

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 450**

51 Int. Cl.:

A61K 31/4184 (2006.01)

A61P 25/08 (2006.01)

A61K 31/137 (2006.01)

A61K 31/27 (2006.01)

A61K 31/473 (2006.01)

A61K 31/551 (2006.01)

A61K 31/20 (2006.01)

A61K 31/7048 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.08.2014 PCT/US2014/051731**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.02.2015 WO15026849**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.2014 E 14838223 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2020 EP 3035926**

54 Título: **Compuestos y métodos para tratar un trastorno epiléptico**

30 Prioridad:

19.08.2013 US 201361867397 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

23.03.2021

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 5th Floor
Oakland, CA 94607-5200, US**

72 Inventor/es:

BARABAN, SCOTT C.

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 813 450 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Compuestos y métodos para tratar un trastorno epiléptico

Referencias cruzadas a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reclama el beneficio de la Solicitud Provisional U.S. No. 61/867,397, presentada el 19 de agosto de 2013.

- 5 Declaración sobre los derechos de las invenciones realizadas bajo investigación y desarrollo patrocinados por el Gobierno federal

Esta invención se realizó con el apoyo del gobierno bajo el número de concesión R01 NS079214 03 otorgado por los National Institutes of Health. El Gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

Antecedentes de la invención

- 10 El síndrome de Dravet (DS) es una epilepsia pediátrica catastrófica con discapacidad intelectual grave, deterioro del desarrollo social y ataques persistentes resistentes a los fármacos. Una de sus causas principales son las mutaciones en Nav1.1 (*SCN1A*), un canal de sodio controlado por voltaje. Los ataques que experimentan las personas con síndrome de Down y otros trastornos de la epilepsia no se tratan adecuadamente con los fármacos antiepilépticos (AEDs) disponibles y los niños con síndrome de Down son malos candidatos para la resección neuroquirúrgica. Por
15 tanto, existe una necesidad en la técnica de opciones de tratamiento de la epilepsia, especialmente aquellas para el DS y las epilepsias pediátricas catastróficas relacionadas. En el presente documento se proporcionan soluciones a estos problemas y otros problemas en la técnica.

Breve resumen de la invención

- 20 En el presente documento, entre otras cosas, se proporciona el uso de clemizol, un análogo de clemizol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en un método de tratamiento de un trastorno de epilepsia. En un aspecto, el método incluye administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad terapéuticamente efectiva de clemizol, un análogo de clemizol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En otro aspecto, el método incluye administrar a un sujeto que lo necesite, una composición farmacéutica que incluye una cantidad terapéuticamente efectiva de clemizol, un análogo de clemizol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

- 25 Además se proporcionan en el presente documento composiciones farmacéuticas para tratar los trastornos de la epilepsia. En un aspecto es una composición farmacéutica que incluye clemizol, un análogo de clemizol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento de un trastorno de epilepsia.

Breve descripción de los dibujos

- 30 Fig 1. Caracterización molecular de mutantes de pez cebra *scn1Lab*. (A) La secuenciación confirmó una mutación de T a G en el ADNc mutante *scn1Lab*. (B) Verificación de la expresión reducida en mutantes *scn1Lab* en comparación con controles hermanos a 3, 5 y 7 dpf usando qPCR. Los datos se presentan como media \pm S.E.M; *significancia tomada como $p < 0.05$ prueba t de Student. Los datos se normalizaron al gen de referencia interno β -actina. Los valores representan promedios de cinco muestras biológicas independientes (1 muestra = 10 larvas agrupadas) para cada una de las 3 etapas de desarrollo. Los datos se presentan como media \pm S.E.M; *significancia tomada como $p < 0.05$ prueba t de Student. (C) Expresión relativa de *scn8aa* y *scn8ab* en mutantes *Nav1.1* ($n = 5$) y controles hermanos ($n = 5$) a 5 dpf. Datos presentados como en B. (D) Hibridación in situ de montaje completo para *scn1Lab* en larvas de pez cebra a 3, 5 y 7 dpf. Las larvas de tipo silvestre se muestran en vistas laterales; la expresión se muestra en color violeta oscuro. Se muestra la expresión de *Scn1Laa* a 3 dpf para comparación. Corazón indicado por puntas de flecha en paneles de 5 y 7 dpf. (E) Vista dorsal de la expresión de *scn1Laa* a 3 dpf; nótese una expresión prominente en las regiones correspondientes al CNS larvario del pez cebra. Abreviaturas: Tel, telencéfalo; TeO, tectum óptico; Cb, cerebelo. Barras de escala = 0.35 mm en D, 0.2 mm en E.

- 45 Fig. 2. Análisis de microarreglos de mutantes de pez cebra *scn1Lab*. (A) Mapas de calor que representan la expresión de genes expresados diferencialmente entre el mutante *scn1Lab* y las larvas de control de hermano a 5 dpf. Las filas representan genes individuales. Las columnas representan diferentes larvas. Los genes que están altamente expresados en mutantes *scn1Lab* en relación con los controles son los que se muestran. (B) Gráfico MA de datos de microarreglos normalizados para los 44,000 genes. La relación logarítmica M y la intensidad de fluorescencia media A se calcularon como promedios para todas las repeticiones. (C) Una lista de los 30 genes principales que muestran las mayores diferencias en la expresión entre los mutantes *scn1Lab* y los controles hermanos.

- 50 Fig 3. Análisis cuantitativo de RT-PCR de mutantes de pez cebra *scn1Lab*. (A) Comparación de los cambios de multiplicidad de expresión génica obtenidos mediante análisis de microarreglos (arreglos) y análisis de qPCR en tiempo real. El eje y representa el cambio de multiplicidad promedio en la expresión génica de cada gen del pez cebra a 5 dpf. El eje x representa diferentes genes. (B) Análisis de qPCR de tres genes implicados en la epileptogénesis. La expresión génica relativa se presenta como relaciones \log_2 para la transcripción menos abundante ($\log_2 \Delta \Delta \text{Act}$). Los datos se normalizaron al gen de referencia interno β -actina. Los valores representan promedios de cinco muestras

biológicas independientes (1 muestra 10 larvas agrupadas). Las barras indican S.E.M; * $p < 0.05$ prueba t. (C) Clasificación de ontología genética de genes expresados diferencialmente detectados en mutantes *scn1Lab* a 5 dpf ($p < 0.05$ ANOVA unidireccional y cambios de multiplicidad > 1.5). Se despliegan los procesos biológicos que representan al menos 5 anotaciones de genes en al menos una categoría.

5 Fig 4. Ataques espontáneos en mutantes de pez cebra *scn1Lab*. (A) Se muestran larvas de pez cebra inmovilizadas y embebidas en agar. Las imágenes se obtuvieron utilizando un objetivo 4x y una lupa 2x en un microscopio vertical Olympus durante los registros electrofisiológicos del cerebro anterior en el control de hermanos (A, izquierda) y las larvas mutantes *scn1Lab* (A, medio) a 5 dpf. Tengase en cuenta la pigmentación oscura de los mutantes. Los electrodos de registro se pueden ver en los paneles A1-2 y el sitio aproximado de la punta del electrodo de registro en el cerebro anterior (círculo rojo) se muestra utilizando una larva representativa marcada con HuC:GFP en A, a la derecha. Barra de escala: 100 μ m. (B) Gráfico de seguimiento de locomoción de muestra para el control de hermanos (B, izquierda) y las larvas mutantes *scn1Lab* (B, derecha) a 5 dpf. (C) Épocas de registro de 10 min representativas obtenidas en el cerebro anterior de larvas mutantes *scn1Lab* paralizadas, inmovilizadas y embebidas en agar entre 3 y 7 dpf. Nótese la presencia de descarga espontánea en ráfaga de pequeña y gran amplitud; expansiones temporales adicionales de la actividad de ataques. También se muestra una grabación representativa, bajo condiciones de grabación idénticas, de una larva de control hermano a 5 dpf. Barra de escala: 2 mV; 30 segundos.

Fig 5. Validación farmacológica de mutantes de pez cebra *scn1Lab*. (A) Mapa de calor que muestra la respuesta a nueve AEDs diferentes. Cada columna representa el cambio porcentual en la frecuencia de ráfagas (línea base - fármaco/línea base $\times 100$) para un mutante de pez cebra individual. Los fármacos que inhiben los episodios de ataques se muestran en azul oscuro. Todos los fármacos se probaron a una concentración de 1 mM. Nótese que en algunos ensayos la carbamazepina y la vigabatrina aumentaron la frecuencia de ráfagas por encima de los niveles de línea base iniciales. (B) Gráfico del cambio medio en la frecuencia de ráfagas y el error estándar para los datos que se muestran en el mapa de calor. La prueba t pareada o la prueba de suma de rangos con signo de Wilcoxon para los datos que no pasaron la prueba de normalidad mostraron significancia de la siguiente manera: diazepam ($p = 0.002$; $n = 7$), bromuro de potasio ($p = 0.016$; $n = 7$), estiripentol ($p = 0.024$; $n = 7$) y valproato ($p = 0.004$; $n = 7$). (C) Gráfico de la duración de la ráfaga para todos los ensayos que se muestran en A. Los datos se presentan como la media \pm S.E.M. para eventos electrográficos de ataques en la línea base (barras negras) y después de la exposición al fármaco (barras blancas). El recuadro muestra un registro representativo de 2 minutos durante la prueba de estiripentol; barras de escala: traza grande 1 mV, 1 seg; traza pequeña, 1 mV, 100 msec. (D) Gráfico de la fracción de tiempo transcurrido en ataques para todos los ensayos que se muestran en A. Los datos se presentan como la media \pm S.E.M. para eventos electrográficos de ataques al inicio del estudio (barras negras) y después de la exposición al fármaco (barras blancas). La prueba t de Student o la prueba de suma de rangos de Mann-Whitney para los datos que no pasaron la prueba de normalidad mostraron la siguiente significancia: diazepam ($p = 0.001$; $n = 7$); bromuro de potasio ($p = 0.043$; $n = 7$); estiripentol ($p = 0.007$; $n = 7$) y valproato ($p = 0.007$; $n = 7$) (E) Gráficos de seguimiento de locomoción para 10 larvas mutantes individuales criadas en medio embrionario (fila superior) o la dieta cetogénica durante 48 h. Los gráficos muestran la velocidad de nado y las huellas de locomoción con colores más oscuros que indican velocidades más altas; Se muestran ensayos de 10 minutos. (F) Épocas de registro extracelulares representativas de 10 min del mismo pez que se muestra en E; los ejemplos representativos se indican con un * en los gráficos de locomoción. Barra de escala: 1 mV, 30 seg. El recuadro muestra la ráfaga con una resolución temporal más alta (indicado por #); barra de escala: 1 mV, 100 msec.

Fig 6. Un cribado para identificar fármacos que rescatan el fenotipo de epilepsia mutante *scn1Lab*. (A) Gráfico de caja de la velocidad media (en mm/seg) para dos registros consecutivos de larvas mutantes en medio embrionario. Los experimentos se realizaron colocando primero las larvas mutantes en medio embrionario y obteniendo una respuesta de locomoción de línea de base, luego se reemplazó el medio embrionario con medio embrionario nuevo (para imitar el procedimiento utilizado para los compuestos de prueba) y se obtuvo una segunda respuesta de locomoción. Se muestra el cambio porcentual en la velocidad desde la línea de base (registro #1) versus (registro #2). En el gráfico de caja, la parte inferior y superior de la caja representan el percentil 25 y el percentil 75, respectivamente. La línea que cruza la caja representa el valor mediano y las líneas verticales abarcan todo el rango de valores. Este gráfico representa los cambios normales en la actividad de seguimiento en ausencia de una exposición al fármaco. (B) Gráfico del efecto de once fármacos antiepilépticos conocidos sobre el comportamiento de los ataques locomotores en mutantes *scn1Lab* a 5 dpf. El ensayo basado en fenotipo se realizó en un formato de 96 pocillos (por ejemplo, véase el panel 5C1). Las barras representan el cambio porcentual en la velocidad media comparando un registro de línea base de la actividad convulsiva mutante con el mismo mutante después de la aplicación de un fármaco. Para todos los estudios farmacológicos se utilizaron de 6 a 12 peces por experimento. Los fármacos se probaron a una concentración de 1 mM; diazepam (Dzp; $p < 0.001$), carbamazepina (Carb, $p = 0.024$), ganaxolona (Gan; $p = 0.003$), estiripentol (Stp; $p = 0.001$), valproato (Vpa, $p = 0.026$) y una exposición de 48 horas a la dieta cetogénica (KD; $p = 0.003$) redujo la actividad de ataques, medida como un cambio en la velocidad, en más de un 34% (línea de puntos en B; representa un cambio de multiplicidad mayor que la desviación estándar en los registros de control). La acetazolamida (Acet, $p < 0.001$) y la etosuximida (Etx; $p = 0.250$) aumentaron el comportamiento de ataques; levetiracetam (Lev; $p = 0.243$) y lamotrigina (Ltg; $p = 0.058$) no tuvieron ningún efecto. (C) Gráfico del comportamiento de ataques locomotores para mutantes *scn1Laab* a 5 dpf para los 320 compuestos probados. Los círculos de colores representan aciertos positivos; los compuestos que redujeron la actividad en un 100% fueron generalmente tóxicos; 6-12 peces por prueba. Las cabezas de flecha denotan el primer ensayo de clemizol. Nótese que algunos compuestos

5 aumentaron la actividad de ataques, como se esperaba. (D) Gráfico de ensayos repetidos del fármaco en nidadas separadas de mutantes *scn1Lab* a 5 dpf; 100 μ M por fármaco; 10 peces por prueba. Abreviaturas: Clem, clemizol; Clem + PTZ, clemizol + PTZ 15 mM; Clorg, clogrilina; Tolp, tolperisona; Zox, zoxazolamina. Se muestra el efecto del clemizol agudo sobre el comportamiento de ataques inducido por PTZ para las larvas de tipo silvestre. Las barras representan la media \pm S.E.M. Para los paneles B y D: prueba t pareada de Student o prueba de suma de rangos de Mann-Whitney con significancia establecida en $p = 0.01$ (*) o $p < 0.001$ (**). (E) Muestra de registros de electrofisiología de mutantes *scn1Lab* expuestos a clemizol primero en el ensayo de locomoción (panel D) y luego monitorizados usando un electrodo de registro extracelular del cerebro anterior (traza superior; ráfaga similar a ictal que se muestra en el recuadro). Se muestran trazas similares para un mutante *Na_v1.1* no tratado (traza media) y un mutante tratado con zoxazolamina (traza inferior). Análisis de estallido para mutantes no tratados ($n = 3$): frecuencia de estallido = 1.5 ± 0.3 ráfagas/min; duración de la ráfaga = 926 ± 414 ms; fracción de tiempo transcurrido en ataques = $0.73 \pm 0.17\%$ versus mutantes tratados con clemizol ($n = 7$): frecuencia de ráfagas = 0.2 ± 0.01 ráfagas/min; duración de la ráfaga = 154 ± 127 ms; fracción de tiempo transcurrido en ataques = $0.03 \pm 0.02\%$; $p = 0.001$ para todas las comparaciones, ANOVA de Kruskal-Wallis con una prueba de comparación múltiple por pares de Dunn). Barras de escala: traza grande 15 0.5 mV, 10 s; recuadro 0.5 mV, 100 mseg.

Fig. 7: Confirmación de la actividad de clemizol en mutantes *scn1Laa*. (A) Épocas de grabación de 10 min representativas obtenidas en el cerebro anterior de larvas mutantes *scn1Laa* paralizadas, inmovilizadas y embebidas en agar a 6 dpf. Nótese la presencia de descarga espontánea en ráfaga de pequeña y gran amplitud. (B) Gráficos de seguimiento de locomoción para 10 larvas de hermanos mutantes y de tipo silvestre individuales. Los gráficos muestran la velocidad de nado y los rastros de locomoción con colores más oscuros que indican velocidades más altas; se muestran ensayos de 10 minutos. Los ataques se calificaron en un sistema de estadificación descrito en Baraban et al. (Neurociencia 2005). S0, poca o ninguna actividad de natación; S1, aumento de la locomoción; S2 remolino como actividad de natación y S3; convulsiones de todo el cuerpo con eventos de natación rápida y pérdida de postura. (C) Gráfico de caja de la velocidad media (en mm/seg) para 96 peces cebra con peces clasificados en supuestos grupos de control de *scn1Laa* y hermanos con base en las etapas de ataques descritas anteriormente. Los experimentos se realizaron colocando primero las larvas mutantes en medio embrionario y obteniendo una respuesta de locomoción de línea base, luego se reemplazó el medio embrionario con medio embrionario nuevo y se obtuvo una segunda respuesta de locomoción. Se muestra el cambio porcentual en la velocidad desde la línea base (registro #1) versus experimental (registro #2). En el gráfico de caja, la parte inferior y superior de la caja representan el percentil 25 y el percentil 75, respectivamente. La línea que cruza la caja representa el valor mediano y las líneas verticales abarcan todo el rango de valores. Se muestran los gráficos para todos los 96 peces (izquierda), el pez cebra *scn1Laa* putativo (centro) y los controles hermanos (izquierda). Se realizó un análisis de PCR subsecuente para confirmar los grupos de control y mutantes. (D) Gráfico del efecto del estiripentol (Stp), diazepam (Dzp), clemizol (Clem) y lamotrigina (Ltg) sobre el comportamiento de los ataques locomotores en mutantes *scn1Laa* a 5 dpf. La velocidad media se muestra antes y después de la aplicación de un fármaco. N = 7 peces por fármaco. Las barras representan la media \pm S.E.M. Prueba t pareada de Student o prueba de suma de rangos de Mann-Whitney con significancia establecida en $p = 0.01$ (*) o $p < 0.001$ (**).

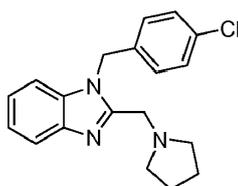
Fig. 8: Los antihistamínicos no tienen propiedades antiepilépticas en mutantes *scn1Lab*. Gráfico del efecto de una variedad de antihistamínicos en el ensayo de ataques locomotores utilizando mutantes *scn1Lab* a 5 dpf. La velocidad media se muestra antes y después de la aplicación de un fármaco. N = 7 peces por fármaco. Los compuestos adicionales se listan a la derecha. Las barras representan la media \pm S.E.M. Prueba t pareada de Student o prueba de suma de rangos de Mann-Whitney con significancia establecida en $p = 0.01$ (*) o $p < 0.001$ (**). Nota: algunos antihistamínicos aumentaron la actividad de ataques en este ensayo.

Fig. 9: Estudios de concentración-respuesta de clemizol en *scn1Lab*. Gráficos de dos estudios de concentración-respuesta diferentes que muestran el porcentaje de inhibición de la velocidad media a partir de un valor de línea base. N = 7 peces por concentración y los ensayos se realizaron en nidadas separadas de larvas mutantes.

Descripción detallada de la invención

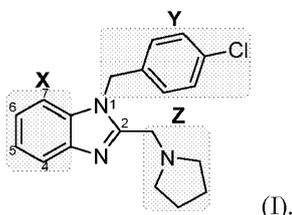
"Analgóico" o "análogo" se usa de acuerdo con su simple significado ordinario en Química y Biología y se refiere a un compuesto químico que es estructuralmente similar a otro compuesto (es decir, un compuesto llamado "referencia") pero difiere en composición, por ejemplo, en el reemplazo de un átomo por un átomo de un elemento diferente, o en presencia de un grupo funcional particular, o en el reemplazo de un grupo funcional por otro grupo funcional, o la estereoquímica absoluta de uno o más centros quirales del compuesto de referencia. Por consiguiente, un análogo es un compuesto que es similar o comparable en función y apariencia pero no en estructura u origen a un compuesto de referencia.

"Clemizol" se refiere a un compuesto que tiene la fórmula:



Clemizol incluye sales y formulaciones farmacéuticamente aceptables de clemizol como se describe en el presente documento (por ejemplo, una "sal de clemizol"). A manera de ejemplo, las sales de clemizol incluyen, pero no se limitan a, clemizol-HCl, clemizolpenicilina, clemizol-sulfato o clemizol-undecilato.

- 5 Un "análogo de clemizol" como se expone en el presente documento se refiere a compuestos de estructura similar. Tales compuestos incluyen, por ejemplo, los compuestos expuestos en PCT/US2008/076804 y la patente U.S. No. 4011322. Se exponen análogos de clemizol de ejemplo adicionales, por ejemplo, en: US 2012/0232062; Pub. PCT. Nos. 2009/038248; US 2010/107739; US 2010/107742, WO 2002/089731. WO 2005/032329, WO 2009/039248, WO 2010/039195, WO 2010/107739 y WO2010/107742. Los análogos de clemizol descritos en el presente documento
- 10 (incluidos los compuestos descritos en las referencias anteriores) pueden estar sustituidos (es decir, modificados) en la posición 1 o 2 como se establece a continuación en la fórmula (I) (cajas Y y Z). Los análogos de clemizol pueden estar sustituidos (es decir, modificados) en 4, 5, 6 o 7 posiciones como se indica en la caja X en la fórmula (I).



- 15 El término "sales farmacéuticamente aceptables" pretende incluir sales de los compuestos activos que se preparan con ácidos o bases relativamente no tóxicos, dependiendo de los sustituyentes particulares encontrados en los compuestos descritos en el presente documento. Cuando el clemizol o un análogo de clemizol contiene
- 20 funcionalidades relativamente ácidas, se pueden obtener sales de adición de base poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente de la base deseada, bien sea pura o en un solvente inerte adecuado. Ejemplos de sales de adición de base farmacéuticamente aceptables incluyen sal de sodio, potasio, calcio, amonio, amino orgánico o magnesio, o una sal similar. Cuando el clemizol o un análogo de clemizol contienen
- 25 funcionalidades relativamente básicas, se pueden obtener sales de adición de ácido poniendo en contacto la forma neutra de tales compuestos con una cantidad suficiente del ácido deseado, bien sea puro o en un solvente inerte adecuado. Ejemplos de sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos como ácidos clorhídrico, bromhídrico, nítrico, carbónico, monohidrogenocarbónico, fosfórico, monohidrogenofosfórico, dihidrogenofosfórico, sulfúrico, monohidrogenosulfúrico, hidrónico o fosforoso y similares, así como las sales derivadas de ácidos orgánicos relativamente no tóxicos como acético, propiónico, isobutírico, maleico, malónico, benzoico, succínico, subérico, fumárico, láctico, mandélico, ftálico, bencenosulfónico, p-toluilsulfónico, cítrico, tartárico, oxálico, metanosulfónico y similares. También se incluyen sales de aminoácidos tales como arginato y similares, y sales de ácidos orgánicos como ácidos glucurónico o galactunónico y similares (véase, por ejemplo, Berge et al., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Science, 1977, pág. 66, 1-19). El clemizol o un análogo de clemizol puede contener funcionalidades tanto básicas como ácidas que permiten la conversión en sales de adición de base o de ácido.

- 35 Por tanto, clemizol o un análogo de clemizol pueden existir como sales, tal como con ácidos farmacéuticamente aceptables. La presente invención incluye tales sales. Ejemplos no limitantes de tales sales incluyen clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos, metanosulfonatos, nitratos, maleatos, acetatos, citratos, fumaratos, propionatos, tartratos (por ejemplo, (+)-tartratos, (-)-tartratos o mezclas de los mismos que incluyen mezclas racémicas), succinatos, benzoatos y sales con aminoácidos tales como ácido glutámico y sales de amonio cuaternario (por ejemplo, yoduro de metilo, yoduro de etilo y similares). Estas sales pueden prepararse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica.

- 40 Las formas neutras de clemizol o un análogo de clemizol se regeneran preferiblemente poniendo en contacto la sal con una base o ácido y aislando el compuesto original de la manera convencional. La forma original del compuesto puede diferir de las diversas formas de sal en determinadas propiedades físicas, tales como la solubilidad en solventes polares.

- 45 Además de las formas de sal, se puede proporcionar clemizol o un análogo de clemizol en forma de profármaco. Los profármacos de clemizol o un análogo de clemizol son aquellos compuestos que experimentan fácilmente cambios químicos bajo condiciones fisiológicas para proporcionar los compuestos de la presente invención. Los profármacos de clemizol o un análogo de clemizol se pueden convertir in vivo después de la administración. Además, los profármacos de clemizol o un análogo de clemizol se pueden convertir en compuestos activos mediante métodos

químicos o bioquímicos en un entorno ex vivo, tal como, por ejemplo, cuando se ponen en contacto con una enzima o reactivo químico adecuados.

5 El clemizol o un análogo de clemizol puede existir en formas no solvatadas así como en formas solvatadas, incluidas las formas hidratadas. En general, las formas solvatadas son equivalentes a las formas no solvatadas y están incluidas dentro del alcance de la presente invención. El clemizol o un análogo de clemizol puede existir en múltiples formas cristalinas o amorfas. En general, todas las formas físicas son equivalentes para los usos contemplados por la presente invención y se pretende que estén dentro del alcance de la presente invención.

10 Una "cantidad efectiva" es una cantidad suficiente para clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) para lograr un propósito establecido en relación con la ausencia de clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) (por ejemplo, lograr el efecto para el cual se administra, tratar una enfermedad, reducir la actividad de las proteínas/enzimas, aumentar la actividad de las proteínas/enzimas, reducir una ruta de señalización o reducir uno o más síntomas de una enfermedad o afección). Un ejemplo de una "cantidad efectiva" es una cantidad de clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) suficiente para contribuir al tratamiento, prevención o reducción de un síntoma o síntomas de una enfermedad, que también podría denominarse como una "cantidad terapéuticamente efectiva". Una "reducción" de un síntoma o síntomas (y equivalentes gramaticales de esta expresión) significa la disminución de la gravedad o frecuencia de los síntomas, o la eliminación de los síntomas (por ejemplo, ataques). Una "cantidad profilácticamente efectiva" de un fármaco es una cantidad de un fármaco que, cuando se administra a un sujeto, tendrá el efecto profiláctico pretendido, por ejemplo, prevenir o retrasar la aparición (o recurrencia) de una lesión, enfermedad, patología o afección, o reducir la probabilidad de aparición (o recurrencia) de una lesión, enfermedad, patología o afección, o sus síntomas (por ejemplo, ataques). El efecto profiláctico completo no ocurre necesariamente mediante la administración de una dosis y puede ocurrir solo después de la administración de una serie de dosis. Por tanto, se puede administrar una cantidad profilácticamente efectiva en una o más administraciones. Las cantidades exactas dependerán del propósito del tratamiento, y un experto en la técnica podrá determinarlas utilizando técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (vols. 1-3, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999); Pickar, Dosage Calculations (1999); y Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

20 La cantidad terapéuticamente efectiva de clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) puede determinarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Las concentraciones objetivo serán aquellas concentraciones de compuestos activos que son capaces de lograr los métodos descritos en este documento, medidos usando los métodos descritos en este documento o conocidos en la técnica.

30 Como es bien conocido en la técnica, las cantidades terapéuticamente efectivas para uso en humanos también se pueden determinar a partir de modelos animales. Por ejemplo, se puede formular una dosis para humanos para lograr una concentración que se ha demostrado que es efectiva en animales. La dosificación en humanos se puede ajustar monitorizando la efectividad de los compuestos y ajustando la dosificación hacia arriba o hacia abajo, como se describió anteriormente. El ajuste de la dosis para lograr la máxima eficacia en humanos basándose en los métodos descritos anteriormente y otros métodos está dentro de las capacidades del experto en la técnica.

40 Las dosificaciones pueden variar dependiendo de las necesidades del paciente y del compuesto que se esté empleando. La dosis administrada a un paciente, en el contexto de la presente invención, debería ser suficiente para lograr una respuesta terapéutica beneficiosa en el paciente a lo largo del tiempo. El tamaño de la dosis también estará determinado por la existencia, naturaleza y alcance de cualquier efecto secundario adverso. La determinación de la dosificación adecuada para una situación particular está dentro de la habilidad del médico. Generalmente, el tratamiento se inicia con dosificaciones más pequeñas que son menores que la dosis óptima del compuesto. A partir de entonces, la dosificación se aumenta en pequeños incrementos hasta que se alcanza el efecto óptimo bajo las circunstancias.

45 Las cantidades e intervalos de dosificación se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles del compuesto administrado eficaces para la indicación clínica particular que se está tratando. Esto proporcionará un régimen terapéutico que es conmensurado con la gravedad del estado de enfermedad del individuo.

50 Utilizando las enseñanzas proporcionadas en este documento, se puede planificar un régimen de tratamiento profiláctico o terapéutico eficaz que no cause una toxicidad sustancial y, aún sea eficaz para tratar los síntomas clínicos demostrados por el paciente en particular. Esta planificación debe implicar la selección cuidadosa del compuesto activo considerando factores tales como la potencia del compuesto, la biodisponibilidad relativa, el peso corporal del paciente, la presencia y gravedad de los efectos secundarios adversos, el modo de administración preferido y el perfil de toxicidad del agente seleccionado.

55 "Control" o "experimento de control" se utiliza de acuerdo con su simple significado ordinario y se refiere a un experimento en el que los sujetos o reactivos del experimento se tratan como en un experimento paralelo, excepto por la omisión de un procedimiento, reactivo o variable del experimento. En algunos casos, el control se utiliza como estándar de comparación para evaluar los efectos experimentales. En algunas realizaciones, un control es la medición

de la actividad de una proteína en ausencia de clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables).

5 Un "compuesto de prueba", como se usa en este documento, se refiere a un compuesto experimental usado en un proceso de selección para identificar actividad, no actividad u otra modulación de una ruta u objetivo biológico particularizado. Un compuesto de prueba puede ser un análogo de clemizol descrito en el presente documento, incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables.

10 Los términos "modulación", "modular" o "modulador" se utilizan de acuerdo con su simple significado ordinario y se refieren al acto de cambiar o variar una o más propiedades. "Modulador" se refiere a una composición que aumenta o disminuye el nivel de una molécula objetivo o la función de una molécula objetivo o el estado físico del objetivo de la molécula. "Modulación" se refiere al proceso de cambiar o variar una o más propiedades. Por ejemplo, según se aplica a los efectos de un modulador sobre un objetivo biológico modular significa cambiar aumentando o disminuyendo una propiedad o función del objetivo biológico o la cantidad del objetivo biológico.

15 Como se define en el presente documento, el término "inhibición", "inhibe", "inhibir" y similares en referencia a una interacción proteína-inhibidor significa afectar negativamente (por ejemplo, disminuir) la actividad o función de la proteína en relación con la actividad o función de la proteína en ausencia del inhibidor. En algunas realizaciones, la inhibición se refiere a la reducción de una enfermedad o síntomas de enfermedad. En algunas realizaciones, la inhibición se refiere a una reducción en la actividad de una proteína o ácido nucleico objetivo particular. Por tanto, la inhibición incluye, al menos en parte, bloquear parcial o totalmente la estimulación, disminuir, prevenir o retrasar la activación, o inactivar, desensibilizar o subregular la transducción de señales o la actividad proteína/enzimática o la cantidad de una proteína. La inhibición, como se usa aquí, puede referirse a la inhibición de un canal de sodio controlado por voltaje.

20 El término "activación" o "activador" y similares se refieren a interacciones proteína-compuesto que afectan positivamente (por ejemplo, aumentan) la actividad o función de la proteína en relación con la actividad o función de la proteína en ausencia del activador. La activación puede referirse a una actividad mejorada de una proteína objetivo en particular. La activación puede referirse a la restauración de la pérdida de función de una proteína objetivo mutada. La activación, como se usa en el presente documento, puede referirse a la activación de un canal de sodio controlado por voltaje.

25 "Poner en contacto" se usa de acuerdo con su simple significado ordinario y se refiere al proceso de permitir que al menos dos especies distintas (por ejemplo, compuestos químicos que incluyen biomoléculas o células) se vuelvan lo suficientemente proximales para reaccionar, interactuar o tocarse físicamente. Debe apreciarse; sin embargo, que el producto de reacción resultante puede producirse directamente a partir de una reacción entre los reactivos añadidos o a partir de un intermedio de uno o más de los reactivos añadidos que se pueden producir en la mezcla de reacción.

30 El término "poner en contacto" puede incluir permitir que dos especies reaccionen, interactúen o se toquen físicamente, en donde las dos especies pueden ser un compuesto como se describe en el presente documento y una proteína o enzima. En algunas realizaciones, el poner en contacto incluye permitir que un compuesto descrito en el presente documento interactúe con una proteína o enzima que está implicada en una ruta de señalización.

35 El término "asociado" o "asociado con" en el contexto de una sustancia o actividad o función de una sustancia asociada con una enfermedad significa que la enfermedad es causada por (en su totalidad o en parte), o un síntoma de la enfermedad es causado por (en su totalidad o en parte) la sustancia o actividad o función de la sustancia.

40 "Paciente" o "sujeto en necesidad del mismo" se refiere a un organismo vivo que padece o es propenso a una enfermedad o afección que puede ser tratada mediante la administración de una composición farmacéutica como se proporciona en el presente documento. Ejemplos no limitantes incluyen humanos, otros mamíferos, bovinos, ratas, ratones, perros, monos, cabras, ovejas, vacas, ciervos y otros animales no mamíferos tales como el pez cebra. Un paciente puede ser humano.

45 "Enfermedad" o "afección" se refiere a un estado de sentirse o estado de salud de un paciente o sujeto capaz de ser tratado con los compuestos o métodos proporcionados en este documento.

50 Los términos "trastorno epiléptico", "trastorno de epilepsia", "trastorno de ataques" o "epilepsia" en este documento se refieren a un espectro de trastornos neurológicos crónicos caracterizados con mayor frecuencia por la presencia de ataques no provocados. Véase por ejemplo Noebels et. al., Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies, 4^a edición, Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (EE. UU.); 2012. La epilepsia, como se usa en este documento, puede referirse a una lesión en el cerebro (por ejemplo, por trauma, apoplejía o cáncer) o mutación genética. Los síntomas de los trastornos de la epilepsia pueden deberse a una señalización electroquímica anormal entre las neuronas del cerebro. Se puede considerar que los pacientes que experimentan dos o más ataques no provocados tienen epilepsia.

55 Los tipos de trastornos de la epilepsia incluyen, por ejemplo, epilepsia Rolándica benigna, epilepsia del lóbulo frontal, espasmos infantiles, epilepsia mioclónica juvenil (JME), epilepsia de ausencia juvenil, epilepsia de ausencia infantil (por ejemplo picnolepsia), ataques por fiebre, epilepsia mioclónica progresiva de Lafora, Síndrome de Lennox-Gastaut,

síndrome de Landau-Kleffner, síndrome de Dravet (DS), epilepsia generalizada con ataques febriles (GEFS+), epilepsia mioclónica grave de la infancia (SMEI), convulsiones familiares neonatales benignas (BFNC), síndrome de West, síndrome de Ohtahara, encefalopatías mioclónicas tempranas, epilepsia parcial migratoria, encefalopatías epilépticas infantiles, Complejo de esclerosis tuberosa (TSC), displasia cortical focal, lisencefalia Tipo I, síndrome de Miller-Dieker, síndrome de Angelman, síndrome de X Frágil, epilepsia en trastornos del espectro autista, heterotopía de banda subcortical, síndrome de Walker-Warburg, enfermedad de Alzheimer, epilepsia postraumática, epilepsias mioclónica progresiva, epilepsia refleja, síndrome de Rasmussen, epilepsia del lóbulo temporal, epilepsia límbica, estado epiléptico, epilepsia abdominal, mioclonus masivo bilateral, epilepsia catamenial, trastorno de ataques de Jackson, enfermedad de Unverricht-Lundborg o epilepsia fotosensible.

"Excipiente farmacéuticamente aceptable" y "portador farmacéuticamente aceptable" o "unidad estructural portadora" se refieren a una sustancia que ayuda a la administración de clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) para y absorción por parte de un sujeto y puede incluirse en las composiciones sin causar un efecto toxicológico adverso significativo en el paciente. Ejemplos no limitantes de excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen agua, NaCl, soluciones salinas normales, lactato de Ringer, sacarosa normal, glucosa normal, aglutinantes, agentes de relleno, desintegrantes, lubricantes, recubrimientos, edulcorantes, saborizantes, soluciones salinas (tales como la solución de Ringer), alcoholes, aceites, gelatinas, carbohidratos tales como lactosa, amilosa o almidón, ésteres de ácidos grasos, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidina y colorantes y similares. Tales preparaciones pueden esterilizarse y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares tales como lubricantes, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir en la presión osmótica, reguladores, colorantes y/o sustancias aromáticas y similares que no reaccionen de manera perjudicial con los compuestos de la invención. Un experto en la técnica reconocerá que otros excipientes farmacéuticamente aceptables son útiles en la presente invención.

El término "preparación" pretende incluir la formulación de clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) con material encapsulante como un portador que proporciona una cápsula en la que el componente activo con o sin otros portadores, está rodeado por un portador, que, por tanto, está asociado con él. Del mismo modo, se incluyen obleas y comprimidos para deshacer en la boca. Las tabletas, polvos, cápsulas, píldoras, obleas y comprimidos para deshacer en la boca pueden usarse como formas de dosificación sólidas adecuadas para la administración oral.

Como se usa en este documento, el término "administrar" significa administración oral, administración como un supositorio, administración por contacto tópico, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intralesional, intratecal, intranasal o subcutánea, o la implantación de un dispositivo de liberación lenta, por ejemplo, una bomba miniosmótica, a un sujeto. La administración es por cualquier ruta, incluyendo parenteral y transmucosa (por ejemplo, bucal, sublingual, palatina, gingival, nasal, vaginal, rectal o transdérmica). La administración parenteral incluye, por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intraarteriolar, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular e intracraneal. Otros modos de administración incluyen, pero no se limitan a, el uso de formulaciones liposomales, infusión intravenosa, parches transdérmicos, etc.

El clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) y sus composiciones farmacéuticas pueden administrarse por vía transdérmica, por vía tópica, formuladas como barras aplicadoras, soluciones, suspensiones, emulsiones, geles, cremas, ungüentos, pastas, jaleas, pinturas, polvos, y aerosoles. Las preparaciones orales incluyen tabletas, píldoras, polvos, grageas, cápsulas, líquidos, comprimidos para deshacer en la boca, obleas, geles, jarabes, pastas, suspensiones, etc., adecuados para la ingestión por parte del paciente. Las preparaciones en forma sólida incluyen polvos, tabletas, píldoras, cápsulas, obleas, supositorios y gránulos dispersables. Las preparaciones en forma líquida incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones, por ejemplo, agua o soluciones de agua/propilenglicol. Clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) pueden incluir adicionalmente componentes para proporcionar una liberación sostenida y/o comodidad. Tales componentes incluyen polímeros mucomiméticos aniónicos de alto peso molecular, polisacáridos gelificantes y sustratos portadores de fármacos finamente divididos. Estos componentes se discuten con mayor detalle en la patente U.S. No. 4,911,920; 5,403,841; 5,212,162; y 4,861,760. El clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) también se pueden suministrar como microesferas para una liberación lenta en el cuerpo. Por ejemplo, las microesferas se pueden administrar mediante inyección intradérmica de microesferas que contienen fármaco, que se liberan lentamente por vía subcutánea (véase Rao, J. Biomater Sci. Polym. Ed. 7: 623-645, 1995; como formulaciones de gel biodegradables e inyectables (véase, por ejemplo, Gao Pharm. Res. 12: 857-863, 1995); o como microesferas para administración oral (véase, por ejemplo, Eyles, J. Pharm. Pharmacol. 49: 669-674, 1997). Las formulaciones de las composiciones de clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) pueden administrarse mediante el uso de liposomas que se fusionan con la membrana celular o experimentan endocitosis, es decir, mediante el empleo de ligandos receptores unidos al liposoma, que se unen a receptores de proteínas de la membrana de la superficie de la célula que dan lugar a endocitosis. Mediante el uso de liposomas, particularmente cuando la superficie del liposoma porta ligandos de receptor específicos para las células diana, o de otra manera se dirigen preferentemente a un órgano específico, se puede enfocar la administración de las composiciones de clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) en las células diana in vivo. (véase, por ejemplo, Al-Muhammed, J. Microencapsul. 13: 293-306, 1996; Chonn, Curr. Opin. Biotechnol. 6: 698-708, 1995; Ostro, Am. J. Hosp. Pharm. 46: 1576 -1587, 1989). Las composiciones también se pueden suministrar como nanopartículas.

Por "coadministrar" se entiende que una composición descrita en el presente documento se administra al mismo tiempo, justo antes o justo después de la administración de una o más terapias adicionales. El clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) se pueden administrar solos o se pueden coadministrar al paciente. La coadministración pretende incluir la administración simultánea o secuencial de los compuestos individualmente o en combinación (más de un compuesto). Por tanto, las preparaciones también se pueden combinar, cuando se desee, con otras sustancias activas (por ejemplo, para reducir la degradación metabólica). El clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) se pueden administrar por vía transdérmica, por vía tópica, o formularse como barras aplicadoras, soluciones, suspensiones, emulsiones, geles, cremas, ungüentos, pastas, jaleas, pinturas, polvos y aerosoles.

Los términos "terapia de complemento", "terapia complementaria", "terapia adjunta" y "terapia de adjunción" se usan indistintamente en el presente documento y se refieren a combinar clemizol, un análogo de clemizol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo con otro anticonvulsivo para tratar epilepsia.

Un "fármaco antiataques", "fármaco antiepiléptico", "AED" o "anticonvulsivo" se utilizan indistintamente en este documento y de acuerdo con su significado común y ordinario e incluyen composiciones para reducir o eliminar ataques. Los anticonvulsivos incluyen, pero no se limitan a acetazolamida, benzodiazepina, cannabadiol, carbamazepina, clobazam, clonazepam, acetato de eslicarbazepina, etosuximida, etotoína, felbamato, fenfluramina, fosfenitoína, gabapentina, ganaxolona, huperazina A, lacosamida, lamotrigina, levetiracetam, nitrazepam, oxcarbazepina, perampam, piracetam, fenobarbital, fenitoína, bromuro de potasio, pregabalina, primidona, retigabina, rufinamida, valproato de sodio, estiripentol, tiagabina, topiramato, vigabatrina, o zonisamida.

I. Métodos de tratamiento

En el presente documento se proporcionan métodos para tratar un trastorno de epilepsia. En un aspecto, el método es un método para tratar un trastorno de epilepsia mediante la administración a un sujeto que lo necesite, una cantidad terapéuticamente efectiva de clemizol, un análogo de clemizol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En otro aspecto, el método es un método para tratar un trastorno de epilepsia administrando a un sujeto que lo necesita, una composición farmacéutica como se describe en este documento, donde la composición farmacéutica incluye clemizol, un análogo de clemizol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El análogo de clemizol puede incluir compuestos de estructura similar a los expuestos, por ejemplo, en PCT/US2008/076804, WO10107739, WO2009039248 o la patente U.S. No. 4011322. La sal farmacéuticamente aceptable puede ser HCl de clemizol. El sujeto puede tener (por ejemplo, puede comer alimentos de acuerdo con) una dieta cetogénica. El sujeto puede ser un niño (por ejemplo, un sujeto que tiene una condición de epilepsia pediátrica).

El trastorno de la epilepsia puede ser epilepsia Rolándica benigna, epilepsia del lóbulo frontal, espasmos infantiles, epilepsia mioclónica juvenil (JME), epilepsia de ausencia juvenil, epilepsia de ausencia infantil (por ejemplo, Picnolepsia), ataques por fiebre, epilepsia mioclónica progresiva de Lafora, síndrome de Lennox-Gastaut, Síndrome de Landau-Kleffner, síndrome de Dravet, epilepsia generalizada con ataques por fiebre (GEFS+), epilepsia mioclónica grave de la infancia (SMEI), convulsiones familiares neonatales benignas (BFNC), síndrome de West, síndrome de Ohtahara, encefalopatías mioclónicas tempranas, epilepsia parcial migratoria, encefalopatías epilépticas infantiles, Complejo de esclerosis tuberosa (TSC), displasia cortical focal, Lisencefalia Tipo I, síndrome de Miller-Dieker, síndrome de Angelman, Síndrome X frágil, epilepsia en trastornos del espectro autista, heterotopía de banda subcortical, síndrome de Walker-Warburg, enfermedad de Alzheimer, epilepsia postraumática, epilepsias mioclónicas progresivas, epilepsia refleja, síndrome de Rasmussen, epilepsia del lóbulo temporal, epilepsia límbica, estado epiléptico, epilepsia abdominal, mioclonus bilateral masivo, epilepsia catamenial, trastorno de ataques de Jackson, enfermedad de Unverricht-Lundborg o epilepsia fotosensible. La epilepsia puede incluir ataques generalizados o convulsiones parciales (es decir, focales).

El trastorno de la epilepsia puede ser síndrome de Dravet, síndrome de Lennox-Gastaut, espasmo infantil o síndrome de Ohtahara. El trastorno de epilepsia puede ser síndrome de Dravet, síndrome de Lennox-Gastaut, espasmo infantil, síndrome de Ohtahara o un trastorno de epilepsia pediátrico. El trastorno de epilepsia infantil puede ser epilepsia infantil benigna, convulsiones familiares neonatales benignas (BFNC), ataques por fiebre, síndrome de Dravet, síndrome de Lennox-Gastaut, espasmo infantil, síndrome de Ohtahara, epilepsia mioclónica juvenil, epilepsia de ausencia juvenil, epilepsia de ausencia infantil (por ejemplo, Picnolepsia) , espasmos infantiles. El trastorno de la epilepsia puede ser síndrome de Dravet.

El trastorno de epilepsia pediátrica puede ser una epilepsia infantil benigna. El trastorno de epilepsia pediátrico puede ser convulsiones familiares neonatales benignas (BFNC). El trastorno de epilepsia pediátrico puede ser ataques por fiebre. El trastorno de epilepsia pediátrico puede ser el síndrome de Dravet. El trastorno de epilepsia pediátrico puede ser el síndrome de Lennox-Gastaut. El trastorno de epilepsia pediátrico puede ser un espasmo infantil. El trastorno de epilepsia pediátrico puede ser el síndrome de Ohtahara. El trastorno de epilepsia pediátrica puede ser epilepsia mioclónica juvenil. El trastorno de epilepsia pediátrica puede ser epilepsia de ausencia juvenil. El trastorno de epilepsia pediátrica puede ser epilepsia de ausencia infantil (por ejemplo, picnolepsia). El trastorno de la epilepsia pediátrica puede ser espasmos infantiles.

El trastorno de epilepsia puede ser el resultado de una enfermedad o lesión neurológica tal como, por ejemplo, encefalitis, cerebritis, absceso, apoplejía, tumor, trauma, esclerosis genética, tuberosa, disgenesia cerebral o encefalopatía hipóxico-isquémica. El trastorno de epilepsia puede estar asociado con una enfermedad neurodegenerativa tal como, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer o la enfermedad de Parkinson. El trastorno de epilepsia puede estar asociado con el autismo. El trastorno de la epilepsia puede estar asociado con una sola mutación genética. La enfermedad de la epilepsia puede estar asociada con conductas compulsivas o ataques electrográficos. La administración de clemizol, un análogo de clemizol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede inhibir comportamientos compulsivos o ataques electrográficos en un trastorno de epilepsia, en un sujeto con enfermedad de Alzheimer (por ejemplo, un sujeto que padece la enfermedad de Alzheimer), en un sujeto con autismo (por ejemplo, un sujeto que tiene autismo), o en un sujeto con la enfermedad de Parkinson (por ejemplo, un sujeto que padece la enfermedad de Parkinson). Por tanto, el clemizol, un análogo de clemizol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede inhibir comportamientos compulsivos o ataques electrográficos en un trastorno de epilepsia. El clemizol, un análogo de clemizol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo pueden inhibir comportamientos compulsivos o ataques electrográficos en un sujeto con enfermedad de Alzheimer. El clemizol, un análogo de clemizol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede inhibir comportamientos compulsivos o ataques electrográficos en un sujeto con autismo. El clemizol, un análogo de clemizol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede inhibir comportamientos compulsivos o ataques electrográficos en un sujeto con enfermedad de Parkinson.

La administración de clemizol, un análogo de clemizol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede reducir la incidencia (por ejemplo, número de apariciones) de ataques no provocados en el sujeto en comparación con la ausencia de clemizol, el análogo de clemizol o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Por tanto, la respuesta de un paciente a la administración de clemizol, un análogo de clemizol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede monitorizarse progresivamente en comparación con un tiempo antes de la administración de los compuestos descritos en este documento (por ejemplo, un control o tiempo de control).

La administración de clemizol, un análogo de clemizol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede reducir o prevenir ataques de mioclonía o estado epiléptico en el sujeto en comparación con la ausencia de clemizol, el análogo de clemizol o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La administración de clemizol, un análogo de clemizol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede reducir o prevenir los ataques de mioclonía en el sujeto en comparación con la ausencia de clemizol, el análogo de clemizol o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La administración de clemizol, un análogo de clemizol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede reducir o prevenir el estado epiléptico en el sujeto en comparación con la ausencia de clemizol, el análogo de clemizol o la sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Por tanto, la respuesta de un paciente a la administración de clemizol, un análogo de clemizol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, puede monitorizarse progresivamente en comparación con un tiempo antes de la administración de los compuestos descritos en este documento (por ejemplo, un control o tiempo de control).

El trastorno de epilepsia puede ser un trastorno de epilepsia que no responde al tratamiento con un fármaco antiepiléptico (AED). El sujeto puede seguir una dieta cetogénica. El trastorno de epilepsia puede ser un trastorno de epilepsia en un adulto (por ejemplo, más de aproximadamente 16 años).

El trastorno de epilepsia puede ser un trastorno de epilepsia en niños. Por tanto, el trastorno de epilepsia puede ser un trastorno de epilepsia pediátrico. El niño puede tener menos de una semana aproximadamente. El niño puede tener menos de 1 mes aproximadamente. El niño puede tener menos de 6 meses aproximadamente. El niño puede tener menos de 12 meses aproximadamente. El niño puede tener menos de 2 años aproximadamente. El niño puede tener menos de 3 años aproximadamente. El niño puede tener menos de 4 años aproximadamente. El niño puede tener menos de 5 años aproximadamente. El niño puede tener menos de 6 años aproximadamente. El niño puede tener menos de 7 años aproximadamente. El niño puede tener menos de 8 años aproximadamente. El niño puede tener menos de 9 años aproximadamente. El niño puede tener menos de 10 años aproximadamente. El niño puede tener menos de 12 años aproximadamente.

El niño puede tener más de una semana aproximadamente. El niño puede tener más de 1 mes aproximadamente. El niño puede tener más de 6 meses aproximadamente. El niño puede tener más de 12 meses aproximadamente. El niño puede tener más de 2 años aproximadamente. El niño puede tener más de 3 años aproximadamente. El niño puede tener más de 4 años aproximadamente. El niño puede tener más de 5 años aproximadamente. El niño puede tener más de 6 años aproximadamente. El niño puede tener más de 7 años aproximadamente. El niño puede tener más de unos 8 años. El niño puede tener más de 9 años aproximadamente. El niño puede tener más de 10 años aproximadamente. El niño puede tener más de 11 años aproximadamente. El niño puede tener más de 12 años aproximadamente.

El niño puede tener un trastorno de epilepsia tratado mediante la administración de un AED como se describe en este documento. Por tanto, se puede administrar clemizol, un análogo de clemizol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo a tal niño (por ejemplo, como terapia complementaria).

En otro aspecto, es un método para tratar el síndrome de Dravet. El método para tratar el síndrome de Dravet incluye administrar a un sujeto que lo necesite, una cantidad terapéuticamente efectiva de clemizol, un análogo de clemizol o

una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El método para tratar el síndrome de Dravet puede incluir administrar a un sujeto que lo necesite, una composición farmacéutica de clemizol, un análogo de clemizol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como se describe en el presente documento. El análogo de clemizol puede incluir compuestos de fórmula (I) descritos en este documento y puede incluir compuestos de estructura similar a la que se expone, por ejemplo, en PCT/US2008/076804, WO10107739, WO2009039248 o la patente U.S. No. 4011322. Clemizol, o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) se puede coadministrar a un sujeto que lo necesite con un AED como se describe en el presente documento.

En los métodos descritos en el presente documento, el clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) se puede coadministrar con un fármaco antiepiléptico (AED). El AED puede ser acetazolamida, benzodiazepina, cannabadiol, carbamazepina, clobazam, clonazepam, acetato de eslicarbazepina, etosuximida, etotoína, felbamato, fenfluramina, fosfenitoína, gabapentina, ganaxolona, huperzina A, lacosamida, lamotrigina, levetiracetam, nitrazepam, oxcarbazepina, perampanel, piracetam, fenobarbital, fenitoína, bromuro de potasio, pregabalina, primidona, retigabina, rufinamida, valproato de sodio, estiripentol, tiagabina, topiramato, vigabatrina o zonisamida. El AED puede ser ácido valproico, valproato, clonazepam, etosuximida, felbamato, gabapentina, carbamazepina, oxcarbazepina, lamotrigina, levetiracetam, benzodiazepina, fenobarbital, pregabalina, primidona, tiagabina, topiramato, bromuro de potasio, fenitoína, estiripentol, vigabatrina o zonisamida. El AED puede ser ácido valproico, valproato, gabapentina, topiramato, carbamazepina, oxcarbazepina o vigabatrina.

El AED puede ser acetazolamida. El AED puede ser benzodiazepina. El AED puede ser cannabadiol. El AED puede ser carbamazepina. El AED puede ser clobazam. El AED puede ser clonazepam. El AED puede ser acetato de eslicarbazepina. El AED puede ser etosuximida. El AED puede ser etotoína. El AED puede ser felbamato. El AED puede ser fenfluramina. El AED puede ser fosfenitoína. El AED puede ser gabapentina. El AED puede ser ganaxolona. El AED puede ser huperzina A. El AED puede ser lacosamida. El AED puede ser lamotrigina. El AED puede ser levetiracetam. El AED puede ser nitrazepam. El AED puede ser oxcarbazepina. El AED puede ser perampanel. El AED puede ser piracetam. El AED puede ser fenobarbital. El AED puede ser fenitoína. El AED puede ser bromuro de potasio. El AED puede ser pregabalina. El AED puede ser primidona. El AED puede ser retigabina. El AED puede ser rufinamida. El AED puede ser valproato de sodio. El AED puede ser estiripentol. El AED puede ser tiagabina. El AED puede ser topiramato. El AED puede ser vigabatrina. El AED puede ser zonisamida. Se puede administrar clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) o una composición farmacéutica de clemizol o un análogo de clemizol como terapia complementaria a uno o más de los AED descritos en el presente documento.

El clemizol, un análogo de clemizol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo puede administrarse así como un complemento (por ejemplo, en combinación con) medicaciones de AED para tratar ataques, incluidos los ataques asociados con los trastornos epilépticos descritos en este documento. Se puede administrar clemizol, un análogo de clemizol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como terapia complementaria (por ejemplo, en combinación con) medicaciones de AED para tratar ataques, incluidos los ataques asociados con los trastornos de epilepsia descritos en el presente documento.

El trastorno de epilepsia puede caracterizarse por ataques parciales o ataques generalizados. El trastorno de epilepsia puede caracterizarse por ataques parciales. El trastorno de epilepsia puede caracterizarse por ataques generalizados. El ataque parcial puede ser un ataque focal simple, un ataque focal complejo o un ataque focal parcial con generalización secundaria. El ataque generalizado puede ser un ataque tónico-clónico generalizado, un ataque de ausencia (es decir, un pequeño mal), un ataque mioclónico, un ataque clónico, un ataque tónico o un ataque atónico.

Cuando se coadministra con los AED descritos en el presente documento, se puede administrar simultáneamente clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables). Cuando se administra simultáneamente, se puede formular clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) junto con el AED (es decir, en una única unidad de dosificación). El clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) se pueden formular para una administración separada del AED pero administrarse al mismo tiempo. Cuando se coadministra con los AED descritos en el presente documento, el clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) se puede administrar secuencialmente (por ejemplo, antes o después) de la administración del AED. Como se establece en el presente documento, un experto en la técnica podría determinar fácilmente el orden secuencial de administración.

Se puede administrar clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) a una dosis de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg. Se puede administrar clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) a una dosis de aproximadamente 10 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg. Se puede administrar clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) a una dosis de aproximadamente 25 mg/kg a aproximadamente 500 mg/kg. Se puede administrar clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) a una dosis de aproximadamente 25 mg/kg a aproximadamente 400 mg/kg. Se puede administrar clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) a una dosis de aproximadamente 25 mg/kg a aproximadamente 350 mg/kg. Se puede administrar clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) a una dosis de aproximadamente 25 mg/kg a aproximadamente 300 mg/kg. Se puede administrar clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) a una dosis de aproximadamente 25

por semana en las dosificaciones descritas en este documento. Se puede administrar clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) al menos tres veces a la semana como se describe en el presente documento. Se puede administrar clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) mensualmente como se describe en el presente documento.

5 II. Composiciones farmacéuticas

En el presente documento se proporcionan composiciones farmacéuticas para tratar una enfermedad de epilepsia descrita en el presente documento. En un aspecto, es una composición farmacéutica que incluye clemizol, un análogo de clemizol o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La composición farmacéutica también puede incluir un excipiente farmacéuticamente aceptable. La sal farmacéuticamente aceptable de clemizol en la composición farmacéutica puede ser HCl de clemizol. La composición farmacéutica se puede formular como una tableta, un polvo, una cápsula, una píldora, una oblea o un comprimido para deshacer en la boca como se describe en este documento. La composición farmacéutica se puede formular en forma de tableta, cápsula, píldora, oblea o un comprimido para deshacer en la boca para administración oral. La composición farmacéutica puede formularse para disolución en una solución para administración mediante técnicas tales como, por ejemplo, administración intravenosa. La composición farmacéutica puede formularse para administración oral, administración en supositorios, administración tópica, administración intravenosa, administración intraperitoneal, administración intramuscular, administración intralesional, administración intratecal, administración intranasal, administración subcutánea, implantación, administración transdérmica o administración transmucosa como se describe en este documento.

20 Cuando se administra como composición farmacéutica, las composiciones farmacéuticas pueden incluir isómeros ópticos, diastereómeros, enantiómeros, isoformas, polimorfos, hidratos, solvatos o productos, o sales farmacéuticamente aceptables de clemizol o un análogo de clemizol descrito en este documento (por ejemplo, agentes, moduladores, inhibidores, antagonistas). El clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) incluidos en la composición farmacéutica se pueden unir covalentemente a una unidad estructural portadora, como se describió anteriormente. Alternativamente, el clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) incluido en la composición farmacéutica no está enlazado covalentemente a una unidad estructural portadora.

El clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) puede administrarse solo o coadministrarse a un sujeto que lo necesite con un AED como se describe en el presente documento. Composiciones farmacéuticas de clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables). La coadministración pretende incluir la administración simultánea o secuencial como se describe en el presente documento de clemizol o un análogo de clemizol individualmente o en combinación (por ejemplo, más de un compuesto - por ejemplo, un AED descrito en el presente documento). Las preparaciones también se pueden combinar, cuando se desee, con otras sustancias activas (por ejemplo, para prevenir ataques).

1. Formulaciones

35 El clemizol, un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) o una composición farmacéutica descrita en el presente documento se puede preparar y administrar en una amplia variedad de formas de dosificación oral, parenteral y tópica. Por tanto, el clemizol, un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) o una composición farmacéutica descrita en el presente documento se puede administrar mediante inyección (por ejemplo, por vía intravenosa, intramuscular, intracutánea, subcutánea, intraduodenal o intraperitoneal). Además, el clemizol, un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) o una composición farmacéutica descrita en el presente documento pueden administrarse por inhalación, por ejemplo, intranasalmente. Además, clemizol, un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) o una composición farmacéutica se puede administrar por vía transdérmica. También se prevé que se pueden usar múltiples vías de administración (por ejemplo, intramuscular, oral, transdérmica) para administrar clemizol, un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) o una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento pueden incluir un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable y uno o más de clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables). Las composiciones farmacéuticas descritas en este documento pueden incluir un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, uno o más de clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) y uno o más AED como se describe en este documento.

La preparación puede incluir portadores farmacéuticamente aceptables. Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden ser sólidos o líquidos. Las preparaciones en forma sólida incluyen polvos, tabletas, píldoras, cápsulas, obleas, supositorios y gránulos dispersables. Un portador sólido puede ser una o más sustancias que también pueden actuar como diluyentes, agentes saborizantes, aglutinantes, conservantes, agentes desintegradores de tabletas o un material encapsulante.

En los polvos, el portador puede ser un sólido finamente dividido en una mezcla con el componente activo finamente dividido. En las tabletas, el componente activo puede mezclarse con el portador que tiene las propiedades aglutinantes necesarias en proporciones adecuadas y compactarse en la forma y tamaño deseados.

Los polvos y tabletas contienen preferiblemente del 5% al 70% del compuesto activo. Los portadores adecuados son carbonato de magnesio, estearato de magnesio, talco, azúcar, lactosa, pectina, dextrina, almidón, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, una cera de bajo punto de fusión, manteca de cacao y similares. El término "preparación" pretende incluir la formulación del compuesto activo con material encapsulante como un portador que proporciona una cápsula en la que el componente activo con o sin otros portadores, está rodeado por un portador, que por tanto está asociado con él. Del mismo modo, se incluyen obleas y comprimidos para deshacer en la boca. Las tabletas, polvos, cápsulas, píldoras, obleas o comprimidos para deshacer en la boca pueden usarse como formas de dosificación sólidas adecuadas para la administración oral.

Los excipientes sólidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, carbonato de magnesio; estearato de magnesio; talco; pectina; dextrina; almidón; tragacanto; una cera de bajo punto de fusión; mantequilla de cacao; carbohidratos; azúcares que incluyen, pero no se limitan a, lactosa, sacarosa, manitol o sorbitol, almidón de maíz, trigo, arroz, patata u otras plantas; celulosa tal como metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa de sodio; y gomas que incluyen arábica y tragacanto; así como proteínas que incluyen, pero no se limitan a, gelatina y colágeno. Si se desea, se pueden añadir agentes disgregantes o solubilizantes, tales como polivinilpirrolidona entrecruzada, agar, ácido algínico o una sal del mismo, tal como alginato de sodio.

Los núcleos de grageas se proporcionan con recubrimientos adecuados tales como soluciones concentradas de azúcar, que también pueden contener goma arábica, talco, polivinilpirrolidona, gel de carbopol, polietilenglicol y/o dióxido de titanio, soluciones de laca y solventes orgánicos o mezclas de solventes adecuados. Pueden añadirse productos colorantes o pigmentos a las tabletetas o recubrimientos de grageas para la identificación del producto o para caracterizar la cantidad de clemizol, un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) o una composición farmacéutica (es decir, dosificación). Las preparaciones farmacéuticas descritas en el presente documento también se pueden usar por vía oral usando, por ejemplo, cápsulas de ajuste rápido hechas de gelatina, así como cápsulas blandas selladas hechas de gelatina y un recubrimiento tal como glicerol o sorbitol.

Para la preparación de supositorios, primero se funde una cera de bajo punto de fusión, tal como una mezcla de glicéridos de ácidos grasos o manteca de cacao, y el componente activo se dispersa de manera homogénea en la misma, tal como mediante agitación. La mezcla homogénea fundida se vierte luego en moldes de tamaño conveniente, se deja enfriar y de ese modo solidificar.

Las preparaciones en forma líquida incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones, por ejemplo, agua o soluciones de agua/propilenglicol. Para inyección parenteral, las preparaciones líquidas se pueden formular en solución en una solución acuosa de polietilenglicol.

Cuando se necesita o desea una aplicación parenteral, las mezclas particularmente adecuadas para clemizol, un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) o una composición farmacéutica son soluciones estériles inyectables, preferiblemente soluciones oleosas o acuosas, así como suspensiones, emulsiones o implantes, incluidos los supositorios. En particular, los portadores para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de dextrosa, solución salina, agua pura, etanol, glicerol, propilenglicol, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, polímeros de bloques de polioxietileno y similares. Las ampollas son dosificaciones unitarias convenientes. El clemizol, un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) o una composición farmacéutica también se puede incorporar a los liposomas o administrar mediante bombas transdérmicas o parches. Las mezclas farmacéuticas adecuadas para uso aquí incluyen las descritas, por ejemplo, en Pharmaceutical Sciences (17^a edición, Mack Pub. Co., Easton, PA) y WO96/05309.

Se pueden preparar soluciones acuosas adecuadas para uso oral disolviendo el componente activo en agua y añadiendo colorantes, sabores, estabilizadores y agentes espesantes adecuados según se desee. Se pueden preparar suspensiones acuosas adecuadas para uso oral dispersando el componente activo finamente dividido en agua con material viscoso, tal como gomas naturales o sintéticas, resinas, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma de acacia, y agentes dispersantes o humectantes tales como un fosfátido de origen natural (por ejemplo, lecitina), un producto de condensación de un óxido de alquileno con un ácido graso (por ejemplo, estearato de polioxietileno), un producto de condensación de óxido de etileno con un alcohol alifático de cadena larga (por ejemplo, heptadecaetilen oxietanol), un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de un ácido graso y un hexitol (por ejemplo, monooleato de polioxietilensorbitol), o un producto de condensación de óxido de etileno con un éster parcial derivado de ácido graso y un anhídrido de hexitol (por ejemplo, monooleato de polioxietilensorbitán). La suspensión acuosa también puede contener uno o más conservantes tales como p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes saborizantes y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa, aspartamo o sacarina. Las formulaciones se pueden ajustar según la osmolaridad.

También se incluyen aquí preparaciones en forma sólida que están destinadas a convertirse, poco antes de su uso, en preparaciones en forma líquida para administración oral. Tales formas líquidas incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones. Estas preparaciones pueden contener, además del componente activo, colorantes, aromatizantes, estabilizadores, reguladores, edulcorantes artificiales y naturales, dispersantes, espesantes, agentes solubilizantes y similares.

Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, tal como cera de abejas, parafina dura o alcohol cetílico. Se pueden añadir agentes edulcorantes para proporcionar una preparación oral agradable, tal como glicerol, sorbitol o sacarosa. Estas formulaciones se pueden conservar mediante la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico. Como ejemplo de un vehículo oleoso inyectable, véase Minto, J. Pharmacol. Exp. El r. 281: 93-102, 1997.

5 Las formulaciones farmacéuticas descritas en el presente documento también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal o un aceite mineral, descritos anteriormente, o una mezcla de estos. Los agentes emulsionantes adecuados incluyen gomas de origen natural, tales como goma de acacia y goma de tragacanto, fosfátidos de origen natural, tales como lecitina de soja, ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, tales como monooleato de sorbitán, y productos de condensación de estos
10 ésteres parciales con óxido de etileno, tales como monooleato de polioxietilensorbitán. La emulsión también puede contener agentes edulcorantes y aromatizantes, como en la formulación de jarabes y elixires. Tales formulaciones también pueden contener un demulcente, un conservante o un colorante.

La preparación farmacéutica está preferiblemente en forma de dosificación unitaria. En tal forma, la preparación se subdivide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del componente activo. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación empazada, conteniendo el empaque cantidades discretas de preparación, tales como tabletas empazadas, cápsulas y polvos en viales o ampollas. Además, la forma de dosificación unitaria puede ser una cápsula, tableta, oblea o comprimido para deshacer en la boca en sí misma, o puede ser el número apropiado de cualquiera de estos en forma empaquetada.

La cantidad de componente activo en una preparación de dosis unitaria puede variarse o ajustarse de 0.1 mg a 10000 mg de acuerdo con la aplicación particular y la potencia del componente activo. Si se desea, la composición también puede contener otros agentes terapéuticos compatibles.

Las formulaciones pueden incluir un surfactante u otro cosolvente apropiado en la composición. Tales cosolventes incluyen: polisorbato 20, 60 y 80; Pluronic F-68, F-84 y P-103; ciclodextrina; y aceite de ricino polioxil 35. Tales cosolventes se emplean típicamente a un nivel entre aproximadamente el 0.01% y aproximadamente el 2% en peso. Puede ser deseable una viscosidad mayor que la de las soluciones acuosas simples para disminuir la variabilidad en la dispensación de las formulaciones, para disminuir la separación física de los componentes de una suspensión o emulsión de la formulación y/o de otro modo para mejorar la formulación. Tales agentes que aumentan la viscosidad incluyen, por ejemplo, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, sulfato de condroitina y sus sales, ácido hialurónico y sus sales, y combinaciones de los anteriores. Tales agentes se emplean típicamente a un nivel entre aproximadamente el 0.01% y aproximadamente el 2% en peso.

Puede ser deseable una viscosidad mayor que la de las soluciones acuosas simples para disminuir la variabilidad en la dispensación de las formulaciones, para disminuir la separación física de los componentes de una suspensión o emulsión de formulación y/o de otra manera mejorar la formulación. Tales agentes constructores de viscosidad incluyen, por ejemplo, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, sulfato de condroitina y sus sales, ácido hialurónico y sales de los mismos, combinaciones de los anteriores, y otros agentes conocidos por los expertos en la técnica. Tales agentes se emplean típicamente a un nivel entre aproximadamente el 0.01% y aproximadamente el 2% en peso. La determinación de cantidades aceptables de cualquiera de los adyuvantes anteriores la puede determinar fácilmente un experto en la técnica.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluir además componentes para proporcionar una liberación sostenida y/o comodidad. Tales componentes incluyen polímeros mucomiméticos aniónicos de alto peso molecular, polisacáridos gelificantes y sustratos portadores de fármacos finamente divididos. Estos componentes se describen con mayor detalle en la patente U.S. No. 4,911,920; 5,403,841; 5,212,162; y 4.861.760.

45 La composición farmacéutica puede estar destinada a uso intravenoso. El excipiente farmacéuticamente aceptable puede incluir reguladores para ajustar el pH a un rango deseable para uso intravenoso. Se conocen muchos reguladores que incluyen sales de ácidos inorgánicos tales como fosfato, borato y sulfato.

El demizol, un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) o una composición farmacéutica del mismo se puede administrar por vía transdérmica, para tratar los trastornos de epilepsia descritos en el presente documento, por vía tópica, formulado como barras aplicadoras, soluciones, suspensiones, emulsiones, geles, cremas, ungüentos, pastas, jaleas, pinturas, polvos y aerosoles.

Clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) se pueden proporcionar como una sal en las composiciones farmacéuticas descritas en este documento y se pueden formar con muchos ácidos, incluidos, pero no limitados a, clorhídrico, sulfúrico, acético, láctico, tartárico, málico, succínico, etc. Las sales tienden a ser más solubles en solventes acuosos u otros solventes protónicos que son las correspondientes formas de base libre.

El demizol, un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) o una composición farmacéutica del mismo administrada para tratar los trastornos epilépticos descritos en el presente documento puede

administrarse mediante administración parenteral, tal como administración intravenosa (IV) o administración en una cavidad corporal o lumen de un órgano. Las formulaciones para la administración comprenderán comúnmente una solución de las composiciones de la presente invención disuelta en un portador farmacéuticamente aceptable. Entre los vehículos y solventes aceptables que se pueden emplear se encuentran el agua y la solución de Ringer, un cloruro de sodio isotónico. Además, pueden emplearse convencionalmente aceites fijos estériles como solvente o medio de suspensión. Para este propósito, puede emplearse cualquier aceite fijo suave, incluidos los mono o diglicéridos sintéticos. Además, también se pueden utilizar ácidos grasos tales como el ácido oleico en la preparación de inyectables. Estas soluciones son estériles y generalmente libres de materias indeseables. Estas formulaciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas. Las formulaciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximar las condiciones fisiológicas tales como agentes reguladores y reguladores del pH, agentes reguladores de la toxicidad, por ejemplo, acetato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, lactato de sodio y similares. La concentración de las composiciones de la presente invención en estas formulaciones puede variar ampliamente y se seleccionará principalmente con base en los volúmenes de fluido, viscosidades, peso corporal y similares, de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado y las necesidades del paciente. Para la administración intravenosa, la formulación puede ser una preparación inyectable estéril, tal como una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular de acuerdo con la técnica conocida usando aquellos agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o solvente parenteralmente aceptable no tóxico, tal como una solución de 1,3-butanodiol.

Las formulaciones farmacéuticas de clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) para tratar un trastorno de epilepsia pueden administrarse mediante el uso de liposomas que se fusionan con la membrana celular o experimentan endocitosis. es decir, mediante el empleo de ligandos unidos al liposoma, o unidos directamente al oligonucleótido, que se unen a los receptores de proteínas de la membrana de la superficie de la célula, lo que produce endocitosis. Mediante el uso de liposomas, particularmente cuando la superficie del liposoma lleva ligandos específicos para las células diana, o de otro modo son preferentemente dirigidos a un órgano específico, se puede enfocar la administración de las composiciones de la presente invención en las células diana in vivo. (Véase, por ejemplo, Al-Muhammed, J. Microencapsul. 13:293-306, 1996; Chonn, Curr. Opin. Biotechnol. 6:698-708, 1995; Ostro, Am. J. Hosp. Pharm. 46:1576-1587, 1989).

La coadministración incluye la administración de un agente activo (por ejemplo, clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables)) dentro de 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 o 24 horas de un segundo agente activo (por ejemplo, un anticonvulsivo). La coadministración puede incluir administrar un agente activo dentro de las 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 o 24 horas de un segundo agente activo. La coadministración puede incluir administrar dos agentes activos simultáneamente, aproximadamente simultáneamente (por ejemplo, dentro de aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20 o 30 minutos entre sí) o secuencialmente en cualquier orden. La coadministración se puede lograr mediante co-formulación, es decir, preparando una única composición farmacéutica que incluya ambos agentes activos. En otras realizaciones, los agentes activos se pueden formular por separado. Los agentes activos y/o adyuvantes pueden unirse o conjugarse entre sí.

La coadministración también incluye la combinación con tratamientos para los trastornos de la epilepsia, tales como los requisitos dietéticos o los cambios en la dieta. Por consiguiente, clemizol, un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) o una composición farmacéutica del mismo se puede administrar a sujetos con dietas especializadas, que incluyen, pero no se limitan a, una dieta cetogénica (por ejemplo, una dieta alta en grasas, adecuada en proteínas y baja en carbohidratos).

2. Dosificaciones efectivas

La composición farmacéutica puede incluir clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) contenido en una cantidad terapéuticamente efectiva, es decir, en una cantidad efectiva para lograr su propósito pretendido. La cantidad real efectiva para una aplicación particular dependerá, entre otras cosas, de la afección que se esté tratando. Por ejemplo, cuando se administran en métodos para tratar un trastorno de epilepsia (por ejemplo, síndrome de Dravet), tales composiciones contendrán cantidades de clemizol, un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) o una composición farmacéutica del mismo eficaz para lograr el resultado deseado (por ejemplo, inhibir ataques).

La dosificación y frecuencia (dosis única o múltiples) de clemizol, un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) o una composición farmacéutica del mismo administrada puede variar dependiendo de una variedad de factores, incluida la ruta de administración; tamaño, edad, sexo, salud, peso corporal, índice de masa corporal y dieta del receptor; naturaleza y alcance de los síntomas de la enfermedad que se está tratando; presencia de otras enfermedades u otros problemas relacionados con la salud; tipo de tratamiento concurrente; y complicaciones de cualquier enfermedad o régimen de tratamiento. Pueden usarse otros regímenes o agentes terapéuticos junto con los métodos descritos en este documento.

Las cantidades terapéuticamente efectivas de clemizol, un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) o una composición farmacéutica del mismo para el tratamiento de enfermedades epilépticas descritas en

el presente documento pueden determinarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. Las concentraciones objetivo serán aquellas concentraciones de clemizol, un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) o una composición farmacéutica del mismo capaz de inhibir o disminuir de otro modo los ataques experimentados por un paciente.

- 5 Pueden determinarse cantidades terapéuticamente efectivas de clemizol, un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) o una composición farmacéutica del mismo para uso en humanos a partir de modelos animales. Por ejemplo, se puede formular una dosis para seres humanos para lograr una concentración que se ha demostrado que es eficaz en animales. La dosificación en humanos se puede ajustar controlando la respuesta del paciente al tratamiento y ajustando la dosificación hacia arriba o hacia abajo, como se describió anteriormente.
- 10 Las dosificaciones se pueden variar dependiendo de los requisitos del sujeto y del compuesto que se emplee. La dosis administrada a un sujeto, en el contexto de las composiciones farmacéuticas aquí presentadas, debería ser suficiente para lograr una respuesta terapéutica beneficiosa en el sujeto a lo largo del tiempo. El tamaño de la dosis también estará determinado por la existencia, naturaleza y alcance de los efectos secundarios adversos. Generalmente, el tratamiento se inicia con dosificaciones más pequeñas, que son menores que la dosis óptima del compuesto. A partir
- 15 de entonces, la dosificación se aumenta en pequeños incrementos hasta que se alcanza el efecto óptimo bajo las circunstancias.

Las cantidades e intervalos de dosificación se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles del clemizol administrado, un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) o una composición farmacéutica del mismo eficaz para el trastorno de epilepsia particular que se está tratando. Esto proporcionará un

20 régimen terapéutico acorde con la gravedad del estado de enfermedad del individuo.

Utilizando las enseñanzas proporcionadas en este documento, se puede planificar un régimen de tratamiento profiláctico o terapéutico eficaz que no cause una toxicidad sustancial y sea aún totalmente eficaz para tratar los síntomas clínicos demostrados por el paciente en particular. Esta planificación debe involucrar la selección cuidadosa de clemizol, un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) o una composición farmacéutica del mismo considerando factores tales como potencia, biodisponibilidad relativa, peso corporal del

25 paciente, presencia y gravedad de efectos secundarios adversos, modo preferido de administración, y el perfil de toxicidad del agente seleccionado.

3. Toxicidad

La relación entre la toxicidad y el efecto terapéutico de un compuesto en particular es su índice terapéutico y puede expresarse como la relación entre la LD₅₀ (la cantidad de compuesto letal en el 50% de la población) y la ED₅₀ (la cantidad de compuesto eficaz en el 50% de la población). Se prefieren los compuestos que presentan altos índices terapéuticos. Los datos de índice terapéutico obtenidos a partir de ensayos de cultivo celular y/o estudios en animales se pueden usar para formular un rango de dosificaciones para uso en humanos. La dosificación de tales compuestos se encuentra preferiblemente dentro de un rango de concentraciones plasmáticas que incluyen la ED₅₀ con poca o

30 ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada. Véase, por ejemplo Fingl et al., En: THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS, Ch.1, p.1, 1975. La formulación exacta, la ruta de administración y la dosificación pueden ser seleccionadas por el médico individual en vista de la condición del paciente y el método particular en el que se utiliza el compuesto.

40 Cuando se necesita o desea una aplicación parenteral, las mezclas particularmente adecuadas para clemizol o un análogo de clemizol (incluidas sus sales farmacéuticamente aceptables) incluidas en la composición farmacéutica pueden ser inyectables, soluciones estériles, oleosas o acuosas, así como suspensiones, emulsiones o implantes, incluidos los supositorios. En particular, los portadores para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de dextrosa, solución salina, agua pura, etanol, glicerol, propilenglicol, aceite de cacahuete, aceite de sésamo, polímeros

45 de bloques de polioxietileno y similares. Las ampollas son dosificaciones unitarias convenientes. Las mezclas farmacéuticas adecuadas para uso en las composiciones farmacéuticas presentadas en este documento pueden incluir las descritas, por ejemplo, en Pharmaceutical Sciences (17^a Ed., Mack Pub. Co., Easton, PA) y WO96/05309.

III. Ejemplos

1. Ejemplo 1

50 La epilepsia se puede adquirir como resultado de una lesión en el cerebro o una mutación genética. Entre las epilepsias genéticas se han identificado más de 650 variantes en el gen *SCN1A* (Harkin, LA et al. The spectrum of *SCN1A*-related infantile epileptic encephalopathies. Brain 130, 843-852 (2007); Mulley J. C., et al., *SCN1A* mutations and epilepsy. Hum. Mutat. 25, 535-542 (2005)). Las mutaciones de sentido contrario o de desplazamiento de marco en este gen se asocian con epilepsia generalizada con ataques febriles plus (GEFS+) ((Ceulemans, B. P., et al., Clinical correlations of mutations in the *SCN1A* gene: from febrile seizures to severe myoclonic epilepsy in infancy. Pediatric Neurol. 30, 236-243 (2004)) así como un trastorno más grave conocido como síndrome de Dravet. Los niños con DS inicialmente presentan un desarrollo normal, pero a menudo experimentan episodios convulsivos febriles durante el primer año de vida con una progresión eventual a ataques recurrentes espontáneos graves, discapacidad intelectual, ataxia y

disfunción psicomotora. Los ataques no se tratan adecuadamente con los fármacos antiepilépticos (AED) disponibles y estos niños son malos candidatos para la resección neuroquirúrgica (Bender, A. C., et al., *SCN1A* mutations in Dravet syndrome: Impact of interneuron dysfunction on neural networks and cognitive outcome. *Epilepsy Beh.* 23, 177-186 (2012)).

5 En el cerebro de los mamíferos hay cuatro subtipos principales de subunidades alfa de los canales de sodio controlados por voltaje: Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3 y Nav1.6, codificados por los genes *SCN1A*, *SCN2A*, *SCN3A* y *SCN8A*, respectivamente. La apertura de estos canales produce una conductancia de sodio y una despolarización rápida de la membrana celular, por ejemplo, características integrales para el inicio del potencial de acción (Catterall, W. A., et al., Nav1.1 channels and epilepsy. *J. Physiol.* 588, 1849-1859 (2010)). En ratones, Nav1.1 se expresa
10 ampliamente en el sistema nervioso central, incluido el segmento inicial del axón de las interneuronas hipocámpales positivas para parvalbúmina y las células principales excitadoras (Kim, D. Y., et al., Reduced sodium channel Na(v)1.1 levels in BACE1-null mice. *J. Biol. Chem.* 286, 8106-8116 (2011); Chen, C., et al., Mice lacking sodium channel beta1 subunits display defects in neuronal excitability, sodium channel expression, and nodal architecture. *J. Neurosci.* 24, 4030-4042 (2004)). La delección heterocigótica de Nav1.1 en ratones conduce a una reducción en la capacidad de
15 disparo de las interneuronas de picos rápidos disociadas de forma aguda (Yu, F. H., et al., Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Nat. Neurosci.* 9, 1142-1149 (2006)). Los ratones con delección heterocigótica global o específica de interneuronas de Nav1.1 exhiben ataques espontáneos e inducidos por la temperatura, ataxia leve, comportamientos similares al autismo y muerte prematura (Yu, F. H., et al., Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy
20 in infancy. *Nat. Neurosci.* 9, 1142-1149 (2006); Oakley, J. C., et al., Temperature- and age-dependent seizures in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 3994-3999 (2009); Cheah, C. S., et al., Specific deletion of Nav1.1 sodium channels in inhibitory interneurons causes seizures and premature death in a mouse model of Dravet syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 14646-14651 (2012)). El ratón con inserción que lleva un codón de parada prematuro en el dominio III del canal Nav1.1 también muestra una disminución en la
25 amplitud del pico durante la activación prolongada de interneuronas y una mayor sensibilidad a los ataques inducidos por la temperatura (Ogiwara, I., et al., Nav1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an *Scn1a* gene mutation. *J. Neurosci.* 27, 5903-5914 (2007)).

La generación y caracterización de modelos animales válidos es fundamental para los esfuerzos por comprender la fisiopatología del síndrome de Down y ayudar en la identificación de terapias novedosas. Si bien se ha prestado una
30 atención considerable al modelado de mutaciones de *SCN1A* en ratones, estos animales han demostrado ser difíciles de criar y los fenotipos de epilepsia están fuertemente influenciados por la genética de las cepas antecedentes. Se pueden generar células madre pluripotentes inducidas a partir de pacientes con DS, pero las neuronas individuales no recapitulan el entorno de red necesario para la generación de ataques in vivo. *Danio rerio* (pez cebra), una especie de vertebrado simple, proporciona un sistema modelo alternativo con ventajas significativas para la manipulación
35 genética, reproducción rentable y el descubrimiento de fármacos in vivo (Lessman, C. A., The developing zebrafish (*Danio rerio*): a vertebrate model for high-throughput screening of chemical libraries. *Birth Defects Res. C. Embryo Today* 93, 268-280 (2011); Delvecchio, C., et al., The zebrafish: a powerful platform for in vivo, HTS drug discovery. *Assay Drug Dev. Technol.* 9, 354-361 (2011); Rinkwitz, S., et al., Zebrafish: an integrative system for neurogenomics and neurosciences. *Prog. Neurobiol.* 93, 231-243 (2011)). Idealmente, un modelo animal debe basarse en una causa
40 genética conocida de la enfermedad (mutación *SCN1A*), recapitular con precisión las características clave de la enfermedad (epilepsia) y responder, o no, a las terapias comúnmente utilizadas en pacientes con la enfermedad (validación farmacológica). Si tiene éxito, tal modelo podría informar la comprensión del proceso de la enfermedad y catalizar las exploraciones hacia nuevas terapias.

En el pez cebra, la familia de canales de sodio controlados por voltaje consiste en cuatro conjuntos de genes duplicados: *scn1Laa* y *scn1Lab*, *scn4aa* y *scn4ab*, *scn5Laa* y *scn5Lab*, y *scn8aa* y *scn8ab* (Novak, A. E., et al., Embryonic and larval expression of zebrafish voltage-gated sodium channel alpha-subunit genes. *Dev. Dyn.* 235, 1962-1973 (2006)). El gen *scn1Lab* del pez cebra comparte una identidad del 77% con el *SCN1A* humano y se expresa en el sistema nervioso central. Se descubrió un mutante homocigótico de pez cebra para este gen (originalmente denominado *didy*^{s552}) en un cribado de mutagénesis química utilizando la respuesta optocinética como ensayo
50 (Schoonheim, P. J., Arrenberg, A. B., Del Bene, F., & Baier H., Optogenetic localization and genetic perturbation of saccade-generating neurons in zebrafish. *J. Neurosci.* 30, 7111-7120 (2010)). Estos tipos de cribados se basan en la inducción de mutaciones puntuales aleatorias utilizando el agente alquilante N-etil-N-nitrosourea (ENU), las mutaciones resultantes son típicamente de pérdida de función y recesivas. Aunque se trata de una mutación homocigótica, los mutantes de pez cebra *scn1Lab* son relevantes para el síndrome de Dravet humano autosómico dominante dada la duplicación del genoma en el pez cebra y la presencia de un homólogo adicional de Nav1.1 (*scn1Laa*). Los mutantes *scn1Lab* se caracterizaron a nivel molecular y de comportamiento, demostraron que los mutantes exhiben ataques espontáneos resistentes a los fármacos y luego los usaron en un nuevo programa de cribado de alto rendimiento para identificar compuestos que mejoran el fenotipo de la epilepsia. Una prueba de detección basada en el fenotipo identificó al clemizol, un compuesto aprobado por la FDA, como un inhibidor efectivo de las conductas convulsivas espontáneas y los ataques electrográficos en estos mutantes.
60

Expresión y caracterización *scn1Lab* del pez cebra mutante. El pez cebra con una mutación en el dominio III de un canal de sodio controlado por voltaje fue identificado por el Dr. Herwig Baier durante un cribado de mutagénesis química (Schoonheim, P. J., Arrenberg, A. B., Del Bene, F., & Baier H., Optogenetic localization and genetic

perturbation of saccade-generating neurons in zebrafish. *J. Neurosci.* 30, 7111-7120 (2010)). Los mutantes *scn1Lab* originales se retrocruzaron sobre el antecedente de Tupfel long (TL) durante 7-10 generaciones y confirmaron una mutación de metionina (M) a arginina (R) en la colonia (Fig. 1A). La transcriptasa reversa (RT) y la PCR cuantitativa (q) revelaron una disminución en la expresión de ARNm para *scn1Lab* en larvas mutantes a los 3, 5 y 7 días después de la fertilización (dpf) (Fig. 1B); los anticuerpos que reconocen esta proteína en el pez cebra no están disponibles. Como se esperaba (Novak, A. E., et al., Embryonic and larval expression of zebrafish voltage-gated sodium channel alpha-subunit genes. *Dev. Dyn.* 235, 1962-1973 (2006)), *scn1Lab* se expresa de manera prominente durante las primeras etapas del desarrollo larvario (Fig. 1B) y específicamente en el sistema nervioso central a 3 dpf (Figs. 1D, E). La hibridación in situ de montaje completo reveló una expresión difusa pero prominente en las regiones del cerebro correspondientes al cerebro anterior (telencéfalo), el tectum óptico y el cerebelo. Se observó un patrón de expresión similar para *scn1Laa* a 3 dpf. A los 5 y 7 dpf, la expresión del CNS permaneció prominente y también se observó una débil señal *scn1Lab* en el corazón (Fig. 1D). La expresión relativa de *scn8aa* o *scn8ab* (Na_v1.6), por ejemplo, una subunidad que se cree que actúa como un modificador genético del síndrome de Down (Martin, M. S., et al., The voltage-gated sodium channel Scn8a is a genetic modifier of severe myoclonic epilepsy of infancy. *Hum. Mol. Gen.* 16, 2892-2899 (2007)), no pudo revelar una diferencia significativa en la expresión entre mutantes y controles hermanos a 5 dpf (Fig. 1C). De manera similar, el análisis de microarreglos a 5 dpf tampoco pudo detectar un cambio compensatorio en la expresión del ARNm de trece subunidades *scn* de pez cebra diferentes (Tabla I), incluido el otro homólogo (*scn1Laa*). Estos resultados demuestran un defecto selectivo en un gen Na_v1.1 del pez cebra expresado en el CNS durante el desarrollo temprano.

20 Análisis transcriptómico a gran escala de mutantes *scn1Lab*. Aunque los trastornos hereditarios de los canales iónicos activados por voltaje se reconocen como una etiología de la epilepsia, no se ha informado de la investigación de cambios transcripcionales para ninguna canalopatía relacionada con la epilepsia. Para detectar diferencias en la expresión génica de una manera no sesgada, se utilizó un chip *Agilent Danio rerio* que cubría aproximadamente 44,000 sondas (Figuras 2A, B). Los análisis de agrupamiento jerárquico mostraron que ~2.5% (1099) de estas sondas se expresaron diferencialmente entre mutantes y controles hermanos a 5 dpf ($p \leq 0.01$, prueba t; 674 sobrerregulados y 425 subregulados); 405 fueron asignados a una categoría de "función desconocida". En la Fig. 2C se muestra una lista de 30 genes conocidos sobrerregulados y subregulados que muestran las mayores diferencias en la expresión. Estas diferencias fueron modestas ya que el 90% (990/1099) de los genes identificados exhibieron cambios de multiplicidad entre 0.8 y 2.0. Similar al análisis de microarreglos de ratones mutantes de gen único *Mecp2* (Jordan, C., et al., Cerebellar gene expression profiles of mouse models for Rett syndrome reveal novel MeCP2 targets. *BMC Med. Genet.* 8, 36 (2007)), muchos de los genes identificados no tenían una función y/o expresión obvia relacionada con el CNS.

Los dos genes más grandes de cambio de multiplicidad, somatolactina β y Na, K-ATPasa, tienen expresión principalmente restringida a la pituitaria (*smtlb*) (Lopez, M., et al., Expression of the somatolactin β gene during zebrafish embryonic development. *Gene Expr. Patterns* 6, 156-161 (2006)) o al oído, bulbo intestinal y conducto pronefrico (*atp1a1a.5*) (Blasiole, B., et al., Cloning, mapping, and developmental expression of a sixth zebrafish Na, K-ATPase alpha1 subunit gene (*atp1a1a.5*). *Mech. Dev.* 119, Suppl 1:S211-S214 (2002)). Las sondas para varios genes relacionados con la apoptosis (*casp8*, *casp8b* y *casp3b*) no revelaron ningún cambio estadísticamente significativo en los estudios de microarreglos. De los genes con expresión alterada en mutantes *scn1Lab*, seis estaban implicados previamente en trastornos neurológicos, por ejemplo, *pcdh19* (encefalopatía epiléptica infantil), *cyfip1* y *fxr2* (síndrome del X frágil), *ocrl* (síndrome de Lowe), *ubap2l* (enfermedad de Parkinson) y *oca2* (síndrome de Angelman). Se verificaron las medidas de expresión génica basadas en microarreglos para 14 genes seleccionados al azar usando qPCR (Fig. 3A).

Se asignaron funciones biológicas a todos los genes usando anotaciones de ontología genética (GO) y los 482 genes que mostraban al menos un cambio de 1.5 veces en la expresión y un valor de $p < 0.01$ se categorizaron además (Fig. 3C). Los genes de unión a iones de calcio incluyen anexina A1c, A1b y 2a, espectrina $\alpha 2$, neurexina 2a, calsinténina 1 y parvalbúmina 3. Cambios significativos en un canal de unión Gap (*cx43*), un gen involucrado en la agrupación de canales de sodio activados por voltaje en el segmento inicial del axón (*spna2*) y el dominio de ubiquitina de un receptor GABA (*map1lc3b*) también fueron notados. Se eligieron tres genes adicionales que no se encontraron en el microarreglo para el análisis de qPCR (Fig. 3B): *hcn1*, un gen que se ha mostrado correlacionado con *SCN1A* usando minería de datos y subregulado en varios modelos de ataques (Noam, Y., et al., Towards an integrated view of HCN channel role in epilepsy. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21, 873-879 (2011)) se redujo significativamente en mutantes *scn1Lab* en comparación con el control de hermanos ($p < 0.05$, prueba t de Student de 2 colas). Sin embargo, *homer* y *bdnf*, por ejemplo, genes implicados en la sinaptogénesis relacionada con la formación de sinapsis excitadoras recurrentes y epilepsia (Avedissian, M., et al., Hippocampal gene expression analysis using the ORESTES methodology shows that *homer 1a* mRNA is upregulated in the acute period of the pilocarpine epilepsy model. *Hippocampus* 17, 130-136 (2007); Tongiorgi, E., et al., Brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein are targeted to discrete dendritic laminae by events that trigger epileptogenesis. *J. Neurosci.* 24, 6842-6852 (2004)) se mantuvieron sin cambios.

Biological functions were

60 Ataques espontáneos en el pez cebra mutante *scn1Lab*. Se monitorizaron las mutaciones *scn1Lab* en busca de indicios electrográficos de ataques espontáneos a partir de los 3 dpf, por ejemplo, la primera etapa larvaria en la que se puede detectar la descarga epileptiforme (Baraban, S.C., et al., A large-scale mutagenesis screen to identify seizure-

resistant zebrafish. *Epilepsia* 48, 1151-157 (2007); Hortopan, G. A., et al., Spontaneous seizures and altered gene expression in GABA signaling pathways in a mind bomb mutant zebrafish. *J. Neurosci.* 30, 13718-13728 (2010); Hunt, R. F., Hortopan, G. A., Gillespie, A., & Baraban, S. C., A novel zebrafish model of hyperthermia-induced seizures reveals a role for TRPV4 channels and NMDA-type glutamate receptors. *Exp. Neurol.* 237, 199-206 (2012); Baraban, S. C., Taylor, M. R., Castro, P. A., & Baier H., Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience* 131, 759-768 (2005); Chege, S. W., Hortopan, G. A., Dinday, M. T., & Baraban, S.C., Expression and function of KCNQ channels in larval zebrafish. *Dev. Neurobiol.* 72, 186-198 (2012)). Las larvas mutantes se identificaron por su apariencia "negra" (Fig. 4A), que es indicativa de un defecto en la agregación del pigmento y mueren prematuramente entre 10 y 12 dpf, como se informó anteriormente (Novak, A. E., et al., Embryonic and larval expression of zebrafish voltage-gated sodium channel alpha-subunit genes. *Dev. Dyn.* 235, 1962-1973 (2006)). Las grabaciones del campo extracelular del cerebro anterior de mutantes *scn1Lab* paralizados e inmovilizados en agar se caracterizaron por frecuentes estallidos breves similares a interictales y eventos similares a ictales de gran amplitud y larga duración que comienzan en 3 dpf (n = 4) y progresivamente se vuelven más prominentes entre 4 y 7 dpf (n = 132) (Figura 2C). Estos eventos se confirmaron en el 100% de los mutantes a 3 dpf, 100% a 4 dpf, 97% a 5 dpf, 98% a 6 dpf y 100% a 7 dpf.

No se observaron eventos eléctricos anormales en los controles de hermanos de la misma edad en ninguna etapa del desarrollo (n = 36). Ataques inducidos por hipertermia (Hunt, R. F., Hortopan, G. A., Gillespie, A., & Baraban, S. C., A novel zebrafish model of hyperthermia-induced seizures reveals a role for TRPV4 channels and NMDA-type glutamate receptors. *Exp. Neurol.* 237, 199-206 (2012)) podrían evocarse en mutantes y controles *scn1Lab* 5 dpf a umbrales de temperatura aparentemente similares (mutante: 26.9 ± 0.5 C°; n = 14; control: 25.9 ± 0.5 C°; n = 14; p = 0.164 prueba t). Sin embargo, estas mediciones se complicaron, en mutantes, por la aparición simultánea de descargas epileptiformes espontáneas de alta frecuencia. Los mutantes tenían niveles elevados de actividad de natación y exhibían un comportamiento similar a un ataque no provocado que consistía en convulsiones de todo el cuerpo y movimientos rápidos no dirigidos a partir de 4 dpf (n = 36). En la Fig. 4B se muestra un gráfico de seguimiento de locomoción representativo de un mutante *scn1Lab* que muestra hiperactividad y comportamiento convulsivo. Este comportamiento es similar al que se clasifica como ataque en Estadio III en larvas expuestas a pentilentetrazol (Baraban, S. C., Taylor, M. R., Castro, P. A., & Baier H., Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience* 131, 759-768 (2005)). Los comportamientos convulsivos nunca se observaron en los controles en ninguna etapa del desarrollo (n = 36). En grupos de larvas de control de mutantes y hermanos, los mutantes *scn1Lab* permanecen cerca de los lados de la placa de Petri, que se considera una forma de tigmotaxis en los (Ellis, L. D., Seibert, J., & Soanes, K. H., Distinct modes of induced hyperactivity in zebrafish larvae. *Brain Res.* 1449, 46-59 (2012)). Estos resultados revelan un fenotipo de epilepsia impresionante en el pez cebrá mutante *scn1Lab*.

Evaluación farmacológica del pez cebrá mutante *scn1Lab*. Los ataques asociados con mutaciones de *SCN1A* responden mal a la mayoría de los AED. Para evaluar la farmaco-sensibilidad, se registraron ataques electrográficos espontáneos en mutantes *scn1Lab* embebidos en agar (5-6 dpf) bajo condiciones de línea base, y nuevamente después de la aplicación de un AED disponible comercialmente. Todos los fármacos se aplicaron en baño a una concentración de 1 mM; se probaron siete peces para cada fármaco. La frecuencia de eventos epileptiformes (incluidas descargas de tipo interictal e ictal) y el tiempo fraccional transcurrido en ataques en mutantes *scn1Lab* se redujeron mediante valproato, diazepam, bromuro de potasio y estiripentol (Figs. 5A, B, D). Las duraciones de las ráfagas no se modificaron significativamente para ninguna de estas exposiciones a fármacos (Fig. 5C).

Como se esperaba, la mayoría de los AED no tuvieron ningún efecto y la actividad epileptiforme se hizo más frecuente después de la exposición a carbamazepina (en 2 de 7 peces), etosuximida (4 de 7 peces) o vigabatrina (6 de 7 peces). Debido a que los niños con DS a menudo responden a la dieta cetogénica (KD) (Dravet, C., et al., Severe myoclonic epilepsy in infancy: Dravet syndrome. *Adv. Neurol.* 95, 71-102 (2005)) un grupo separado de mutantes *scn1Lab* estuvo expuesto, hermanos y controles WT a una forma de dieta durante 48 horas comenzando con 4 dpf. Los datos de seguimiento de locomoción en larvas expuestas a KD a 6 dpf confirman una reducción en el comportamiento similar a ataques para controlar los niveles en 7 de 10 mutantes (Fig. E; velocidad media, mutantes tratados = 0.43 ± 0.09 mm/seg, n = 16; un mutantes tratados = 0.81 ± 0.05 mm/s, n = 28; p < 0.05 ANOVA de Kruskal-Wallis en rangos con una comparación múltiple por pares de Dunn). No se observaron diferencias significativas en el comportamiento de nado en los controles hermanos tratados con KD (velocidad media = 0.63 ± 0.05 mm/seg, n = 20) en comparación con las larvas de WT sin tratar a 6 dpf (velocidad media = 0.62 ± 0.07 mm/seg.; n = 20). La exposición aguda (20 min) a la dieta no tuvo ningún efecto sobre el comportamiento de convulsiones mutantes en el ensayo de locomoción (n = 14; cambio en la velocidad media <34%). Grabaciones de campo del cerebro anterior posteriores obtenidas del mismo pez cebrá utilizado en el ensayo de locomoción (Fig. 5F, traza superior) confirmó la aparición de descarga epileptiforme espontánea para los mutantes *scn1Lab* expuestos al medio embrionario y una supresión de la actividad de ráfaga en mutantes expuestos al KD durante 48 h (Fig. 5F, traza inferior). Estos resultados demuestran que el perfil farmacológico de los mutantes *scn1Lab* se parece al observado en niños con síndrome de Down.

Cribado de fármacos de alto rendimiento en mutantes *scn1Lab*. Puesto que la actividad de ataques del comportamiento se monitoriza fácil y rápidamente utilizando un formato de seguimiento de locomoción (Baraban, S.C., et al., A large-scale mutagenesis screen to identify seizure-resistant zebrafish. *Epilepsia* 48, 1151-157 (2007); Hortopan, G. A., et al., Spontaneous seizures and altered gene expression in GABA signaling pathways in a mind bomb mutant zebrafish. *J. Neurosci.* 30, 13718-13728 (2010); Baraban, S. C., Taylor, M. R., Castro, P. A., & Baier H.,

Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience* 131, 759-768 (2005); Chege, S. W., Hortopan, G. A., Dinday, M. T., & Baraban, S.C., Expression and function of KCNQ channels in larval zebrafish. *Dev. Neurobiol.* 72, 186-198 (2012); Berghmans, S., Hunt, J., Roach, A., & Goldsmith, P., Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. *Epilepsy Res.* 75, 18-28 (2007); Baxendale, S., et al., Identification of compounds with anti-convulsant properties in a zebrafish model of epileptic seizures. *Dis. Model. Mech.* 5, 773-774 (2012); Cario, C. L., Farrell, T. C., Milanese, C., & Burton, E. A., Automated measurement of zebrafish larval movement. *J. Physiol.* 589, 3703-3708 (2011); Winter, M. J., et al., Validation of a larval zebrafish locomotor assay for assessing the seizure liability of early-stage development drugs. *J. Pharm. Tox. Methods* 5, 176-187 (2008); Orellana-Paucar, A. M., et al., Anticonvulsant activity of bisabolene sesquiterpenoids of *Curcuma longa* in zebrafish and mouse seizure models. *Epilepsy Beh.* 24, 14-22 (2012) (Figs. 4B and 5B1).

Se diseñó una estrategia de alto rendimiento basada en el fenotipo para seleccionar bibliotecas químicas en busca de compuestos que reduzcan el comportamiento mutante a la Etapa 0 (muy poca actividad de natación) o Etapa I (actividad de natación aumentada, pero no convulsiva), por ejemplo, un comportamiento equivalente al observado en mutantes WT normales. La medición automatizada de la actividad larvaria se logró utilizando el software de seguimiento EthoVision (Noldus Information Technology) y una cámara de alta velocidad. Estudios previos confirmaron que el movimiento a alta velocidad ≥ 20 mm/s corresponde a convulsiones paroxísticas similares a ataques (Etapa III) (Winter, M. J., et al., Validation of a larval zebrafish locomotor assay for assessing the seizure liability of early-stage development drugs. *J. Pharm. Tox. Methods* 5, 176-187 (2008); Orellana-Paucar, A. M., et al., Anticonvulsant activity of bisabolene sesquiterpenoids of *Curcuma longa* in zebrafish and mouse seizure models. *Epilepsy Beh.* 24, 14-22 (2012)).

Utilizando un formato de 96 pocillos, se siguió automáticamente la actividad de nado mutante en la línea base, y luego de nuevo después de la adición de un compuesto de prueba (100 μ l); cada compuesto se probó en 6 a 12 larvas individuales a 5 dpf. El cambio en la actividad de nado mutante entre dos épocas de registro consecutivas en medio embrionario se tomó como línea base y se muestra en la Fig. 6A (n = 28). Con base en una desviación estándar de 17.3 para los registros de línea base asociados simplemente con un intercambio de solución, se cribaron los compuestos que inhibían el movimiento (medido como un cambio en la velocidad media) en $\geq 34\%$. Para validar esta metodología, primero se cribaron once AEDs y el KD utilizando este ensayo. Como se esperaba de los ensayos electrofisiológicos (Fig. 5), diazepam, bromuro de potasio, estiripentol, valproato y una exposición de 48 horas a KD inhibieron eficazmente el comportamiento de ataques en el ensayo basado en locomoción (Fig. 6B); La ganaxolona, un esteroide neuroactivo relacionado con la alopregnalona, también fue eficaz. A continuación, se cribaron los compuestos de prueba a una concentración inicial de 667 μ M de una biblioteca que incluía fármacos aprobados por la US Food and Drug Administration (FDA) y probados en toxicología.

Entre los 320 compuestos examinados in vivo, se encontró que 18 inhibían significativamente los ataques espontáneos en mutantes *scn1Lab* a niveles comparables a los de la Etapa 0 o el comportamiento de la Etapa I y/o reducían la velocidad media de nado (círculos rojos en la Fig. 6C). A continuación, estos 18 compuestos se volvieron a probar en un grupo separado de mutantes *scn1Lab* a concentraciones de 667, 67 y 6.7 μ M. En el cribado inicial, se identificaron 81 compuestos como letales, es decir, sin latidos cardíacos visibles ni movimiento en respuesta al tacto después de una exposición de 30 minutos y se volvieron a evaluar a una dilución de 1:100; ninguno de estos avanzó más. La biblioteca de fármacos incluía un número de compuestos adicionales con propiedades anticonvulsivas putativas (beclamida, ácido aminohidroxibutírico y tiletamina) que también fueron ineficaces en el ensayo de locomoción de 96 pocillos a 667 μ M. 14 de los compuestos que se volvieron a probar o no lograron inhibir con éxito el comportamiento de ataques en un segundo grupo de mutantes *scn1Lab* o solo suprimieron el comportamiento a la concentración más alta de fármaco. Se seleccionaron los siguientes 4 compuestos (de 18) que fueron efectivos para reducir la actividad de natación inducida por ataques y la velocidad media en las tres concentraciones de fármaco para pruebas adicionales: zoxazolamina, HCl de clemizol, HCl de clorgilina y HCl de tolperisona (Fig. 6D). Cada uno de estos compuestos se evaluó por tercera vez en el ensayo de locomoción a una concentración de 100 μ M y, subsecuentemente, se monitorizó la actividad electrográfica del cerebro anterior. Clorgilina (un inhibidor de la monoamino oxidasa A) y los relajantes musculares zoxazolamina (Hadra, R. & Millichap J. G., Quantitative assessment of motor function in cerebral palsy: evaluation of zoxazolamine (flexin), a new muscular relaxant agent. *Neurology* 6, 843-852 (1956)) y tolperisona (Sakitama, K., The effects of centrally acting muscle relaxants on the intrathecal noradrenaline-induced facilitation of the flexor reflex mediated by group II afferent fibers in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* 63, 369-736 (1993)) se identificaron como "falsos positivos" porque redujeron la actividad de natación a esta concentración, pero cuando el mismo mutante se embebió en agar, todavía se observaron episodios de ataques electrográficos (véase la Fig. 6E).

Solo un compuesto, clemizol (antihistamínico e inhibidor de la unión del ARN NS4B) (Finkelstein, M., Kromer, C. M., Sweeney, S. A., & Delahunt C. S., Some aspects of the pharmacology of clemizole hydrochloride. *J. Am. Pharm. Assoc. Am. Pharm. Assoc.* 49, 18-22 (1960); Einav, S., Sobol, H. D., Gehrig, E., & Glenn J. S., Discovery of a hepatitis C target and its pharmacological inhibitors by microfluidic affinity analysis. *Nat. Biotechnol.* 26, 1019-1027 (2008)), fue eficaz para suprimir la actividad de ataques espontáneos en ambos ensayos (Fig. 6D-E). El clemizol no tuvo un efecto significativo sobre el comportamiento de los ataques en el ensayo de locomoción a concentraciones entre 6.25 y 50 μ M (n = 33). Como evaluación adicional del potencial terapéutico para el tratamiento con clemizol agudo, se demostró que el clemizol 100 μ M fue eficaz para reducir el comportamiento de ataques en el pez cebra WT expuesto a

pentilentetrazol 15 mM (Fig. 6D; n = 10), es decir, un modelo de ataques agudos con base en el antagonismo del receptor GABA. Estos resultados sugieren que los mutantes *scn1Lab* se pueden usar en un cribado de alto rendimiento para identificar posibles compuestos principales para el síndrome de Dravet.

El mutante de pez cebra *scn1Lab* descrito aquí es el primer modelo de vertebrado simple de una mutación del canal de sodio que recapitula las características del síndrome de Dravet, una forma catastrófica de epilepsia resistente a los fármacos en niños. Estos mutantes exhiben hiperactividad, incluyendo comportamiento convulsivo, ataques electrográficos espontáneos, vida útil más corta y un perfil farmacológico similar a la condición humana. El análisis molecular adicional de los mutantes *scn1Lab* sugiere la ausencia de grandes cambios en la expresión génica global y una falta de compensación, a nivel de ARN, por otras subunidades del canal de Na⁺ controlados por voltaje. Una estrategia de cribado de fármacos en dos etapas basada en el fenotipo para identificar compuestos líderes con el potencial de mejorar los fenotipos de la epilepsia asociados con la mutación *SCN1A* identificó un fármaco aprobado por la FDA (clemizol).

La actividad electroencefalográfica (EEG) es típicamente normal en el primer año de vida de los pacientes con síndrome de Down que evolucionan hacia una actividad paroxística y polipotencia anormal entre los 1 y los 9 años de edad. Este patrón dependiente de la edad se imitó en el desarrollo de larvas de pez cebra a edades en las que la expresión de *SCN1A* era significativa. Los registros extracelulares del cerebro anterior en larvas muy jóvenes (3 dpf) parecían en gran parte normales con la ocasional pequeña explosión de actividad de polipotencia. La actividad similar a interictal breve y frecuente con descargas de ráfagas de polipotencia de gran amplitud se hizo más prominente a medida que las larvas envejecían. La arquitectura de estos eventos eléctricos se asemejaba a los descritos previamente en larvas de tipo silvestre expuestas a pentilentetrazol (Baraban, S. C., Taylor, M. R., Castro, P. A., & Baier H., Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience* 131, 759-768 (2005)), 4-aminopiridina (Baraban, S.C., et al., A large-scale mutagenesis screen to identify seizure-resistant zebrafish. *Epilepsia* 48, 1151-157 (2007)), linopiridina (Chege, S. W., Hortopan, G. A., Dinday, M. T., & Baraban, S.C., Expression and function of KCNQ channels in larval zebrafish. *Dev. Neurobiol.* 72, 186-198 (2012)) o hipertermia (Hunt, R. F., Hortopan, G. A., Gillespie, A., & Baraban, S. C., A novel zebrafish model of hyperthermia-induced seizures reveals a role for TRPV4 channels and NMDA-type glutamate receptors. *Exp. Neurol.* 237, 199-206 (2012)).

La aparición de actividad electrográficos de ataques corresponde con hiperactividad, convulsiones de todo el cuerpo con actividad asociada de natación de alta velocidad y breve pérdida de postura en mutantes que se comportan libremente. Estos tipos de comportamientos espontáneos nunca se observan en larvas de tipo silvestre y, de nuevo, se parecen a los observados anteriormente solo durante la exposición a fármacos convulsivos. Estos comportamientos son un indicador indirecto de la actividad de ataques y podrían usarse para una evaluación rápida in vivo de los tratamientos farmacológicos y la letalidad en un formato de pozos múltiples utilizando un software de seguimiento de locomoción automatizado (Berghmans, S., Hunt, J., Roach, A., & Goldsmith, P., Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. *Epilepsy Res.* 75, 18-28 (2007); Baxendale, S., et al., Identification of compounds with anti-convulsant properties in a zebrafish model of epileptic seizures. *Dis. Model. Mech.* 5, 773-774 (2012); Winter, M. J., et al., Validation of a larval zebrafish locomotor assay for assessing the seizure liability of early-stage development drugs. *J. Pharm. Tox. Methods* 5, 176-187 (2008)). Los ataques en los mutantes de pez cebra *scn1Lab* respondieron a la dieta cetogénica y a cuatro AEDs (por ejemplo, valproato, benzodiazepina, bromuro de potasio y estiripentol) prescritos clínicamente para pacientes con DS.

De manera interesante, los eventos electrográficos de ataques en mutantes *scn1Lab* permanecieron sin cambios (o quizás empeoraron) en respuesta a varios AEDs disponibles comercialmente. Si bien es posible que se requieran concentraciones de fármaco superiores a 1 mM para abolir los eventos eléctricos, estos se considerarían concentraciones altas y potencialmente no selectivas. En ensayos de fármacos que utilizan un modelo de ataques agudos inducidos por PTZ en larvas de pez cebra (Baraban, S.C., et al., A large-scale mutagenesis screen to identify seizure-resistant zebrafish. *Epilepsia* 48, 1151-157 (2007); Berghmans, S., Hunt, J., Roach, A., & Goldsmith, P., Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. *Epilepsy Res.* 75, 18-28 (2007); Baxendale, S., et al., Identification of compounds with anti-convulsant properties in a zebrafish model of epileptic seizures. *Dis. Model. Mech.* 5, 773-774 (2012); Afrikanova, T., et al., Validation of the zebrafish pentylentetrazol seizure model: locomotor versus electrographic responses to antiepileptic drugs. *PLoS One* 8, e54166 (2013)), las concentraciones de AED de 1 mM e inferiores a menudo eran suficientes para evaluar la actividad antiepileptica. Al no responder a siete AEDs diferentes, este modelo se ajusta a la definición clínica de epilepsia farmacorresistente (de Toffol, B., et al., ESPERA study: Applicability of the new ILAE criteria for antiepileptic drug resistance of focal epilepsies in current clinical practice. *Epilepsy Behav* 25, 166-169 (2012)).

Durante casi 40 años, el descubrimiento y la identificación de nuevos AEDs se ha basado casi en su totalidad en modelos animales preclínicos de ataques adquiridos o agudas en roedores (Loscher, W. & Schmidt, D., Modern antiepileptic drug development has failed to deliver: Ways out of the current dilemma. *Epilepsia* 52, 657-658 (2011)). Esta metodología identificó con éxito fármacos que bloquean los ataques tónico-clónicos generalizados en humanos (Bialer, M. & White H. S., Key factors in the discovery and development of new antiepileptic drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 9, 10-19 (2012)) pero sigue siendo lento, intensivo en recursos, caro y laborioso. Si bien las pruebas contra PTZ u otros tipos de ataques adquiridos en larvas de pez cebra pueden ser más eficientes que ensayos similares en roedores (Berghmans, S., Hunt, J., Roach, A., & Goldsmith, P., Zebrafish offer the potential for a primary screen to

identify a wide variety of potential anticonvulsants. *Epilepsy Res.* 75, 18-28 (2007); Baxendale, S., et al., Identification of compounds with anti-convulsant properties in a zebrafish model of epileptic seizures. *Dis. Model. Mech.* 5, 773-774 (2012) Afrikanova, T., et al., Validation of the zebrafish pentyleneetetrazol seizure model: locomotor versus electrographic responses to antiepileptic drugs. *PLoS One* 8, e54166 (2013)), en última instancia deberían identificar las mismas clases de compuestos.

Por el contrario, aquí se describe una estrategia de cribado alternativa que utiliza un formato de 96 pocillos para una monitorización del comportamiento automatizada rápida seguida de un ensayo electrofisiológico sensible de la actividad electrográficas de ataques espontáneo en un pez mutante que imita un trastorno genético humano conocido. Esta estrategia in vivo monitoriza simultáneamente la letalidad y no se limita a *SCN1A*, sino que podría aplicarse a cualquier trastorno de epilepsia. De hecho, esta metodología basada en el fenotipo podría formar la base de una metodología genéticamente informada o "personalizada" para el descubrimiento de fármacos. Si bien se han desarrollado ratones modificados genéticamente que imitan mutaciones *SCN1A* conocidas y exhiben epilepsia, la reproducción puede ser complicada, la cepa antecedente puede modificar los fenotipos de los ataques y los AEDs rara vez se prueban en estos animales. Por ejemplo, en ratones mutantes *SCN1A^{RX+}*, el estiripentol y el clobazam solo se evaluaron para determinar los efectos sobre los umbrales de ataques inducidos por hipertermia (Cao, D., et al., Efficacy of stiripentol in hyperthermia-induced seizures in a mouse model of Dravet syndrome. *Epilepsia* 53, 1140-1145 (2012)). El tratamiento de ratones mutantes *SCN1A^{+/-}* con clonazepam, un modulador alostérico de los receptores GABA-A, rescató algunos de los comportamientos similares a autistas, pero no se evaluó como antiepiléptico (de Toffol, B., et al., ESPERA study: Applicability of the new ILAE criteria for antiepileptic drug resistance of focal epilepsies in current clinical practice. *Epilepsy Beh* 25, 166-169 (2012)).

Donde se han descrito modelos de epilepsia de roedores resistentes a fármacos, tales como el subgrupo de ratas de tipo silvestre seleccionadas de modelos de kindling o post-status epilepticus (Han, S., et al., Autistic-like behaviour in *Scn1a^{+/-}* mice and rescue by enhanced GABA-mediated neurotransmission. *Nature* 489, 385-390 (2012)), siguen estando mal caracterizados y no son adecuados para las etapas iniciales de alto rendimiento del cribado de fármacos. Por el contrario, utilizando un mutante *scn1Lab* de pez cebra con una identidad de secuencia superior al 75% para una mutación del canal de sodio humano, se completó un perfil transcriptómico a gran escala de más de 44,000 sondas, demostró una progresión del desarrollo de la expresión del canal *scn1Lab* y fenotipos epilépticos, analizó los efectos de las terapias antiepilépticas disponibles y se cribó una biblioteca química de 320 compuestos contra los ataques espontáneos no provocados. Aunque este primer cribado de prueba de principio se logró con un pez por pozo, de 6 a 12 peces por ensayo y un ensayo por semana, la facilidad con la que se puede escalar el pez cebra (especialmente en un entorno comercial) para estudiar de cientos a miles de larvas por semana hacen de este un sistema atractivo para un programa rápido de descubrimiento de fármacos in vivo de primera etapa a gran escala. La evaluación simultánea in vivo de la toxicidad, una de las mayores fuentes de fallas en el traslado de compuestos guía del laboratorio a la clínica, es una ventaja crítica de esta metodología sobre las estrategias de cribado con base en cultivos organotípicos del hipocampo o *in silico* disponibles.

Aunque los datos de descubrimiento de fármacos en modelos animales deben tratarse con precaución, el clemizol, un compuesto con propiedades inhibitoras de antagonista de H1 y ARN NS4B, es un fármaco aprobado por la FDA con un perfil toxicológico seguro que surgió de este cribado y ofrece un punto de partida interesante para futuras investigaciones. Por ejemplo, aunque recientemente se reconoció que los antihistamínicos inhiben los ataques inducidos en ratas recién nacidas (Yamada, K., Takizawa, F., Tamura, T., & Kanda T., The effect of antihistamines on seizures induced by increasing-current electroshocks: ketotifen, but not olopatadine, promotes the seizures in infant rats. *Biol. Pharm. Bull.* 35, 693-697 (2012)), sin estar sujeto a ninguna teoría en particular, es probable que este no sea el mecanismo de acción aquí. Se demostró que otros cuatro antihistamínicos H1 (maleato de pimetixeno, HCl de clorpiramina, naftalenosulfonato de mebhidrolina e iproheptina) no lograron suprimir el comportamiento convulsivo en mutantes *scn1Lab*. Adicionalmente, la evidencia sugiere el potencial de los antihistamínicos H1 para modificar de manera adversa los ataques en los niños (Miyata, I., Saegusa, H., & Sakurai, M., Seizure-modifying potential of histamine H1 antagonists: a clinical observation. *Pediatr. Int.* 53, 706-708 (2011)) indicando que se requerirá un análisis más detallado para identificar un mecanismo de acción. Dado que el clemizol también fue eficaz en una versión de pez cebra de la prueba de Metrazol, puede valer la pena realizar pruebas preclínicas adicionales en el NIH-sponsored Anticonvulsant Drug Development Program en la Universidad de Utah. Lo más importante es que estos estudios sugieren que el cribado de fármacos in vivo y el análisis experimental del pez cebra mutante *scn1Lab* podrían resultar extremadamente valiosos para comprender (y tratar) el síndrome de Dravet.

Animales. Los embriones de pez cebra de *Scn1Lab* (*didy^{s552}*) fueron un amable regalo de Herwig Baier. El Pez cebra adulto HuC: GFP fue un amable regalo de Stephen Ekker. Los peces cebra se generaron y mantuvieron de acuerdo con las directrices del University of California, San Francisco Committee on the Use and Care of Animals. Las larvas de pez cebra se mantuvieron en "medio embrionario" que consistía en Instant Ocean al 0-03% (Aquarium Systems, Inc., Mentor, OH, EE.UU.) en agua desionizada que contenía azul de metileno al 0.002% como fungicida. Las nidadas de larvas de pez cebra se criaron a partir de animales heterocigotos *scn1Lab* que se habían retrocruzado con TL de tipo silvestre o pez cebra HuC:GFP durante al menos 7 generaciones. Se utilizaron mutantes homocigotos (clasificados con base en la pigmentación) y larvas de hermanos de la misma edad. Aunque se desconoce el defecto genético preciso responsable del problema de la pigmentación de la piel, es interesante que en los datos de la micromatriz se observó una sobrerregulación de 1.5 veces de un gen que codifica el receptor de melanocortina 5a.

Monitorización de ataques. Se describieron procedimientos para el seguimiento de la locomoción y la electrofisiología (Baraban, S.C., et al., A large-scale mutagenesis screen to identify seizure-resistant zebrafish. *Epilepsia* 48, 1151-157 (2007); Baraban, S. C., Taylor, M. R., Castro, P. A., & Baier H., Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience* 131, 759-768 (2005)). En experimentos piloto, el pez cebra HuC: GFP se utilizó en experimentos de electrofisiología para obtener una estimación de la ubicación de los electrodos de grabación. Se obtuvieron gráficos de locomoción para un pez por pocillo en una época de registro de 10 minutos utilizando un sistema DanioVision que ejecuta el software EthoVision XT (Noldus Information Technology; Leesburg, VA). La puntuación de los ataques se realizó como se describe (Baraban, S. C., Taylor, M. R., Castro, P. A., & Baier H., Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience* 131, 759-768 (2005)). Los gráficos de locomoción se analizaron para la distancia recorrida (en mm) y la velocidad media (en mm/seg). Los eventos epileptiformes se analizaron en pClamp (Molecular Devices; Sunnyvale, CA) y se definieron como deflexiones de la membrana hacia arriba o hacia abajo superiores a 2x el nivel de ruido de línea base y se clasificaron bien sea como interictales (duración de 100 a 300 ms) o como ictales (duración de 1000 a 5000 mseg). La frecuencia de la ráfaga se determinó contando el número de episodios epileptiformes por minuto durante una época de registro de 10 minutos. La duración de la ráfaga se determinó midiendo el intervalo de inicio a desplazamiento para todos los eventos durante la misma época.

Los fármacos se obtuvieron de Sigma-Aldrich y se disolvieron en medio embrionario. Se prepararon soluciones madre en medio embrionario a 1 mM y se ajustó el pH a ~ 7.5. Ganaxolona fue un amable regalo de BioCrea GmbH (Radebeul, Alemania). Los compuestos para el cribado de fármacos se adquirieron de MicroSource Discovery Systems, Inc. (International Drug Collection; Gaylordsville, CT) y se proporcionaron como soluciones de DMSO 10 mM. Los compuestos de prueba se disolvieron en medio embrionario y se probaron a concentraciones entre 6.7 y 667 μ M; concentración final de DMSO ~7%. Se eligió una concentración de cribado inicial de 667 μ M para los estudios de comportamiento en peces que nadan libremente, ya que se encuentra en el rango más bajo de concentraciones de AED previamente reportadas como efectivas contra los ataques inducidos por PTZ (10-20 mM) en larvas de pez cebra (0.1 a 25 mM) (Baraban, S. C., Taylor, M. R., Castro, P. A., & Baier H., Pentylentetrazole induced changes in zebrafish behavior, neural activity and c-fos expression. *Neuroscience* 131, 759-768 (2005); Berghmans, S., Hunt, J., Roach, A., & Goldsmith, P., Zebrafish offer the potential for a primary screen to identify a wide variety of potential anticonvulsants. *Epilepsy Res.* 75, 18-28 (2007); Afrikanova, T., et al., Validation of the zebrafish pentylentetrazol seizure model: locomotor versus electrographic responses to antiepileptic drugs. *PLoS One* 8, e54166 (2013)) y fue el uso más eficiente del pequeño volumen de solución madre (250 μ L) proporcionada por MicroSource Discovery Systems, Inc. Se seleccionó una concentración ligeramente mayor (1 mM) para los ensayos iniciales de validación del AED en las Figuras 5 y 6 para tener en cuenta las posibles complicaciones asociadas con la difusión a través del agar. Se evaluó la toxicidad del DMSO en diluciones entre 0.01 y 100% utilizando larvas de tipo silvestre (n = 12 peces por concentración); DMSO a > 25% fue letal.

En todos los estudios de cribado de fármacos, los compuestos se codificaron y los experimentos fueron realizados por investigadores ciegos a la naturaleza del compuesto. Se obtuvieron grabaciones de línea base de la actividad de ataques de mutantes bañados en medio embrionario; a continuación, se obtuvo un segundo gráfico después de un cambio de solución a un compuesto de prueba. Cada compuesto de prueba clasificado como "impacto positivo" en el ensayo de locomoción se confirmó visualmente como vivo con base en el movimiento en respuesta al tacto y latidos cardíacos visibles. Los peces WT exhiben poca o ninguna actividad de natación espontánea durante estas épocas de grabaciones de 10 minutos (véase Fig. 3B) y no se usaron en el ensayo de descubrimiento de fármacos.

Se describieron procedimientos para microarreglos, PCR cuantitativa e hibridación in situ de montaje completo (Hortopan, G. A., et al., Spontaneous seizures and altered gene expression in GABA signaling pathways in a mind bomb mutant zebrafish. *J. Neurosci.* 30, 13718-13728 (2010)).

Los datos se presentan como media y SEM, a menos que se indique otra cosa. La significación estadística por pares se determinó con la prueba t de Student para datos no emparejados de dos colas, ANOVA o prueba de suma de rangos de Mann-Whitney, según fuera apropiado, a menos que se indique otra cosa. Los resultados se consideraron significativos a $P < 0.05$, a menos que se indique otra cosa.

1. Ejemplo 2

Con base en la discusión anterior y algo de actividad observada en las dosis de 100 y 300 mg/kg en cribado cualitativo de MES en ratones, se procedió con pruebas cuantitativas en el modelo de ratón MES/scMET/Tox para determinar la ED50/TD50. Durante la determinación del TPE en el modelo MES, no se observó actividad a la dosis inicial de 300 mg/kg. Sin embargo, se observó actividad a la dosis de 500 mg/kg con 2/4 animales protegidos a los 0.25 min y 4/4 animales protegidos a los 30 minutos. No se observó actividad o toxicidad (incapaz de agarrar el rotorod) en ninguna otra dosis o punto de tiempo probado. No se observó actividad en el modelo scMET. Los datos del modelo MES muestran que hay una actividad/protección significativa con ASP469016 en este modelo de ratón con una ED50 <400 mg/kg.

Resultados del cribado de anticonvulsivos: cuantificación de IP de ratones

ES 2 813 450 T3

ID ASP: 469016	*	ID de Cribado: 1	ID del Patrocinador: 642	Clase de patrocinador:	Patrocinador ASP/CM
Código de solvente:	MC	Prep. de solvente			
Peso del animal	- g				
Fecha iniciada:	06-May-2014	Fecha de finalización	09-May-2014		
Referencia:	503:297,297.509:3,4				

Valor ED50

Prueba	Tiempo (Hrs)	ED50	95% de intervalo de confianza	Pendiente	STD Err	Valor PI
MES	0.5	< 400.0	-			
SCMET	0.5	> 250.0	-			
TOX	0.5	> 500.0	-			

Respuesta biológica ED50

Prueba	Tiempo (hr)	Dosis (mg/kg)	Dths	N/F	C
MES	0.50	350		0/8	
MES	0.50	400		7/8	
MES	0.50	500		4/4	
SCMET	0.50	200		0/8	
SCMET	0.50	250		0/4	
TOX	0.50	500		0/4	

Nota: La presencia de un asterisco (*) indica que hay varios códigos de comentarios.

5

Tiempo hasta el efecto pico

Time (Horas)			0.25		0.5		1.0		2.0		4.0		6.0		8.0		24		3.0	
Prueba	Dosis	Dths	N/F	C	N/F	C	N/F	C	N/F	C	N/F	C	N/F	C	N/F	C	H/F	C	N/F	C
MES	300		0/4		0/4		0/4		0/4		0/4		/		/		/		/	
MES	500		2/4		4/4		0/4		0/4		0/4		/		/		/		/	
TOX	400		0/8		0/8		/		/		/		/		/		/		/	
TOX	500		0/4		0/4		0/4		/		/		/		/		/		/	

Nota: WF = número de animales activos o tóxicos sobre el número probado.
C = Código de comentario La presencia de un asterisco (*) indica que hay múltiples códigos de comentario.

Comentarios a los NIH:

Comentarios proveedor: al Las dosis de MES de 350 m/kg y 400 m/kg y la dosis de Scmet de 200 m/kg se realizaron con el lote de Ori y todas las demás dosis se realizaron con el lote A. Material insuficiente para continuar con las pruebas adicionales.

2. Ejemplo 3

10 ASP469016 se probó en nuestro cribado inicial T31 (MES/scMET/Tox) a 30, 100 y 300 mg/kg. Los datos para cada condición se presentan como N/F, donde N es igual al número de animales protegidos y F es igual al número de

5 animales probados. Para las pruebas de toxicidad (TOX), N es igual al número de animales que presentan efectos tóxicos y F es igual al número de animales probados. Los códigos de la columna C se refieren a los comentarios de los técnicos que realizan el experimento y se definen en la sección de comentarios si es necesario. Se anota cualquiera de las muertes. Como se muestra en el modelo de 6 Hz (32 mA), solo 1/4 de los animales fueron protegidos a 100 mg/kg a los 30 min. En el modelo de ataques inducidos por MES, solo 1/4 de los animales fueron protegidos a 100 y 300 mg/kg a los 30 min. No se detectó toxicidad (incapaz de captar el rotorod) o actividad en ninguna otra dosis o punto de tiempo probado.

Resultados del cribado de anticonvulsivos - MES de ratones e identificación de 6Hz

ID ASP: 469016	U	ID de Cribado: 1	ID del Patrocinador: 642	Clase de Patrocinador:	de ASP/CM
Código de solvente:	MC	Prep. de solvente:	M&P,SB	Código de ruta:	IP
Peso del animal	- g			6Hz	32
				Corriente(mA):	
Fecha iniciada:	11-Feb-2014	Fecha de finalización	11-Feb-2014		
Referencia:	503:153.				

10 Respuesta

Tiempo (Horas)	0.5		2.0		0.25		1.0		4.0		6.0		3.0		8.0		24		
	N/F	C	N/F	C	N/F	C	N/F	C	N/F	C	N/F	C	N/F	C	N/F	C	N/F	C	
Prueba Dosis Forma Dths																			
6HZ 30	0/4		0/4		/		/		/		/		/		/		/		/
6HZ 100	1/4		0/4		/		/		/		/		/		/		/		/
6HZ 300	0/4		0/4		/		/		/		/		/		/		/		/
MES 30	0/4		0/4		/		/		/		/		/		/		/		/
MES 100	1/4		0/4		/		/		/		/		/		/		/		/
MES 300	1/4		0/4		/		/		/		/		/		/		/		/
TOX 30 SUS	0/8		0/8		/		/		/		/		/		/		/		/
TOX 100 SUS	0/8		0/8		/		/		/		/		/		/		/		/
TOX 300 SUS	0/8		0/8		/		/		/		/		/		/		/		/

Nota: N/F = número de animales activos o tóxicos sobre el número probado.
 = Código de comentario. La presencia de un asterisco (*) indica que hay múltiples códigos de comentario.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado de clemizol, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para uso en un método de tratamiento de un trastorno de epilepsia, comprendiendo dicho método administrar a un sujeto en necesidad del mismo, una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto, en el que la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de adición de ácido inorgánico de clemizol, una sal de amonio cuaternario de clemizol o una sal de adición de ácido orgánico de clemizol seleccionada de un maleato, acetato, citrato, fumarato, propionato, isobutirato, undecilato, malato, malonato, suberato, lactato, mandelato, ftalato, oxalato, bencenosulfonato, p-toluisulfonato, metanosulfonato, tartrato, succinato, benzoato y una sal de clemizol con un aminoácido.
2. El compuesto para el uso de la reivindicación 1, en el que la sal farmacéuticamente aceptable es un hidrocloruro de clemizol, un hidrobromuro de clemizol, un hidroyoduro de clemizol, un sulfato de clemizol, un fosfato de clemizol, un monohidrogenofosfato de clemizol, un dihidrogenofosfato de clemizol, un nitrato de clemizol, un carbonato de clemizol, un monohidrogenocarbonato de clemizol, un maleato de clemizol, un acetato de clemizol, un citrato de clemizol, un fumarato de clemizol, un propionato de clemizol, un isobutirato de clemizol, un undecilato de clamizol, un malato de clamizol, un malonato de clemizol, un suberato de clemizol, un lactato de clemizol, un mandelato de clemizol, un ftalato de clemizol, un oxalato de clemizol, un bencenosulfonato de clemizol, un p-toluisulfonato de clemizol, un metanosulfonato de clemizol, un tartrato de clemizol, un succinato de clemizol, un benzoato de clemizol, una sal de clemizol con un aminoácido o una sal de amonio cuaternario de clemizol.
3. El compuesto para el uso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicho trastorno de epilepsia es:
- (i) síndrome de Dravet, síndrome de Lennox-Gastaut, espasmo infantil, o síndrome de Ohtahara; o
- (ii) síndrome de Dravet; o
- (iii) un trastorno de epilepsia pediátrico.
4. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el compuesto inhibe conductas compulsivas o ataques electrográficos en un sujeto con epilepsia, un sujeto con enfermedad de Alzheimer, un sujeto con autismo o un sujeto con enfermedad de Parkinson.
5. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la administración del compuesto reduce la incidencia de ataques no provocados en dicho sujeto en comparación con la ausencia del compuesto.
6. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la administración del compuesto reduce o previene los ataques mioclónicos o el estado epiléptico en dicho sujeto en comparación con la ausencia del compuesto.
7. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicho sujeto tiene una dieta cetogénica.
8. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que:
- (i) el compuesto se administra al sujeto en una cantidad de aproximadamente 0.1 mg a aproximadamente 1000 mg por kg de peso corporal; o
- (ii) el compuesto se administra al sujeto en una dosis diaria de aproximadamente 0.1 mg a aproximadamente 1000 mg por kg de peso corporal a dicho sujeto.
9. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el compuesto es HCl de clemizol.
10. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el compuesto se administra como una composición farmacéutica, en el que opcionalmente la composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto.
11. El compuesto para el uso de la reivindicación 10, en el que la composición farmacéutica comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.
12. El compuesto para el uso de la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en el que dicha composición farmacéutica comprende el compuesto y un fármaco antiepiléptico (AED).
13. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el compuesto se coadministra con un fármaco antiepiléptico (AED).
14. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el compuesto es una terapia complementaria con un fármaco antiepiléptico (AED).
15. El compuesto para el uso de la reivindicación 13 o la reivindicación 14, en el que el AED se administra simultáneamente o secuencialmente con el compuesto.

16. El compuesto para el uso de cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en el que dicho AED es

- 5 (i) acetazolamida, benzodiazepina, cannabadióles, carbamazepina, clobazam, clonazepam, acetato de eslicarbazepina, etosuximida, etotoína, felbamato, fenfluramina, fosfenitoína, gabapentina, ganaxolona, huperzina A, lacosamida, lamotrigina, levetiracetam, nitrazepam, oxcarbazepina, perampanel, piracetam, fenobarbital, fenitoína, bromuro de potasio, pregabalina, primidona, retigabina, rufinamida, valproato de sodio, estiripentol, tiagabina, topiramato, vigabatrina o zonisamida; o
- (ii) ácido valproico, valproato, clonazepam, etosuximida, felbamato, gabapentina, carbamazepina, oxcarbazepina, lamotrigina, levetiracetam, benzodiazepina, fenobarbital, pregabalina, primidona, tiagabina, topiramato, bromuro de potasio, fenitoína, estiripentol, vigabatrina o zonisamida; o
- 10 (iii) ácido valproico, valproato, Gabapentina, topiramato, carbamazepina, oxcarbazepina o vigabatrina.

FIG. 1A

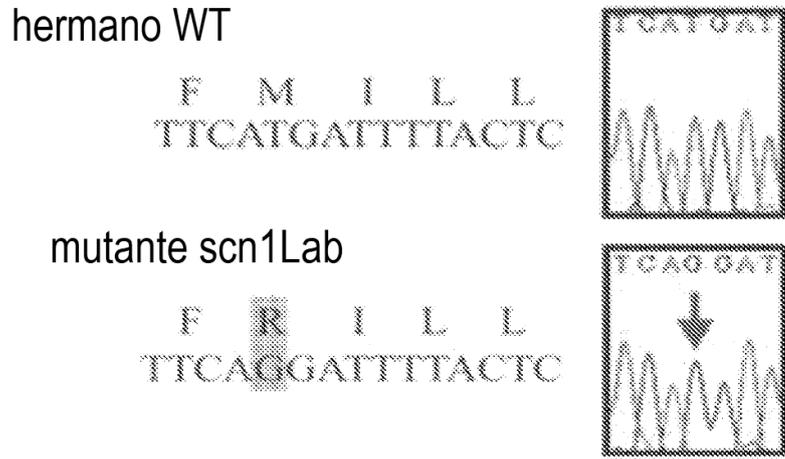


FIG. 1B

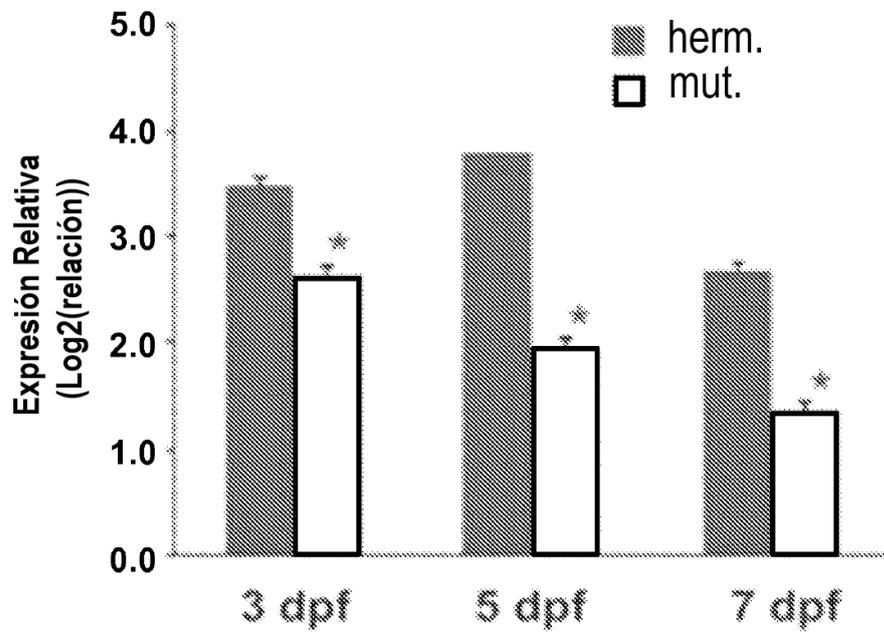


FIG. 1C

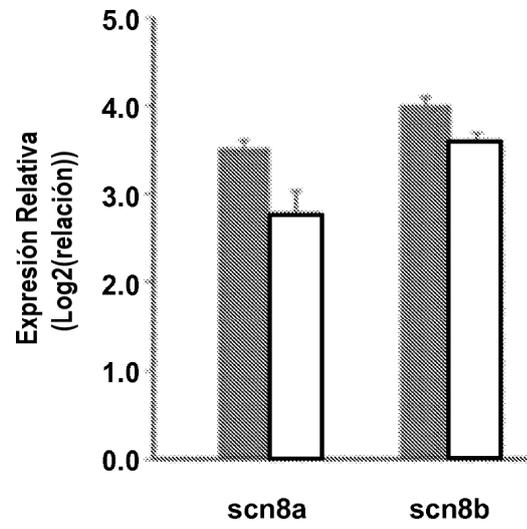


FIG. 1D

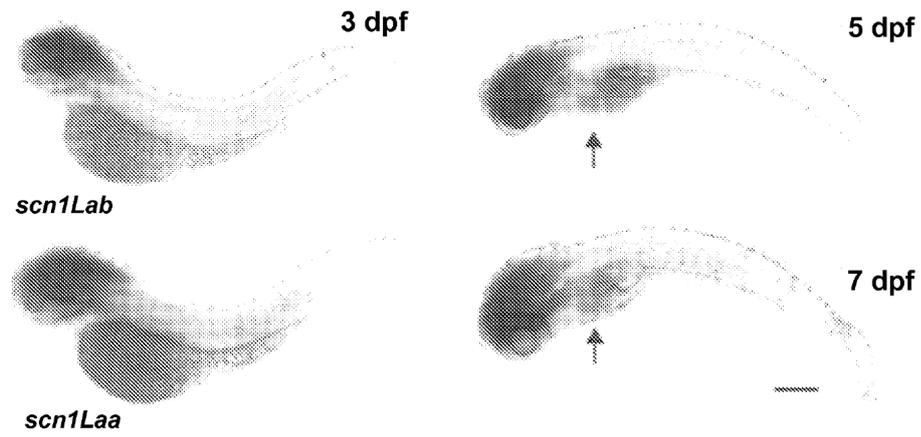


FIG. 1E

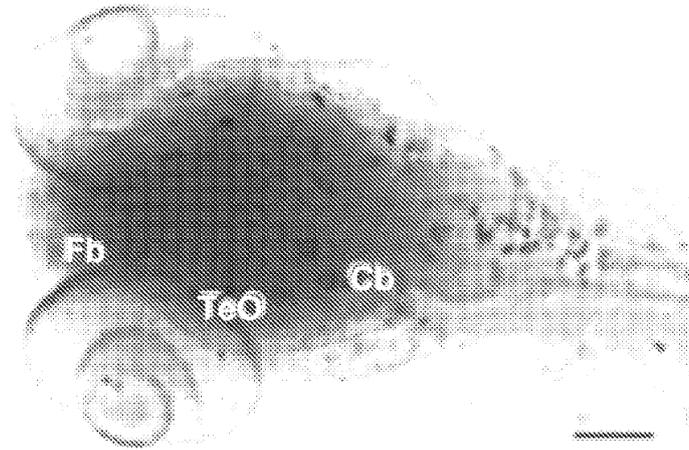


FIG. 2A

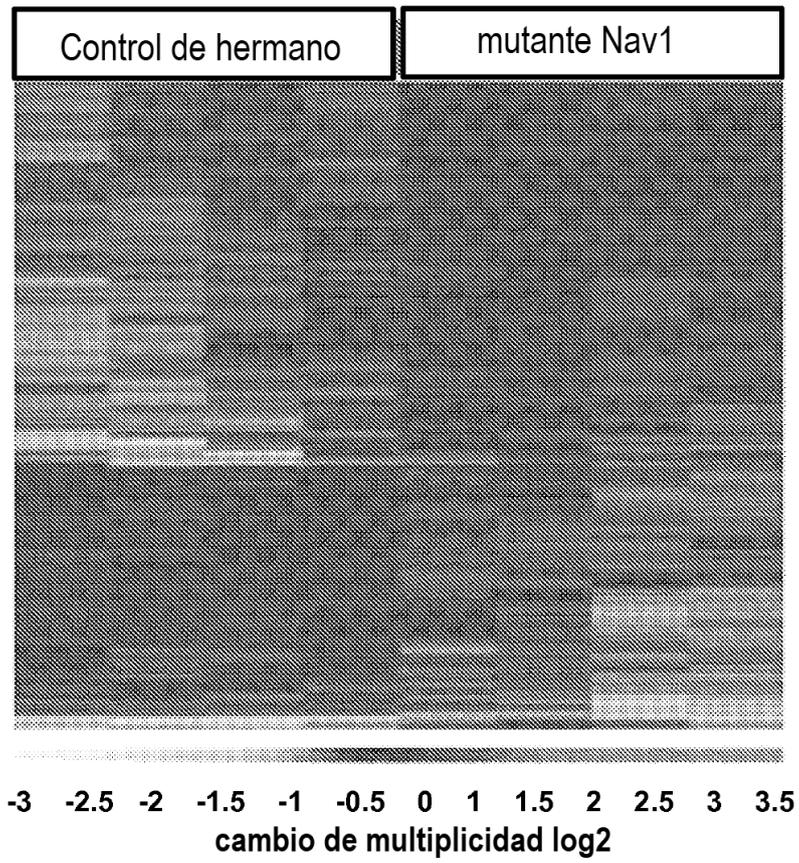


FIG. 2B

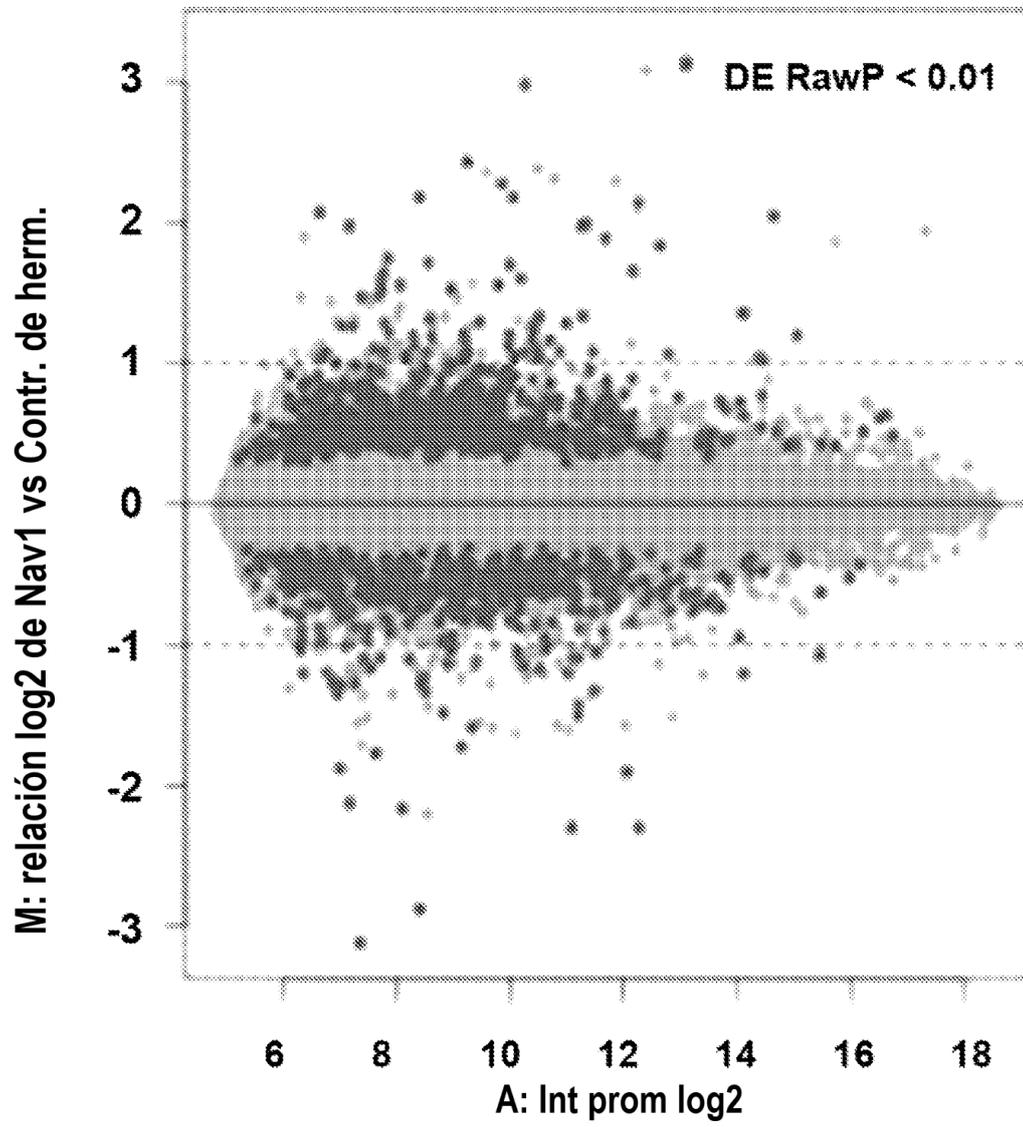


FIG. 2C

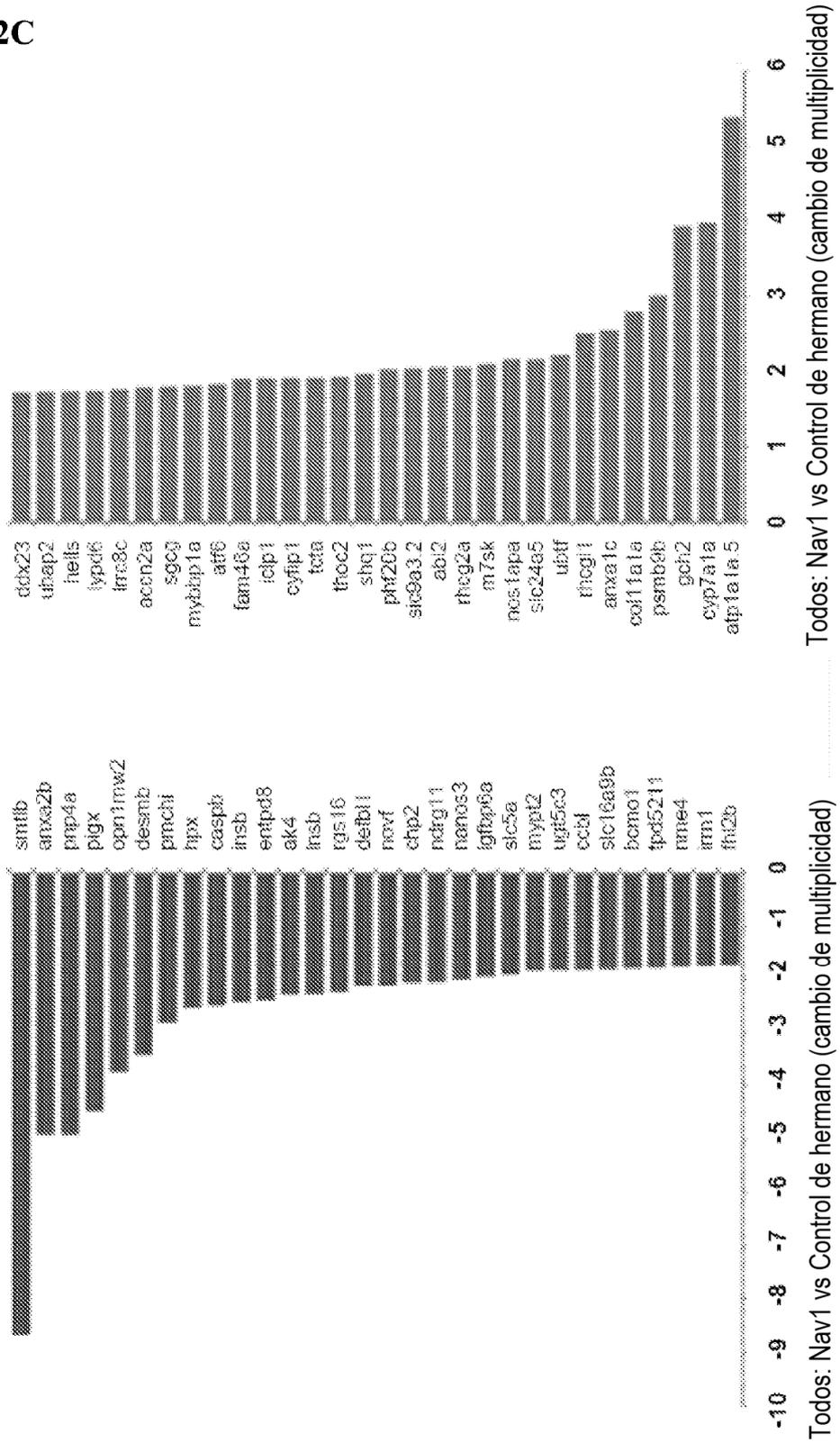


FIG. 3A

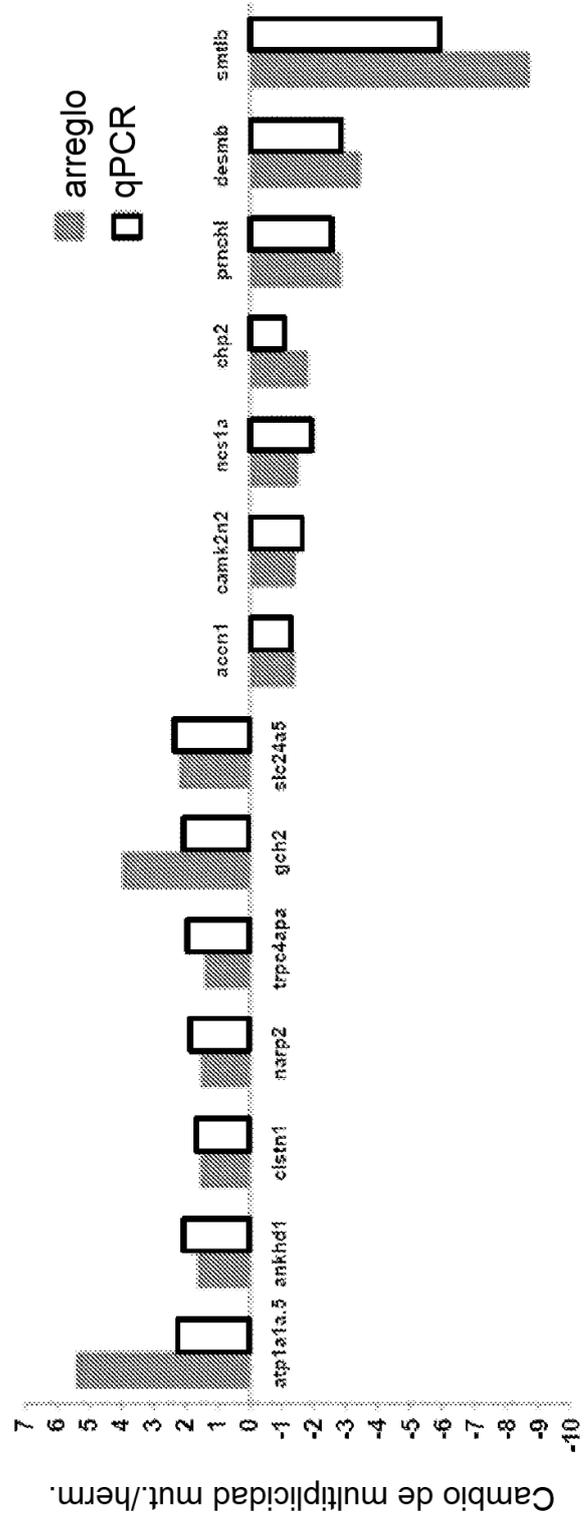


FIG. 3B

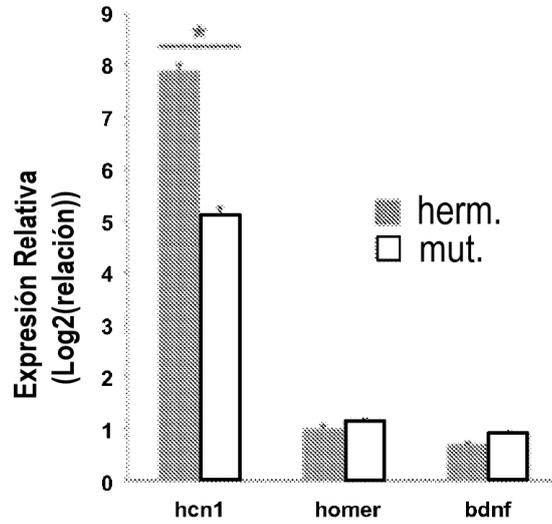


FIG. 3C

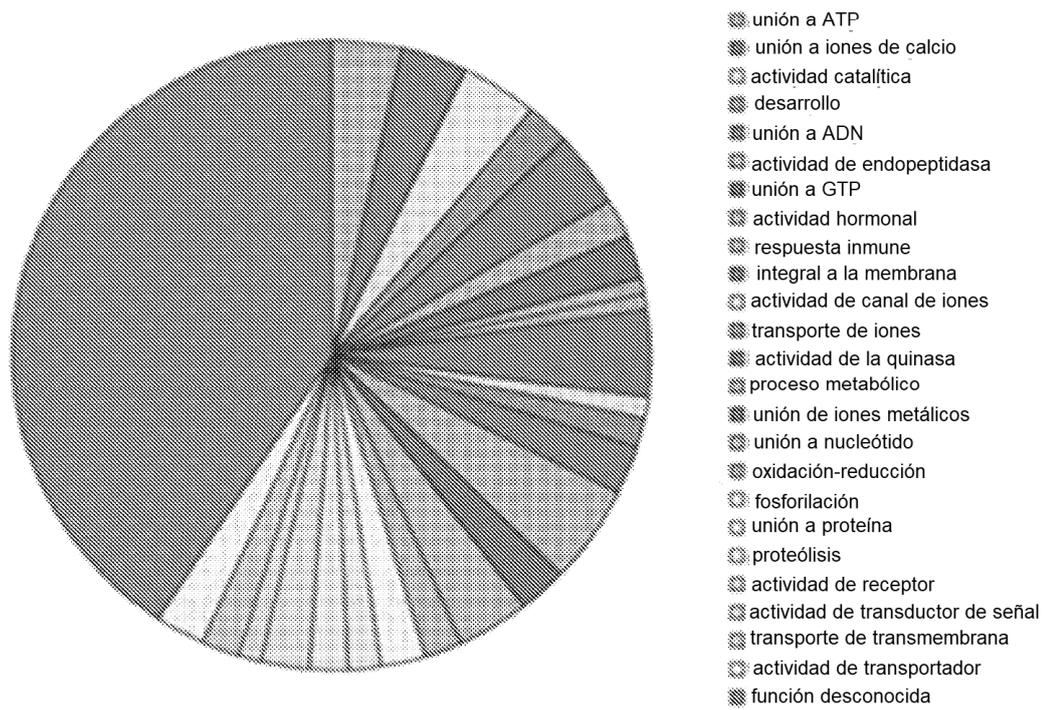


FIG. 4A

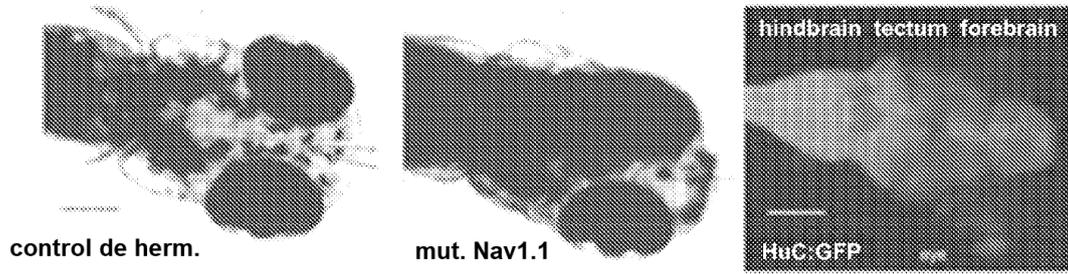


FIG. 4B

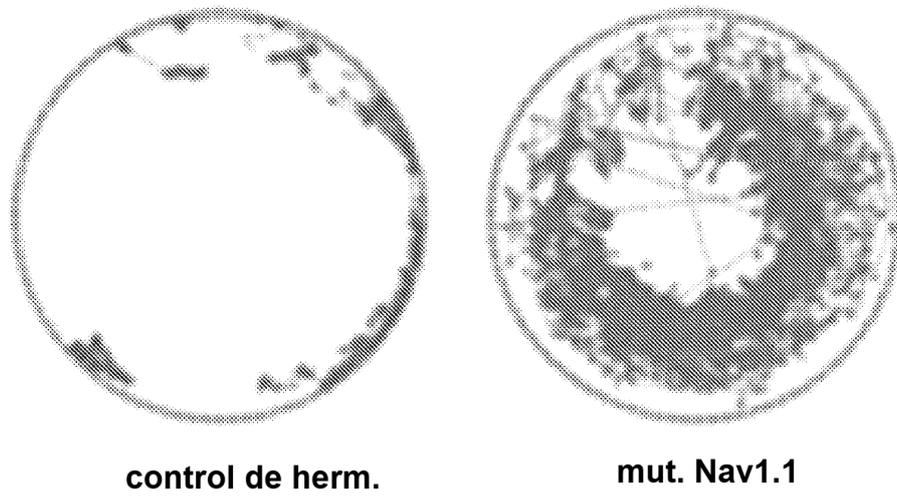


FIG. 4C

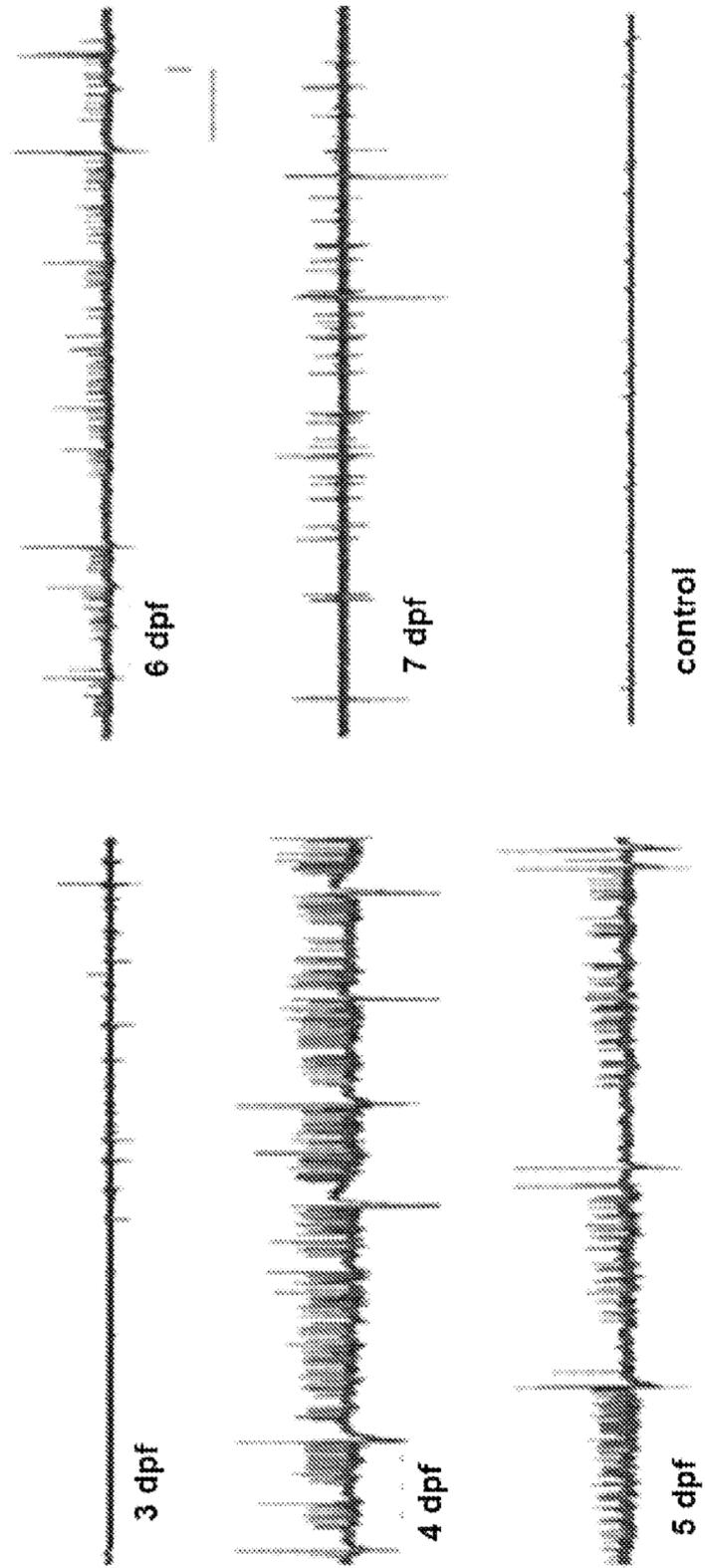


FIG. 5A

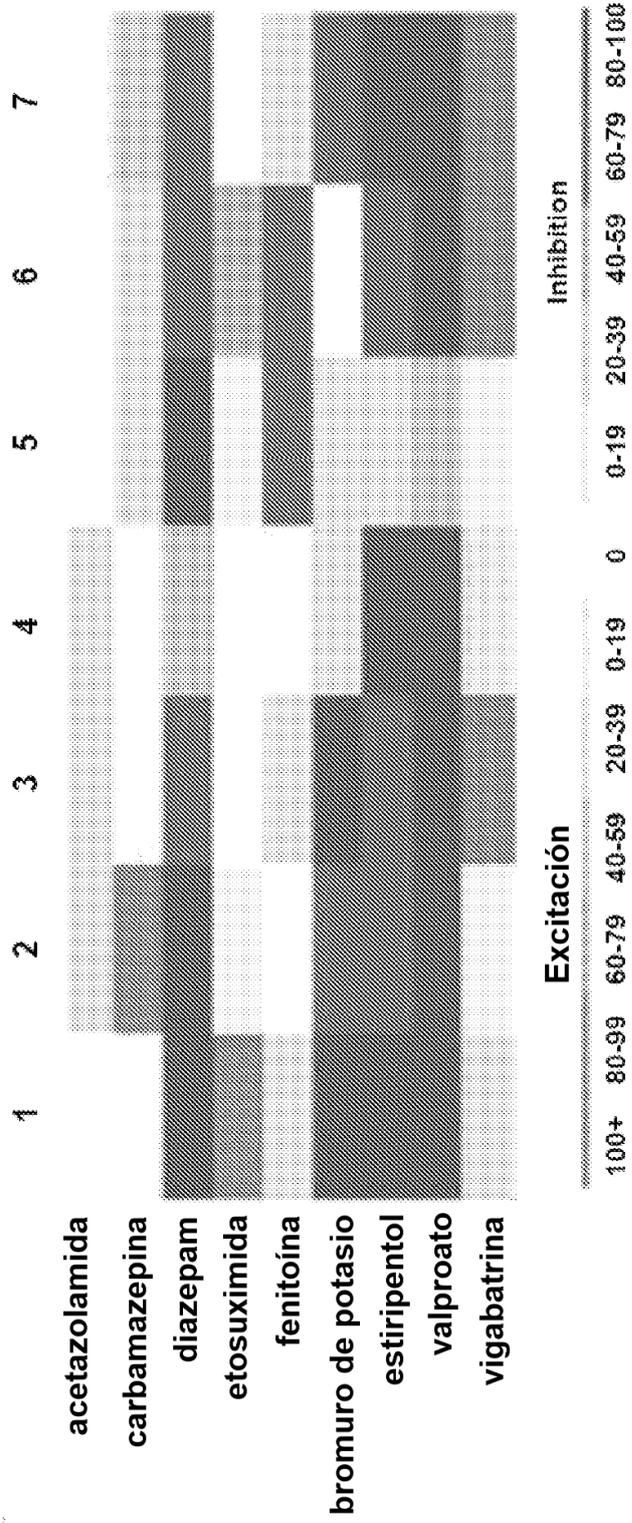


FIG. 5B

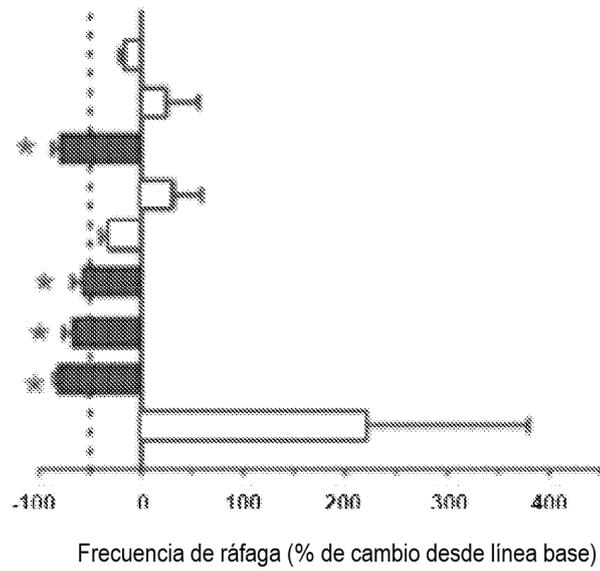


FIG. 5C

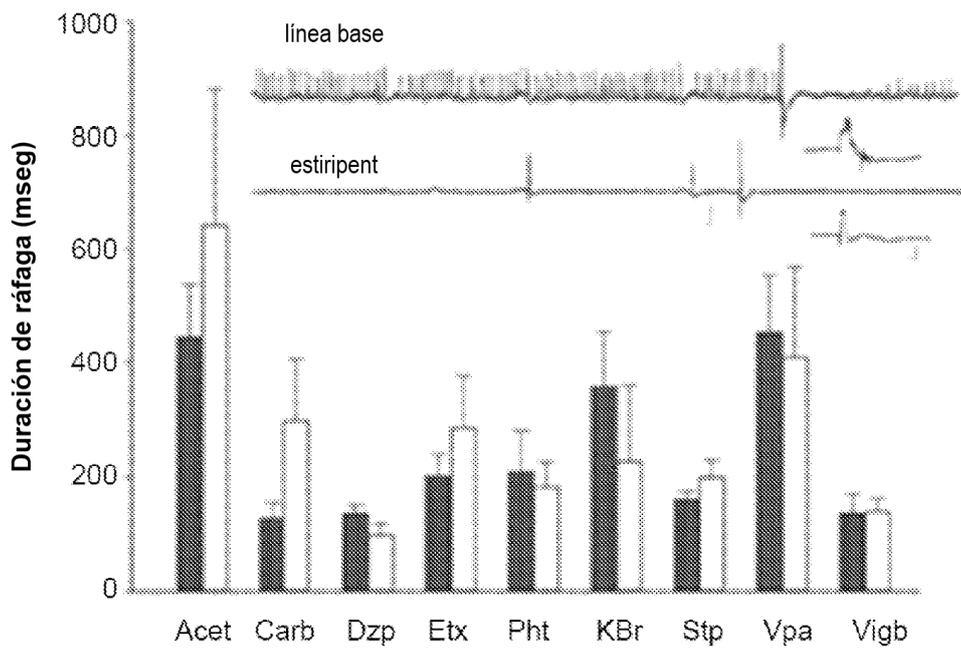


FIG. 5D

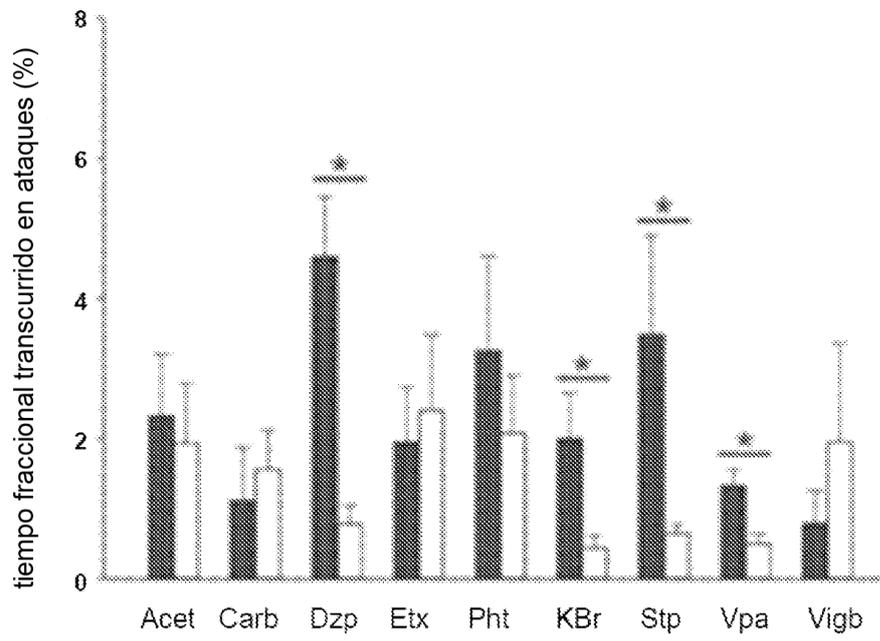


FIG. 5E

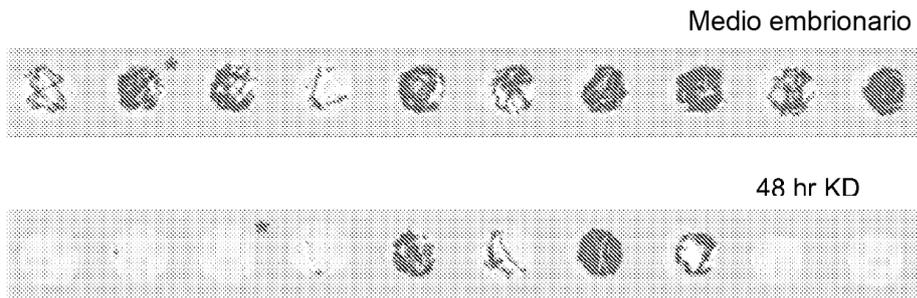


FIG. 5F

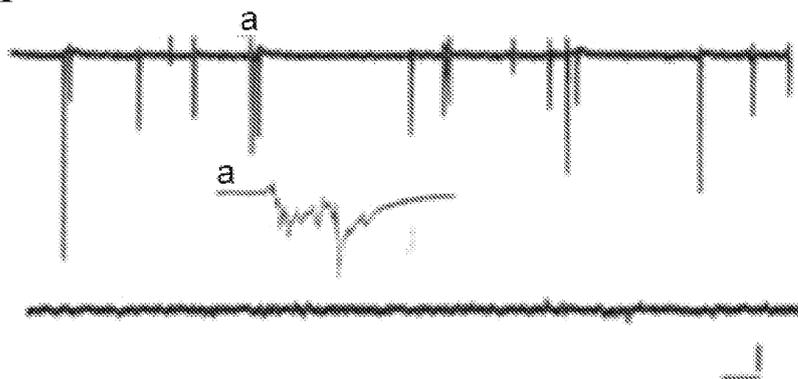


FIG. 6A

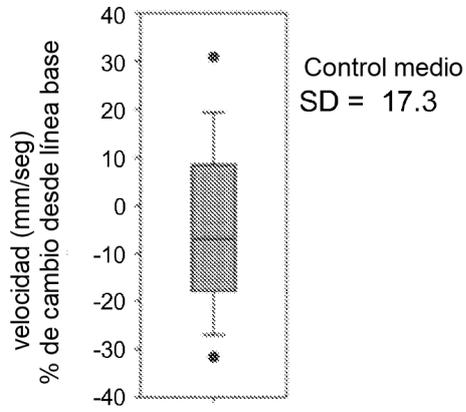


FIG. 6B

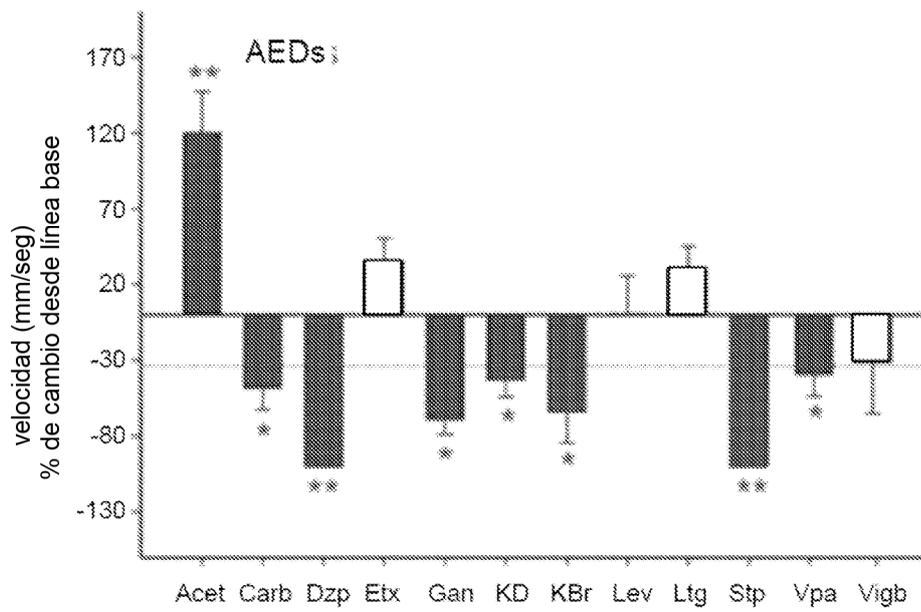


FIG. 6C

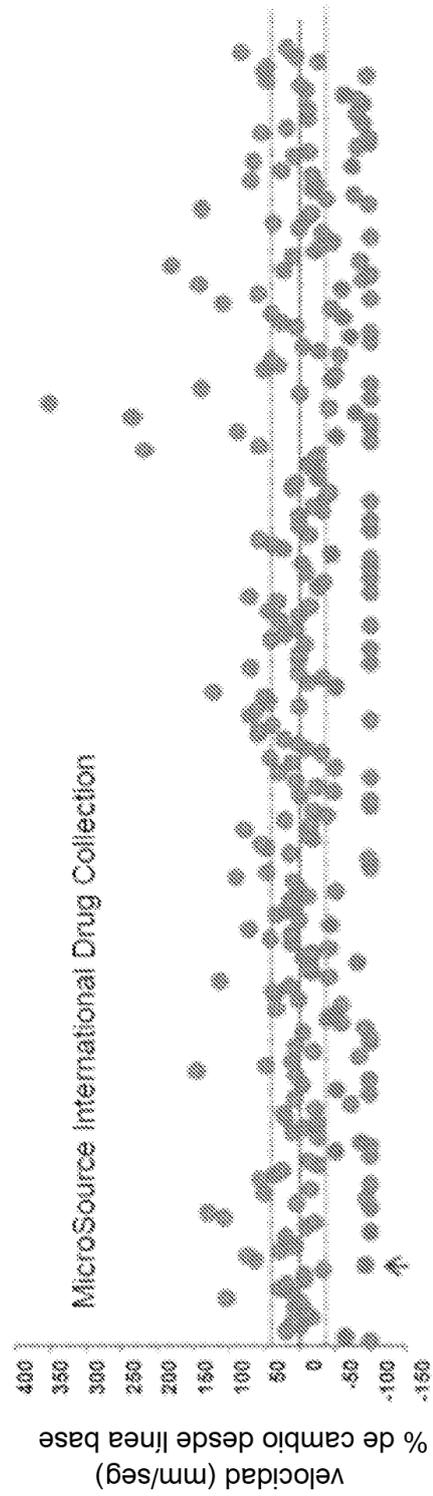


FIG. 6D

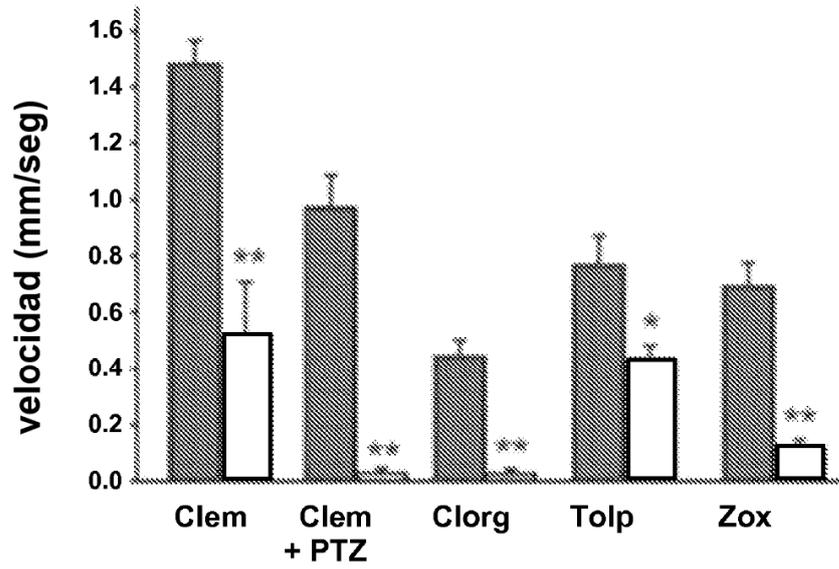


FIG. 6E

mutante scnLab (no tratado)



mutante scnLab (clemizol)



mutante scnLab (zoxazolamida)



FIG. 7A

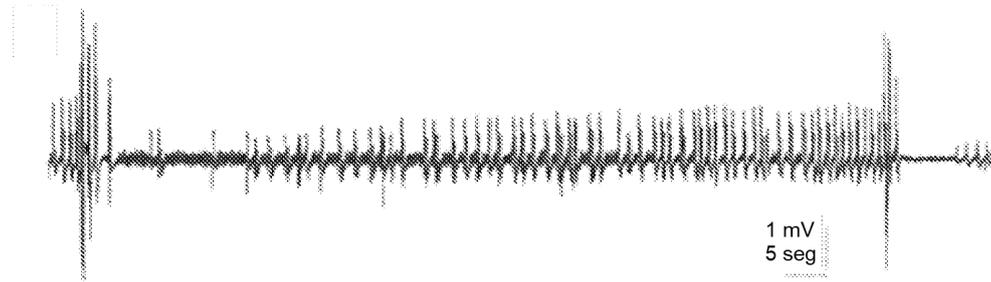


FIG. 7B

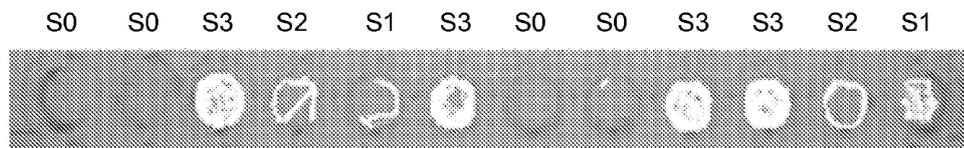


FIG. 7C

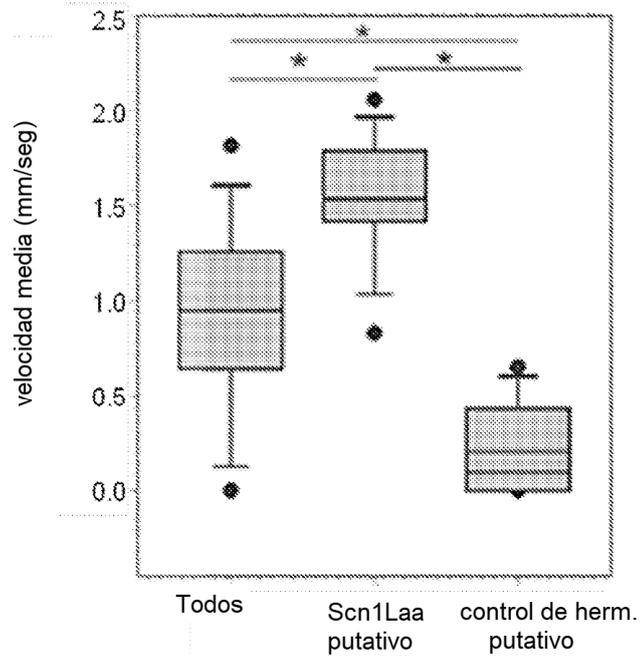


FIG. 7D

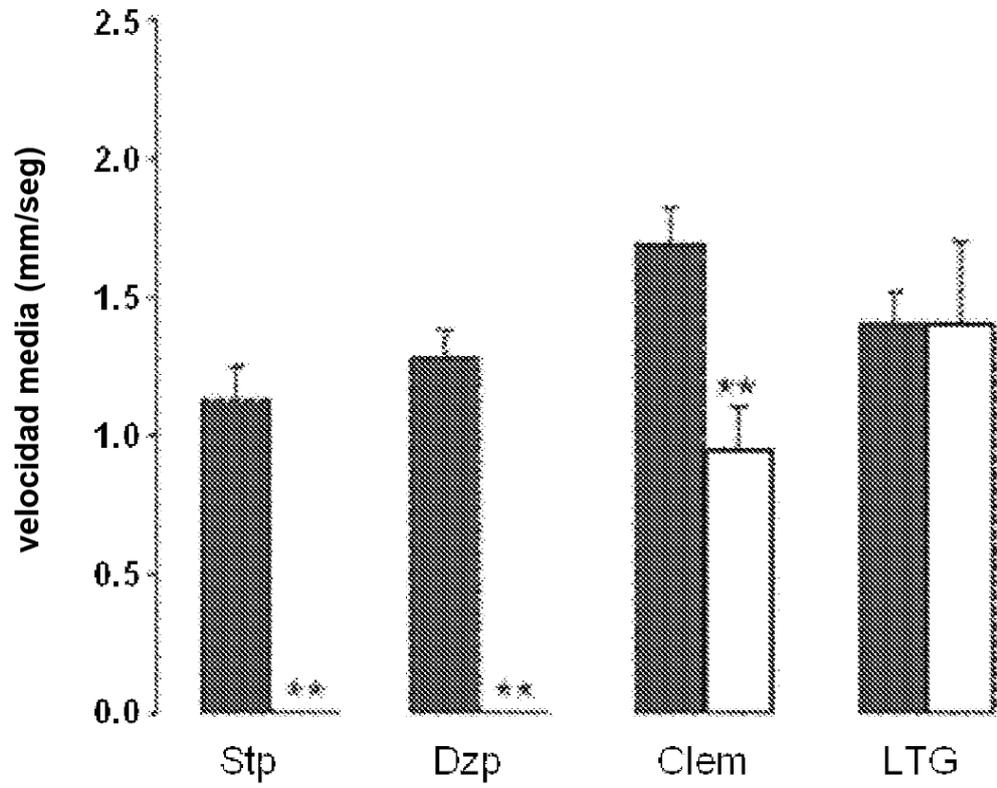


FIG. 8

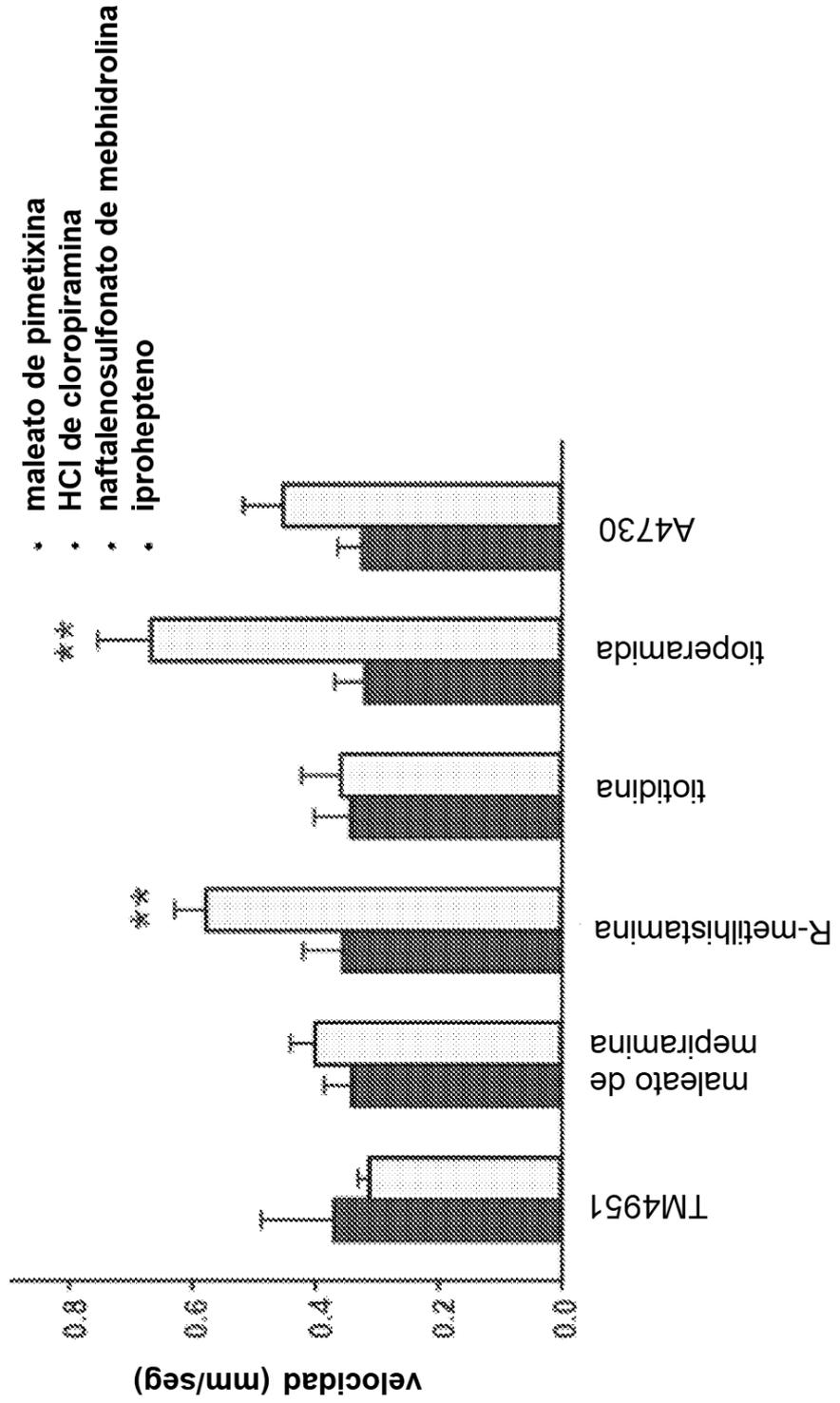


FIG. 9A

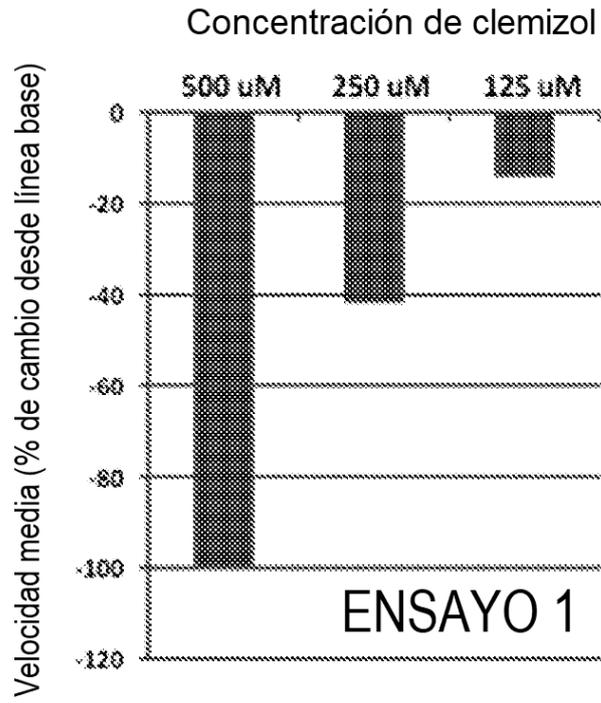


FIG. 9B

