el Compuesto A se administra a una dosis de 5-1000 mg por día al ser humano.

Modalidad 32. El método de la modalidad 31, en el que el Compuesto A se administra a una dosis de 5-500 mg por día al ser humano.

Modalidad 33. El método de la modalidad 31, en el que el Compuesto A se administra a una dosis de 5-250 mg por día al ser humano.

Modalidad 34. El método de la modalidad 31, en el que el Compuesto A se administra a una dosis de 20-150 mg por día al ser humano.

Modalidad 35. El método de la modalidad 31, en el que el Compuesto A se administra a una dosis de 100 mg por día al ser humano.

Modalidad 36. El método de cualquiera de las modalidades 1-22, en el que el Compuesto A se administra a una dosis de 0.01-2.0 mg/kg al ser humano.

Modalidad 37. El método de la modalidad 36, en el que el Compuesto A se administra a una dosis de 0.03-1.0 mg/kg al ser humano.

Modalidad 38. El método de la modalidad 36, en el que el Compuesto A se administra a una dosis de 0.05-0.5 mg/kg al ser humano.

Modalidad 39. El método de cualquiera de las modalidades 1-38, en el que el Compuesto A se administra por vía oral al ser humano entre aproximadamente 30 minutos antes a aproximadamente 2 horas después de comer una comida.

Modalidad 40. El método de la modalidad 39, en el que el Compuesto A se administra por vía oral al ser humano durante una comida o dentro de los 15 minutos después de comer.

Modalidad 41. El método de una cualquiera de las modalidades 1-40, en el que el ASM es ácido valproico.

Modalidad 42. El método de la modalidad 41, en el que el ácido valproico se administra a una dosis de 2-16 mg/kg al ser humano.

Modalidad 43. El método de la modalidad 41, en el que el ácido valproico se administra a una dosis de 4-12 mg/kg al ser humano.

Modalidad 44. El método de cualquiera de las modalidades 1-40, en el que el ASM es fenitoína.

Modalidad 45. El método de la modalidad 44, en el que la fenitoína se administra a una dosis de 0.05-5 mg/kg al ser humano.

Modalidad 46. El método de la modalidad 44, en el que la fenitoína se administra a una dosis de 0.1-1 mg/kg al ser humano.

Modalidad 47. El método de cualquiera de las modalidades 1-40, en el que el ASM es lacosamida.

Modalidad 48. El método de la modalidad 47, en el que la lacosamida se administra a una dosis de 0.1-5 mg/kg al ser humano.

Modalidad 49. El método de la modalidad 47, en el que la lacosamida se administra a una dosis de 0.5-1 mg/kg al ser humano.

Modalidad 50. El método de cualquiera de las modalidades 1-40, en el que el ASM es cenobamato.

Modalidad 51. El método de la modalidad 50, en el que el cenobamato se administra a una dosis de 0.05-5 mg/kg al ser humano.

Modalidad 52. El método de la modalidad 50, en el que el cenobamato se administra a una dosis de 0.1-1 mg/kg al ser humano.

Modalidad 53. El método de una cualquiera de las modalidades 1-52, en el que la administración conjunta del Compuesto A y el ASM proporciona una eficacia mejorada en relación con la administración individual del Compuesto A o el ASM solo.

5. EJEMPLOS

Se realizaron estudios para determinar el efecto del Compuesto A con otros ASMs.

5.1. Ejemplo 1. Efectos anticonvulsivos del Compuesto A solo y en combinación con ASMs comunes

Se evaluó la interacción del Compuesto A con otros ASMs después de la dosificación oral en el ensayo de electrochoque máximo (MES) en ratón para determinar si algunas combinaciones eran favorables o desfavorables. La eficacia se cuantificó calculando la fracción de animales con convulsiones tónicas en las patas traseras después de la estimulación corneal.

5.1.1 Compuesto A

Cuando se dosificó solo, el Compuesto A (1, 2, 4 u 8 mg/kg) redujo la aparición de convulsiones tónicas en el ensayo MES tanto 0.5 como 2 horas después de la dosificación oral. La relación de respuesta a la concentración se ajustó a una isoterma de unión con una IC_{50} de concentración plasmática de 154 nM y una IC_{50} de concentración cerebral de 275 nM (n=7 por dosis, por punto de tiempo).

Preparación del compuesto: El compuesto A se solubilizó inicialmente en DMSO. Luego, esta solución se agregó a una solución de metilcelulosa al 0.5 % para crear una suspensión del compuesto más uniforme y menos agregada. Se prepararon diluciones en serie a partir del tubo con la concentración más alta del Compuesto A y las suspensiones del compuesto se agitaron aún más antes de la dosificación en animales. La concentración final de DMSO fue del 5 %, una cantidad sin toxicidad aparente ni neuroprotección en el ensayo MES. La fenitoína y el ácido valproico se solubilizaron en solución salina al 100 % (0.9 %). El levetiracetam se solubilizó en metilcelulosa al 0.5 % y Tween 80 al 0.2 % en agua desionizada.

Animales: Se usaron ratones albinos CF-1 macho adultos (25-35 g) adquiridos de Harlan-Envigo. Los ratones se alojaron cuatro por jaula y tuvieron acceso a agua filtrada y comida *ad libidum* durante todo el experimento.

Ensayo MES: Los compuestos se administraron por vía oral por sonda antes de la prueba a menos que se indique lo contrario. Durante la prueba MES, se administró una corriente alterna de 60 Hz (50 mA) durante 0.2 segundos a través de electrodos corneales a los ratones. Se colocó una gota de solución de Alcaína al 0.5 % en el ojo antes de la entrega actual. Posteriormente, los electrodos se colocaron suavemente sobre los ojos del animal y la descarga eléctrica se inició disparando a través de un activador de pedal. Los animales se sujetaron con la mano y se soltaron suavemente mientras se administraba la descarga y comenzaba la convulsión. Se controló la extensión tónica de las patas traseras de los animales como punto final de esta prueba.

Análisis estadístico: Todas las estadísticas se calcularon usando el software Prism versión 7 (Software Graphpad). El método utilizado para cada experimento se indica en la sección de resultados. Las curvas de concentración-respuesta se calcularon como las que mejor se ajustan a la ecuación

$$Y = \text{Inferior} + (\text{Superior} - \text{Inferior}) / (1 + 10^{((\text{LogIC}_{50} - X) * \text{HillSlope}))}$$

donde X era el logaritmo de la concentración plasmática. A menos que se indique lo contrario, la parte inferior se restringió a 0. La parte superior se restringió al valor determinado experimentalmente por las mediciones de control del vehículo.

Respuesta a la dosis del Compuesto A: La respuesta a la dosis después de la administración oral de 1, 2, 4 u 8 mg/kg del Compuesto A se evaluó en el ensayo MES de ratón en 2 puntos de tiempo diferentes: 0.5 y 2 horas después de la dosificación oral (Figura 1 y Figura 2). Los animales se asignaron al azar al vehículo (n=7 a las 2 h, n=5 a las 0.5 h) o diferentes grupos de dosis (n=7

por dosis, por punto de tiempo) y el ensayo MES lo realizó un experimentador que desconocía las condiciones del tratamiento.

En el punto de tiempo de 2 horas, el Compuesto A mostró una reducción dependiente de la dosis en el número de convulsiones tónicas evaluadas mediante la extensión de las patas traseras. Una dosis de 8 mg/kg proporcionó una protección significativa en comparación con los ratones tratados con vehículo (número de ratones con convulsiones tónicas/número total probado: 1 mg/kg: 5/7 ($p=0.939$), 2 mg/kg: 4/7 ($p=0.598$), 4 mg/kg: 2/7 ($p=0.085$), 8 mg/kg: 1/7 ($p=0.023$), vehículo: 6/7. Valores p calculados mediante ANOVA unidireccional utilizando la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett). Se utilizaron los mismos datos para calcular el porcentaje de ratones protegidos de la extensión tónica de las patas traseras (1 mg/kg: 28.6% ($p> 0.999$), 2 mg/kg: 42.9% ($p> 0.999$), 4 mg/kg: 71.4% ($p = 0.103$), 8 mg/kg: 85.7% ($p = 0.029$), vehículo: 14.3%; valores p calculados mediante la prueba exacta de Fisher). Se recolectaron muestras de cerebro y plasma de ratones inmediatamente después de la prueba de eficacia y se analizaron usando UHPLC-ESI-MS/MS (Tabla 1).

Tabla 1. Concentraciones Plasmáticas y Cerebrales del compuesto A

					Concentración (μM)	
ID del Comp	Dosis (mg/kg)	# de Días	# de Dosis	Tiempo de Recolección de Tejidos (h)	Plasma	Cerebro
Comp A	1	1	1	2	0.10	0.19
Comp A	2	1	1	2	0.13	0.21
Comp A	4	1	1	2	0.23	0.36
Comp A	8	1	1	2	0.43	0.56

Concentraciones totales en cerebro y plasma de 1 mg/kg: 0.19 μM (70.2 ng/g) y 0.1 μM (35.8 ng/mL), 2 mg/kg: 0.21 μM (75.8 ng/g) y 0.13 μM (46.7 ng/mL), 4 mg/kg: 0.36 μM (131.3 ng/g) y 0.23 μM (83 ng/mL), 8 mg/kg: 0.56 μM (207.7 ng/g) y 0.43 μM (157.8 ng/mL), respectivamente.

En el punto de tiempo de 0.5 horas, las dosis de 1, 2 y 4 mg/kg mostraron una reducción dependiente de la dosis en el número de convulsiones tónicas con extensión de las patas traseras, proporcionando 4 mg/kg una protección significativa en comparación con los ratones tratados con vehículo (1 mg/kg: 4/7 ($p=0.449$), 2 mg/kg: 2/7 ($p=0.088$), 4 mg/kg: 1/7 ($p=0.032$), 8 mg/kg: 3/7 ($p=0.215$), vehículo: 5/5; ANOVA unidireccional calculado usando la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. A 8 mg/kg, 1/7 animales tuvieron dos convulsiones tónicas con extensión de las patas traseras después de la estimulación, una ocurrencia que no se observó en otros grupos de dosis o ratones tratados con vehículo. Se observó una eficacia dependiente de la dosis similar para ratones protegidos del componente extensor tónico de las patas traseras de la convulsión tónica (1 mg/kg: 42.9 % ($p>0.0205$), 2 mg/kg: 71.4 % ($p=0.028$), 4 mg/kg: 85.7 % ($p=0.015$), 8 mg/kg: 71.4 % ($p=0.028$), vehículo: 0 %; calculado usando la prueba exacta de Fisher). Se recolectaron muestras de cerebro y plasma de ratones inmediatamente después de la prueba de eficacia y se analizaron usando UHPLC-ESI-MS/MS (Tabla 2).

Tabla 2. Concentraciones Plasmáticas y Cerebrales del Compuesto A

					Concentración (μM)	
ID del Comp	Dosis (mg/kg)	# de Días	# de Dosis	Tiempo de Recolección de Tejidos (h)	Plasma	Cerebro
Comp A	1	1	1	0.5	0.13	0.27
Comp A	2	1	1	0.5	0.22	0.36
Comp A	4	1	1	0.5	0.42	0.64
Comp A	8	1	1	0.5	0.71	1.09

Las concentraciones totales medias en cerebro y plasma para cada grupo de dosis fueron: 1 mg/kg: 0.27 μM (97.9 ng/g) y 0.13 μM (48.9 ng/ml), 2 mg/kg: 0.36 μM (132 ng/g) y 0.22 μM (80.7 ng/ml), 4 mg/kg: 0.64 μM (234.7 ng/g) y 0.42 μM (154.4 ng/mL), 8 mg/kg: 1.09 μM (402 ng/g) y 0.71 μM (261.3 ng/mL), respectivamente.

La Figura 3 muestra la relación concentración-respuesta que resume todos los datos PK-PD para el Compuesto A en el ensayo MES. El panel superior

muestra la inhibición de las convulsiones tónicas en función de la concentración plasmática y el panel inferior muestra la inhibición en función de la concentración cerebral. Aunque se observaron exposiciones más altas en el cerebro y el plasma a las 0.5 horas en comparación con los tiempos de pretratamiento de 2 horas, la eficacia observada en cada nivel de exposición reflejó la concentración en el cerebro o el plasma independientemente del tiempo después de la dosificación (Figura 3). Debido a la respuesta a la dosis bien definida con un pretratamiento de 2 horas del Compuesto A, se eligió este punto de tiempo para estudios adicionales. Los datos recopilados 2 horas después de la dosificación se ajustaron a una curva de concentración-respuesta con solo la IC_{50} y el coeficiente de Hill variando para un ajuste óptimo. La línea discontinua horizontal indica la incidencia de convulsiones tónicas en el vehículo: $94.1 \pm 0.03 \%$ (media $\pm$ S.E.M., $n = 85$). Este valor se tomó como la parte superior de la curva y la parte inferior se restringió a 0 (inhibición completa). Las estimaciones de IC_{50} basadas en la concentración cerebral y plasmática fueron 275 nM y 154 nM, respectivamente.

5.1.2 Combinación de Compuesto A y Ácido Valproico

Se eligieron dosis de 1 mg/kg PO con pretratamiento de 2 horas para el Compuesto A y 100 mg/kg IP con pretratamiento de 0.5 horas para Ácido Valproico para el estudio de combinación inicial. Se realizó un segundo experimento para repetir los hallazgos del primer estudio y probar dosis adicionales de ácido valproico (30 y 56 mg/kg IP) para cuantificar el alcance de la eficacia adicional producida por el Compuesto A (1 mg/kg PO). Los resultados de estos dos experimentos combinados se discuten a continuación.

Los animales se asignaron aleatoriamente y se dosificaron por vía oral con el Compuesto A o el vehículo 2 horas antes de la prueba de eficacia, seguido de una dosificación IP de Ácido Valproico o vehículo 0.5 horas antes de la prueba de eficacia. En base a este diseño experimental, los animales en los grupos de control de dosis única o el grupo de control con vehículo también recibieron dos

dosis cada uno: (Compuesto A + Vehículo, Vehículo + Ácido valproico, Compuesto A + Ácido valproico o Vehículo + Vehículo).

La dosificación conjunta de Compuesto A y Ácido valproico a 100 mg/kg condujo a un aumento significativo en el número de ratones sin convulsiones tónicas con extensión de la pata trasera en comparación con ratones tratados con una sola dosis de Compuesto A (Compuesto A + Ácido valproico a 100 mg/kg: 10/15 frente a Compuesto A a 1 mg/kg + Vehículo: 4/15 ($p=0.021$), y frente a Vehículo + Ácido valproico a 100 mg/kg: 5/15 ($p=0.059$); los valores de p se calcularon mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Se observó una tendencia de mayor protección contra las convulsiones tónicas con la dosis combinada de Compuesto A y 56 mg/kg de Ácido Valproico, mientras que no se observó diferencia con la combinación de Compuesto A y 30 mg/kg de Ácido Valproico: Compuesto A + Ácido Valproico a 56 mg/kg: 4/8 frente a Compuesto A a 1 mg/kg + Vehículo: 4/15 ($p=0.396$) y frente a Vehículo + Ácido Valproico a 56 mg/kg: 1/7 ($p=0.226$); Compuesto A + Ácido Valproico a 30 mg/kg: 2/8 frente a Compuesto A a 1 mg/kg + Vehículo: 4/15 ($p=0.995$) y frente a Vehículo + Ácido Valproico a 56 mg/kg: 0/8 ($p=0.463$) (Figura 4).

Ambos grupos de dosis combinadas de Compuesto A (1 mg/kg) + Ácido Valproico a 56 y 100 mg/kg dieron lugar a una protección significativa en comparación con animales tratados con vehículo: Compuesto A + Ácido Valproico a 100 mg/kg: 10/15 ($p=0.0001$) y Compuesto A + Ácido Valproico a 56 mg/kg: 4/8 ($p=0.0381$), frente a Vehículo + Vehículo: 0/15; los valores de p se calcularon mediante ANOVA unidireccional seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett.

Se recogieron muestras de plasma y cerebro de ratones inmediatamente después de la prueba de eficacia y se analizaron usando UHPLC-ESI-MS/MS (Tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones Plasmáticas y Cerebrales del Compuesto A y Ácido Valproico

Plasma							
1 mg/kg Comp A		+ 100 mg/kg Ácido Valproico		100 mg/kg Ácido Valproico		+ 1 mg/kg Comp A	
Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
24 ng/mL	22	15 ng/mL	6	151710 ng/mL	78134	144073 ng/mL	52101
0.066 μ M	0.05	0.042 μ M	0.016	1059 μ M	546	1006 μ M	364

Cerebro							
1 mg/kg Comp A		+ 100 mg/kg Ácido Valproico		100 mg/kg Ácido Valproico		+ 1 mg/kg Comp A	
Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
59 ng/g	51	36 ng/g	23	40084 ng/g	8722	42686 ng/g	15028
0.16 μ M	0.14	0.097 μ M	0.062	280 μ M	61	298 μ M	105

No hubo una diferencia significativa en las concentraciones plasmáticas o cerebrales del Compuesto A cuando se dosificó solo o junto con Ácido Valproico. Las concentraciones plasmáticas y cerebrales totales medias del Compuesto A a 1 mg/kg cuando se dosifica solo: 0.066 μ M (24 ng/ml) y 0.16 μ M (59 ng/g), cuando se dosifica con Ácido Valproico (30 mg/kg): 0.038 μ M (14 ng/mL) y 0.075 μ M (28 ng/g), cuando se dosifica con Ácido Valproico (56 mg/kg): 0.050 μ M (18 ng/mL) y 0.117 μ M (43 ng/g), y cuando se dosifica con Ácido Valproico (100 mg/kg): 0.042 μ M (15 ng/ml) y 0.097 μ M (36 ng/g). Asimismo, no hubo cambios significativos en las concentraciones plasmáticas o cerebrales de Ácido Valproico en las 3 dosis probadas cuando se combinaron con el Compuesto A.

Los experimentos de dosificación conjunta con el Compuesto A y AV también se analizaron como el efecto del Compuesto A sobre la relación concentración-respuesta de AV para cuantificar el efecto sobre la IC₅₀ para la inhibición de las convulsiones tónicas por AV (Figura 5).

	Cerebro
--	----------------

1.5 mg/kg Comp A		+ 150 mg/kg Levetiracetam		150 mg/kg Levetiracetam		+ 1.5 mg/kg Comp A	
Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
31 ng/g	8	52 ng/g	56	91.9 µg/g	7.0	90.4 µg/g	12.8
0.08 µM	0.02	0.14 µM	0.15	539.9 µM	41	531 µM	75.3

Ninguna dosis produjo un aumento significativo en la fracción de ratones sin convulsiones tónicas en comparación con los ratones tratados con vehículo: 120 mg/kg: 0/6 ($p=0.98$), 150 mg/kg 2/8 ($p=0.93$), vehículo: 2/18; valor de p calculado por ANOVA unidireccional mediante la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett (Figura 6).

La dosificación conjunta con 1 o 1.5 mg/kg de Compuesto A no tuvo efecto sobre los niveles plasmáticos o cerebrales de Levetiracetam: 957 µM (163 µg/ml) de plasma y 554 µM (943 µg/g) de cerebro (LEV 120 mg/kg + 1 mg/kg de Compuesto A); 1235 µM (210 µg/mL) de plasma y 531 µM (90.4 µg/g) de cerebro (LEV 150 mg/kg + 1.5 mg/kg de Compuesto A). Los valores de exposición para el Compuesto A a 1 mg/kg solo o dosificado de manera conjunta con Levetiracetam a 120 mg/kg fueron 0.03 µM (11.1 ng/mL) y 0.03 µM (11.1 ng/mL) en plasma, y 0.06 µM (20.9 ng/g) y 0.05 µM (20.0 ng/g) en cerebro, respectivamente. Los valores de exposición para el Compuesto A a 1.5 mg/kg solo o dosificado de manera con Levetiracetam a 150 mg/kg fueron 0.04 µM (15 ng/mL) y 0.07 µM (25 ng/mL) en plasma, y 0.08 µM (31 ng/g) y 0.14 µM (52 ng/g) en cerebro, respectivamente.

El aumento en la fracción de ratones sin convulsiones tónicas con cualquier combinación de dosis no fue significativamente mayor que el efecto del Compuesto A solo: Compuesto A a 1 mg/kg: 2/11 frente a Compuesto A (1 mg/kg) + LEV (120 mg/kg): 2/5, $p=0.578$; y Compuesto A a 1.5 mg/kg: 3/8 frente a Compuesto A (1.5 mg/kg) + LEV (150 mg/kg): 4/8, $p=0.805$; valor de p calculado por ANOVA bidireccional mediante la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett (Figura 6).

5.1.4 Combinación de Compuesto A y Fenitoína

Los canales Kv7 se localizan de manera conjunta en el segmento inicial del axón con los canales Nav1.6 y Nav1.2. Dado que el compuesto A activa los canales Kv7 y la Fenitoína inhibe los canales de sodio controlados por voltaje, se anticipó una interacción favorable, pero se desconocía la magnitud.

La respuesta a la dosis del Compuesto A (0.25, 0.75, 1, 1.5 y 2.5 mg/kg) administrado por vía oral con un tiempo de pretratamiento de 2 horas se probó en el ensayo MES en presencia o ausencia de una dosis constante predeterminada de Fenitoína (2 mg/kg, IP, 2 horas de pretratamiento).

En comparación con los animales tratados con vehículo, las dosis únicas de Compuesto A condujeron a un aumento dependiente de la dosis en la fracción de animales sin convulsiones tónicas: Compuesto A a 0.25 mg/kg: 0/8 ($p=0.999$), 0.75 mg/kg: 2/8 ($p=0.948$), 1 mg/kg: 2/8 ($p=0.948$), 1.5 mg/kg: 2/8 ($p=0.948$), 2.5 mg/kg: 4/8 ($p=0.12$); Fenitoína a 2 mg/kg: 6/24 ($p=0.72$); Vehículo 2/24. Cuando se administró de manera conjunta con Fenitoína, el Compuesto A en dosis de 0.75, 1, 1.5 y 2.5 mg/kg produjo un aumento significativo en la fracción de animales sin convulsiones tónicas en comparación con los animales tratados con vehículo: Compuesto A 0.25 mg/kg + Fenitoína 2 mg/kg: 3/8 ($p=0.48$), Compuesto A 0.75 mg/kg + Fenitoína 2 mg/kg: 5/8 ($p=0.018$), Compuesto A 1 mg/kg + Fenitoína 2 mg/kg: 6/8 ($p=0.002$), Compuesto A 1.5 mg/kg + Fenitoína 2 mg/kg: 6/8 ($p=0.002$), Compuesto A 2.5 mg/kg + Fenitoína 2 mg/kg: 7/8 ($p=0.0001$); los valores de p se calcularon mediante la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett ANOVA unidireccional (Figura 7).

La comparación de animales a los que se administró una dosis única de Compuesto A con los grupos dosificados de manera conjunta con el Compuesto A y Fenitoína mostró un aumento significativo en la fracción de animales sin convulsiones tónicas en grupos dosificados de manera conjunta con dosis de 1 y 1.5 mg/kg. Se observó una tendencia similar cuando se comparó una dosis única de Fenitoína con grupos de dosis conjunta, observándose una ausencia significativa de convulsiones con 1, 1.5 y 2.5

mg/kg de Compuesto A: combinación de 0.25 de Compuesto A + 2 mg/kg de Fenitoína: 3/8 frente a dosis única de Compuesto A (0.25 mg/kg): 0/8 ($p=0.165$) y 6/24 de Fenitoína (2 mg/kg; $p=0.715$), combinación de Compuesto A 0.75 + Fenitoína 2 mg/kg: 5/8 frente a dosis única Compuesto A (0.75 mg/kg): 2/8 ($p=0.165$) y 6/24 Fenitoína (2 mg/kg; $p=0.074$), combinación de Compuesto A 1 + Fenitoína 2 mg/kg: 6/8 frente a dosis única de Compuesto A (1 mg/kg): 2/8 ($p=0.048$) y 6/24 Fenitoína (2 mg/kg; $p=0.012$), combinación de Compuesto A 1.5 + Fenitoína 2 mg/kg: 6/8 frente a dosis única de Compuesto A (1.5 mg/kg): 2/8 ($p=0.048$) y 6/24 (Fenitoína a 2 mg/kg; $p=0.012$), combinación de Compuesto A 2.5 + Fenitoína 2 mg/kg: 7/8 frente a dosis única del Compuesto A (2.5 mg/kg): 4/8 ($p=0.165$) y 6/24 Fenitoína (2 mg/kg; $p=0.001$); los valores de p se calcularon mediante ANOVA bidireccional seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett (Figura 7).

No se observaron cambios significativos en las concentraciones plasmáticas o cerebrales para la Fenitoína cuando se dosificó con o sin el Compuesto A (Tabla 4).

Tabla 4. Concentración Plasmática y Cerebral del Compuesto A y Fenitoína

Plasma											
2 mg/kg Fenitoína		+ 0.25 mg/kg Comp A		+ 0.75 mg/kg Comp A		+ 1 mg/kg Comp A		+ 1.5 mg/kg Comp A		+ 2.5 mg/kg Comp A	
Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
1019 ng/mL	206	1014 ng/mL	80	1025 ng/mL	149	989 ng/mL	101	1210 ng/mL	23 2	971 ng/mL	82
4.1 μ M	0.8	4.0 μ M	0.3	4.1 μ M	0.6	3.9 μ M	0.4	4.8 μ M	0.9	3.9 μ M	0.3

Cerebro											
2 mg/kg Fenitoína		+ 0.25 mg/kg Comp A		+ 0.75 mg/kg Comp A		+ 1 mg/kg Comp A		+ 1.5 mg/kg Comp A		+ 2.5 mg/kg Comp A	
Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
1052 ng/g	137	1055 ng/g	126	1070 ng/g	119	1263 ng/g	67	1196 ng/g	13 3	1051 ng/g	67
4.2 μ M	0.5	4.2 μ M	0.5	2.9 μ M	0.3	5.0 μ M	0.4	4.8 μ M	0.5	2.9 μ M	0.2

Exposición plasmática y cerebral de Fenitoína en dosis única de 2 mg/kg respectivamente: 4.1 μM (1019 ng/mL) y 4.2 μM (1052 ng/g), combinados con 0.25 mg/kg de Compuesto A: 4.0 μM (1014 ng/mL) y 4.2 μM (1055 ng/g), combinados con 0.75 mg/kg de Compuesto A: 4.1 μM (1025 ng/mL) y 2.9 μM (1070 ng/g), combinado con 1 mg/kg de Compuesto A: 3.9 μM (989 ng/mL) y 5.0 μM (1263 ng/g), combinado con 1.5 mg/kg de Compuesto A: 4.8 μM (1210 ng/mL) y 4.8 μM (1196 ng/g), y combinado con 2.5 mg/kg del Compuesto A: 3.9 μM (971 ng/mL) y 2.9 μM (1051 ng/g).

De manera similar, no hay cambios significativos en la concentración plasmática y cerebral para el Compuesto A cuando se dosifica solo o en combinación con Fenitoína (Tabla 5).

Tabla 5. Concentración Plasmática y Cerebral del Compuesto A y Fenitoína

Plasma											
0.25 mg/kg Comp A		+ 2 mg/kg Fenitoína		0.75 mg/kg Comp A		+ 2 mg/kg Fenitoína		1 mg/kg Comp A		+ 2 mg/kg Fenitoína	
Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
4.3 ng/mL	2.6	5.6 ng/mL	1.3	11.7 ng/mL	2.3	16.0 ng/mL	3.9	17.0 ng/mL	8.0	19.0 ng/mL	5.0
0.01 μM	0.01	0.02 μM	0.00	0.03 μM	0.01	0.04 μM	0.01	0.05 μM	0.02	0.05 μM	0.01

1.5 mg/kg Comp A		+ 2 mg/kg Fenitoína		2.5 mg/kg Comp A		+ 2 mg/kg Fenitoína	
Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
19.5 ng/mL	12.5	23.4 ng/mL	12.8	45.1 ng/mL	12.7	58.4 ng/mL	14.6
0.05 μM	0.03	0.06 μM	0.04	0.12 μM	0.03	0.16 μM	0.04

Cerebro											
0.25 mg/kg Comp A		+ 2 mg/kg Fenitoína		0.75 mg/kg Comp A		+ 2 mg/kg Fenitoína		1 mg/kg Comp A		+ 2 mg/kg Fenitoína	
Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
14.8 ng/g	2.6	18.4 ng/g	3.3	43.8 ng/g	7.6	56.7 ng/g	17.3	35.0 ng/g	17	37.0 ng/g	11.0

0.04 μM	0.01	0.05 μM	0.01	0.12 μM	0.02	0.15 μM	0.05	0.09 μM	0.04	0.10 μM	0.03
------------	------	------------	------	------------	------	------------	------	------------	------	------------	------

1.5 mg/kg Comp A		+ 2 mg/kg Fenitoína		2.5 mg/kg Comp A		+ 2 mg/kg Fenitoína	
Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
30.8 ng/g	14.3	42.0 ng/g	18.9	144.1 ng/g	8.2	186.5 ng/g	38
0.08 μM	0.04	0.11 μM	0.05	0.39 μM	0.07	0.51 μM	0.10

Compuesto A a dosis única de 0.25 mg/kg en plasma y cerebro frente a combinación con Fenitoína (2 mg/kg) respectivamente: 0.01 μM (4.3 ng/mL) y 0.04 μM (14.8 ng/g) frente a 0.02 μM (5.6 ng/mL) y 0.05 μM (18.4 ng/g), dosis única de 0.75 mg/kg frente a combinación: 0.03 μM (11.7 ng/mL) y 0.12 μM (43.8 ng/g) frente a 0.04 μM (16.0 ng/mL) y 0.15 μM (56.7 ng/g), dosis única de 1 mg/kg frente a combinación: 0.05 μM (17.0 ng/mL) y 0.10 μM (35.0 ng/g) frente a 0.05 μM (19.0 ng/mL) y 0.10 μM (37.0 ng/g), dosis única de 1.5 mg/kg frente a combinación: 0.05 μM (19.5 ng/mL) y 0.08 μM (30.8 ng/g) frente a 0.06 μM (23.4 ng/mL) y 0.11 μM (42 ng/g), dosis única de 2.5 mg/kg frente a combinación: 0.12 μM (45.1 ng/mL) y 0.39 μM (144.1 ng/g) frente a 0.16 μM (58.4 ng/mL) y 0.51 μM (186.5 ng/g).

Los experimentos de dosificación conjunta con el Compuesto A y la fenitoína también se analizaron como el efecto de la fenitoína en la relación concentración-respuesta del Compuesto A para cuantificar el efecto sobre la IC₅₀ para la inhibición de las convulsiones tónicas por el Compuesto A (Figura 8).

5.1.5 Conclusiones

El Compuesto A demostró una eficacia dependiente de la dosis en el ensayo MES de ratón que se correlacionó bien con los valores de exposición en plasma y cerebro. La combinación del Compuesto A y Ácido Valproico a 100 mg/kg o Fenitoína a 2 mg/kg condujo a una mayor eficacia observada en el

ensayo MES que la observada con cualquiera de los compuestos solos. La dosificación conjunta del Compuesto A con Levetiracetam no proporcionó una mejora significativa en la eficacia del ensayo MES en comparación con el Compuesto A solo.

Ácido Valproico (30, 56 o 100 mg/kg IP, dosificado 0.5 horas antes de la MES): La combinación del Compuesto A (1 mg/kg PO, 2 horas antes de la MES) con Ácido Valproico (AV) dosificado a 100 mg/kg produjo una mayor inhibición que cuando se dosificó el Compuesto A solo (Compuesto A a 1 mg/kg + Ácido Valproico a 100 mg/kg: 10/15 frente a Compuesto A a 1 mg/kg + Vehículo: 4/15 ($p=0.021$)) (Grupos de dosis única: $n=15$ Compuesto A a 1 mg/kg, $n=15$ Ácido Valproico a 100 mg/kg, $n=7$ Ácido Valproico a 30 y 56 mg/kg; Grupos de dosis combinadas: $n=15$ Compuesto A 1 mg/kg + Ácido Valproico 100 mg/kg, $n=8$ Compuesto A + Ácido Valproico 30 y 56 mg/kg; $n=15$ vehículo). El Compuesto A dosificado a 1 mg/kg redujo el nivel plasmático de Ácido Valproico necesario para la protección contra las convulsiones tónicas en el ensayo MES. La IC_{50} para el Ácido Valproico solo fue de 1440 μ M. Cuando se combinó con 1 mg/kg de Compuesto A, la IC_{50} para el Ácido valproico fue de 608 μ M, una disminución de 2.37 veces. La concentración plasmática total media del Compuesto A a 1 mg/kg cuando se dosifica solo: 0.07 μ M (24.2 ng/mL) y cuando se dosifica con Ácido Valproico (30 mg/kg): 0.04 μ M (14.0 ng/mL), cuando se dosifica con Ácido Valproico (56 mg/kg): 0.03 μ M (12.0 ng/mL) y cuando se dosifica con Ácido Valproico (100 mg/kg): 0.04 μ M (15.0 ng/mL).

Levetiracetam (120 y 150 mg/kg IP, dosificado 2 horas antes de MES): Una dosis de 1 mg/kg del Compuesto A produjo una concentración plasmática de 66 ± 14 nM (media $\pm$ SEM, $n=15$) y redujo la fracción con convulsiones tónicas en un 26.7%. La dosificación conjunta del Compuesto A con Levetiracetam (LEV) no proporcionó una mejora en la protección contra las convulsiones tónicas en comparación con el Compuesto A solo: Compuesto A a 1 mg/kg: 2/11 frente a Compuesto A (1 mg/kg) + LEV (120 mg/kg): 2/5, $p=0.578$; y Compuesto A a 1.5 mg/kg: 3/8 frente a Compuesto A (1.5 mg/kg) + LEV (150 mg/kg): 4/8, $p=0.805$. Las concentraciones plasmáticas del Compuesto A a 1 mg/kg solo o dosificado

de manera conjunta con LEV a 120 mg/kg fueron 0.03 μM (11.1 ng/mL) y 0.03 μM (11.1 ng/mL), a 1.5 mg/kg solo o dosificado de manera conjunta con LEV a 150 mg/kg fueron 0.041 μM (15 ng/mL) y 0.068 μM (25 ng/mL) respectivamente.

Fenitoína (2 mg/kg IP, dosificado 2 horas antes de MES): La combinación del Compuesto A con Fenitoína dosificado a 2 mg/kg produjo una mayor inhibición que cuando el Compuesto A se dosificó solo. Cuando se administró de manera conjunta 2 horas antes de la MES con Fenitoína, el Compuesto A en dosis orales de 0.75, 1, 1.5 y 2.5 mg/kg produjo un aumento significativo en la fracción de ratones sin convulsiones tónicas en comparación con los animales tratados con vehículo: Compuesto A 0.25 mg/kg + Fenitoína 2 mg/kg: 3/8 ($p=0.48$), Compuesto A 0.75 mg/kg + Fenitoína 2 mg/kg: 5/8 ($p=0.013$), Compuesto A 1 mg/kg + Fenitoína 2 mg/kg: 6/8 ($p=0.002$), Compuesto A 1.5 mg/kg + Fenitoína 2 mg/kg: 6/8 ($p=0.002$), Compuesto A 2.5 mg/kg + Fenitoína 2 mg/kg: 7/8 ($p=0.0001$). La IC_{50} para el Compuesto A solo fue de 147 nM. Cuando se combinó con 2 mg/kg de fenitoína, la IC_{50} para el Compuesto A fue de 39.7 nM. No hubo cambios significativos en la concentración plasmática del Compuesto A cuando se administró solo o en combinación con Fenitoína: Compuesto A a dosis única de 0.25 mg/kg frente a combinación con Fenitoína (2 mg/kg): 0.01 μM (4.3 ng/mL) frente a 0.02 μM (5.6 ng/mL), 0.75 mg/kg dosis única frente a combinación: 0.03 μM (11.7 ng/mL) frente a 0.04 μM (16 ng/mL), 1 mg/kg dosis única frente a combinación: 0.05 μM (17 ng/mL) frente a 0.05 μM (19 ng/mL), 1.5 mg/kg dosis única frente a combinación: 0.05 μM (19.5 ng/mL) frente a 0.06 μM (23.4 ng/mL), 2.5 mg/kg dosis única frente a combinación: 0.12 μM (45.1 ng/mL) frente a 0.16 μM (58.4 ng/mL).

5.2. Ejemplo 2. Efectos Anticonvulsivos del Compuesto A solo y en Combinación con Lacosamida

La eficacia del Compuesto A y su interacción farmacológica con Lacosamida se evaluó después de la dosificación oral en el ensayo de convulsión de electrochoque máximo en ratón (AC-MES).

El objetivo de estos estudios fue caracterizar la actividad anticonvulsiva dependiente de la dosis del Compuesto A y su interacción farmacológica con Lacosamida en el ensayo AC-MES en ratones después de una única administración oral de los compuestos. El ensayo AC-MES suele responder a bloqueadores de canales de sodio no selectivos y abridores de canales de potasio, y se ha utilizado como modelo animal traslacional para convulsiones de inicio parcial. El ensayo MES se ha utilizado ampliamente para la detección y caracterización de nuevos compuestos anticonvulsivos (Löscher et al., *Epilepsy Res.* 1991, 8(2):79-94; Piredda et al., *J Pharmacol Exp Ther.* 1985, 232(3):741-745; y White et al., *Ital J Neurol Sci.* 1995, 16(1-2):73-77). Después de la estimulación por electrochoque a corrientes suficientemente altas, los ratones y las ratas exhiben una extensión tónica seguida de clonus de las patas traseras. Si un compuesto de prueba es capaz de prevenir la extensión tónica, se consideró protector.

La eficacia anticonvulsiva del Compuesto A y la Lacosamida, y el efecto de combinar el Compuesto A con Lacosamida se probaron en el ensayo AC-MES en ratones macho CF-1 después de una sola dosis oral. Se obtuvieron muestras de plasma y cerebro para comprender la relación entre la concentración y la eficacia del fármaco.

5.2.1 Materiales y Métodos

Compuesto de Prueba – Compuesto A

Identidad:	Compuesto A
Número de Lote:	Lote 12
Descripción Física:	Polvo blanco sólido
Pureza:	98.8%
Proveedor:	Xenon Pharmaceuticals Inc.

Compuesto de Prueba: Lacosamida

Identidad:	Lacosamida
Número de Lote:	Lote 03
Descripción Física:	Polvo blanco
Pureza:	>95%

Proveedor:	Toronto Research Chemicals
------------	----------------------------

Vehículo F1: metilcelulosa al 0.5 % y Tween-80 al 0.2 % en agua desionizada (DI). Se calentaron 0.8 L de agua DI hasta 70°C a 80°C. Se pesaron cinco gramos de metilcelulosa y se añadieron lentamente en pequeñas porciones a agua DI calentada. La mezcla se agitó hasta formar una suspensión lechosa homogénea. La suspensión se trasladó a una habitación fría y se agitó durante la noche para obtener una solución clara. Se añadieron dos mL de Tween-80 a la solución clara y se diluyeron hasta 1 L con agua DI. La solución vehículo se almacenó entre 2°C y 8°C.

Vehículo F2: dimetilsulfóxido al 5 % (DMSO) y F1. Se añadió 5 % de DMSO al vehículo F1.

Formulación de la Dosis: Se pesaron el Compuesto A y la Lacosamida en viales separados. El Compuesto A se formuló en el vehículo F2 y la Lacosamida se formuló en el vehículo F1. Se añadió una cantidad apropiada de vehículo a los polvos del Compuesto A y la Lacosamida y luego se mezcló en el Homogeneizador IKA T-18 Ultra-Turrax para crear una suspensión uniforme a la concentración deseada. Luego, los viales se envolvieron en papel de aluminio para protegerlos de la luz y se colocaron en una placa de agitación hasta el momento de la dosificación.

Sistema de Prueba

Especies/Cepa:	Ratón CF-1
Número y Sexo:	144 machos
Fuente:	Charles River Laboratories
Edad y Peso Corporal al Inicio de la Dosificación:	Los animales tenían entre 6.5 y 8.5 semanas de edad y el peso corporal oscilaba entre 27 y 38 g al inicio de la dosificación.
Alojamiento:	Los animales se alojaron en grupos (4 por jaula) en jaulas que cumplen con las leyes y regulaciones de bienestar animal aplicables. La temperatura estuvo entre 18 °C y 25 °C y la humedad relativa entre 45 % y 65 %.
Aclimatación:	A su llegada, los animales fueron examinados para asegurar un estado de salud satisfactorio y se aclimataron a la instalación durante al menos 5 días antes del estudio.

Alimento/Agua:	Los animales recibieron alimento para roedores certificado (Teklad Rodent Chow #2014) <i>ad libitum</i> . El agua del grifo estaba disponible <i>ad libitum</i> .
----------------	--

Diseño experimental: Los animales se asignaron a grupos de tratamiento como se indica en la Tabla 6, Tabla 7, Tabla 8 y Tabla 9.

Se realizaron tres estudios con el Compuesto A y cuatro estudios con Lacosamida. Sus respectivas fechas de estudio se muestran en la Tabla 6 a la Tabla 9.

Tabla 6. Grupos Experimentales – Estudio 2A

Grupo	Compuesto	Dosis (mg/kg)	Vía	Número de Ratones	Tiempo de pretratamiento (h)	Volumen de Dosis (mL/kg)	Formulación
1	Vehículo	0	PO	8	0.5	10	F2
2	Compuesto A	1	PO	8	0.5	10	F2
3	Compuesto A	5	PO	8	0.5	10	F2
4	Compuesto A	10	PO	8	0.5	10	F2
5	Lacosamida	6	PO	8	2	10	F1
6	Lacosamida	8	PO	8	2	10	F1

PO: por vía oral, oral.

Tabla 7. Grupos Experimentales – Estudio 2B

Grupo	Compuesto	Dosis (mg/kg)	Vía	Número de Ratones	Tiempo de pretratamiento (h)	Volumen de Dosis (mL/kg)	Formulación
1	Vehículo	0	PO	8	0.5	10	F2
2	Compuesto A	5	PO	8	0.5	10	F2
3	Compuesto A	7.5	PO	7	0.5	10	F2
4	Compuesto A	10	PO	9	0.5	10	F02
5	Lacosamida	10	PO	8	2	10	F1

PO: por vía oral, oral.

Tabla 8. Grupos Experimentales – Estudio 2C

Grupo	Compuesto	Dosis (mg/kg)	Vía	Número de Ratones	Tiempo de pretratamiento (h)	Volumen de Dosis (mL/kg)	Formulación
1	Vehículo	0	PO	8	0.5	10	F2+F1
2	Compuesto A	3	PO	8	0.5	10	F2+F1
3	Lacosamida	10	PO	8	2	10	F2+F1
4	Compuesto A + Lacosamida	3+10	PO	8	0.5+2	10	F2+F1

PO: por vía oral, oral.

Tabla 9. Grupos Experimentales – Estudio 2D

Grupo	Compuesto	Dosis (mg/kg)	Vía	Número de Ratones	Tiempo de pretratamiento (h)	Volumen de Dosis (mL/kg)	Formulación
1	Vehículo	0	PO	8	2	10	F1
2	Lacosamide	6	PO	8	2	10	F1
3	Lacosamide	20	PO	8	2	10	F1

PO: por vía oral, oral.

Estudio Ciego y Aleatorio: El experimentador que administró el compuesto asignó aleatoriamente a cada animal a un grupo de tratamiento. Un experimentador diferente, sin conocer la asignación del grupo de tratamiento, realizó la prueba. Además, la dosificación de compuestos y las pruebas de MES se realizaron en diferentes salas para asegurarse de que un experimentador que realiza la prueba desconozca completamente el tratamiento. Todos los animales probados en un experimento determinado tenían las mismas posibilidades de asignación a cualquier grupo de tratamiento.

Observaciones Clínicas: Se observó el comportamiento anormal de todos los animales durante 10 minutos después de la dosificación con el Compuesto A y

Lacosamida por el experimentador que dosificó a los animales y nuevamente en el momento de la estimulación por el experimentador que probó los animales. Se registraron todos los cambios cualitativos del comportamiento normal.

Ensayo AC-MES: El ensayo MES se ha utilizado ampliamente en la búsqueda de sustancias anticonvulsivas (Piredda et al., Löscher et al. y White et al.). La prueba MES se considera un modelo para las convulsiones tónico-clónicas generalizadas (GTC) y proporciona una indicación de la capacidad de un compuesto para prevenir la propagación de las convulsiones. En el modelo AC-MES, se administró un electrochoque de corriente alterna (60 Hz, 40 mA) durante 0.2 segundos mediante electrodos corneales (HSE-HA Rodent Shocker, Harvard Apparatus, modelo No: 73-0105). A los ratones CF-1 se les dosificó PO (de acuerdo con el Procedimiento Operativo Estándar (SOP) TECH-006) con vehículo o Compuesto A 0.5 horas antes del ensayo de electrochoque. Inmediatamente antes de la estimulación con electroshock, los ojos de los animales fueron anestesiados con una aplicación tópica de solución de alcaína al 0.5 % (clorhidrato de proparacaína, una gota por ojo). A continuación, se sujetaron los ratones, se aplicaron los electrodos corneales y se administró la descarga. En animales vírgenes, la convulsión se caracteriza por una convulsión tónica generalizada inicial con un componente extensor tónico de las patas traseras. Se considera que un animal está protegido contra convulsiones inducidas por MES tras la abolición del componente extensor tónico de las patas traseras de la convulsión y luego se califica como "0". Si un ratón muestra una extensión tónica de las patas traseras, la puntuación es "1". Los ratones fueron sacrificados inmediatamente después de una evaluación inicial de la puntuación de las convulsiones después del electrochoque para la recolección de plasma y cerebro.

Recolección y Preparación de Muestras: Los ratones se anestesiaron mediante inhalación de isoflurano (de acuerdo con SOP TECH-018) hasta que alcanzaron un plano quirúrgico de anestesia. Luego, se insertó una jeringa (jeringa de 1 mL con una aguja de calibre 22) debajo del esternón en el

corazón (de acuerdo con SOP TECH-031). Se recogieron aproximadamente 0.5 ml de sangre, se depositaron en un tubo de K₂EDTA y se almacenaron en hielo. A continuación, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Se extrajeron los cerebros, se colocaron en un vial previamente pesado y se congelaron instantáneamente en hielo seco. Al final de la recolección de la muestra, la sangre se centrifugó a 4000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y el plasma se pipeteó en un tubo rotulado. Todas las muestras se almacenaron en un congelador a -80 °C hasta el momento del bioanálisis.

Muestras de Plasma: La extracción de muestras de plasma se llevó a cabo mediante precipitación de proteínas usando acetonitrilo. Las muestras de plasma diluido (50 µL) se mezclaron con 50 µL de solución estándar interna (IS) en acetonitrilo:agua 1:1 (v:v) seguido de la adición de 200 µL de acetonitrilo. Las muestras se agitaron en vórtex durante 30 segundos, se centrifugaron a 13 000 rpm durante 20 minutos, se decantaron en una placa de 96 pocillos y se centrifugaron a 4 000 rpm durante 20 minutos. Las muestras se analizaron mediante espectrometría de masas en tándem de ionización por electropulverización de cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC-ESI-MS/MS) como se describe en el procedimiento de bioanálisis a continuación.

Muestras de Cerebro: Antes de la extracción, se homogeneizaron cerebros completos previamente pesados en acetonitrilo:agua 1:1 (v:v) (2 mL por cerebro de ratón) utilizando un Homogeneizador IKA T18 Ultra-Turrax a una configuración de 4 durante aproximadamente 1 minuto. El homogeneizado se centrifugó a 13 000 rpm durante 20 minutos y 50 µL del sobrenadante se trataron exactamente como se describe anteriormente para las muestras de plasma.

Procedimientos de Bioanálisis: Todas las muestras, incluyendo los extractos de homogeneizado de plasma y cerebro (incluyendo los estándares de calibración y las muestras de control de calidad (QC) preparadas en plasma de ratón con K₂EDTA), se extrajeron mediante precipitación de proteínas. A cada alícuota de

50 µL de muestra, se agregaron 50 µL de solución IS (2500 ng/mL de Lacosamida en agua:acetonitrilo (1:1)) y 50 µL de ácido fosfórico al 6% (v:v) en agua, luego se agregaron 200 µL de acetonitrilo. Las muestras en tubos de 1.7 ml se mezclaron en vórtex y luego se centrifugaron durante 20 minutos a 13 000 rpm. Cincuenta microlitros del sobrenadante se mezclaron con 150 µL de agua:acetonitrilo (1:1) en una placa de 96 pocillos, que se centrifugó después de mezclar durante 20 minutos a 4 000 rpm. A continuación, las muestras estaban listas para el análisis UHPLC-MS/MS.

Las muestras se analizaron para el Compuesto A mediante un método UHPLC-MS/MS de grado de investigación utilizando las condiciones enumeradas a continuación.

Instrumento	Sciex TQ-5500																
Matriz:	Plasma de ratón (K ₂ EDTA)																
	Homogeneizado de cerebro de ratón																
Analito	Compuesto A																
Estándar Interno (SI):	(S)-5-cloro-4-((1-(5-cloro-2-fluorofenil)etil)amino)-2-fluoro-N-(pirazin-2-il)bencenosulfonamida																
Condiciones MS:	ESI: positivo																
	Compuesto A: [M+H] ⁺ m/z 369.2/247.2																
	(S)-5-cloro-4-((1-(5-cloro-2-fluorofenil)etil)amino)-2-fluoro-N-(pirazin-2-il)bencenosulfonamida (IS): [M+H] ⁺ m/z 458.793/157																
Condiciones UHPLC:	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Tiempo (min)</th><th>%B</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>0.0</td><td>10</td></tr> <tr><td>0.2</td><td>10</td></tr> <tr><td>3.4</td><td>6</td></tr> <tr><td>3.5</td><td>100</td></tr> <tr><td>4.0</td><td>100</td></tr> <tr><td>4.1</td><td>10</td></tr> <tr><td>5.0</td><td>10</td></tr> </tbody> </table>	Tiempo (min)	%B	0.0	10	0.2	10	3.4	6	3.5	100	4.0	100	4.1	10	5.0	10
Tiempo (min)	%B																
0.0	10																
0.2	10																
3.4	6																
3.5	100																
4.0	100																
4.1	10																
5.0	10																
	Fase Móvil A: ácido fórmico al 0.1 % en agua																
	Fase Móvil B: ácido fórmico al 0.1 % en acetonitrilo																
Estándares de Calibración	Los estándares se prepararon a 2.34, 4.69, 9.38, 18.8,																

37.5, 75.0, 150, 300, 600, 1200, 2400 y 4800 ng/mL

Muestras QC Las muestras de QC se prepararon a 14.0, 225 y 3600 ng/mL y se analizaron por triplicado.

Las muestras se analizaron para detectar Lacosamida mediante un método UHPLC-MS/MS de grado de investigación utilizando las condiciones enumeradas a continuación.

Instrumento Sciex TQ-5500

Matriz: Plasma de ratón (K₂EDTA)
Homogeneizado de cerebro de ratón

Analito Lacosamida

Estándar Interno (SI): (S)-5-((1-bencilpirrolidin-3-il)(metil)amino)-6-metil-N-(tiazol-4-il)piridina-2-sulfonamida

Condiciones MS: ESI: positivo
Lacosamida: [M+H]⁺ m/z 251.168/91
(S)-5-((1-bencilpirrolidin-3-il)(metil)amino)-6-metil-N-(tiazol-4-il)piridina-2-sulfonamida (IS): [M+H]⁺ m/z 551.1/214.0

Condiciones UHPLC:

Tiempo (min)	%B
0.0	20
0.6	20
1.00	100
1.50	100
1.60	20
2.5	20

A: ácido fórmico al 0.1 % en agua

B: ácido fórmico al 0.1 % en acetonitrilo

Estándares de Calibración Los estándares se prepararon a 2.34, 4.69, 9.38, 18.8, 37.5, 75.0, 150, 300, 600, 1200, 2400 y 4800 ng/mL.

Muestras QC Las muestras de QC se prepararon a 14.0, 225 y 3600 ng/mL y se analizaron por triplicado.

Las concentraciones de muestra se determinaron utilizando el modelo de mejor ajuste, ya sea funciones de calibración lineales o cuadráticas, ponderadas $1/x$, generadas por la regresión de la relación del área del analito al pico IS en las muestras estándar a sus respectivas concentraciones. Los criterios de aceptación para las corridas analíticas requerían que los valores calculados hacia atrás de los estándares y las muestras de QC estuvieran dentro de ± 20 % de sus valores nominales, excepto para el estándar más bajo o límite inferior de cuantificación (LLOQ) para el cual el criterio de aceptación fue de ± 25 %. Por lo menos seis de los doce puntos estándar tenían que mostrar valores calculados hacia atrás dentro de ± 20 % de sus concentraciones nominales para que se aceptara la calibración. Por lo menos tres muestras de QC, una en cada concentración, tenían que mostrar valores calculados hacia atrás dentro de ± 20 % de sus concentraciones nominales para que todo el lote de muestras fuera válido.

Procesamiento y Análisis de Datos: Todas las estadísticas se calcularon utilizando el software GraphPad Prism versión 8. Las curvas de respuesta a la concentración se generaron utilizando la ecuación de Hill Langmuir:

Ecuación 1

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

dónde:

- B = inferior, establecido como 0.
- T = superior, establecido como 1.
- n = el coeficiente de Hill, restringido a menos de cero.
- IC_{50} = concentración de un compuesto requerida para una inhibición del 50 % in vitro.

Todos los datos de grupo se expresan como media. Las diferencias entre grupos se analizaron utilizando Kruskal-Wallis seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunn. Se alcanzó significación estadística a valores de $p < 0.05$.

Bioanálisis: Todas las pruebas de idoneidad del sistema (SST), QC, matriz y disolventes en blanco cumplieron los criterios de aceptación descritos en SOP MTD-066. El LLOQ para el Compuesto A y la Lacosamida fue de 2.34 ng/mL para el Estudio 2C, 4.69 ng/mL para ambos compuestos en los Estudios 2D y 2A, y 2.34 ng/mL y 4.69 ng/mL para Lacosamida y el Compuesto A, respectivamente, en el Estudio 2B. El límite superior de cuantificación (ULOQ) fue de 4 800 ng/mL para ambos compuestos en todos los estudios.

Eficacia en el Ensayo AC-MES: Los resultados del estudio de convulsiones inducidas por AC-MES en ratones se presentan en la Tabla 10, Tabla 11, Tabla 12 y Tabla 13, y en la Figura 9, Figura 10, y la Figura. 11

Respuesta a la Dosis y la Concentración del Compuesto A: Las respuestas a la dosis y la concentración del Compuesto A se muestran en la Figura 9. En los tres estudios de eficacia (2A, 2B y 2C), el 100 % de los ratones CF-1 tratados con vehículo mostró una convulsión tónica con extensión de las patas traseras. En el Estudio 2A, la fracción de animales a los que se administró el Compuesto A que mostró una respuesta convulsiva tónica al estímulo AC-MES disminuyó de 8/8 a 1 mg/kg, a 7/8 a 5 mg/kg, a 3/8 a 10 mg/kg, lo que sugiere un aumento de la eficacia dependiente de la dosis. En el Estudio 2B, las dosis de 5 mg/kg y 10 mg/kg mostraron una mayor eficacia, con 0/8 y 1/9 animales con convulsiones, respectivamente, que en el Estudio 2A, lo que puede deberse a concentraciones plasmáticas más altas alcanzadas en el Estudio 2B (concentraciones plasmáticas medias: 0.470 μ M a 5 mg/kg y 0.553 μ M a 10 mg/kg) que en el Estudio 2A (concentraciones plasmáticas medias: 0.276 μ M a 5 mg/kg y 0.366 μ M a 10 mg/kg). Además, los Estudios 2A y 2B se realizaron con una semana de diferencia, lo que también puede explicar la diferencia en la eficacia. En el Estudio 2C, una dosis de 3 mg/kg del Compuesto A mostró que 2/8 animales se convulsionaron a una concentración plasmática media de 0.284 μ M. En los tres estudios (2A, 2B y 2C), la diferencia entre los grupos tratados con el Compuesto A y los grupos dosificados con vehículo alcanzó significación estadística (los valores de p se muestran en la Figura 9).

Un ratón del grupo de 10 mg/kg en el Estudio 2A y tres ratones del estudio 2B (dos ratones del grupo de 10 mg/kg y un ratón del grupo de 7.5 mg/kg) mostraron signos de comportamiento (temblores, disminución de la actividad y patas traseras extendidas) (concentraciones de plasma: 2A: 0.391 μ M; 2B: 10 mg/kg: 0.608 y 0.516 μ M, 7.5 mg/kg: 0.746 μ M). Las concentraciones de Compuesto A alcanzadas en tejido cerebral y plasma fueron dosis lineales (Figura 9).

La curva compuesta de respuesta a la concentración del Compuesto A de los tres estudios mostró una EC_{50} para plasma de 0.300 μ M y una EC_{50} para tejido cerebral de 0.471 μ M (Figura 9).

5.2.2 Resultados

Antes de probar el Compuesto A en combinación con Lacosamida en el modelo AC-MES, la Lacosamida se probó a diferentes dosis en un estudio separado (2D) y en grupos separados de ratones dentro de los estudios resumidos para el Compuesto A anteriormente, para establecer una dosis-respuesta completa. La respuesta a la dosis y la concentración compuesta de Lacosamida de estos 4 estudios se muestra en la Figura 10. La Lacosamida mostró un efecto dependiente de la dosis y la concentración contra las convulsiones tónicas inducidas por AC-MES con un efecto máximo a 20 mg/kg con 3/8 animales con convulsiones (concentración plasmática media de 23.9 μ M). La fracción de animales con convulsiones en el grupo tratado con 20 mg/kg de Lacosamida fue significativamente diferente del grupo tratado con vehículo (valor de $p = 0.0052$). El análisis de la curva de concentración-respuesta de Lacosamida mostró una EC_{50} para plasma de 21.6 μ M y una EC_{50} para tejido cerebral de 22.2 μ M. Para el estudio de combinación de Compuesto A + Lacosamida, Estudio 2C, se eligió una dosis de 10 mg/kg de Lacosamida y 3 mg/kg de Compuesto A, los cuales mostraron una eficacia mínima cuando se dosificaron solos en el modelo AC-MES.

La combinación del Compuesto A (3 mg/kg administrados PO 0.5 horas antes de AC-MES) con Lacosamida (10 mg/kg administrados PO 2 horas antes de AC-MES) eliminó las convulsiones tónicas (Tabla 12). La diferencia entre el grupo tratado con Lacosamida (Lacosamida sola a 10 mg/kg con 6/8 animales con convulsiones) y el grupo de combinación (Compuesto A + Lacosamida con 0/8 animales con convulsiones) fue estadísticamente significativa (valor de $p = 0.0189$), mientras que la diferencia entre el grupo tratado con Compuesto A (Compuesto A solo a 3 mg/kg con 2/8 animales con convulsiones) y el grupo de combinación no fue estadísticamente significativa. Las concentraciones plasmáticas del Compuesto A (administrado a 3 mg/kg) y Lacosamida (administrada a 10 mg/kg) fueron similares ya sea que se dosificaron solos o en combinación, lo que sugiere que una mayor eficacia observada en el grupo de combinación no fue el resultado de una mayor exposición de cualquiera de los compuestos. Las concentraciones plasmáticas medias alcanzadas fueron: 0.284 μM para el Compuesto A cuando se administró solo a 3 mg/kg; 0.279 μM para el Compuesto A cuando se administró a 3 mg/kg en combinación con Lacosamida; 17.1 μM para lacosamida cuando se administró sola a 10 mg/kg; y 15.5 μM para Lacosamida cuando se administró a 10 mg/kg en combinación con el Compuesto A.

Tabla 10. Estudio 2A: Resumen de los Efectos Anticonvulsivos del Compuesto A y la Lacosamida en Ratones AC-MES Después de una Dosis Oral Única

ID del Compuesto y Dosis	Plasma Media (μM)	Cerebro Medio (μM)	Relación B/P	Captación en Fracción	Fracción con Signos de Comportamiento
Vehículo	n/a	n/a	n/a	8/8	0/8
Compuesto A (1 mg/kg)	0.08	0.15	1.85	8/8	0/8
Compuesto A (5 mg/kg)	0.28	0.40	1.45	7/8	0/8
Compuesto A (10 mg/kg)	0.37	0.50	1.36	3/8	1/8
Lacosamida (6 mg/kg)	9.07	4.85	0.54	8/8	0/8
Lacosamida (8 mg/kg)	10.8	6.27	0.58	8/8	0/8

mg/kg)					
--------	--	--	--	--	--

B/P: relación cerebro/plasma; n/a: no aplicable.

Tabla 11. Estudio 2B: Resumen de los Efectos Anticonvulsivos del Compuesto A y la Lacosamida en el Ratón AC-MES Después de una Dosis Oral Única

ID del Compuesto y Dosis	Plasma Media (µM)	Cerebro Medio (µM)	Relación B/P	Captación en Fracción	Fracción con Signos de Comportamiento
Vehículo	n/a	n/a	n/a	8/8	0/8
Compuesto A (5 mg/kg)	1	0.71	1.51	0/8	0/8
Compuesto A (7.5 mg/kg)	0.53	0.87	1.64	0/7	1/7
Compuesto A (10 mg/kg)	0.55	0.91	1.64	1/9	2/9
Lacosamida (10 mg/kg)	12.6	2.63	0.21	8/8	0/8

B/P: relación cerebro/plasma; n/a: no aplicable.

Tabla 12. Estudio 2C: Resumen de los Efectos Anticonvulsivos del Compuesto A y la Lacosamida en Combinación en el Ratón AC-MES Después de una Dosis Oral Única

ID del Compuesto y Dosis	Plasma Media (µM)	Cerebro Medio (µM)	Relación B/P	Captación en Fracción	Fracción con Signos de Comportamiento
Vehículo	n/a	n/a	n/a	8/8	0/8
Compuesto A (3 mg/kg)	0.28	0.51	1.79	2/8	0/8
Lacosamida (10 mg/kg)	17.1	4.84	0.28	6/8	0/8
Compuesto A (3 mg/kg) + Lacosamida (10 mg/kg)	0.28 + 15.5	0.54 + 4.52	1.95 + 0.29	0/8	0/8

B/P: relación cerebro a plasma; n/a: no aplicable.

Tabla 13. Estudio 2D: Resumen de los Efectos Anticonvulsivos de la Lacosamida en el Ratón AC-MES Después de una Dosis Oral Única

ID del Compuesto y Dosis	Plasma Media (μM)	Cerebro Medio (μM)	Relación B/P	Captación en Fracción	Fracción con Signos de Comportamiento
Vehículo	n/a	n/a	n/a	8/8	0/8
Lacosamida (6 mg/kg)	6.90	7.95	1.15	8/8	0/8
Lacosamida (20 mg/kg)	23.9	26.8	1.12	3/8	0/8

B/P: relación cerebro a plasma; n/a: no aplicable.

5.2.1 Conclusiones

El compuesto A y la Lacosamida demostraron una eficacia dependiente de la concentración en el ensayo AC-MES de ratón CF-1. Los valores de EC_{50} del Compuesto A en plasma y cerebro proyectados a partir del análisis de la curva de concentración-respuesta fueron $0.30 \mu\text{M}$ y $0.47 \mu\text{M}$, respectivamente. La combinación de Compuesto A a 3 mg/kg y Lacosamida a 10 mg/kg condujo a la supresión completa de las convulsiones tónicas en comparación con la supresión parcial cuando el Compuesto A o Lacosamida se administraron solos en el ensayo AC-MES de ratón.

Se probaron cinco dosis orales (PO) del Compuesto A cada una en el modelo AC-MES. Treinta minutos después de la administración del Compuesto A a 1 mg/kg ($n=8$), 3 mg/kg ($n=8$), 5 mg/kg ($n=16$), 7.5 mg/kg ($n=7$) y 10 mg/kg ($n=17$) por vía oral a ratones CF-1 macho (pesos corporales de 28.2 a 43.8 g), los ratones se sometieron a un estímulo eléctrico corneal de 60 Hz (0.2 segundos de duración, 40 mA). Este estímulo provocó una extensión tónica de las patas traseras en todos los animales que recibieron dosis de vehículo. Cualquier animal que no mostrara extensión de las patas traseras en respuesta al estímulo eléctrico se consideró protegido. También se realizó una evaluación neurológica observacional (prueba cualitativa) en el momento de la prueba como examen de tolerabilidad. Se recogieron muestras terminales de plasma y

cerebro de todos los animales para obtener los niveles de concentración del Compuesto A y para comprender la relación entre la eficacia y la concentración del fármaco.

Después de una dosis oral única, el Compuesto A mostró un efecto dependiente de la concentración contra las convulsiones tónicas inducidas por AC-MES con un efecto máximo de 0/8 animales con convulsiones a una concentración plasmática de 0.47 μM (del Estudio 2B a 5 mg/kg). En el Estudio 2A (a 1 mg/kg, n=8; 5 mg/kg, n=8; y 10 mg/kg, n=8; fecha de estudio 28 de marzo de 2019), la fracción de animales que mostró una respuesta convulsiva tónica al estímulo AC-MES después de un pretratamiento de 30 minutos con el Compuesto A disminuyó de 8/8 (concentración plasmática media de 0.0815 μM ; 1 mg/kg), a 7/8 (concentración plasmática media de 0.28 μM ; 5 mg/kg), y a 3/8 (concentración plasmática media de 0.37 μM ; 10 mg/kg). En el Estudio 2B (5 mg/kg, n=8; 7.5 mg/kg, n=7 y 10 mg/kg, n=9; fecha de estudio 5 de junio de 2019), dosis de 5 mg/kg (concentración plasmática media de 0.47 μM) y 10 mg/kg (concentración plasmática media de 0.55 μM) del Compuesto A mostraron una gran eficacia (0/8 y 1/9 animales con convulsiones, respectivamente). En el Estudio 2C (3 mg/kg, n=8; fecha del estudio 11 de junio de 2019), la dosis de 3 mg/kg del Compuesto A mostró que 2/8 animales se convulsionaron a una concentración plasmática de 0.28 μM . En los tres estudios de eficacia (2A, 2B y 2C), la diferencia entre los grupos tratados con el Compuesto A y los grupos que recibieron la dosis del vehículo alcanzó significación estadística. Los datos de los 3 estudios se combinaron para el análisis de la curva de concentración-respuesta del Compuesto A cuando se administró solo. La curva de concentración-respuesta del Compuesto A mostró una concentración efectiva media máxima (EC_{50}) para plasma de 0.30 μM y una EC_{50} para tejido cerebral de 0.47 μM .

Un ratón del grupo de 10 mg/kg en el Estudio 2A y tres ratones del estudio 2B (dos ratones del grupo de 10 mg/kg y un ratón del grupo de 7.5 mg/kg) mostraron signos de comportamiento (temblores, disminución de la actividad y

patas traseras extendidas) (concentraciones plasmáticas: 2A: 0.39 μM ; 2B: 10 mg/kg: 0.61 y 0.52 μM , 7.5 mg/kg: 0.75 μM).

Antes de probar el Compuesto A en combinación con Lacosamida en el modelo AC-MES (Estudio 2C), se probó Lacosamida sola a diferentes dosis para establecer una dosis-respuesta completa. Se probaron cuatro dosis de Lacosamida por vía oral en el modelo AC-MES por separado (Estudio 2D: 6 mg/kg y 20 mg/kg, n=8 por grupo, fecha de estudio 14 de marzo de 2019; Estudio 2A: 6 mg/kg y 8 mg/kg, n=8 por grupo, fecha de estudio 28 de mayo de 2019; Estudio 2B: 10 mg/kg, n=8, fecha de estudio 05 de junio de 2019 y Estudio 2C: 10 mg/kg, n=8, fecha del estudio 11 de junio de 2019) y como parte de los estudios. Dos horas después de la administración de Lacosamida en dosis de 6 mg/kg (n=16), 8 mg/kg (n=8), 10 mg/kg (n=16) y 20 mg/kg (n=8) mediante sonda oral a ratones macho CF-1 (peso corporal de 28.2 a 43.8 g), los ratones se sometieron a un estímulo AC-MES. La Lacosamida mostró un efecto dependiente de la dosis y la concentración contra las convulsiones tónicas inducidas por AC-MES con un efecto máximo a 20 mg/kg con 3/8 animales con convulsiones (concentración plasmática media de 23.9 μM) y un efecto mínimo a dosis más bajas de 6, 8 y 10 mg/kg. Los datos de todos los 4 estudios (2A, 2B, 2C y 2D) se combinaron para el análisis de la curva de respuesta a la concentración de Lacosamida cuando se administró sola. La curva de respuesta a la concentración de Lacosamida mostró una EC_{50} para plasma de 21.6 μM y una EC_{50} para tejido cerebral de 22.2 μM . En base a estudios de dosis-respuesta, se eligió una dosis de 10 mg/kg de Lacosamida y 3 mg/kg de Compuesto A que mostró una eficacia mínima cuando se administraron solos para el estudio de combinación en el modelo AC-MES.

La combinación del Compuesto A (3 mg/kg PO, 0.5 horas antes de AC-MES) con Lacosamida (10 mg/kg PO, 2 horas antes de AC-MES) en ratones macho CF-1 suprimió completamente las convulsiones tónicas en comparación con la supresión parcial cuando el Compuesto A o la Lacosamida se dosificaron solos (Compuesto A solo a 3 mg/kg: 2/8 animales con convulsiones; Lacosamida sola a 10 mg/kg: 6/8 animales con convulsiones; Compuesto A + Lacosamida: 0/8

animales con convulsiones; vehículo: 8/8 animales con convulsiones). Las concentraciones plasmáticas del Compuesto A (3 mg/kg) y Lacosamida (10 mg/kg) fueron similares ya sea que se dosificaron solos o en combinación, lo que sugiere que la máxima eficacia observada en el grupo de combinación no fue el resultado de una mayor exposición de cualquiera de los compuestos. Las concentraciones plasmáticas totales medias alcanzadas fueron: Compuesto A cuando se dosificó solo a 3 mg/kg: 0.283 μ M; Compuesto A cuando se dosificó en combinación a 3 mg/kg: 0.279 μ M; Lacosamida cuando se dosificó sola a 10 mg/kg: 17.1 μ M; Lacosamida cuando se dosificó en combinación a 10 mg/kg: 15.5 μ M.

5.3. Ejemplo 3. Compuesto A solo y en Combinación con Levetiracetam en un Ensayo de Convulsiones Psicomotoras de 6 Hz

El objetivo de este estudio fue evaluar la interacción del Compuesto A con Levetiracetam en un modelo de ratón de convulsiones sensible a cada compuesto, el ensayo de convulsiones psicomotoras de 6 Hz (Barton et al., *Epilepsy Res.* 2001; 47(3):217-227). Se evaluó si la combinación de ambos compuestos es favorable o desfavorable para la eficacia dosificando el Compuesto A y el Levetiracetam solos y en combinación, cada uno a una dosis que produce una eficacia submáxima por sí solo. El Compuesto A y el Levetiracetam se administraron cada uno a una dosis que produce una eficacia submáxima en el ensayo de 6 Hz por sí solo para permitir la detección de un cambio en la eficacia en cualquier dirección cuando se combinaron estos compuestos. Se analizaron muestras de plasma y cerebro para comprender cómo la combinación del Compuesto A y el Levetiracetam puede afectar la farmacocinética y la farmacodinámica.

5.3.1 Materiales y Métodos

Compuesto de Prueba – Compuesto A

Identidad:	Compuesto A
Número de Lote:	12
Descripción Física:	Sólido blanco

Pureza (%):	98.8
Proveedor:	Olon Recerca Biosciences (Lot No. 60367-18-002)

Compuesto de referencia: Levetiracetam

Identidad:	Levetiracetam
Número de Lote:	03
Descripción Física:	Polvo blanco
Pureza (%):	98%
Proveedor:	Toronto Research Chemicals; Catalog No. L331500, Lot No. 3-JSH-3-1

Vehículo: Compuesto A formulación F2: dimetilsulfóxido al 5% (DMSO), metilcelulosa al 0.5% en agua desionizada (DI). Formulación F1 de Levetiracetam: metilcelulosa al 0.5 % p:p, Tween 80 al 0.2 % v:v en agua desionizada.

Formulación de la Dosis: Se pesó la cantidad apropiada de Compuesto A (sin corrección por pureza) y se disolvió en DMSO a 20x la concentración final prevista. La solución madre de DMSO 20x del Compuesto A se diluyó 20 veces con metilcelulosa al 0.5 % en agua DI para lograr la concentración final deseada. La suspensión del Compuesto A resultante se agitó o se mezcló con un vórtex para producir una suspensión homogénea. La formulación se mantuvo a temperatura ambiente y se agitó continuamente o se mezcló en vórtex antes de la administración de cada dosis.

Para Levetiracetam, se calentó agua DI (0.8 L) hasta 70 °C a 80 °C. Se pesaron cinco gramos de metilcelulosa y se añadieron lentamente en pequeñas porciones a agua DI calentada. La mezcla se agitó hasta formar una suspensión lechosa homogénea. La suspensión se trasladó a una habitación fría y se agitó durante la noche para obtener una solución clara. Se añadieron dos mL de Tween 80 a la solución clara y se diluyeron hasta 1 L con agua DI. La solución vehículo se almacenó entre 2 °C y 8 °C.

Se pesó polvo de Levetiracetam en viales. Se añadió una cantidad apropiada de vehículo al polvo y luego se mezcló en el homogeneizador IKA-T18 ULTRA TURRAX para crear una suspensión uniforme a la concentración deseada.

Luego, los viales se envolvieron en papel de aluminio para protegerlos de la luz y se colocaron en una placa de agitación hasta el momento de la dosificación.

Sistema de Prueba

Especies/Cepa: Ratones CF-1
 Número y Sexo: 104 machos
 Fuente: Charles River Laboratories

Edad y Peso Corporal al
 Inicio de la Dosificación:

ID del Estudio	Edad (días)	Rango de peso (g)
3A	60	32.7 a 46.0
3B	46	29.0 a 37.3
3C	48	31.0 a 40.0

Alojamiento:

Los animales se alojaron en grupo (4 por jaula) en jaulas que cumplen con las leyes y reglamentos de bienestar animal aplicables (CCAC). La temperatura estuvo entre 18 °C y 25 °C y la humedad relativa entre 45 % y 65 %.

Aclimatación:

A su llegada, los animales fueron examinados para asegurar su estado de salud satisfactorio y se aclimataron a la instalación durante por lo menos 5 días antes de ponerlos en estudio.

Alimento/Agua:

Los animales recibieron alimento para roedores certificado (Teklad Rodent Chow #2014) *ad libitum*.
 El agua del grifo estaba disponible *ad libitum*.

Diseño Experimental: Los animales se asignaron a grupos de tratamiento como se indica en la Tabla 14. A todos los ratones se les administró vehículo o Compuesto A a través de sonda PO (Procedimiento Operativo Estándar (SOP) TECH-006) y vehículo o Levetiracetam mediante inyección IP (TECH-004) 1

hora antes de la inducción de la convulsión. Se eligió la ED₂₀ (4 mg/kg) del Compuesto A para experimentos de combinación (basado en el experimento de respuesta a la dosis, Estudio 3A). Se eligió una dosis de 300 mg/kg de Levetiracetam en base a experimentos previos que arrojaron una eficacia promedio del 35 % con esta dosis.

Tabla 14. Resumen de los Grupos Experimentales

Estudio	Comp	Dosis (mg/kg)	Volumen de dosis (mL/kg)	Con. De Formulación (mg/mL)	Vehículo	Vía de Admin.	No. de Animales (Sexo)	Tiempo de Pre-tratamiento (h)
3A	Vehículo	0	10	n/a	F2	PO	8 (macho)	1
	Comp A	1	10	0.1	F2	PO	8 (macho)	1
	Comp A	3	10	0.3	F2	PO	8 (macho)	1
	Comp A	5	10	0.5	F2	PO	8 (macho)	1
	Comp A	8	10	0.8	F2	PO	8 (macho)	1
3B	Vehículo	n/a	10	n/a	F2	PO	8 (macho)	1
	Vehículo	n/a	10	n/a	F1	IP	8 (macho)	1
	Vehículo	0	10	n/a	F2	PO	8 (macho)	1
	Lev	300	10	30	F1	IP	8 (macho)	1
	Comp A	4	10	0.4	F2	PO	8 (macho)	1
3C	Vehículo	n/a	10	n/a	F2	PO	8 (macho)	1
	Vehículo	n/a	10	n/a	F1	IP	8 (macho)	1
	Vehículo	0	10	n/a	F2	PO	8 (macho)	1
	Lev	300	10	30	F1	IP	8 (macho)	1
	Comp A	4	10	0.4	F2	PO	8 (macho)	1
	Vehículo	0	10	n/a	F1	IP	8 (macho)	1
	Comp A	4	10	0.4	F2	PO	8 (macho)	1
	Lev	300	10	30	F1	IP	8 (macho)	1
	Comp A	4	10	0.4	F2	PO	8 (macho)	1
	Lev	300	10	30	F1	IP	8 (macho)	1

Adminin: administración; Con.: concentración; Comp.: Compuesto; IP: intraperitoneal; Lev: Levetiracetam; n/a: no aplicable; PO: por vía oral, oral.

Estudio Ciego y Aleatorio: El experimentador que administró el compuesto asignó aleatoriamente a cada animal a un grupo de tratamiento. Un experimentador diferente, sin conocer la asignación del grupo de tratamiento, realizó la prueba. Todos los animales probados en un experimento determinado tenían las mismas posibilidades de asignación a cualquier grupo de tratamiento.

Observación de Signos Clínicos: Se observó el comportamiento anormal de todos los animales a los que se les dosificó el compuesto durante 10 minutos después de la dosificación por parte del experimentador que dosificó a los animales y nuevamente en el momento de la estimulación por parte del experimentador que probó los animales. Se registraron todos los cambios cualitativos del comportamiento normal.

Ensayo de Convulsiones Psicomotoras de 6 Hz: Todos los animales se llevaron a la sala de experimentos por lo menos 1 hora antes de la estimulación eléctrica. Inmediatamente antes del ensayo, se aplicó una gota de Alcaína (clorhidrato de proparacaína, 0.5 %) en cada uno de los ojos del ratón. A continuación, se sujetó firmemente al animal y se le aplicaron un par de electrodos en los ojos (Unidad de Terapia Electroconvulsiva 57800, Ugo Basile). Se provocó un estímulo de 3 segundos con un pedal a 34 miliamperios, 6 Hz y un ancho de pulso de 0.2 milisegundos. Inmediatamente después de completar el estímulo, el animal se colocó en un cilindro de Plexiglás y se registró el comportamiento de las convulsiones (clonus de la mandíbula, clonus de miembros anteriores y cola de Straub) (de acuerdo con TECH 036). Se consideró que un animal estaba protegido contra convulsiones si no mostraba ninguno de los tres comportamientos convulsivos psicomotores típicos (clonus de mandíbula, clonus de miembros anteriores, cola de Straub) inducidos por este protocolo de estimulación en animales de control.

Recolección y Preparación de Muestras: Los ratones se anestesiaron mediante inhalación de isoflurano (TECH-018) hasta que alcanzaron un plano quirúrgico de anestesia. Luego, se insertó una jeringa (jeringa de 1 mL con una aguja de calibre 22) debajo del esternón en el corazón (TECH-031). Se recolectaron aproximadamente 0.5 mL de sangre, se depositaron en un tubo de K₂EDTA y se almacenaron en hielo. Luego, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical (TECH 018). Se extrajeron los cerebros, se colocaron en un vial previamente pesado y se congelaron instantáneamente en hielo seco. Al final de la recolección de la muestra, la sangre se centrifugó a 4 000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y el plasma se pipeteó en un tubo rotulado. Todas las muestras se almacenaron en un congelador a -80 °C hasta el bioanálisis (8 días después de la recolección de muestras para los Estudios 3A y 3B; 20 días después de la recolección de muestras para el Estudio 3C).

Análisis de Muestras de Plasma y Tejidos: Se descongelaron a temperatura ambiental tubos de polipropileno de molino de bolas que contenían tejidos cerebrales pesados y se añadieron 3 mL de disolvente de homogeneización (agua:acetonitrilo (1:1, v:v)). Los tubos se colocaron en el Homogeneizador Bead Mill (Bead Ruptor Elite Model, Omni International) y se agitaron a una velocidad de 3.70 m/s durante un solo ciclo que duró 30 segundos. El tubo homogeneizado se centrifugó a 4 000 rpm durante 20 minutos, el sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se almacenó congelado a -80 °C hasta su análisis. Todas las muestras, incluyendo los extractos de homogeneizado de plasma y cerebro (incluyendo las muestras de calibración y control de calidad (QC) preparadas en plasma de rata K₂EDTA), se extrajeron mediante precipitación de proteínas. A cada alícuota de 50 µL de muestra, 50 µL de solución estándar interna (2500 ng/mL de (S)-5-cloro-4-((1-(5-cloro-2-fluorofenil)etil)amino)-2-fluoro-*N*-(pirazin-2-il)bencenosulfonamida y 4-((2-((7-azabicyclo[2.2.1]heptan-7-il)metil)-6-fluorobencil)amino)-2,6-difluoro-*N*-(isotiazol-3-il)bencenosulfonamida para el Compuesto A y Levetiracetam, respectivamente, en agua/acetonitrilo (1:1)), se añadieron 50 µL de ácido fosfórico al 6 % (v/v) en agua y luego 200 µL de acetonitrilo. Las muestras en los tubos de 1.5 ml se mezclaron en vórtex y luego se centrifugaron durante 20

minutos a 13 000 rpm. Cincuenta microlitros del sobrenadante se mezclaron con 150 µL de agua/acetonitrilo (1:1) en una placa de 96 pocillos que se centrifugó después de la mezcla durante 20 minutos a 4 000 rpm y luego estuvo lista para el análisis mediante espectrometría de masas en tándem de cromatografía líquida (LC-MS/MS).

Las muestras se analizaron mediante un método LC-MS/MS de grado de investigación de la siguiente manera:

Instrumento: Sciex TQ-5500
 Matriz: Plasma de ratón (K₂EDTA)
 Homogeneizado de cerebro de ratón
 Analito: Compuesto A
 Estándar Interno (IS): (S)-5-cloro-4-((1-(5-cloro-2-fluorofenil)etil)amino)-2-fluoro-N-(pirazin-2-il)bencenosulfonamida
 Condiciones de MS: ESI (ionización por electropulverización): positivo
 Compuesto A: [M+H]⁺ m/z 369.2/247.2
 (S)-5-cloro-4-((1-(5-cloro-2-fluorofenil)etil)amino)-2-fluoro-N-(pirazin-2-il)bencenosulfonamida (IS): [M+H]⁺ m/z 458.793/157

Condiciones de
 Cromatografía líquida
 de ultra alta resolución
 (UHPLC):

Tiempo (min)	%B
0.0	10
0.2	10
3.4	86
3.5	100
4.0	100
4.1	10
5.0	10

A: ácido fórmico al 0.1 % en agua

B: ácido fórmico al 0.1 % en acetonitrilo

Estándares de
 Calibración

Los estándares se prepararon a 2.34, 4.69, 9.38, 18.8, 37.5, 75, 150, 300, 600, 1200, 2400 y 4800 ng/mL para los Estudios 3A y 3B.

Los estándares se prepararon a 0.586, 1.17, 2.34, 4.69, 9.38, 18.8, 36.5, 75.0, 150, 300, 600 y 1200 ng/mL para el Estudio 3C.

Analito: Levetiracetam
 Estándar Interno (IS): 4-((2-((7-azabicyclo[2.2.1]heptan-7-il)metil)-6-fluorobencil)amino)-2,6-difluoro-*N*-(isotiazol-3-il)bencenosulfonamida
 Condiciones MS: ESI: positivo
 Levetiracetam: $[M+H]^+$ m/z 171/126
 4-((2-((7-azabicyclo[2.2.1]heptan-7-il)metil)-6-fluorobencil)amino)-2,6-difluoro-*N*-(isotiazol-3-il)bencenosulfonamida (IS): $[M+H]^+$ m/z 509/218

Condiciones de UHPLC:

Tiempo (min)	%B
0.0	20
0.6	20
1.0	100
1.7	100
1.8	20
3.0	20

A: ácido fórmico al 0.1 % en agua

B: ácido fórmico al 0.1 % en acetonitrilo

Estándares de calibración

Los estándares se prepararon a 4.69, 9.38, 18.8, 37.5, 75, 150, 300, 600, 1200, 2400, 4800 y 9600 ng/mL

Procesamiento y Análisis de Datos: El análisis de datos estadísticos se realizó utilizando GraphPad Prism (versión 8.2.1). Los datos de dosis-respuesta se analizaron mediante una prueba de Kruskal-Wallis, seguida de comparaciones múltiples de Dunn. Se consideró significativo un valor de $p < 0.05$. Las curvas de dosis y concentración-respuesta se generaron utilizando la ecuación de Hill Langmuir:

Ecuación 1

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

dónde:

- B = inferior, establecido como 0.
- T = superior, establecido como 1.
- n = el coeficiente de Hill, restringido a menos de cero.
- IC_{50} = concentración de un compuesto requerida para una inhibición del 50 % in vitro.

Todos los datos se informan con tres cifras significativas y todos los datos de grupo se informan como media $\pm$ DE a menos que se indique lo contrario.

5.3.2 Resultados

Bioanálisis: Todas las pruebas de idoneidad del sistema, las muestras de QC, la matriz y los blancos de disolvente cumplieron los criterios de aceptación. Los parámetros de análisis se tabulan en la Tabla 15. Las muestras de QC en cada concentración se analizaron por triplicado.

Tabla 15. Parámetros de Bioanálisis

Estudio	Comp A LLOQ (ng/mL)	Comp A ULOQ (ng/mL)	Comp A QC (ng/mL)	Lev LLOQ (ng/mL)	Lev ULOQ (ng/mL)	Lev QC (ng/mL)	Muestras abajo LLOQ
3A	2.34	4800	14 225 3600	n/a	n/a	n/a	ninguna
3B	2.34	4800	14 225 3600	4.69	9600	28 450 7200	2 plasma 7 cerebro
3C	1.17	1200	3.52 56.25 900	9.38	9600	28 450 7200	1 plasma 1 cerebro

Lev: Levetiracetam; LLOQ: límite inferior de cuantificación; n/a: no aplicable; ULOQ: límite superior de cuantificación.

Observaciones Clínicas: Un animal al que se administró 8 mg/kg de Compuesto A (plasma: 1.16 μ M; cerebro: 1.65 μ M) mostró temblores y estaba frío al tacto en el momento de la prueba.

Respuesta a la Dosis del Compuesto A en el Ensayo de Convulsiones Psicomotoras de 6 Hz (estudio 3A): el Compuesto A dosificado por vía oral 1 hora antes de la estimulación corneal mostró una eficacia dependiente de la dosis con 8/8 animales con convulsiones a 1 mg/kg y 3 mg/kg, 5/8 animales con convulsiones a 5 mg/kg y 3/8 animales con convulsiones a 8 mg/kg. La protección contra convulsiones fue significativamente diferente del vehículo a 8 mg/kg de Compuesto A ($p=0.0081$; Figura 12A). La curva de respuesta a la dosis proyecta una ED_{50} de 6.48 mg/kg y una ED_{20} de 4.13 mg/kg con un coeficiente de Hill de $n = -3.09$ (Figura 12B).

Las relaciones farmacocinéticas-farmacodinámicas de plasma y cerebro de animales individuales se muestran en la Figura 12A y la Figura 12B, respectivamente. Los resultados y la exposición por grupo se tabulan en la Tabla 16. La eficacia del Compuesto A dependía de la concentración con una

EC₅₀ en plasma de 0.35 μ M y una EC₅₀ en el cerebro de 0.54 μ M con un coeficiente de Hill de $n = -1.95$ y $n = -2.17$, respectivamente (Figura 12C y Figura 12D).

Tabla 16. Eficacia y Exposición del Compuesto A luego de una Única Administración Oral de Diferentes Dosis a Ratones CF-1 (Estudio 3A)

Compuesto	Dosis (mg/kg)	Plasma (μ M)	DE de Plasma (μ M)	Cerebro (μ M)	DE de cerebro (μ M)	Captación en Fracción
Vehículo	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	8/8
Comp A	1	0.04	0.01	0.09	0.06	8/8
Comp A	3	0.15	0.06	0.26	0.10	8/8
Comp A	5	0.18	0.07	0.29	0.16	5/8
Comp A	8	0.47	0.29	0.70	0.41	3/8

n/a: no aplicable.

Combinación de Compuesto A y Levetiracetam en el Ensayo de Convulsiones Psicomotoras de 6 Hz (Estudios 3B y 3C): para evaluar si la combinación de Compuesto A y Levetiracetam es favorable o desfavorable para la eficacia en el ensayo de convulsiones psicomotoras de 6 Hz, se seleccionó una dosis submáxima para cada compuesto. Se determinó que la ED₂₀ del Compuesto A era de 4 mg/kg en el experimento anterior de dosis-respuesta. En estudios previos, se logró una eficacia promedio del 35 % con 300 mg/kg de Levetiracetam, con una variabilidad considerable entre los estudios. En dos experimentos diseñados de forma idéntica (Estudios 3B y 3C, ver arriba y la Tabla 14), la combinación de 4 mg/kg de Compuesto A y 300 mg/kg de Levetiracetam fue significativamente más eficaz en el ensayo de convulsiones psicomotoras de 6 Hz que cualquiera de los compuestos solos (Tabla 16).

Estudio 3B: En el Estudio 3B, el Compuesto A o el Levetiracetam dosificado solo no dio como resultado una protección contra las convulsiones (las concentraciones de plasma y cerebro del Compuesto A fueron mucho más bajas de lo esperado), pero la combinación de ambos compuestos protegió a

3/8 animales de las convulsiones (Figura 14A, Tabla 12). El beneficio de la dosificación combinada fue significativo en comparación con el vehículo y en comparación con cualquiera de los compuestos dosificados solos ($p = 0.034$). Las concentraciones de Compuesto A y Levetiracetam alcanzadas en plasma (Compuesto A: $0.014 \pm 0.009 \mu\text{M}$; Levetiracetam: $1500 \pm 320 \mu\text{M}$) y cerebro (Compuesto A: $0.03 \pm 0.02 \mu\text{M}$; Levetiracetam: $861 \pm 120 \mu\text{M}$) fueron comparables entre los grupos de dosis única y de dosis combinada (Figura 14, Tabla 17). Por lo tanto, el efecto beneficioso de la combinación del Compuesto A y el Levetiracetam no puede explicarse por una mayor exposición de cualquiera de los compuestos (Figura 15).

Estudio 3C: En el Estudio 3C, se repitió el diseño del Estudio 3B. Esta vez, la misma dosis de 4 mg/kg de Compuesto A dio como resultado concentraciones de Compuesto A más de 10 veces mayores en plasma ($0.17 \pm 0.09 \mu\text{M}$ frente a $0.01 \pm 0.01 \mu\text{M}$) y cerebro ($0.41 \pm 0.23 \mu\text{M}$ frente a $0.03 \pm 0.02 \mu\text{M}$) que en el Estudio 3B (Figura 15, Tabla 17). Las concentraciones de Levetiracetam también fueron ligeramente más altas que en el Estudio 3B (cerebro: $1130 \pm 130 \mu\text{M}$ frente a $861 \pm 120 \mu\text{M}$, plasma: $1770 \pm 287 \mu\text{M}$ frente a $1500 \pm 320 \mu\text{M}$; Figura 15, Tabla 17). Las exposiciones aumentadas se tradujeron en una eficacia aumentada de cualquiera de los compuestos dosificados solos en comparación con el Estudio 3B: el Compuesto A a 4 mg/kg protegió a 1/7 animales y el Levetiracetam a 300 mg/kg protegió a 2/8 animales de convulsiones (Figura 14A, Tabla 17). La combinación de Compuesto A y Levetiracetam protegió a todos los animales analizados en este estudio (Figura 14A Tabla 17; $n=7$; se excluyó un animal porque no tenía niveles medibles de Levetiracetam en plasma o cerebro). Con la eficacia completa alcanzada después de la dosificación combinada del Compuesto A y Levetiracetam, el efecto sobre la eficacia fue significativamente diferente no solo del vehículo ($p=0.0002$), sino también de cualquiera de los compuestos dosificados solos ($p<0.01$). Similar al Estudio 3B, las concentraciones de Compuesto A y Levetiracetam alcanzadas en plasma y cerebro fueron comparables entre los grupos de dosis única y dosis combinada (Figura 15, Tabla 17). Por lo tanto, el efecto beneficioso de la combinación del Compuesto A y el Levetiracetam no

puede explicarse por una mayor exposición de cualquiera de los compuestos (Figura 16).

Estudios 3B y 3C Combinados: Cuando se combina la dosis-respuesta de ambos experimentos, se alcanzó la máxima eficacia con el Compuesto A o con Levetiracetam dosificado solo con Levetiracetam en 14/16 convulsiones, mientras que la combinación de ambos compuestos resultó en 5/15 animales con convulsiones. La combinación de Compuesto A y Levetiracetam protegió así al 66.7 % de los animales de convulsiones, lo que fue significativamente diferente del vehículo ($p<0.0001$), y de cualquiera de los compuestos solos ($p<0.001$, Figura 14B, Tabla 17).

Tabla 17. Eficacia y Exposición del compuesto A y Levetiracetam 1 Hora Después de la Dosificación Solo o en Combinación con Ratones CD-1

Estudio	Comp	Dosis (mg/kg)	Compuesto A				Levetiracetam				Captación en Fracción
			Plasma (μM)	DE de Plasma (μM)	Cerebro (μM)	DE del Cerebro (μM)	Plasma (μM)	DE de Plasma (μM)	Cerebro (μM)	DE del Cerebro (μM)	
3B	Veh.	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	8/8
	Comp A	4	0.01	0.01	0.03	0.02	n/a	n/a	n/a	n/a	8/8
	Lev	300	n/a	n/a	n/a	n/a	1500	320	861	120	8/8
	Comp A + Lev	4 + 300	0.02	0.01	0.04	0.02	1350	128	1010	78.8	5/8
3C	Veh.	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	8/8
	Comp A	4	0.17	0.09	0.41	0.23	n/a	n/a	n/a	n/a	5/6*
	Lev	300	n/a	n/a	n/a	n/a	1770	287	1130	130	6/8
	Comp A + Lev	4 + 300	0.17	0.06	0.383	0.19	2160	383	1100	265	0/7**
Combined	Comp A	4	0.10	0.10	0.22	0.25	n/a	n/a	n/a	n/a	13/14*
	Lev	300	n/a	n/a	n/a	n/a	1640	324	996	185	14/16
	Comp A + Lev	4 + 300	0.09	0.09	0.21	0.22	1730	497	1050	188	5/15**

Lev: Levetiracetam; n/a: no aplicable. *Dos animales fueron excluidos de la evaluación de la eficacia debido a un error de estimulación. Se produjo una violación (pérdida de contacto) durante la estimulación. **Se excluyó un animal porque no tenía una concentración medible de Levetiracetam ni en el plasma ni en el cerebro.

5.3.3 Conclusiones

El Compuesto A demostró una eficacia dependiente de la dosis en el ensayo psicomotor de 6 Hz en ratones con una ED₅₀ de 6.48 mg/kg. La eficacia se correlacionó bien con la concentración plasmática y cerebral del Compuesto A con una EC₅₀ plasmática de 0.35 µM y una EC₅₀ cerebral de 0.54 µM.

La combinación de Compuesto A a 4 mg/kg y Levetiracetam a 300 mg/kg condujo a una eficacia significativamente mayor en este ensayo que la observada con cualquiera de los compuestos solos en dos experimentos separados de diseño idéntico (Estudio 3B: $p=0.034$; Estudio 3C: $p<0.01$). La dosificación combinada no afectó significativamente la exposición plasmática o cerebral de ninguno de los compuestos. A concentraciones cerebrales comparables de Levetiracetam (1130 ± 130 µM frente a 1100 ± 265 µM; Estudio 3C), la adición del Compuesto A al Levetiracetam aumentó la eficacia del 25 % (solo Levetiracetam) al 100 % (Compuesto A + Levetiracetam).

En primer lugar, se realizó un estudio de dosis-respuesta (3A) para el Compuesto A en el ensayo psicomotor de 6 Hz para determinar la dosis a la que el 20 % de los animales estaban protegidos de las convulsiones (ED₂₀). El Compuesto A se administró a ratones CF-1 macho (peso corporal: 32.7 a 46.0 g) a 1, 3, 5 y 8 mg/kg por sonda oral a 8 animales por grupo 1 hora antes de la inducción de convulsiones psicomotoras a través de una estimulación corneal de 3 segundos a 34 miliamperios (6 Hz; ancho de pulso de 0.2 milisegundos). La eficacia en este ensayo se cuantificó calculando la fracción de animales en cada grupo de 8 que estaba protegida del comportamiento convulsivo (clonus de la mandíbula, clonus de las extremidades anteriores o cola de Straub) después de una estimulación de 6 Hz. Se analizaron muestras de plasma y cerebro para evaluar la relación concentración-respuesta.

Mientras que 1 mg/kg y 3 mg/kg del Compuesto A no dieron como resultado protección contra convulsiones, la fracción de animales con convulsiones se redujo a 5/8 en animales dosificados con 5 mg/kg y a 3/8 en el grupo de 8 mg/kg. A 8 mg/kg (plasma: 0.47 ± 0.29 µM; cerebro: 0.70 ± 0.41 µM; media $\pm$

SD), el Compuesto A mostró una protección significativa ($p=0.0081$) en comparación con el grupo del vehículo (8/8 convulsiones). Las curvas de dosis y respuesta a la concentración para el Compuesto A proyectan una dosis a la que el 50 % de los animales estaban protegidos de las convulsiones (ED_{50}) de 6.48 mg/kg, una concentración plasmática a la que el 50 % de los animales estaban protegidos de las convulsiones (EC_{50}) de 0.35 μ M y una EC_{50} cerebral de 0.54 μ M. La ED_{20} para el Compuesto A en este ensayo se calculó en 4.13 mg/kg.

Un animal que recibió una dosis de 8 mg/kg de Compuesto A mostró temblores y estaba frío al tacto. A una concentración de plasma de 1.16 μ M y de cerebro de 1.65 μ M, este animal tuvo la mayor exposición al Compuesto A entre todos los animales en este experimento.

La combinación de Compuesto A y Levetiracetam en dosis que producen una eficacia submáxima se evaluó en dos experimentos separados, diseñados de forma idéntica (Estudios 3B y 3C). Experimentos anteriores habían establecido que una inyección intraperitoneal (IP) de 300 mg/kg de Levetiracetam 1 hora antes de la estimulación produce una eficacia del 35 % con una estimulación de 34 miliamperios y 6 Hz. El experimento de dosis-respuesta con el Compuesto A (Estudio 3A) proyectó una ED_{20} de 4 mg/kg cuando el Compuesto A se administró por vía oral (PO) 1 hora antes de la estimulación. A continuación, se evaluaron los siguientes grupos experimentales ($n=8$) en cada uno de los dos experimentos diseñados de forma idéntica: 1. Control del vehículo (PO e IP); 2. Compuesto A a 4 mg/kg PO y vehículo IP; 3. Levetiracetam a 300 mg/kg IP y vehículo PO; 4. Compuesto A a 4 mg/kg PO y Levetiracetam a 300 mg/kg IP. Se administró una estimulación corneal de 3 segundos a 34 miliamperios (6 Hz, ancho de pulso de 0.2 milisegundos) 1 hora después de la administración del compuesto. La eficacia se evaluó en función de la fracción de animales protegidos del comportamiento convulsivo (clonus de mandíbula, clonus de extremidad anterior o cola de Straub).

En el Estudio 3B, cualquier compuesto dosificado solo a ratones CF-1 macho (pesos corporales: 29.0 a 37.3 g) no resultó en protección contra convulsiones, pero la combinación de ambos compuestos protegió a 3/8 animales de convulsiones ($p = 0.034$). Las concentraciones de Compuesto A y Levetiracetam alcanzadas en plasma (Compuesto A: $0.014 \pm 0.009 \mu\text{M}$; Levetiracetam: $1500 \pm 320 \mu\text{M}$) y el cerebro (Compuesto A: $0.03 \pm 0.02 \mu\text{M}$; Levetiracetam: $861 \pm 120 \mu\text{M}$) eran comparables entre las dosis únicas y los grupos de dosis combinada, pero en general fueron mucho más bajos de lo esperado para una dosis de 4 mg/kg.

En el Estudio 3C, realizado en ratones macho CF-1 (pesos corporales: 31.0 a 40.0 g), 4 mg/kg de Compuesto A dieron como resultado concentraciones más de 10 veces mayores de Compuesto A en plasma ($0.167 \pm 0.0897 \mu\text{M}$ frente a $0.014 \pm 0.009 \mu\text{M}$) y cerebro ($0.41 \pm 0.23 \mu\text{M}$ frente a $0.03 \pm 0.02 \mu\text{M}$) que en el Estudio 3B. Las concentraciones de Levetiracetam también fueron ligeramente superiores a las del 3B (cerebro: $1130 \pm 130 \mu\text{M}$ frente a $861 \pm 120 \mu\text{M}$; plasma: $1770 \pm 287 \mu\text{M}$ frente a $1500 \pm 320 \mu\text{M}$). El aumento de la exposición se tradujo en una mayor eficacia de cualquiera de los compuestos dosificados solos: el Compuesto A a 4 mg/kg protegió a 1/7 animales y el Levetiracetam a 300 mg/kg protegió a 2/8 animales de las convulsiones. La combinación de Compuesto A y Levetiracetam protegió a todos los animales probados en este grupo (7/7 protegidos; $p < 0.01$) en comparación con cualquiera de los compuestos solos. A concentraciones cerebrales comparables de Levetiracetam ($1130 \pm 130 \mu\text{M}$ frente a $1100 \pm 265 \mu\text{M}$, Estudio 3C), la adición del compuesto A al Levetiracetam aumentó la eficacia del 25 % (solo Levetiracetam) al 100 % (Compuesto A + Levetiracetam).

5.4. Ejemplo 4. Efecto Anticonvulsivo del Compuesto A Solo y en Combinación con Cenobamato en el Ensayo AC-MES en Ratones CF-1

Se evaluó la eficacia del Compuesto A y su interacción farmacológica con Cenobamato después de la dosificación oral en el ensayo de convulsión de electrochoque máximo de corriente alterna (AC-MES) en ratón (ver Ejemplo 2).

El objetivo de este estudio fue caracterizar la actividad anticonvulsiva dependiente de la dosis del Compuesto A y su interacción farmacológica con Cenobamato en el ensayo AC-MES en ratones después de una única administración oral de los compuestos. La eficacia anticonvulsiva del Compuesto A y el Cenobamato y el efecto de combinar el Compuesto A con el Cenobamato se probaron en el ensayo AC-MES en ratones macho CF-1 después de una sola dosis oral. Se obtuvieron muestras de plasma y cerebro para comprender la relación entre la concentración y la eficacia del fármaco.

5.4.1 Materiales y Método

El Compuesto A, los vehículos, las formulaciones de dosis y los sistemas de ensayo usados en el Ejemplo 4 eran idénticos a los usados en el Ejemplo 2, sustituyendo Lacosamida por Cenobamato.

Compuesto de Prueba: Cenobamato

Identidad:	Cenobamate
Número de Lote:	Lote 01
Descripción Física:	Polvo blanco
Pureza:	99.5%
Proveedor:	No disponible

Diseño Experimental: Los animales se asignaron a grupos de tratamiento como se indica en la Tabla 18 a la Tabla 19. Se realizaron cuatro estudios con Compuesto A y Cenobamato cada uno. Sus respectivas fechas de estudio se muestran en la Tabla 18 a la Tabla 19.

Tabla 18. Grupos Experimentales – Estudio 4A

Grupo	Compuesto	Dosis (mg/kg)	Vía	Número de Ratones	Tiempo de Pre-Tratamiento (h)	Volumen de Dosis (mL/kg)	Formulación
1	Vehículo	0	PO	8	0.5	10	F2
2	Compuesto A	1	PO	8	0.5	10	F2
3	Compuesto A	5	PO	8	0.5	10	F2

4	Compuesto A	10	PO	8	0.5	10	F2
---	-------------	----	----	---	-----	----	----

PO: por vía oral, oral.

Tabla 19. Grupos Experimentales – Estudio 4B

Grupo	Compuesto	Dosis (mg/kg)	Vía	Número de Ratones	Tiempo de Pre-Tratamiento (h)	Volumen de Dosis (mL/kg)	Formulación
1	Vehículo	0	PO	8	0.5	10	F2
2	Compuesto A	5	PO	8	0.5	10	F2
3	Compuesto A	7.5	PO	7	0.5	10	F2
4	Compuesto A	10	PO	9	0.5	10	F2

PO: por vía oral, oral.

Tabla 20. Grupos Experimentales – Estudio 4C

Grupo	Compuesto	Dosis (mg/kg)	Vía	Número de Ratones	Tiempo de Pre-Tratamiento (h)	Volumen de Dosis (mL/kg)	Formulación
1	Vehículo	0	PO	8	0.5	10	F2
2	Compuesto A	3	PO	8	0.5	10	F2

PO: por vía oral, oral.

Tabla 21. Grupos Experimentales – Estudio 4F

Grupo	Compuesto	Dosis (mg/kg)	Vía	Número de Ratones	Tiempo de Pre-Tratamiento (h)	Volumen de Dosis (mL/kg)	Formulación
1	Vehículo	0	PO	8	2	10	F2 + F1
2	Compuesto A	2	PO	8	0.5	10	F2 + F1
3	Cenobamato	5	PO	8	2	10	F2 + F1
4	Compuesto A + Cenobamato	2+5	PO	8	0.5+2	10	F2 + F1

PO: por vía oral, oral.

Tabla 22. Grupos Experimentales – Estudio 4D

Grupo	Compuesto	Dosis (mg/kg)	Vía	Número de Ratones	Tiempo de Pre-Tratamiento	Volumen de Dosis (mL/kg)	Formulación
-------	-----------	---------------	-----	-------------------	---------------------------	--------------------------	-------------

					(h)		
1	Vehículo	0	PO	8	2	10	F1
2	Cenobamato	3	PO	8	2	10	F1
3	Cenobamato	10	PO	8	2	10	F1
4	Cenobamato	30	PO	8	8	10	F1

PO: por vía oral, oral.

Tabla 23. Grupos Experimentales – Estudio 4E

Grupo	Compuesto	Dosis (mg/kg)	Vía	Número de Ratones	Tiempo de Pre-Tratamiento (h)	Volumen de Dosis (mL/kg)	Formulación
1	Vehículo	0	PO	8	2	10	F1
2	Cenobamato	3	PO	7	2	10	F1
3	Cenobamato	5	PO	7	2	10	F1
4	Cenobamato	7.5	PO	8	2	10	F1

PO: por vía oral, oral.

Tabla 24. Grupos Experimentales – Estudio 4G

Grupo	Compuesto	Dosis (mg/kg)	Vía	Número de Ratones	Tiempo de Pre-Tratamiento (h)	Volumen de Dosis (mL/kg)	Formulación
1	Compuesto A + Cenobamato	0.5+5	PO	8	0.5+2	10	F2 + F1
2	Compuesto A + Cenobamato	1+5	PO	8	0.5+2	10	F2 + F1

PO: por vía oral, oral.

El Estudio Ciego y Aleatorio, las Observaciones Clínicas, el Ensayo AC-MES, la Recolección y los Procedimientos de Preparación de Muestras, Análisis de Muestras de Plasma y Cerebro y Bioanálisis en el Ejemplo 4 fueron idénticos a los utilizados en el Ejemplo 2.

Las muestras se analizaron para el Compuesto A mediante un método UHPLC-MS/MS de grado de investigación utilizando las condiciones enumeradas a continuación.

Instrumento: Sciex TQ-5500

Matriz: Plasma de ratón (K₂EDTA)

Homogeneizado de cerebro de ratón

Analito: Compuesto A

Estándar Interno (IS): (S)-5-cloro-4-((1-(5-cloro-2-fluorofenil)etil)amino)-2-fluoro-*N*-(pirazin-2-il)bencenosulfonamida

Condiciones de MS: ESI: positivo

Compuesto A: [M+H]⁺ m/z 369.2/247.2

(S)-5-cloro-4-((1-(5-cloro-2-fluorofenil)etil)amino)-2-

fluoro-*N*-(pirazin-2-il)bencenosulfonamida (IS): [M+H]⁺ m/z 458.793/157

Condiciones de UHPLC:

Tiempo (min)	%B
0.0	10
0.2	10
3.4	6
3.5	100
4.0	100
4.1	10
5.0	10

Estándares de calibración

Fase móvil A: ácido fórmico al 0.1 % en agua

Fase móvil B: ácido fórmico al 0.1 % en acetonitrilo

Los estándares se prepararon a 2.34, 4.69, 9.38, 18.8, 37.5, 75.0, 150, 300, 600, 1200, 2400 y 4800 ng/mL para 4A, 4B y 4C.

Se prepararon estándares a 0.586, 1.17, 2.34, 4.69, 9.38, 18.8, 37.5, 75.0, 150, 300, 600 y 1200 ng/mL para 4F.

Los estándares se prepararon a 0.293, 0.586, 1.17, 2.34, 4.69, 9.38, 18.8, 37.5, 75.0, 150, 300, 600 ng/mL para 4G.

Las muestras de QC se prepararon a 14.0, 225 y 3600

Muestras de QC ng/mL, se analizaron por triplicado para 4A, 4B y 4C.
 Las muestras de QC se prepararon a 3.5, 56.3 y 900 ng/mL y se analizaron por triplicado para 4F.
 Se prepararon muestras de QC a 1.75, 28.1 y 450 ng/mL, analizadas por triplicado para 4G.

Las muestras se analizaron para Cenobamato mediante un método UHPLC-MS/MS de grado de investigación utilizando las condiciones que se enumeran a continuación.

Instrumento: Sciex TQ-5500
 Matriz: Plasma de ratón (K₂EDTA)
 Homogeneizado de cerebro de ratón
 Analito: Cenobamato
 Estándar Interno (IS): (2*S*,5*R*)-5-(4-((2-fluorobencil)oxi)fenil)pirrolidin-2-carboxamida
 (4F, 4G); *terc*-butil (2-(azetidin-1-ilmetil)bencil)(3,5-difluoro-4-(*N*-(tiazol-4-il)sulfamoil)fenil)carbamato (4D, 4E)
 Condiciones MS: ESI: positivo
 Cenobamato: [M+H]⁺ m/z 267.8/155.1
 (2*S*,5*R*)-5-(4-((2-fluorobencil)oxi)fenil)pirrolidin-2-carboxamida
 (ES): [M+H]⁺ m/z 315.1/108.9
terc-butil (2-(azetidin-1-ilmetil)bencil)(3,5-difluoro-4-(*N*-(tiazol-4-il)sulfamoil)fenil)carbamato (IS): [M+H]⁺ m/z 551.1/214

Tiempo (min)	%B
0.0	20
0.6	20
1.00	100
1.50	100

1.60	20
2.5	20

A: ácido fórmico al 0.1 % en agua

B: ácido fórmico al 0.1 % en acetonitrilo

Condiciones de UHPLC: Los estándares se prepararon a 2.34, 4.69, 9.38, 18.8, 37.5, 75.0, 150, 300, 600, 1200, 2400 y 4800 ng/mL para 4F, 4D, 4E y 4G.

Muestras QC Las muestras de QC se prepararon a 14.0, 225 y 3600 ng/mL, se analizaron por triplicado para 4F, 4D, 4E y 4G.

La determinación de la concentración de la muestra y el Procesamiento y Análisis de Datos en el Ejemplo 4 fueron idénticos al Ejemplo 2.

5.4.2 Resultados

Bioanálisis: Todos los blancos de prueba de idoneidad del sistema (SST), QC, matriz y disolvente cumplieron los criterios de aceptación descritos en SOP MTD-066. El límite inferior de cuantificación (LLOQ) y el límite superior de cuantificación (ULOQ) para el Compuesto A y el Cenobamato se muestran en la Tabla 25.

Tabla 25. LLOQ y ULOQ para el Compuesto A y Cenobamato

Estudio	Compuesto	LLOQ	ULOQ
4A	Compuesto A	4.68	4800
4B	Compuesto A	4.68	4800
4C	Compuesto A	2.34	4800
4F	Compuesto A	0.586	1200
4F	Cenobamato	2.34	4800
4D	Cenobamato	4.68	4800
4E	Cenobamato	2.34	4800
4G	Compuesto A	0.293	600
4G	Cenobamato	2.34	4800

LLOQ: límite inferior de cuantificación. ULOQ: límite superior de cuantificación

Eficacia en el ensayo AC-MES: Los resultados del estudio de convulsiones inducidas por AC-MES en ratones se presentan en la Tabla 26 a la Tabla 32, y en la Figura 17, Figura. 18 y la Figura 19.

Compuesto A Solo: Los datos de las respuestas de dosis y concentración del Compuesto A se resumen en la Figura 17, Tabla 26, Tabla 27 y Tabla 28. En los tres estudios de eficacia (4A, 4B, 4C y 4F), el 100 % de los ratones CF-1 tratados con vehículo mostró una convulsión tónica con extensión de las patas traseras. En el Estudio 4A (a 1 mg/kg, n=8; 5 mg/kg, n=8; y 10 mg/kg, n=8), la fracción de animales que mostró una respuesta convulsiva tónica al estímulo AC-MES después de un pretratamiento de 30 minutos con el Compuesto A disminuyó de 8/8 (concentración plasmática media de 0.08 μ M; 1 mg/kg), a 7/8 (concentración plasmática media de 0.28 μ M; 5 mg/kg), y a 3/8 (concentración plasmática media de 0.37 μ M; 10 mg/kg). En el Estudio 4B (5 mg/kg, n=8; 7.5 mg/kg, n=7 y 10 mg/kg, n=9), dosis de 5 mg/kg (concentración plasmática media de 0.47 μ M) y 10 mg/kg (concentración plasmática media de 0.55 μ M) del Compuesto A mostraron una gran eficacia (0/8 y 1/9 animales con convulsiones, respectivamente). En el Estudio 4C (3 mg/kg, n=8), la dosis de 3 mg/kg del Compuesto A mostró 2/8 animales con convulsiones a una concentración plasmática de 0.28 μ M. En el estudio 4F (2 mg/kg, n=8), la dosis de 2 mg/kg mostró 5/8 animales con convulsiones a una concentración plasmática de 0.11 μ M. En todos los estudios de eficacia excepto el 4F, la diferencia entre los grupos tratados con el compuesto A y los grupos dosificados con vehículo alcanzó significación estadística (los valores de p se muestran en la Figura 17).

Un ratón del grupo de 10 mg/kg en el Estudio 4A y tres ratones del estudio 4B (dos ratones del grupo de 10 mg/kg y un ratón del grupo de 7.5 mg/kg) mostraron signos de comportamiento (temblores, disminución de la actividad y patas traseras extendidas) (concentraciones plasmáticas: 4A: 0.39 μ M; 4B: 10 mg/kg: 0.61 y 0.52 μ M, 7.5 mg/kg: 0.75 μ M).

La curva compuesta de respuesta a la concentración del Compuesto A de los tres estudios mostró una EC_{50} para plasma de 0.30 μM y una EC_{50} para tejido cerebral de 0.47 μM (Figura 17). Las concentraciones de Compuesto A alcanzadas en tejido cerebral y plasma fueron dosis lineales (Figura 17).

Cenobamato Solo: Antes de probar el Compuesto A en combinación con Cenobamato en el modelo AC-MES (Estudio 4F y 4G), probamos cenobamato solo en diferentes dosis para establecer una dosis-respuesta completa. Los datos de la respuesta a la dosis y la concentración de Cenobamato se resumen en la Figura 18, Tabla 29 y Tabla 30. Se probaron siete dosis de Cenobamato por vía oral en el modelo AC-MES por separado (Estudio 4D: 3 mg/kg, 10 mg/kg y 30 mg/kg, n=8 por grupo; Estudio 4E: 3 mg/kg, 5 mg/kg y 7.5 mg/kg, n=8; y Estudio 4F: 5 mg/kg, n=8) y como parte de los estudios. Dos horas después de la administración de Cenobamato en dosis de 3 mg/kg (n=15), 5 mg/kg (n=7), 7.5 mg/kg (n=7), 10 mg/kg (n=8) y 30 mg/kg (n=8) por sonda oral a ratones macho CF-1, los ratones se sometieron a un estímulo AC-MES. El Cenobamato mostró un efecto dependiente de la dosis y la concentración contra las convulsiones tónicas inducidas por AC-MES con 3/7 animales con convulsiones a 7.5 mg/kg (concentración plasmática media de 78.1 μM), 1/8 animales con convulsiones a 10 mg/kg (concentración plasmática media de 87 μM), 0/8 animales con convulsiones a 30 mg/kg (concentración plasmática media de 24 μM) y un efecto mínimo a dosis más bajas de 3 y 5 mg/kg. Los datos de todos los 3 estudios (4D, 4E y 4F) se combinaron para el análisis de la curva de respuesta a la concentración de Cenobamato cuando se administró solo (Figura 18). La curva de respuesta a la concentración de Cenobamato mostró una EC_{50} para plasma de 70.5 μM y una EC_{50} para tejido cerebral de 25.2 μM .

Combinación de Compuesto A y Cenobamato: En base a estudios de dosis-respuesta, se eligió una dosis de 5 mg/kg de Cenobamato y dosis de 0.5, 1 y 2 mg/kg de Compuesto A que mostraron una eficacia mínima cuando se administraron solos para el estudio de combinación en el modelo AC-MES.

Los datos de los estudios de combinación se resumen en la Figura 19, Tabla 31 y Tabla 32. Realizamos dos estudios de combinación, 4F (Compuesto A a 2 mg/kg combinado con cenobamato a 5 mg/kg) y 4G (Compuesto A a 0.5 y 1 mg/kg combinado con cenobamato a 5 mg/kg). La combinación del Compuesto A (0.5, 1 y 2 mg/kg PO, 0.5 horas antes de AC-MES) con Cenobamato (5 mg/kg PO, 2 horas antes de AC-MES) en ratones macho CF-1 mostró 2/8 animales con convulsiones con 0.5 mg/kg de Compuesto A, 1/8 animales con convulsiones con 1 mg/kg de Compuesto A y 0/8 animales con convulsiones con 2 mg/kg de Compuesto A en comparación con un efecto parcial o nulo cuando el Compuesto A (5/8 animales con convulsiones cuando el Compuesto A se dosificó solo a 2 mg/kg) o Cenobamato (8/8 animales con convulsiones cuando se administró cenobamato solo a 5 mg/kg) solos. En el estudio 4F, las concentraciones plasmáticas del Compuesto A (concentración plasmática media a 2 mg/kg: 0.11 μ M cuando se dosificó solo y 0.29 cuando se dosificó en combinación) y Cenobamato (concentración plasmática media a 5 mg/kg: 31.3 μ M cuando se dosificó solo y 38.9 μ M cuando se dosificó en combinación) fueron ligeramente más altas cuando se dosificó en combinación en comparación con cuando se dosificó solo. En el estudio 4G, las concentraciones plasmáticas totales medias alcanzadas fueron: Compuesto A dosificado en combinación a 0.5 mg/kg: 0.03 μ M; Compuesto A dosificado en combinación a 1 mg/kg: 0.11 μ M; Cenobamato dosificado en combinación a 5 mg/kg (+0.5 mg/kg Compuesto A): 41.1 μ M; cenobamato dosificado en combinación a 5 mg/kg (+1 mg/kg de Compuesto A): 39.7 μ M. La curva de respuesta a la concentración del Compuesto A y el Cenobamato administrados en combinación mostró una EC_{50} extrapolada para el plasma de 0.01 μ M y para el tejido cerebral de 0.03 μ M para el Compuesto A.

Tabla 26. Estudio 4A: Resumen de los Efectos Anticonvulsivos del Compuesto A en el Ratón AC-MES Después de una Dosis Oral Única

ID del Compuesto y Dosis	Plasma Media (μM)	Cerebro Medio (μM)	Relación B/P	Captación en Fracción	Fracción con Signos de Comportamiento
Vehículo	n/a	n/a	n/a	8/8	0/8
Compuesto A (1 mg/kg)	0.08	0.15	1.85	8/8	0/8
Compuesto A (5 mg/kg)	0.28	0.40	1.45	7/8	0/8
Compuesto A (10 mg/kg)	0.37	0.50	1.36	3/8	1/8

B/P: relación cerebro/plasma; n/a: no aplicable.

Tabla 27. Estudio 4B: Resumen de los Efectos Anticonvulsivos del Compuesto A en el Ratón AC-MES Después de una Dosis Oral Única

ID del Compuesto y Dosis	Plasma Media (μM)	Cerebro Medio (μM)	Relación B/P	Captación en Fracción	Fracción con Signos de Comportamiento
Vehículo	n/a	n/a	n/a	8/8	0/8
Compuesto A (5 mg/kg)	1	0.71	1.51	0/8	0/8
Compuesto A (7.5 mg/kg)	0.53	0.87	1.64	0/7	1/7
Compuesto A (10 mg/kg)	0.55	0.91	1.64	1/9	2/9

B/P: relación cerebro/plasma; n/a: no aplicable.

Tabla 28. Estudio 4C: Resumen de los Efectos Anticonvulsivos del Compuesto A en Ratones AC-MES Después de una Dosis Oral Única

ID del Compuesto y Dosis	Plasma Media (μM)	Cerebro Medio (μM)	Relación B/P	Captación en Fracción	Fracción con Signos de Comportamiento
Vehículo	n/a	n/a	n/a	8/8	0/8
Compuesto A (3 mg/kg)	0.28	0.51	1.79	2/8	0/8

B/P: relación cerebro/plasma; n/a: no aplicable.

Tabla 29. Estudio 4D: Resumen de los Efectos Anticonvulsivos del Cenobamato en Ratones AC-MES Después de una Dosis Oral Única

ID del Compuesto y Dosis	Plasma Media (μM)	Cerebro Medio (μM)	Relación B/P	Captación en Fracción	Fracción con Signos de Comportamiento
Vehículo	n/a	n/a	n/a	8/8	0/8
Cenobamato (3 mg/kg)	29.6	8.70	0.29	8/8	0/8
Cenobamato (10 mg/kg)	87.0	26.8	0.31	1/8	0/8
Cenobamato (30 mg/kg)	237	71.3	0.30	0/8	0/8

B/P: relación cerebro/plasma; n/a: no aplicable.

Tabla 30. Estudio 4E: Resumen de los Efectos Anticonvulsivos del Cenobamato en Ratones AC-MES Después de una Dosis Oral Única

ID del Compuesto y Dosis	Plasma Media (μM)	Cerebro Medio (μM)	Relación B/P	Captación en Fracción	Fracción con Signos de Comportamiento
Vehículo	n/a	n/a	n/a	8/8	0/8
Cenobamato (3 mg/kg)	27.7	12.2	0.44	6/7	0/8
Cenobamato (5 mg/kg)	53.6	22.1	0.41	6/7	0/8
Cenobamato (7.5 mg/kg)	78.1	34.5	0.44	3/8	0/8

B/P: relación cerebro/plasma; n/a: no aplicable.

Tabla 31. Estudio 4F: Resumen de los Efectos Anticonvulsivos del Compuesto A en Combinación con Cenobamato en Ratones AC-MES Después de una Dosis Oral Única

ID del Compuesto y Dosis	Plasma Media (μM)	Cerebro Medio (μM)	Relación B/P	Captación en Fracción	Fracción con Signos de Comportamiento
Vehículo	n/a	n/a	n/a	8/8	0/8
Compuesto A (2 mg/kg)	0.11	0.25	2.32	5/8	0/8
Cenobamato (5 mg/kg)	31.3	12.0	0.38	8/8	0/8
Compuesto A + Cenobamato (2+5)	0.29 + 38.9	0.67 + 14.7	2.34 + 0.38	0/8	0/8

B/P: relación cerebro/plasma; n/a: no aplicable.

Tabla 32. Estudio 4G: Resumen de los Efectos Anticonvulsivos del Compuesto A en Combinación con Cenobamato en Ratones AC-MES Después de una Dosis Oral Única

ID del Compuesto y Dosis	Plasma Media (μM)	Cerebro Medio (μM)	Relación B/P	Captación en Fracción	Fracción con Signos de Comportamiento
Compuesto A + Cenobamato (0.5 mg/kg + 5 mg/kg)	0.03 + 41.1	0.09 + 18.1	3.22 + 0.44	2/8	0/8
Compuesto A + Cenobamato (1 mg/kg + 5 mg/kg)	0.11 + 39.7	0.30 + 17.0	2.76 + 0.43	1/8	0/8

5.4.3 Conclusiones

El compuesto A y el Cenobamato demostraron una eficacia dependiente de la concentración en el ensayo AC-MES de ratón CF-1. Los valores de EC_{50} del Compuesto A en plasma y cerebro proyectados a partir del análisis de la curva de concentración-respuesta fueron $0.30 \mu\text{M}$ y $0.47 \mu\text{M}$, respectivamente. La curva compuesta de respuesta a la concentración del Compuesto A y Cenobamato administrados en combinación proyectó una EC_{50} para plasma de $0.01 \mu\text{M}$ y para tejido cerebral de $0.03 \mu\text{M}$ para el Compuesto A. Los resultados proyectan un aumento en la potencia del Compuesto A de 33.3 veces y 14.2

veces para plasma y tejido cerebral, respectivamente, cuando se administra en combinación con Cenobamato.

Se ensayaron cada una seis dosis orales (PO) del Compuesto A en el ensayo AC-MES. Treinta minutos después de la administración del Compuesto A a 1 mg/kg (n=8), 2 mg/kg (n=8), 3 mg/kg (n=8), 5 mg/kg (n=16), 7.5 mg/kg (n=7) y 10 mg/kg (n=17) por sonda oral a ratones macho CF-1, los ratones se sometieron a un estímulo eléctrico corneal de 60 Hz (0.2 segundos de duración, 40 mA). Este estímulo provocó una extensión tónica de las patas traseras en todos los animales que recibieron dosis de vehículo. Cualquier animal que no mostrara extensión de las patas traseras en respuesta al estímulo eléctrico se consideró protegido. También se realizó una evaluación neurológica observacional (prueba cualitativa) en el momento de la prueba como examen de tolerabilidad. Se recolectaron muestras terminales de plasma y cerebro de todos los animales para obtener los niveles del Compuesto A y las concentraciones de cenobamato, y para comprender la relación entre la eficacia y la concentración del fármaco.

Después de una dosis oral única, el Compuesto A mostró un efecto dependiente de la concentración contra las convulsiones tónicas inducidas por AC-MES con un efecto máximo de 0/8 animales con convulsiones a una concentración plasmática de 0.470 μ M (del Estudio 4B a 5 mg/kg). En el Estudio 4A (a 1 mg/kg, n=8; 5 mg/kg, n=8; y 10 mg/kg, n=8), la fracción de animales que mostró una respuesta convulsiva tónica al estímulo AC-MES después de un pretratamiento de 30 minutos con el Compuesto A disminuyó de 8/8 (concentración plasmática media de 0.08 μ M; 1 mg/kg), a 7/8 (concentración plasmática media de 0.28 μ M; 5 mg/kg), y a 3/8 (concentración plasmática media de 0.37 μ M; 10 mg/kg). En el Estudio 4B (5 mg/kg, n=8; 7.5 mg/kg, n=7 y 10 mg/kg, n=9), dosis de 5 mg/kg (concentración plasmática media de 0.47 μ M) y 10 mg/kg (concentración plasmática media de 0.55 μ M) del Compuesto A mostraron una gran eficacia (0/8 y 1/9 animales con convulsiones, respectivamente). En el Estudio 4C (3 mg/kg, n=8), la dosis de 3 mg/kg del Compuesto A mostró 2/8 animales con convulsiones a una

concentración plasmática de 0.28 μM . En el estudio 4F (2 mg/kg, n=8), la dosis de 2 mg/kg mostró 5/8 animales con convulsiones a una concentración plasmática de 0.11 μM . En todos los estudios de eficacia excepto el 4F, la diferencia entre los grupos tratados con el Compuesto A y los grupos dosificados con vehículo alcanzó significación estadística (los valores de p se muestran en la Figura 17). Los datos de todos los cuatro estudios se combinaron para el análisis de la curva de concentración-respuesta del Compuesto A cuando se administró solo. La curva de concentración-respuesta del Compuesto A mostró una concentración efectiva media máxima (EC_{50}) para plasma de 0.30 μM y una EC_{50} para tejido cerebral de 0.47 μM .

Un ratón del grupo de 10 mg/kg en el Estudio 4A y tres ratones del estudio 4B (dos ratones del grupo de 10 mg/kg y un ratón del grupo de 7.5 mg/kg) mostraron signos de comportamiento (temblores, disminución de la actividad y patas traseras extendidas) (concentraciones de plasma: 4A: 0.39 μM ; 4B: 10 mg/kg: 0.61 y 0.52 μM , 7.5 mg/kg: 0.75 μM).

Antes de probar el Compuesto A en combinación con cenobamato en el modelo AC-MES, el Cenobamato se probó solo a diferentes dosis para establecer una dosis-respuesta completa. Se probaron siete dosis de Cenobamato por vía oral en el modelo AC-MES por separado (Estudio 4D: 3 mg/kg, 10 mg/kg y 30 mg/kg, n=8 por grupo; Estudio 4E: 3 mg/kg, 5 mg/kg y 7.5 mg/kg, n=8; y Estudio 4F: 5 mg/kg, n=8) y como parte de los estudios. Dos horas después de la administración de cenobamato en dosis de 3 mg/kg (n=15), 5 mg/kg (n=7), 7.5 mg/kg (n=7), 10 mg/kg (n=8) y 30 mg/kg (n=8) por sonda oral a ratones macho CF-1, los ratones se sometieron a un estímulo AC-MES. El Cenobamato mostró una eficacia dependiente de la dosis y la concentración contra las convulsiones tónicas inducidas por AC-MES con 3/7 animales con convulsiones a 7.5 mg/kg (concentración plasmática media de 78.1 μM), 1/8 animales con convulsiones a 10 mg/kg (concentración plasmática media de 87 μM), 0/8 animales con convulsiones a 30 mg/kg (concentración plasmática media de 237 μM). Las dosis más bajas de 3 y 5 mg/kg tuvieron un efecto mínimo con 7/8 animales con convulsiones. La fracción de animales con

convulsiones en el grupo tratado con Cenobamato fue significativamente diferente en 2/3 de los estudios del grupo tratado con vehículo (los valores de p se muestran en la Figura 18). Los datos de todos los 3 estudios (4D, 4E y 4F) se combinaron para el análisis de la curva de respuesta a la concentración de Cenobamato cuando se administró solo. La curva de respuesta a la concentración de Cenobamato mostró una EC_{50} para plasma de 70.5 μ M y una EC_{50} para tejido cerebral de 25.2 μ M.

En base a los estudios de dosis-respuesta, se eligió una dosis de 5 mg/kg de Cenobamato y 0.5, 1 y 2 mg/kg de Compuesto A que mostró una eficacia mínima cuando se administró solo para el estudio de combinación en el modelo AC-MES.

Se realizaron dos estudios de combinación, 4F (Compuesto A a 2 mg/kg combinado con Cenobamato a 5 mg/kg) y 4G (Compuesto A a 0.5 y 1 mg/kg combinado con Cenobamato a 5 mg/kg). La combinación del Compuesto A (0.5, 1 y 2 mg/kg PO, 0.5 horas antes de AC-MES) con Cenobamato (5 mg/kg PO, 2 horas antes de AC-MES) en ratones macho CF-1 mostró 2/8 animales con convulsiones con 0.5 mg/kg de Compuesto A, 1/8 animales con convulsiones con 1 mg/kg de Compuesto A y 0/8 animales con convulsiones con 2 mg/kg de Compuesto A en comparación con 5/8 animales con convulsiones cuando el Compuesto A se dosificó solo a 2 mg/kg u 8/8 animales con convulsiones cuando Cenobamato se dosificó solo a 5 mg/kg. En el estudio 4F, la diferencia entre el grupo tratado con Cenobamato y el grupo de combinación fue estadísticamente significativa, mientras que la diferencia entre el grupo tratado con el Compuesto A y el grupo de combinación no fue estadísticamente significativa. En el estudio 4G, la diferencia entre el grupo de vehículo y los grupos de combinación fue estadísticamente significativa (nota: en este estudio no se usaron el grupo de control de vehículo y los grupos de control de dosis única del Compuesto A y Cenobamato; los valores p se muestran en la Figura 19). En el estudio 4F, las concentraciones plasmáticas del Compuesto A (concentración plasmática media a 2 mg/kg: 0.11 μ M cuando se dosificó solo y 0.29 cuando se dosificó en combinación) y Cenobamato

(concentración plasmática media a 5 mg/kg: 31.3 μ M cuando se dosificó solo y 38.9 μ M cuando se dosificó en combinación) fueron ligeramente más altas cuando se dosificó en combinación en comparación con cuando se dosificó solo. En el estudio 4G, las concentraciones plasmáticas totales medias alcanzadas fueron: Compuesto A cuando se administró una combinación de dosis de 0.5 mg/kg: 0.03 μ M; Compuesto A cuando se dosificó en combinación a 1 mg/kg: 0.11 μ M; Cenobamato cuando se dosificó una combinación de dosis de 5 mg/kg (0.5 mg/kg Compuesto A): 41.1 μ M; Cenobamato cuando se dosificó en combinación a 5 mg/kg (1 mg/kg Compuesto A): 39.7 μ M.

La curva compuesta de respuesta a la concentración del Compuesto A y Cenobamato administrados en combinación mostró una EC_{50} extrapolada del Compuesto A para plasma de 0.01 μ M y para tejido cerebral de 0.03 μ M. Los resultados muestran un aumento en la potencia del Compuesto A de 33.3 veces y 14.2 veces para plasma y tejido cerebral, respectivamente, cuando se dosificó en combinación con Cenobamato.

* * * * *

Todas las patentes estadounidenses, publicaciones de solicitudes de patentes estadounidenses, solicitudes de patentes estadounidenses, patentes extranjeras, solicitudes de patentes extranjeras y publicaciones no patentes a las que se hace referencia en esta especificación, incluyendo la solicitud no provisional de Estados Unidos No. 63/147,736, presentada el 9 de febrero de 2021, se incorporan aquí como referencia en su totalidad.

Aunque las composiciones, métodos y usos anteriores se han descrito con cierto detalle para facilitar la comprensión, será evidente que se pueden practicar ciertos cambios y modificaciones dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. En consecuencia, las modalidades descritas deben considerarse ilustrativas y no restrictivas, y la invención reivindicada no debe limitarse a los detalles proporcionados en este documento, sino que puede modificarse dentro del alcance y los equivalentes de las reivindicaciones adjuntas.