



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112930175 A

(43) 申请公布日 2021.06.08

(21) 申请号 201980049623.9

(22) 申请日 2019.07.26

(30) 优先权数据

62/711,051 2018.07.27 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.01.25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/043765 2019.07.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/023923 EN 2020.01.30

(71) 申请人 泽农医药公司

地址 加拿大不列颠哥伦比亚省

(72) 发明人 J·P·贝查德 R·P·谢林顿

J-J·A·卡迪厄 P·K·塔里

(74) 专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

代理人 马莉华 徐迅

(51) Int.Cl.

A61K 31/137 (2006.01)

A61K 31/235 (2006.01)

A61P 25/08 (2006.01)

权利要求书2页 说明书35页 附图2页

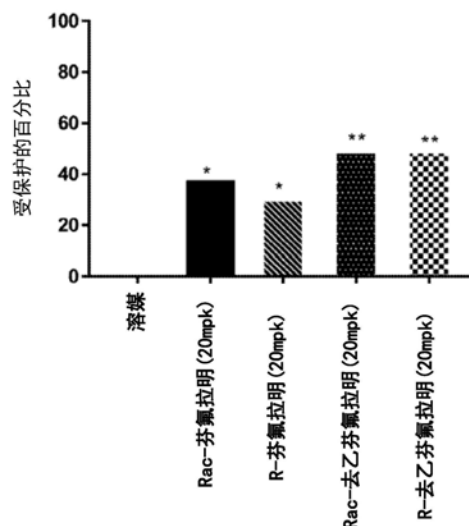
(54) 发明名称

治疗癫痫的方法

(57) 摘要

在某些实施方式中,本公开涉及用于治疗患有癫痫性发作疾病或有患癫痫性发作疾病的风险的哺乳动物的方法和用途,包括施用本文公开的某些分离的芬氟拉明对映异构体,其作为抗癫痫药(AED)的令人惊讶地有效,尽管抗癫痫药效比芬氟拉明外消旋药低,但其心脏毒性也比芬氟拉明外消旋药低。优选的实施方式考虑了Dravet综合征的治疗;其他优选的实施方式预期治疗其他癫痫性发作疾病。

受保护的百分比



1. 一种用于治疗人类受试者中的癫痫或癫痫性发作疾病的选自(R)-芬氟拉明或其药学上可接受的盐、(R)-去乙芬氟拉明或其药学上可接受的盐和(R)-苯氟雷司或其药学上可接受的盐的化合物；

其中所述化合物的对映异构体过量(ee)大于80%。

2. 如权利要求1所述的化合物,其特征在於,所述化合物的ee大于90%。

3. 如权利要求1所述的化合物,其特征在於,所述化合物的ee大于95%。

4. 如权利要求1所述的化合物,其特征在於,所述化合物的ee大于97%。

5. 如权利要求1所述的化合物,其特征在於,所述化合物的ee大于99%。

6. 如权利要求1所述的化合物,其特征在於,所述化合物的ee在80%至99%之间。

7. 如权利要求1所述的化合物,其特征在於,所述化合物的ee在90%至99%之间。

8. 如权利要求1至7中任一项所述的化合物,其特征在於,所述受试者患有Dravet综合征。

9. 如权利要求1至8中任一项所述的化合物,其特征在於,所述化合物是(R)-芬-氟拉明或其药学上可接受的盐。

10. 如权利要求1至8中任一项所述的化合物,其特征在於,所述化合物是(R)-去乙芬氟拉明或其药学上可接受的盐。

11. 如权利要求1至8中任一项所述的化合物,其特征在於,所述化合物是(R)-苯氟雷司或其药学上可接受的盐。

12. 一种药物组合物,其包含化合物和一种或多种药学上可接受的赋形剂；

其中所述化合物选自(R)-芬氟拉明或其药学上可接受的盐、(R)-去乙芬氟拉明或其药学上可接受的盐和(R)-苯氟雷司或其药学上可接受的盐；和

其中所述化合物的对映异构体过量(ee)大于80%。

13. 如权利要求12所述的药物组合物,其特征在於,所述化合物的ee大于90%。

14. 如权利要求12所述的药物组合物,其特征在於,所述化合物的ee大于95%。

15. 根据权利要求12所述的药物组合物,其特征在於,所述化合物的ee大于97%。

16. 如权利要求12所述的药物组合物,其特征在於,所述化合物的ee大于99%。

17. 如权利要求12所述的药物组合物,其特征在於,所述化合物的ee在80%至99%之间。

18. 如权利要求12所述的药物组合物,其特征在於,所述化合物的ee在90%至99%之间。

19. 如权利要求12至18中任一项所述的药物组合物,其特征在於,所述化合物是(R)-芬氟拉明或其药学上可接受的盐。

20. 如权利要求19所述的药物组合物,其特征在於,所述组合物包含大于30mg的(R)-芬氟拉明或其药学上可接受的盐。

21. 如权利要求19所述的药物组合物,其特征在於,所述组合物包含大于35mg的(R)-芬氟拉明或其药学上可接受的盐。

22. 根据权利要求19所述的药物组合物,其特征在於,所述组合物包含大于40mg的(R)-芬氟拉明或其药学上可接受的盐。

23. 如权利要求19所述的药物组合物,其特征在於,所述组合物包含40mg至300mg的

(R)-芬氟拉明或其药学上可接受的盐。

24. 如权利要求19所述的药物组合物, 其特征在于, 所述组合物包含40mg至150mg的(R)-芬氟拉明或其药学上可接受的盐。

25. 如权利要求12至18中任一项所述的药物组合物, 其特征在于, 所述化合物是(R)-去乙芬氟拉明或其药学上可接受的盐。

26. 根据权利要求12至18中任一项所述的药物组合物, 其特征在于, 所述化合物是(R)-苯氟雷司或其药学上可接受的盐。

27. 用于治疗人类受试者中的癫痫或癫痫性发作疾病的如权利要求12-26中任一项所示的药物组合物。

28. 根据权利要求27所述的药物组合物, 其特征在于, 所述受试者患有Dravet综合征。

29. 一种用于治疗的化合物, 选自(R)-芬氟拉明或其药学上可接受的盐、(R)-去乙芬氟拉明或其药学上可接受的盐和(R)-苯氟雷司或其药学上可接受的盐;

其中所述化合物的对映异构体过量(ee)大于80%。

30. 一种用于治疗人类受试者的癫痫或癫痫性发作疾病的化合物, 选自外消旋去乙芬氟拉明的化合物或其药学上可接受的盐。

31. 如权利要求30所述的化合物, 其特征在于, 所述受试者患有Dravet综合征。

32. 一种药物组合物, 其包含外消旋去乙芬氟拉明或其药学上可接受的盐和一种或多种药学上可接受的赋形剂。

33. 用于治疗人类受试者中的癫痫或癫痫性发作疾病的如权利要求32所述的药物组合物。

34. 如权利要求33所述的药物组合物, 其特征在于, 所述受试者患有Dravet综合征。

治疗癫痫的方法

1. 领域

[0001] 本公开涉及芬氟拉明的(R)-对映异构体或其活性代谢产物,去乙芬氟拉明或其前药在治疗包括Dravet综合征在内的癫痫中的用途。

2. 背景

[0002] 癫痫和癫痫性发作疾病(epileptic seizure disorder)代表一类神经系统疾病、障碍和病症,据估计在全球范围内折磨了6500万人,其中包括至少300万人在美国。每年在美国报告约150,000例新的癫痫病例。癫痫性发作疾病是特征为频率、强度和持续时间广泛变化的偶发性全身性或局灶性发作的慢性病(例如,Berg等人,2010癫痫51(4):676-685)。癫痫性发作可能表现为短暂性惊厥、呼吸暂停、意识丧失、语言或运动能力受损、姿势性张力丧失(loss of postural tone)、肌肉非自愿性收缩或由中枢神经系统(CNS)的皮层神经元异常和过度信号传递引起的其他后果中的一种或多种。因此,癫痫发作会损害个人安全进行日常活动(如散步、游泳或开车)的能力,或者可能是人身伤害的根本原因,例如挫伤、割伤、烧伤、骨伤、跌倒受伤等。更严重地,癫痫发作有时可能会导致癫痫猝死(SUDEP),据估计,美国每年有40,000例癫痫发作。

[0003] 已经对大量癫痫样发作疾病进行了特征分类,包括部分性发作(例如简单、复杂、继发性全身性和局灶性发作)、全身性发作(例如失神、肌阵挛性、失调性、强直性和强直性阵挛性)包括光敏性癫痫、自我诱发的晕厥、顽固性癫痫、天使(Angelman)综合征、良性罗兰多(rolandic)癫痫、CDKL5疾病、儿童和青少年失神癫痫、Dravet综合征、额叶癫痫、Glut1缺乏综合征、下丘脑错构瘤、婴儿痉挛/Wests综合征、少年肌阵挛性癫痫、失语综合征、Lennox-Gastaut综合征(LGS)、肌阵挛缺失的癫痫、大田原综合征、帕纳约托普洛斯(Panayiotopoulos)综合征、PCDH19癫痫、进行性肌阵挛性癫痫、拉斯穆森(Rasmussens)综合征、20号环状染色体综合征、反射性癫痫、颞叶癫痫、拉福拉(Lafora)进行性肌阵挛性癫痫、神经皮肤综合症、结节性硬化症、婴儿早期癫痫性脑病、早发性癫痫性脑病、全身性癫痫伴高热惊厥(GEFS+)、Rett综合征、多发性硬化症、阿尔茨海默氏病、自闭症、共济失调、肌张力减退和阵发性运动障碍。

[0004] 已开发出约25种抗癫痫药(AED)来控制或治疗癫痫发作,其中许多AED在CNS中起非选择性钠通道阻滞剂的作用。(Macdonald RL,Meldrum BS.抗癫痫药作用原理(Principles of antiepileptic drug action).抗癫痫药(Antiepileptic Drugs)第四版,Levy RH,Mattson RG,Meldrum BS等编辑,纽约:拉文出版社,1995:61-77)。但是,对AED的反应因患者而异,这使得难以预测任何特定AED在给定受试者中的疗效:没有一种AED被视为可治愈任何癫痫性发作疾病。此外,AED在大约三分之一的癫痫患者中无效,这提示人们认识到多种不同的遗传缺陷是不同的癫痫性癫痫发作的基础(例如,Striano等人,2016药理研究(Pharmacol.Res.)107:426-429)。

[0005] Dravet综合征,也被称为婴儿期严重的肌阵挛性癫痫(SMEI),是一种癫痫性发作疾病,于1978年首次被描述(Dravet,1978,VieMed,8:543-548)。Dravet综合征的发生率大约在40,000分之一到20,000分之一之间,其特征是在生命的第一年会发作,通常最初是由

发烧引起的,随后的发作不一定是由发烧引起的。患有Dravet综合征的患者可能患有频繁且不可预测的癫痫发作、温度或光敏性诱发的癫痫发作、运动异常和/或智力发育受损、停滞或退化。

[0006] 神经元特异性电压门控钠通道(SCN1A)的遗传缺陷在2001年被确定为大多数(但不是全部)Dravet综合征病例的根本原因(Claes等,2001美国人类遗传学杂志(Am.J.Hum.Genet.)68:1327-1332;Marini等人,2011癫痫症52(Suppl.2):24-29;Ceulemans等人,2012癫痫症53(7):1131-1139)。因此,具有神经元钠通道阻断活性的AED(包括SCN1A作为其作用机理)被忌用于Dravet综合征的治疗。

[0007] 芬氟拉明((R/S)-N-乙基-1-[3-(三氟甲基)苯基]丙-2-胺)是抑制食欲的苯丙胺样药物,以两种对映异构体的外消旋混合物形式存在,并与芬特明(2-甲基-1-苯基丙-2-胺)一起作为抗肥胖药的配方销售20多年。芬氟拉明能够突破血脑屏障(BBB),并通过破坏囊泡5-HT储存并通过选择性血清素转运体逆转5-HT摄取来增加中枢神经系统的血清素(5-羟色胺,5-HT)水平。这些血清素能作用被认为是芬氟拉明抑制食欲的基础,并且已经在体外大鼠诱导的大鼠内嗅皮层模型中进行了潜在的抗癫痫作用研究(Gentsch等人,2000年,癫痫症41(8):925-928)。

[0008] 然而,当发现芬氟拉明引起不良的心血管影响,包括心脏瓣膜肥大、肺动脉高压和通过在心脏组织中表达的5-羟色胺受体5-HT_{2B}引起的芬氟拉明激动剂活性导致的心脏纤维化时,芬氟拉明退出了药品市场。(Andrejak等人,心血管疾病档案(Arch.Cardiovascular Dis.)(2013)106:333-339;Elangbam等人,实验与毒理病理学(Exp Toxicol Pathol)(2008)60(4-5):253-262;和Cambon等人,心血管疾病档案(2015)108:172-180)。芬氟拉明通过其主要代谢产物去乙芬氟拉明,在限制Dravet综合征患者组群中癫痫发作的频率或严重性方面显示出一定程度的明显疗效(Ceulemans等,2012;Boel等,1996,小儿神经病学(Neuropediatrics)27:171-173;Lagae,L.等人,“ZX008(芬氟拉明HCl口服溶液)在Dravet综合征中的表现:第3期,随机,双盲,安慰剂对照试验的结果,”海报号2.434,美国癫痫病学会年会,2017年12月1-5日),但由于其AED的心脏毒性史而仍然无法作为AED使用。结构相关的化合物苯氟雷司(benfluorex)((R/S)-2-(1-(3-(三氟甲基)苯基)丙-2-基氨基)乙基苯甲酸酯)也是两种对映异构体的外消旋混合物,是类似地促进5-HT释放的去乙芬氟拉明的前药(通过其代谢产物去乙芬氟拉明对5HT₂受体具有激动剂活性),并且在它之前作为抗糖尿病药上市了一段时间,也由于与芬氟拉明相关的不良心血管作用而被撤销。但是,苯氟雷司以前尚未作为AED进行过研究。

[0009] 显然,在本领域中仍然需要有效治疗癫痫和其他癫痫性发作疾病,包括Dravet综合征。本公开通过提供用于治疗癫痫性发作疾病的组合物和方法满足了该需求,并提供了其他相关的优点。

3. 概要

[0010] 在某些实施方式中,本公开涉及芬氟拉明的(R)-对映异构体、苯氟雷司的(R)-对映异构体或芬氟拉明或苯氟雷司的活性代谢产物的(R)-对映异构体,去乙芬氟拉明或其前药,用于治疗或预防包括Dravet综合征的癫痫病。

[0011] 因此,在一个实施方式中,本公开提供了一种在哺乳动物中治疗或预防癫痫性发作疾病的方法,其包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的以下一种、两种或全部三种:(i)

(R)-芬氟拉明或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药；(ii) (R)-去乙芬氟拉明或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药，和(iii) (R)-苯氟雷司或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药，其中(R)-芬氟拉明基本上不含(S)-芬氟拉明(例如，大于80%ee)，(R)-去乙芬氟拉明基本上不含(S)-去乙芬氟拉明(例如，大于80%ee)，(R)-苯氟雷司基本上不含(S)-苯氟雷司(例如，大于80%ee)。在某些实施方式中，提供了一种治疗患有癫痫性发作疾病或有患癫痫性发作疾病风险的哺乳动物的方法，该方法包括同时或顺序且以任何顺序向该哺乳动物给药：(a) 治疗有效量的下述一种、两种或三种：(i) (R)-芬氟拉明或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药；(ii) (R)-去乙芬氟拉明或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药，以及(iii) (R)-苯氟雷司或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药；(b) 治疗有效量的芬特明或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药；其中(R)-芬氟拉明基本上不含(S)-芬氟拉明(例如，大于80%ee)，(R)-去乙芬氟拉明基本上不含(S)-去乙芬氟拉明(例如，大于80%ee)，并且(R)-苯氟雷司基本上不含(S)-苯氟雷司(例如，大于ee的80%)。

[0013] 在本方法的某些其他实施方式中，癫痫性发作疾病是Dravet综合征。在本方法的某些其他进一步的实施方式中，癫痫发作疾病选自包括光敏性癫痫、自我诱发的晕厥、顽固性癫痫、天使(Angelman)综合征、良性罗兰多(rolandic)癫痫、CDKL5疾病、儿童和青少年失神癫痫、Dravet综合征、额叶癫痫、Glut1缺乏综合征、下丘脑错构瘤、婴儿痉挛/Wests综合征、少年肌阵挛性癫痫、失语综合征、Lennox-Gastaut综合征(LGS)、肌阵挛缺失的癫痫、大田原综合征、帕纳约托普洛斯(Panayiotopoulos)综合征、PCDH19癫痫、进行性肌阵挛性癫痫、拉斯穆森(Rasmussens)综合征、20号环状染色体综合征、反射性癫痫、颞叶癫痫、拉福拉(Lafora)进行性肌阵挛性癫痫、神经皮肤综合症、结节性硬化症、婴儿早期癫痫性脑病、早发性癫痫性脑病、全身性癫痫伴高热惊厥(GEFS+)、Rett综合征、多发性硬化症、阿尔茨海默氏病、自闭症、共济失调、肌张力减退、阵发性运动障碍、局灶性发作、全身性发作、无神志发作、Jeavons综合征、癫痫性脑病、向日葵综合征、脆性X综合征、交替性偏瘫、夜间黑色显性遗传额叶癫痫(ADNFLE)良性罗兰多癫痫、杜斯综合症、早期肌阵挛性脑病、婴儿期癫痫伴局灶性癫痫发作、全身性强直阵挛性癫痫发作、无肌阵挛性癫痫、持续性睡眠刺激波癫痫性脑病、青少年失神发作、进行性肌阵挛性癫痫、SCN2A相关性癫痫、KCNQ2相关性癫痫和TBC1域含激酶(TBCK)相关性智力障碍(ID)综合征。

[0014] 在某些其他实施方式中，提供了治疗患有癫痫性发作疾病或有患癫痫性发作疾病风险的哺乳动物的方法，其包括向所述哺乳动物施用治疗有效量的外消旋去乙芬氟拉明[(R/S)-1-(3-(三氟甲基)苯基)丙-2-胺]或其前药。

[0015] 在某些实施方式中，提供了一种治疗患有癫痫性发作疾病或有患癫痫性发作疾病风险的哺乳动物的方法，该方法包括同时或依次以任何顺序向该哺乳动物给药：(a) 治疗有效量的外消旋去乙芬氟拉明[(R/S)-1-(3-(三氟甲基)苯基)丙-2-胺]或其前药；(b) 治疗有效量的芬特明或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药。

[0016] 在某些其他实施方式中，癫痫性发作疾病是Dravet综合征。在某些实施方式中，其中癫痫性发作疾病选自光敏性癫痫、自我诱发的晕厥、顽固性癫痫、天使(Angelman)综合征、良性罗兰多(rolandic)癫痫、CDKL5疾病、儿童和青少年失神癫痫、Dravet综合征、额叶癫痫、Glut1缺乏综合征、下丘脑错构瘤、婴儿痉挛/Wests综合征、少年肌阵挛性癫痫、失语综合征、Lennox-Gastaut综合征(LGS)、肌阵挛缺失的癫痫、大田原综合征、帕纳约托普洛斯

(Panayiotopoulos) 综合征、PCDH19 癫痫、进行性肌阵挛性癫痫、拉斯穆森 (Rasmussens) 综合征、20 号环状染色体综合征、反射性癫痫、颞叶癫痫、拉福拉 (Lafora) 进行性肌阵挛性癫痫、神经皮肤综合征、结节性硬化症、婴儿早期癫痫性脑病、早发性癫痫性脑病、全身性癫痫伴高热惊厥 (GEFS+)、Rett 综合征、多发性硬化症、阿尔茨海默氏病、自闭症、共济失调、肌张力减退、阵发性运动障碍、局灶性发作、全身性发作、无神志发作、Jeavons 综合征、癫痫性脑病、向日葵综合征、脆性 X 综合征、交替性偏瘫、夜间黑色显性遗传额叶癫痫 (ADNFLE) 良性罗兰多癫痫、杜斯综合征、早期肌阵挛性脑病、婴儿期癫痫伴局灶性癫痫发作、全身性强直阵挛性癫痫发作、无肌阵挛性癫痫、持续性睡眠刺激波癫痫性脑病、青少年失神发作、进行性肌阵挛性癫痫、SCN2A 相关性癫痫、KCNQ2 相关性癫痫和 TBC1 域含激酶 (TBCK) 相关性智力障碍 (ID) 综合征。

[0017] 在一些实施方式中，本公开提供了治疗癫痫或癫痫性发作疾病的方法，其包括向有此需要的人类受试者施用治疗有效量的 (R) - 芬氟拉明或其药学上可接受的盐，其中 (R) - 芬氟拉明或其药学上可接受的盐的对映异构体过量 (ee) 大于 80%，例如大于 90%、95%、97%、98%、99% 或 99.5%，或诸如 ee 在 80% 至 99% 或 90% 至 99% 之间。在某些实施方式中，所述用对映异构体过量的 (R) - 芬氟拉明或其药学上可接受的盐治疗癫痫或癫痫性发作疾病的方法，例如通过降低癫痫发作频率或平均惊厥发作频率来降低癫痫发作的频率，通过与基线相比至少降低 20%，例如与基线相比至少降低 25、35、50、60、65、70、75 或 80%，尤其是与基线相比降低至少 25、50 或 75%。

[0018] 在某些实施方式中，本公开提供了一种药物组合物，其包含 (R) - 芬氟拉明或其药学上可接受的盐和一种或多种药学上可接受的赋形剂，其中 (R) - 芬氟拉明或其药学上可接受的盐的 ee 大于 80%，例如大于 90%、95%、97%、98%、99% 或 99.5%，或例如 ee 在 80% 至 99% 或 90% 至 99% 之间的。

[0019] 在一些实施方式中，本公开提供了治疗癫痫或癫痫性发作疾病的方法，其包括向有需要的人类受试者施用治疗有效量的 (R) - 去乙芬氟拉明或其药学上可接受的盐或前药，其中 (R) - 去乙芬氟拉明或其药学上可接受的盐或前药的对映异构体过量 ee 大于 80%，例如大于 90%、95%、97%、98%、99% 或 99.5%，或例如 ee 在 80% 至 99% 或 90% 至 99% 之间。在某些实施方式中，所述用对映异构体过量的 (R) - 去乙芬氟拉明或其药学上可接受的盐治疗癫痫或癫痫性发作疾病的方法，例如通过降低癫痫发作频率或平均惊厥发作频率来降低癫痫发作的频率，通过与基线相比至少降低 20%，例如与基线相比至少降低 25、35、50、60、65、70、75 或 80%，尤其是与基线相比降低至少 25、50 或 75%。

[0020] 在某些实施方式中，本公开提供了药物组合物，其包含 (R) - 去乙芬氟拉明或其药学上可接受的盐或前药和一种或多种药学上可接受的赋形剂，其中 (R) - 去乙芬氟拉明或其药学上可接受的盐或前药具有大于 80% 的 ee，例如大于 90%，95%，97%，98%，99% 或 99.5%，或者例如 ee 在 80% 至 99% 或 90% 至 99% 之间。

[0021] 在一些实施方式中，本公开提供了治疗癫痫或癫痫性发作疾病的方法，其包括向有此需要的人类受试者施用治疗有效量的 (R) - 苯氟雷司或其药学上可接受的盐，其中 (R) - 苯氟雷司或其药学上可接受的盐的对映异构体过量 (ee) 大于 80%，例如大于 90%、95%、97%、98%、99% 或 99.5%，或诸如 ee 在 80% 至 99% 或 90% 至 99% 之间。在某些实施方式中，所述用对映异构体过量的 (R) - 苯氟雷司或其药学上可接受的盐治疗癫痫或癫痫性发作疾

病的方法,例如通过降低癫痫发作频率或平均惊厥发作频率来降低癫痫发作的频率,通过与基线相比至少降低20%,例如与基线相比至少降低25、35、50、60、65、70、75或80%,尤其是与基线相比降低至少25、50或75%。

[0022] 在某些实施方式中,本公开提供了一种药物组合物,其包含(R)-苯氟雷司或其药学上可接受的盐和一种或多种药学上可接受的赋形剂,其中(R)-苯氟雷司或其药学上可接受的盐的ee大于80%,例如大于90%、95%、97%、98%、99%或99.5%,例如ee在80%和99%之间或90%和99%,或例如ee在80%之间%和99%或90%和99%。

[0023] 在一些实施方式中,本公开提供了治疗癫痫或癫痫性发作疾病的方法,其包括向有此需要的人类受试者施用治疗有效量的外消旋去乙芬氟拉明或其药学上可接受的盐或前药。在一些实施方式中,本公开提供了外消旋的去乙芬氟拉明或其药学上可接受的盐或前药用于治疗,例如用于治疗人类受试者的癫痫或癫痫性发作疾病。在某些实施方式中,所述用外消旋去乙芬氟拉明或其药学上可接受的盐或前药治疗癫痫或癫痫性发作疾病的方法,例如通过降低癫痫发作频率或平均惊厥发作频率来降低癫痫发作的频率,通过与基线相比至少降低20%,例如与基线相比至少降低25、35、50、60、65、70、75或80%,尤其是与基线相比降低至少25、50或75%。

[0024] 在某些实施方式中,本公开提供了一种药物组合物,其包含外消旋的去甲芬氟拉明或其药学上可接受的盐或前药以及一种或多种药学上可接受的赋形剂。在某些实施方式中,药物组合物用于治疗,例如用于治疗人类受试者的癫痫或癫痫性发作疾病。

[0025] 在一些实施方式中,本公开提供了选自以下的化合物:(R)-芬氟拉明或其药学上可接受的盐,(R)-去乙芬氟拉明或其药学上可接受的盐或其前药和(R)-苯氟雷司或其药学上可接受的盐或其前药用于治疗,例如用于治疗人类受试者的癫痫或癫痫性发作疾病,其中化合物的ee大于80%,例如大于90%、95%、97%、98%、99%或99.5%,或例如ee在80%和99%或90%和99%之间。

[0026] 在某些实施方式中,本公开提供了一种药物组合物,包含一化合物和一种或多种药学上可接受的赋形剂的,其中所述化合物选自(R)-芬氟拉明或其药学上可接受的盐,(R)-去乙芬氟拉明或药学上可接受的盐或其前药,和(R)-的苯氟雷司或其药学上可接受的盐,用于治疗,例如治疗人类受试者的癫痫或癫痫性发作疾病,其中所述化合物的ee大于80%,例如大于90%、95%、97%、98%、99%或99.5%,或例如ee在80%和99%或90%和99%之间。

[0027] 参考以下详细描述和附图,本公开的这些和其他方面以及实施方式将显而易见。本说明书中提及和/或在应用数据表中列出的所有美国专利、美国专利申请公开、美国专利申请、外国(非美国)专利、外国(非美国)专利申请和非专利出版物通过引用将其整体并入本文,就好像每个单独地并入一样。如果需要,可以修改本公开的方面和实施方式以采用各种专利、申请和出版物的概念来提供其他实施方式。

4. 附图的简要说明

[0028] 图1显示了在CF-1小鼠的6Hz癫痫发作试验中测试候选AED化合物的结果。条形代表在体内测试前一小时,以IP施用20mg/kg的消旋的芬氟拉明、(R)-芬氟拉明、消旋的去乙芬氟拉明和(R)-去乙芬氟拉明,或溶媒对照后,小鼠受保护的百分比(每组n=16)。

[0029] 图2显示了在使用雄性DBA/2小鼠(n=10/组)的小鼠视听性发作试验中,(R/S)-芬

氟拉明和(R)-芬氟拉明的抗惊厥作用的结果。视听反应评分为0(无发作),1(狂奔),2(阵挛性惊厥),3(强直性伸展)或4(死亡)。结果表示为平均值 \pm SEM,并显示了每个单独的数据点。

5. 详细说明

5.1 定义

[0030] 如说明书和所附权利要求书中所使用的,除非有相反的说明,否则下列术语具有所表示的含义:

[0031] “对映异构体”是指可以以两种不同的异构形式存在的不对称分子,其在空间上具有不同的构型。用于指定或指对映异构体的其他术语包括“立体异构体”(由于手性中心周围的排列或立体化学不同;尽管所有对映异构体均为立体异构体,但并非所有立体异构体均为对映异构体)或“光学异构体”(由于对映异构体的旋光性,这是不同对映异构体沿不同方向旋转平面偏振光的能力)。因为它们没有对称平面,所以对映异构体与其镜像并不相同;以两种对映异构体形式存在的分子是手性的,这意味着它们可以视为以“左手”和“右手”形式存在。有机分子中手性的最常见原因是键合到四个不同取代基或基团的四面体碳的存在。这样的碳被称为手性中心或立体中心。一种指示立体中心的原子的三维排列(或构型)的方法是,当最低优先级基团远离假设的观察者时,是指基团优先级的布置:如果其余三个基团从高优先级到低优先级的排列是顺时针方向,则立体中心具有R构型;如果排列是逆时针,则立体感中心具有S构型。

[0032] 对映异构体具有相同的经验化学式,并且在反应,其物理性质和光谱性质方面通常在化学上相同。但是,对映异构体可能对其他不对称化合物显示出不同的化学反应性,并且可能对不对称物理干扰有不同的反应。最常见的不对称干扰是偏振光。

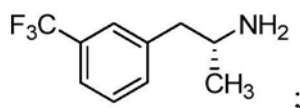
[0033] 对映异构体可以旋转平面偏振光;因此,对映异构体是光学活性的。同一化合物的两种不同对映异构体将使平面偏振光沿相反方向旋转;因此,对于假定的观察者,光可以向左或逆时针旋转(这是左旋或“l”或负或“-”),也可以向右或顺时针旋转(这是右旋或“d”或加号或“+”)。旋光度的符号(+)或(-)与R或S的名称无关。等量的两种手性对映异构体的混合物称为外消旋混合物或外消旋体,用符号(+/-)或前缀“d/l”表示,表示右旋和左旋形式的混合物。外消旋物或外消旋混合物的旋光度为零,因为存在等量的(+)和(-)形式。通常,单个对映异构体的存在只会使偏振光沿一个方向旋转;反之,因此,单一对映异构体是指光学纯的。

[0034] 名称“R”和“S”用于表示分子围绕其手性中心的绝对构型。名称可以显示为前缀或后缀;它们可以或不可以通过对号与对映异构体名称分开;它们可能被连字符,也可能不被连字符;并且它们可能会或可能不会被括号包围。

[0035] 当涉及外消旋化合物或混合物时,“拆分(Resolution)”或“拆分(resolving)”是指将外消旋体分离为其两种对映异构体形式(即,(+)和(-);(R)和(S))形式)。

[0036] “对映异构体过量”或“ee”是指其中一种对映异构体的含量超过另一种对映异构体的产物,并且定义为每种对映异构体的摩尔分数的绝对差。对映异构体过量通常表示为混合物中存在的对映异构体相对于其他对映异构体的百分比。为了本公开的目的,当(R)对映异构体以大于80%,优选大于90%,更优选大于95%,最优选大于99%的对映异构体过量存在时,认为本发明化合物的(R)对映异构体基本上不含(S)对映异构体。

[0037] 本文使用的化学命名协议和结构图是IUPAC命名系统的修改形式,使用ACD/名称版本9.07软件程序。例如,去乙芬氟拉明的(R)-对映异构体具有以下结构:



且化学名称为(R)-1-(3-(三氟甲基)苯基)丙-2-胺。

[0038] “前药”是指可以通过生理条件或通过溶剂分解转化为本公开的生物活性化合物的化合物。因此,术语“前药”是指药学上可接受的本公开的化合物的代谢前体。当前药给予有需要的受试者时,前药可能是无活性的,但是体内转化为本发明的活性化合物。前药通常例如通过在血液中水解而在体内快速转化以产生本公开的化合物。前药化合物通常在哺乳动物生物体中提供溶解性,组织相容性或延迟释放的优点(参见,Bundgard,H.,Design of Prodrugs(1985),第7-9页,21-24(Elsevier,Amsterdam))。Higuchi等人在A.C.S.的“前药作为新型递送系统”中对前-药进行了讨论。专题讨论会系列,第一卷14,《药物设计中的生物可逆性载体》,爱德华·B·罗氏(Edward B.Roche)编辑,美国药学会和佩加蒙出版社(American Pharmaceutical Association and Pergamon Press),1987年,将其全部内容通过引用并入本文。

[0039] 术语“前药”还意指包括任何共价键合的载体,当将这种前药施用于哺乳动物时,其在体内释放本发明的活性化合物。本公开的化合物的前药可以包含官能团,当通过体内方法裂解时,该官能团提供了本公开的化合物。前药包括其中羟基、氨基或巯基键合至当将前药施用于哺乳动物对象时裂解分别形成游离羟基、游离氨基或游离巯基的任何基团的本公开的化合物。前药的实例包括但不限于,本公开的化合物中的醇的乙酸盐、甲酸酯和苯甲酸酯衍生物或胺官能团的酰胺衍生物等。

[0040] 为了本公开的目的,(R)-芬氟拉明和(R)-苯氟雷司都被认为是(R)-去乙芬氟拉明的前药,因为(R)-芬氟拉明和(R)-苯氟雷司都在体内代谢为(R)-去乙芬氟拉明,其证明具有根据本文所述某些实施方式的方法和用途的所需抗癫痫活性。

[0041] 本公开还意在涵盖通过将一个或多个原子替换为具有不同原子质量或质量数的原子而被同位素标记的主题化合物的(R)-对映异构体。可掺入所揭示化合物的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧的同位素,例如分别是 ^2H 、 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{13}N 、 ^{15}N 、 ^{15}O 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{18}O 。这些放射性标记的化合物通过表征例如作用机理或对药理学上重要的作用部位的结合亲和力,可用于帮助确定或测量本发明化合物的对映异构体的有效性。同位素标记的化合物可用于药物和/或底物组织分布研究。鉴于放射性同位素氚的掺入容易程度和易于检测的手段,放射性同位素氚(即 ^3H)和碳14(即 ^{14}C)为此特别有用。掺入了氚(^3H)的放射性配体特别适用于膜的配体结合研究,因为氚的半衰期较长,并且发射的能量相对较低,因此放射性同位素相对安全。通常通过在未标记的化合物中将氚与氢交换来制备放射性配体。

[0042] 氘(即 ^2H)等较重的同位素取代可以提供某些治疗上的优势,这是因为代谢稳定性更高,例如,体内半衰期延长或剂量要求降低,因此在某些情况下可能是首选。

[0043] 用正电子发射同位素替代,例如 ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{15}O 和 ^{13}N ,可用于正电子发射形貌(PET)研究中,以检查底物受体的占有率。主题化合物的同位素标记的对映异构体通常可以通过本领域技术人员已知的常规技术或通过类似于本文所述的方法,使用适当的同位素标记的试

剂代替先前使用的非标记的试剂来制备。

[0044] 本公开还意在涵盖所公开的(R)-对映异构体的体内代谢产物。此类产物可能主要是由于酶促过程,例如由所施用化合物的氧化、还原、水解、酰胺化、酯化等产生。因此,本公开包括通过如下方法产生的代谢产物,该方法包括将主题化合物的对映异构体与哺乳动物接触一段时间足以产生代谢产物。可以通过以可检测的剂量向动物(例如大鼠、小鼠、豚鼠、猴或人)施用可检测剂量的本发明化合物的放射性标记的对映异构体,从而允许代谢发生的足够时间,并从尿液、血液或其他生物样品中分离代谢产物来鉴定此类代谢产物。

[0045] 如本文所用,“选择性(Selectivity)”“选择的(selective)”是本公开的化合物相对于另一事物(或另一组事物)优先(例如,以统计学上显著的方式)缔合的趋势的相对量度。

[0046] “稳定的对映异构体”和“稳定的结构”是指表示一种化合物,该化合物具有足够的稳健性,可以从反应混合物中分离到有用的纯度,并且可以配制成有效的治疗剂。

[0047] 哺乳动物既包括人类,也包括家养动物,例如实验动物和家庭宠物(例如,猫、狗、猪、牛、羊、山羊、马和兔子),以及非家养动物,例如野生动物等。

[0048] “药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂”包括但不限于任何适用于人类或家畜的佐剂、载体、赋形剂、助流剂、甜味剂、稀释剂、防腐剂、染料/着色剂、增味剂、表面活性剂、润湿剂、分散剂、助悬剂、稳定剂、等渗剂,溶剂或乳化剂。优选地,载体、稀释剂或赋形剂已经由管理机构批准,例如但不限于美国食品和药物管理局、加拿大卫生部或欧洲药品管理局,其对于人类或动物药物用途是可接受的。

[0049] 药物组合物是指本公开的化合物和本领域通常接受的用于将生物活性化合物递送给哺乳动物(例如,人)的媒介的制剂。这样的媒介包括所有药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0050] 本公开的药物组合物包含一种或多种药学上可接受的赋形剂,其包括但不限于任何溶剂、佐剂、生物利用度增强剂、载体、助流剂、甜味剂、稀释剂、防腐剂、染料/着色剂、增味剂、表面活性剂、润湿剂、分散剂、助悬剂、稳定剂、等渗剂、缓冲剂和/或乳化剂。优选地,作为一种非限制性实例,一种或多种赋形剂被美国食品和药物管理局、加拿大卫生部或欧洲药品管理局批准为可用于人类或家畜。

[0051] 本文所述的“预防”癫痫或其他癫痫性发作病是指以统计学上显著的方式(例如,相对于适当的对照)预防或减少在哺乳动物中发生所述病症的可能性,特别是当哺乳动物易患这种疾病,但尚未被诊断为患有这种疾病时。

[0052] “治疗有效量”是指本公开的化合物的量,当给药时,该量足以,在接受治疗的哺乳动物优选人对癫痫或其他癫痫性发作疾病进行如下定义的有效治疗。构成“治疗有效量”的本发明化合物的量将根据化合物、癫痫病状及其严重程度、给药方式和待治疗的哺乳动物的年龄而变化,但是可以确定本领域普通技术人员通常考虑到他或她自己的知识和本公开。

[0053] 本文所用的“治疗的”或“治疗”是指在患有疾病或病症的哺乳动物,优选人中治疗癫痫或其他癫痫样发作疾病,包括例如以下一种或多种:

(i) 抑制癫痫或其他癫痫性发作疾病,即抑制其发展,例如统计学上显著的方式(例如,相对于适当的对照而言)减缓癫痫发作或疾病的其他症状的严重程度、持续时间或

频率的增加；

(ii) 缓解癫痫或其他癫痫发作疾病，即，引起癫痫在统计学上显著（例如，相对于适当的对照而言为）消退；或

(iii) 缓解由癫痫或其他癫痫性发作疾病引起的症状，例如，以统计学上显著的方式（例如，相对于适当的对照），减少癫痫发作或疾病的其他症状的严重程度、持续时间或频率。

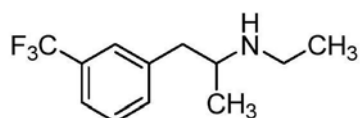
[0054] 在某些实施方式中，用本文所述的主题化合物的一种或多种(R)-对映异构体治疗包括以统计学上显著的方式（例如，相对于合适的对照）降低癫痫发作的频率，例如从基线开始降低癫痫发作频率或平均惊厥发作频率。在一些实施方式中，用一种或多种本发明化合物的(R)-对映异构体进行的治疗使癫痫发作频率或平均惊厥发作频率与基线相比降低了至少20%，例如与基线相比降低了至少25、35、50、60、65、70、75或80%，特别是与基线相比降低了至少25%、50%或75%。

[0055] 如本文所使用的，术语“改善的(ameliorating)”、“改善了(ameliorated)”、“减轻的(alleviating)”或“减轻了(alleviated)”应被赋予它们通常可接受的定义。例如，“改善”通常意味着相对于改善事件之前的状况更好或改善。“缓解”通常是指使症状相对于缓解事件之前的状况更可忍受。如本文所用，“改善的(ameliorating)”或“改善了(ameliorated)”可指通过施用根据本文公开的实施方式的化合物而使得癫痫或其他癫痫性发作疾病或癫痫或所述癫痫样发作疾病的病症更好或改善。如本文所用，“减轻的(alleviating)”或“减轻了(alleviated)”可指通过施用根据本文公开的实施方式的化合物使得癫痫或其他癫痫性发作疾病或癫痫或所述其他癫痫性发作疾病的症状更可忍受。例如，减轻癫痫发作将包括降低（例如，以统计学上显著的方式降低）癫痫发作的严重性或发生率。

5.2 本公开的(R)-对映异构体

[0056] 本公开的主题化合物的(R)-对映异构体是芬氟拉明的(R)-对映异构体，苯氟雷司的(R)-对映异构体和去乙芬氟拉明的(R)-对映异构体，包括具有本文所述的各种对映异构体过量的R-对映异构体，及其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药。

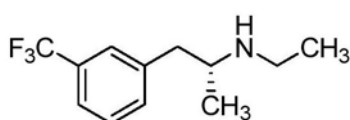
[0057] 芬氟拉明是两种对映异构体的外消旋混合物，具有以下结构：



芬氟拉明

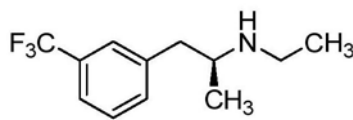
；

且化学名称为(R/S)-N-乙基-1-(3-(三氟甲基)苯基)丙-2-胺。芬氟拉明的制备首先在法国专利M1658(1963)中公开。芬氟拉明的(R)-对映异构体和(S)-对映异构体分别具有以下结构：



(R)-芬氟拉明

和

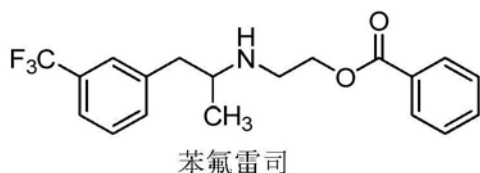


(S)-芬氟拉明

；

和(R)-N-乙基-1-(3-(三氟甲基)苯基)丙-2-胺和(S)-N-乙基-1-(3-(三氟甲基)苯基)丙-2-胺。为了本公开的目的,芬氟拉明的(R)-对映异构体在本文中被识别为(R)-芬氟拉明,并且芬氟拉明的(S)-对映异构体在本文中被识别为(S)-芬氟拉明。在本领域中应理解,(R)-芬氟拉明对应于左芬氟拉明、1-芬氟拉明或(-)-芬氟拉明,并且(S)-芬氟拉明对应于右芬氟拉明、d-芬氟拉明或(+)-芬氟拉明。

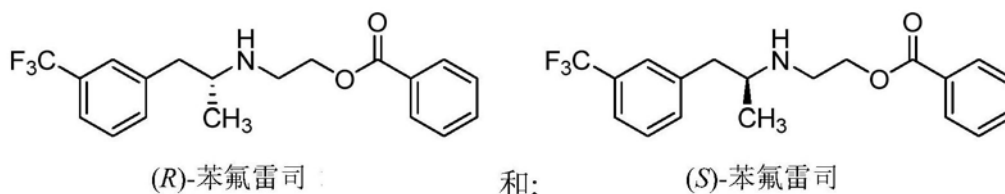
[0058] 苯氟雷司是两种对映异构体的外消旋混合物,具有以下结构:



;

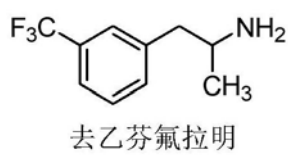
和(R/S)-2-(1-(3-(三氟甲基)苯基)丙-2-基氨基)苯甲酸乙酯的化学名称。在美国专利号3,607,909中描述了苯氟雷司的制备。

[0059] 苯氟雷司的(R)-对映异构体和(S)-对映异构体分别具有以下结构:



以及化学名称分别为(R)-2-(1-(3-(三氟甲基)苯基)丙-2-基氨基)苯甲酸乙酯和(S)-2-(1-(3-(三氟甲基)苯基)丙-2-基氨基)苯甲酸乙酯。为了本公开的目的,苯氟雷司的(R)-对映异构体在本文中被标识为(R)-苯氟雷司,苯氟雷司的(S)-对映异构体在本文中被标识为(S)-苯氟雷司。

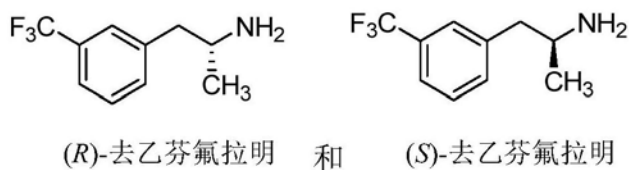
[0060] 芬氟拉明和苯氟雷司的活性代谢产物是去乙芬氟拉明,它也是两种对映异构体的外消旋混合物。去乙芬氟拉明具有以下结构:



;

(R/S)-1-(3-(三氟甲基)苯基)丙-2-胺的化学名称。去乙芬氟拉明外消旋体(CAS注册号[1886-26-6])可商购(例如,从加拿大安大略省北约克的多伦多研究化学公司;加拿大安大略省密西沙加的Clearsynth;或英国北哈罗的DrugImpurities。可以通过本领域技术人员已知的标准拆分技术来分离去乙芬氟拉明的对映异构体,或者可以根据本领域技术人员已知的方法或通过本文公开的方法来制备。

[0061] 去乙芬氟拉明的(R)-对映异构体和(S)-对映异构体分别具有以下结构:



化学名称分别为(R)-1-(3-(三氟甲基)苯基)丙-2-胺和(R)-1-(3-(三氟甲基)苯基)

基)丙-2-胺。为了本公开的目的,去乙芬氟拉明的(R)-对映异构体在本文中被标识为(R)-去乙芬氟拉明,而去乙芬氟拉明的(S)-对映异构体在本文中被标识为(S)-去乙芬氟拉明。在本领域中应理解,(R)-去乙芬氟拉明对应于1-去乙芬氟拉明,或(-)-去乙芬氟拉明,并且(S)-去乙芬氟拉明对应于d-去乙芬氟拉明或(+)-去乙芬氟拉明。

[0062] 在某些实施方式中,本文所述的方法、用途和组合物中使用本发明化合物的(R)-对映异构体(即,芬氟拉明,苯氟雷司和/或去乙芬氟拉明中的一种或多种)以对映异构体过量使用(ee),例如ee大于20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%。在一些实施方式中,主题化合物的(R)-对映异构体用于本文所述的方法、用途和组合物中,ee在20%至97%、98%或99%之间、例如在30%至99%、40%至99%、50%至99%、60%至99%、70%至99%、80%至99%、85%至99%、90%至99%、95%至99%、96%至99%或97%至99%,尤其是90%至99%之间。

5.3本公开的化合物的效用和测试

[0063] 在某些优选的实施方式中,本公开涉及使用的或使用本发明化合物的(R)-对映异构体(即,一种或多种芬氟拉明、苯氟雷司和/或去乙芬氟拉明)的方法,和药物组合物,其包含用于治疗或预防本文所述的癫痫或其他癫痫性发作疾病的药物组合物。

[0064] 当前公开的实施方式部分基于意外的和先前不可预测的发现(i)本发明化合物的(R)-对映异构体具有芬氟拉明(或其代谢产物去乙芬氟拉明)的多种特定有益活性,因此对于如本文所提供的治疗或预防癫痫性发作疾病,和(ii)可以基本上不含(例如,大于80% ee)相应形式的形式制备这种治疗有效的(R)-对映异构体(S)-对映异构体,其中存在芬氟拉明(或其代谢产物去乙芬氟拉明)的特定有害活性,该活性不利地导致了芬氟拉明的有害心脏毒性。

[0065] 具体地,本文首次公开了芬氟拉明所需的抗癫痫活性存在于(R)-芬氟拉明或其代谢产物(R)-去乙芬氟拉明中,并且这些特定对映异构体仅具有低水平的不希望有的芬氟拉明心脏毒活性,因此是有效的AED。相反,大部分的芬氟拉明心脏毒性活性存在于(S)-芬氟拉明或其代谢产物(S)-去乙芬氟拉明中,因此这些对映异构体不适合用作候选AED。如本文中描述的,通过提供主题化合物的基本上不含(例如,大于80% ee)相应的(S)-对映异构体的(R)-对映异构体、AED药物组合物、方法和用途是首次公开了提供治疗或预防(如本文所提供)癫痫性发作疾病的芬氟拉明的治疗有益作用,同时基本上避免了与芬氟拉明和去乙芬氟拉明相关的有害心脏毒性的药物。

[0066] 更具体地,芬氟拉明的不良心脏毒性在于5-羟色胺受体2B激动剂活性(5-HT_{2B}受体激动剂活性),其主要与(S)-芬氟拉明及其代谢产物(S)-去乙芬氟拉明分离。因此,基本上不含(例如,超过88% ee) (S)-芬氟拉明的(R)-芬氟拉明的制剂令人惊讶地导致对映异构体富集的制剂,其特征在于,相对于由(S)-芬氟拉明、(S)-去乙芬氟拉明、芬氟拉明或去乙芬氟拉明制备的制剂具有显著更低的心脏毒性,从而提供了有用的AED。

[0067] 另外,制备基本不含(例如,大于80% ee)的(S)-芬氟拉明的(R)-芬氟拉明令人惊讶地产生具有5-羟色胺受体2A(5-HT_{2A}受体)激动剂活性以及5-羟色胺受体2C(5-HT_{2C}受体)激动剂活性的对映异构体AED组合物,并且可以代谢为(R)-去乙芬氟拉明,后者具有增强的5-HT_{2A}/5-HT_{2C}激动剂活性以及所需的促进去甲肾上腺素(NE)释放的AED特性。根据非限制性理论,对于某些实施方式,AED具有以下活性概况:5-HT_{2A}激动剂/5-HT_{2C}激动剂/NE

释放启动子/差的5-HT_{2B}激动剂。如本文所公开的，(R)-芬氟拉明及其代谢物(R)-去乙芬氟拉明出乎意料地显示出该优选的概况，以提供用于本发明方法的空前的候选AED。

[0068] 在本公开之前，在本领域中应理解，有效的5-HT_{2A}激动剂活性、有效的5-HT_{2C}激动剂活性和有效的NE释放促进活性全部存在于(S)-去乙芬氟拉明中，因此被视为候选AED。因为(S)-去乙芬氟拉明还显示出有效的5-HT_{2B}激动剂活性，所以它也被认为是不良芬氟拉明心脏毒性的来源，其不能与合乎需要的有效芬氟拉明AED活性分开。(Rothman等人，药理学、生物化学和行为学(Pharmacol.Biochem.Behav.) 71:825 (2002); Rothman等人，药理学与实验治疗学杂志(J.Pharmacol.Exp.Therapeut.) 305:1191 (2003))。

[0069] 本公开首次教导，尽管(R)-芬氟拉明及其代谢产物(R)-去乙芬氟拉明表现出次优的5-HT_{2A}激动剂和NE释放启动子活性(即，其活性分别低于(S)-芬氟拉明和(S)-去乙芬氟拉明)的事实，但可以通过选择效力较低的(R)-芬氟拉明获得治疗有效的AED。不希望受理论的束缚，目前选择效力较低的(R)-芬氟拉明或(R)-去乙芬氟拉明作为用于治疗或预防(如本文所提供的)癫痫性发作疾病的AED，只要(R)-对映异构体相对于芬氟拉明或去乙芬氟拉明，也是弱的5-HT_{2B}激动剂。因此，在本公开之前，还没有预料到与选择(R)-芬氟拉明和(R)-去乙芬氟拉明在治疗或预防(如本文所提供的)癫痫性发作疾病的本发明的方法中的用途中的相关优点，这些对映异构体作为AED的适用性以前尚未被认识到。

[0070] 因此，在某些实施方式中，本发明涉及治疗患有癫痫性发作疾病或有患癫痫性发作疾病风险的哺乳动物，优选人的方法，该方法包括给予哺乳动物治疗有效量的下述一种、两种或全部三种：

- (i) (R)-芬氟拉明或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药；
- (ii) (R)-去乙芬氟拉明或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药，和
- (iii) (R)-苯氟雷司或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药，

其中(R)-芬氟拉明基本上不含(S)-芬氟拉明(例如，大于80%ee)，(R)-去乙芬氟拉明基本上不含(S)-去乙芬氟拉明(例如，大于80%ee)，和(R)-苯氟雷司基本上不含(S)-苯氟雷司(例如大于80%ee)。

[0071] 本公开同样涉及上述化合物(i)、(ii)和(iii)中的一种、两种或全部三种在治疗患有或有患上癫痫性发作疾病风险的哺乳动物，优选人中的用途。

[0072] 在某些其他实施方式中，本公开涉及治疗患有癫痫性发作疾病或有患上癫痫性发作疾病风险的哺乳动物的方法，该方法包括向该哺乳动物施用治疗有效量的消旋去甲去氟拉明[(R/S)1-(3-(三氟甲基)苯基)丙-2-胺]。本公开还涉及外消旋去乙芬氟拉明在治疗患有癫痫性发作疾病或有患癫痫性发作疾病风险的哺乳动物中的用途。

[0073] 在一些实施方式中，本公开涉及上述化合物(i)、(ii)和(iii)中的一种、两种或全部三种或外消旋的去乙芬氟拉明在治疗中的用途。

5.3.1 癫痫和癫痫性发作疾病

[0074] 在一些实施方式中，本公开的方法和用途涉及哺乳动物，优选人的癫痫病的治疗。在特定的实施方式中，本公开的方法和用途针对患有或有患癫痫性发作疾病风险的哺乳动物，优选人的治疗。

[0075] 癫痫和癫痫性发作疾病如上所述。相关领域的技术人员将熟悉许多诊断、预后、外科、遗传和/或其他临床标准，以识别患有癫痫或任何癫痫性发作疾病或可能患有癫痫或癫

痫性发作疾病的受试者或患者,这可能表明和/或可以适应本文所述的AED组合物的临床适用性。参见,例如,Sontheimer,神经系统疾病(Diseases of the Nervous System),2015学术出版社/爱思唯尔(Academic Press/Elsevier),Waltham,MA;默克诊疗手册》第19版中的“神经系统疾病”(“Neurologic Disorders” in The Merck Manual of Diagnosis and Therapy 19th Ed.) (R.S.Porter,Ed.,2011,Merck,Inc.,NJ);美国国立卫生研究院国家神经疾病和中风研究所网站上的“神经病学诊断测试和程序”,Bethesda,MD, www.ninds.nih.gov/disorders/misc/diagnostic_tests.htm;临床实践中的神经病学“Neurology in Clinical Practice”-Vol.II,第4版,Bradley等人,(Eds),2004Butterworth Heinemann/Elsevier,费城,PA;中枢神经系统的非肿瘤性疾病(非肿瘤病理图谱-第一辑(Atlas of Nontumor Pathology-First Series Fascicle)),D.N.Lewis等人,(eds.),2010Amer.病理学注册处,安纳波利斯交界处,MD;布拉德利在临床实践中的神经病学(第6版)(Bradley's Neurology in Clinical Practice(6th Ed.)),R.B.Daroff等人(eds.),2012Saunders/Elsevier,Waltham,MA;还参见,例如,Wright等人,2016分子遗传学与基因组医学(Molec.Genet.Genom.Med.) 4(2):197;Claes等人,2001美国人类遗传学杂志(Am.J.Hum.Genet.) 68:1327-1332;Marini等人,2011癫痫(Epilepsia) 52(Suppl.2):24-29;Ceulemans等人,2012癫痫(Epilepsia) 53(7):1131-1139)。因此,对于患有或怀疑患有癫痫或任何其他癫痫性发作疾病的患者的诊断和临床监测标准是相关领域技术人员众所周知的。

[0076] 因此,本文所述的组合物和方法可用于治疗或预防(如本文所提供的)与癫痫或癫痫性发作疾病有关的多种疾病、障碍或病症,包括但不限于光敏性癫痫、自我诱发的晕厥、顽固性癫痫、局灶性癫痫、天使(Angelman)综合征、良性罗兰多(rolandic)癫痫、CDKL5疾病、儿童和青少年失神癫痫、Dravet综合征、额叶癫痫、Glut1缺乏综合征、下丘脑错构瘤、婴儿痉挛/Wests综合征、少年肌阵挛性癫痫、失语综合征、Lennox-Gastaut综合征(LGS)、肌阵挛缺失的癫痫、大田原综合征、帕纳约托普洛斯(Panayiotopoulos)综合征、PCDH19癫痫、进行性肌阵挛性癫痫、拉斯穆森(Rasmussens)综合征、20号环状染色体综合征、反射性癫痫、颞叶癫痫、拉福拉(Lafora)进行性肌阵挛性癫痫、神经皮肤综合症、结节性硬化症、婴儿早期癫痫性脑病、早发性癫痫性脑病、全身性癫痫伴高热惊厥(GEFS+)、Rett综合征、多发性硬化症、阿尔茨海默氏病、自闭症、共济失调、肌张力减退和阵发性运动障碍。

5.3.2体外测定

[0077] 用于确定(R)-对映异构体作为5HT_{2C}和/或5HT_{2A}激动剂的功效的体外测定法是已知的。参见,例如,Rothman等人,2003药理学与实验治疗学杂志(J.Pharmacol.Exp.Therapeut.) 305(3):1191-1199;Lawrence等人,2000分子药理学(Molecular Pharmacology),57:75-81;Porter等人,1999英国药理学杂志(Brit.J of Pharmacology) 128:13-20。

5.3.3动物模型

[0078] 用于测试主题化合物的(R)-对映异构体在治疗或预防(如本文所提供的)癫痫或癫痫性发作疾病的功效的动物模型是众所周知的。参见,例如,以下生物学实施例中描述的动物模型。

5.3.4剂量

[0079] 通常,某些公开的实施方式的成功治疗剂将满足以下一些或全部标准。口服量应达到或高于20%。动物模型的功效小于约0.1 μ g至约100mg/kg体重,目标人类剂量为0.1 μ g至约100mg/kg体重,尽管超出此范围的剂量也可以接受(“mg/kg”指每千克接受治疗的受试者体重施用的化合物的毫克数)。治疗指数(或毒性剂量与治疗剂量之比)应大于100。效能(例如,如通过IC50值表示,该IC50值是通过针对其靶标的体外表征确定的)应小于10 μ M,优选小于1 μ M,最优选小于50nM。

[0080] 在某些实施方式中,本文公开的方法和用途包括施用约0.1mg/kg至约50mg/kg的剂量的一种或多种主题化合物(例如芬氟拉明)的(R)-对映异构体,包括约0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、2.5、5、10、15、20或25mg/kg至约35、40、45或50mg/kg,例如约20至40mg/kg或25至35mg/kg,例如20、25、30、35或40mg/kg \pm 5%,包括30mg/kg \pm 5%。在某些实施方式中,本文公开的方法和用途包括施用约0.1mg/kg至约10mg/kg剂量的一种或多种主题化合物(例如芬氟拉明)的(R)-对映异构体,包括约0.25、0.5、0.75或1mg/kg至约2、2.5、5或10mg/kg,例如约0.5mg/kg至约2.5mg/kg或约1mg/kg至约2mg/kg,例如0.5、0.75、1、1.5、2、2.25或2.5mg/kg \pm 5%,包括1mg/kg \pm 5%或2mg/kg \pm 5%。在一个特定的实施方式中,将1mg/kg至2mg/kg的剂量施用于人类受试者以治疗癫痫或癫痫性发作疾病,如Dravet综合征。在根据本发明的方法和用途施用一种以上的本发明化合物的实施方式中,以上剂量可以代表所施用化合物的组合总剂量,或者上述剂量可以代表所施用每种化合物的单独剂量。

[0081] 在一些实施方式中,本文公开的方法和用途包括给予人剂量的一种或多种主题化合物(例如芬氟拉明)的(R)-对映异构体,其对应于约1mg/kg至约50mg/kg的小鼠剂量,包括约1、5、10、15、20或25mg/kg至约35、40、45或50mg/kg的小鼠剂量,例如约20至40mg/kg或25至35mg/kg,例如20、25、30、35或40mg/kg \pm 5%,包括30mg/kg \pm 5%。在根据本发明的方法和用途施用一种以上的本发明化合物的实施方式中,以上剂量可以代表所施用化合物的组合总剂量,或者上述剂量可以代表所施用每种化合物的单独剂量。

5.4本公开的药物组合物和给药

[0082] 在某些实施方式中,本公开还涉及药物组合物,其包含主题化合物的(R)-对映异构体,包括具有如本文所述的各种对映异构体过量的(R)-对映异构体,和一种或多种药学上可接受的赋形剂。在一个实施方式中,本公开涉及药物组合物,其包含单独地或以其组合的所述主题化合物的(R)-对映异构体,在药学上可接受的载体或赋形剂中,并且当施用于动物,优选哺乳动物,最优选人类患者时,以有效治疗或预防(如本文所提供)癫痫或其他癫痫性发作疾病的量存在。

[0083] 在另一个实施方式中,本公开涉及药物组合物,其包含治疗有效量的以下一种、两种或全部三种:

- (i) (R)-芬氟拉明或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药;
- (ii) (R)-去乙芬氟拉明或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药,和
- (iii) (R)苯氟雷司-或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药;

和药学上可接受的赋形剂,其中(R)-芬氟拉明基本上不含(S)-芬氟拉明(例如,大于80%ee), (R)-去乙芬氟拉明基本上不含(S)-去乙芬氟拉明(例如,大于80%ee), 和(R)-苯氟雷司基本上不含(S)-苯氟雷司(例如大于80%ee)。

[0084] 在一些实施方式中,本公开涉及一种药物组合物,其包含(R)-芬氟拉明或其药学上可接受的盐和一种或多种药学上可接受的赋形剂,其中(R)-芬氟拉明或其药学上可接受的盐为如本文所述的对映异构体过量,例如具有大于80%、90%、95%、97%、98%、99%或99.5% ee。在一些实施方式中,这样的药物组合物包含的(R)-芬氟拉明或其药学上可接受的盐的量不是30mg,即包括小于或大于30mg的量,例如大于31、32、35、40、45或50毫克或小于29、27或25毫克。在某些实施方式中,药物组合物包含从31、32、35、40、45或50mg到100、150、200、250、300、350或400mg,例如31mg至150mg、32mg至150mg、35mg至150mg、40mg至150mg、50mg至150mg、31mg至200mg、32mg至200mg、35mg至200mg、40mg至200mg、50mg至200mg、31mg至300mg、32mg至300mg、35mg至300mg、40mg至300mg、50mg至300mg、31mg至400mg、32mg至400mg、35mg至400mg、40mg至400mg或50mg至400mg。在一些实施方式中,药物组合物包含1、2、3、5、7或10mg至25、27或29mg的量的(R)-芬氟拉明或其药学上可接受的盐,例如5mg至25mg、5mg至27mg、5mg至29mg、10mg至25mg、10mg至27mg或10mg至29mg。在一些情况下,药物组合物包括从5mg、10mg、15mg或20mg至100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、350mg或400mg的(R)-芬氟拉明或其药学上可接受的盐,例如10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、75、80、100、125、150、175、200、225、250、300、350或400mg。

[0085] 在一些实施方式中,本公开涉及药物组合物,其包含(R)-苯氟雷司或其药学上可接受的盐和一种或多种药学上可接受的赋形剂,其中(R)-苯氟雷司或其药学上可接受的盐为如本文所述的对映异构体过量,例如具有大于80%、90%、95%、97%、98%、99%或99.5% ee。在一些实施方式中,这样的药物组合物包含的(R)-苯氟雷司或其药学上可接受的盐的量不是30mg,即包括小于或大于30mg的量,例如大于31、32、35、40、45或50毫克或小于29、27或25毫克。在某些实施方式中,药物组合物包含从31、32、35、40、45或50mg到100、150、200、250、300、350或400mg,例如31mg至150mg、32mg至150mg、35mg至150mg、40mg至150mg、50mg至150mg、31mg至200mg、32mg至200mg、35mg至200mg、40mg至200mg、50mg至200mg、31mg至300mg、32mg至300mg、35mg至300mg、40mg至300mg、50mg至300mg、31mg至400mg、32mg至400mg、35mg至400mg、40mg至400mg或50mg至400mg。在一些实施方式中,药物组合物包含1、2、3、5、7或10mg至25、27或29mg的量的(R)-苯氟雷司或其药学上可接受的盐,例如5mg至25mg、5mg至27mg、5mg至29mg、10mg至25mg、10mg至27mg或10mg至29mg。在一些情况下,药物组合物包括从5mg、10mg、15mg或20mg至100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、350mg或400mg的(R)-苯氟雷司或其药学上可接受的盐,例如10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、75、80、100、125、150、175、200、225、250、300、350或400mg。

[0086] 在一些实施方式中,本公开涉及药物组合物,其包含(R)-去乙芬氟拉明或药学上可接受的盐或前药和一种或多种药学上可接受的赋形剂,其中(R)-去乙芬氟拉明或药学上可接受的盐或前药为本文所述的对映异构体过量,例如具有大于80%、90%、95%、97%、98%、99%或99.5% ee。在一些实施方式中,这样的药物组合物包含的(R)-去乙芬氟拉明或其药学上可接受的盐的量不是30mg,即包括小于或大于30mg的量,例如大于31、32、35、40、45或50毫克或小于29、27或25毫克。在某些实施方式中,药物组合物包含从31、32、35、40、45或50mg到100、150、200、250、300、350或400mg,例如31mg至150mg、32mg至150mg、35mg至150mg、40mg至150mg、50mg至150mg、31mg至200mg、32mg至200mg、35mg至200mg、40mg至200mg、50mg至200mg、31mg至300mg、32mg至300mg、35mg至300mg、40mg至300mg、50mg至

300mg、31mg至400mg、32mg至400mg、35mg至400mg、40mg至400mg或50mg至400mg。在一些实施方式中,药物组合物包含1、2、3、5、7或10mg至25、27或29mg的量的(R)-去乙芬氟拉明或其药学上可接受的盐,例如5mg至25mg、5mg至27mg、5mg至29mg、10mg至25mg、10mg至27mg或10mg至29mg。在一些情况下,药物组合物包括从5mg、10mg、15mg或20mg至100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、350mg或400mg的(R)-去乙芬氟拉明或其药学上可接受的盐,例如10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、75、80、100、125、150、175、200、225、250、300、350或400mg。

[0087] 在某些实施方式中,本公开涉及药物组合物,其提供对映异构体过量的(R)-去乙芬氟拉明或其药学上可接受的盐或前药。在这样的实施方式中,对映异构体过量可以如本文所述,例如具有大于80%、90%、95%、97%、98%、99%或99.5%的ee。这样的药物组合物可以包含一种或多种本文所述的药学上可接受的赋形剂。

[0088] 在另一个实施方式中,本公开涉及药物组合物,其包含治疗有效量的去乙芬氟拉明外消旋物或其药学上可接受的盐或前药。

[0089] 本公开的(R)-对映异构体(或在某些实施方式中的去乙芬氟拉明外消旋体)以纯净形式或以合适的药物组合物形式的给药可以通过用于相似用途的试剂的任何可接受的给药方式来进行。本公开的药物组合物可以通过将主题化合物与适当的药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂组合来制备,并且可以配制成固体、半-固体、液体或气体制剂,例如片剂、胶囊剂、散剂、颗粒剂、软膏剂、溶液剂、栓剂、注射剂、吸入剂、凝胶剂、微球剂和气雾剂。施用此类药物组合物的典型途径包括但不限于口服、局部、透皮、吸入、肠胃外、舌下、直肠、阴道和鼻内。本文所用的术语“肠胃外”包括皮下注射、静脉内、肌肉内、胸骨内注射或输注技术。配制本公开的药物组合物,以使得其中包含的活性成分在将组合物施用于患者时可被生物利用。将要施用于受试者或患者,优选哺乳动物,更优选人类的组合物可以采取一个或多个剂量单位的形式,其中例如片剂可以是单个剂量单位,以及本发明的化合物的气雾剂形式的容器可以容纳多个剂量单位。制备这种剂型的实际方法对于本领域技术人员而言是已知的或显而易见的。例如,请参见《药物科学与实践》(The Science and Practice of Pharmacy)第20版(费城药物与科学学院,2000年)。在任何情况下,要给予的组合物将包含治疗有效量的主题化合物或其药学上可接受的盐,以根据本公开的教导来治疗或预防(如本文所提供的)所关注的疾病或状况。

[0090] 可用于本发明的药物组合物还包含药学上可接受的载体,包括任何合适的稀释剂或赋形剂,其包括本身不诱导产生对接受该组合物的个体有害的抗体的任何药剂,并且可以在没有过度毒性的情况下给药。药学上可接受的载体包括但不限于液体,例如水、盐水、甘油和乙醇等。《雷明顿药物科学》(Mack Pub.Co.,N.J.,当前版本)对可药用的载体、稀释剂和其他赋形剂进行了详尽的讨论。

[0091] 本公开的药物组合物可以是固体或液体的形式。一方面,一种或多种载体是颗粒状的,因此该组合物是例如片剂或粉末形式。载体可以是液体,与组合物形成例如是口服糖浆、可注射液体或气雾剂,其可用于例如吸入给药。

[0092] 当打算口服给药时,药物组合物优选为固体或液体形式,其中半-固体、半-液体、悬浮液和凝胶形式包括在本文认为是固体或液体形式中。

[0093] 作为用于口服的固体组合物,可以将药物组合物配制成粉剂、颗粒剂、压制片剂、丸剂、胶囊剂、口香糖、植入基(wafer)等形式。这种固体组合物通常将包含一种或多种惰性

稀释剂或可食用载体。此外,可能存在以下一种或多种:粘合剂,例如羧甲基纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂如淀粉、乳糖或糊精,崩解剂如藻酸、藻酸钠、羟基乙酸淀粉钠(Primogel)、玉米淀粉等;润滑剂,例如硬脂酸镁或氢化植物油(Sterotex);助流剂,例如胶体二氧化硅;甜味剂,如蔗糖或糖精;调味剂,例如薄荷、水杨酸甲酯或橙色调味剂;和着色剂。

[0094] 当药物组合物为胶囊剂形式时,例如明胶胶囊剂,除了上述类型的材料外,它还可以包含液体载体,例如聚乙二醇或油。

[0095] 药物组合物可以是液体的形式,例如酏剂(elixir)、糖浆剂、溶液、乳剂或混悬剂。作为两个实例,该液体可以用于口服或通过注射递送。当打算用于口服给药时,优选的组合物除了包含本发明化合物的(R)-对映异构体之外,还包含一种或多种甜味剂、防腐剂、染料/着色剂和增味剂。在打算通过注射给药的组合物中,可以包括表面活性剂、防腐剂、湿润剂、分散剂、悬浮剂、缓冲剂、稳定剂和等渗剂中的一种或多种。

[0096] 本公开的液体药物组合物,无论它们是溶液剂、混悬剂还是其他类似形式,都可以包含一种或多种以下佐剂:无菌稀释剂,例如注射用水、盐溶液,优选生理盐水、林格氏溶液、等渗氯化物、不挥发性油,例如可用作溶剂或悬浮介质的合成甘油单酯或甘油二酯、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他溶剂;抗菌剂,例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,如乙二胺四乙酸(EDTA);缓冲液,例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐,以及用于调节张力的试剂,例如氯化钠或葡萄糖。肠胃外制剂可以装入玻璃或塑料制成的安瓿瓶,一次性注射器或多剂量小瓶中。生理盐水是优选的佐剂。可注射药物组合物优选是无菌的。

[0097] 旨在用于肠胃外或口服施用的本公开的液体药物组合物应包含一定量的主题化合物的(R)-对映异构体,从而将获得合适的剂量。通常,主题化合物的该(R)-对映异构体的量为组合物重量的至少0.01%。当打算口服时,该量可以在组合物重量的0.1%至约70%之间变化。优选的口服药物组合物包含约4%至约50%的本发明化合物的(R)-对映异构体,例如约5%、7%、10%或15%至约20%、25%、30%、35%、40%或45%。制备根据本发明的优选药物组合物和制剂,使得肠胃外剂量单位在稀释之前包含0.01至10重量%的主题化合物的(R)-对映异构体,例如稀释前,按重量计0.01至4%、5%、6%、7%、8%或9%,或稀释前,按重量计介于0.01%、0.2%、0.5%、0.8%、1%、1.5%、2%、3%、4%或5%至10%。

[0098] 本公开的药物组合物可以用于局部给药,在这种情况下,载体可以适当地包含溶液、乳液、软膏或凝胶基质。例如,该基础可以包含以下一项或多项:凡士林、羊毛脂、聚乙二醇、蜂蜡、矿物油、稀释剂(例如水和酒精)以及乳化剂和稳定剂。增稠剂可以存在于用于局部施用的药物组合物中。如果打算用于透皮给药,则该组合物可以包括透皮贴剂或离子电渗疗法装置。局部用制剂可包含约0.1至约10%w/v(每单位体积的重量)之间的浓度的主题化合物的(R)-对映异构体,例如稀释前按重量计为0.01%至4%、5%、6%、7%、8%或9%,或者稀释前按重量计为介于0.01%、0.2%、0.5%、0.8%、1%、1.5%、2%、3%、4%或5%至10%之间。

[0099] 本公开的药物组合物可以用于例如栓剂形式的直肠给药,所述栓剂将在直肠中融化并释放药物。用于直肠给药的组合物可包含油性基质作为合适的非刺激性赋形剂。这样的基质包括但不限于羊毛脂、可可脂和聚乙二醇。

[0100] 用于肌内或鞘内施用的典型制剂将由活性剂在油中的悬浮液或溶液,或活性成分在油中的溶液,例如花生油或芝麻油。用于静脉内或鞘内施用的典型制剂将由无菌等渗水溶液组成,所述无菌等渗水溶液包含例如活性成分和葡萄糖,或氯化钠,或葡萄糖和氯化钠的混合物。通过采用本领域已知的方法给予患者后,本公开组合物可以配制成提供快速、持续或延迟释放活性成分,即本发明化合物的(R)-对映异构体(或在某些实施方式中为去乙芬氟拉明外消旋体)。控释药物递送系统包括渗透泵系统和溶出系统,其包含聚合物包衣的储库或药物-聚合物基质制剂。控释系统的实例在美国专利No.3,845,770和4,326,525以及P.J.Kuzma等人,局部麻醉(Regional Anesthesia),1997,22(6):543-551,其全部内容通过引用并入本文。

[0101] 本公开的组合物还可以通过鼻内药物递送系统递送,以用于局部、全身和鼻-脑医学疗法。受控颗粒分散(CPD)TM技术,传统的鼻喷雾瓶、吸入器或喷雾器是本领域技术人员已知的,以靶向嗅觉区域和鼻旁窦来提供有效的局部和全身性药物递送。

[0102] 本公开还涉及适于向人或动物雌性施用的阴道内壳或核心药物递送装置。该装置可以由聚合物基质中的活性药物成分组成,被壳层包围,并且每天能够以基本上零级模式释放主题化合物的(R)-对映异构体,类似于PCT公开专利申请号W0 98/50016和美国专利No.6,416,780中用于应用睾丸素的装置。

[0103] 最合适的给药途径将取决于所治疗疾病的性质和严重程度。本领域技术人员还熟悉确定给药方法(例如,口服、静脉内、吸入、皮下、直肠等),剂型,合适的药物赋形剂以及其他与主题化合物的(R)-对映异构体递送相关的其它问题。

[0104] 本公开的药物组合物可以包括各种材料,其改变了固体或液体剂量单位的物理形式。例如,组合物可以包括在活性成分周围形成包衣壳的材料。形成包衣壳的材料通常是惰性的,并且可以选自例如糖、虫胶和其他肠溶包衣剂。或者,可以将活性成分装在明胶胶囊中。

[0105] 本公开的固体或液体形式的药物组合物可以包含与主题化合物的(R)-对映异构体结合的试剂,从而有助于化合物的递送。可以这种能力发挥作用的合适试剂包括单克隆或多克隆抗体、蛋白质或脂质体。

[0106] 本公开的药物组合物可以由可以以气雾剂形式施用的剂量单位组成。术语“气雾剂”用于表示各种系统,从胶体性质的系统到由加压包装组成的系统。可以通过液化或压缩气体或通过分配活性成分的合适的泵系统进行输送。本发明化合物的(R)-对映异构体的气雾剂可以单相、双-相或三-相系统递送,以递送活性成分。气雾剂的输送包括必需的容器、活化剂、阀、子容器等,它们一起可以形成试剂盒。本领域技术人员无需过多实验即可确定优选的气雾剂。

[0107] 本公开的药物组合物可以通过药学领域众所周知的方法来制备。例如,可以通过将主题化合物的(R)-对映异构体(或在某些实施方式中,去乙芬氟拉明外消旋体)与无菌蒸馏水混合以形成溶液来制备打算通过注射给药的药物组合物。可以添加表面活性剂以促进均匀溶液或悬浮液的形成。表面活性剂是与主题化合物的(R)-对映异构体非-共价相互作用以促进化合物在水性递送系统中的溶解或均匀悬浮。

[0108] 通常,主题化合物的(R)-对映异构体(或在某些实施方式中,去乙芬氟拉明外消旋体)的治疗有效日剂量为(对于70kg哺乳动物)约0.001mg/kg(即0.07mg)至约100mg/kg(即

7.0g) ;优选的治疗有效日剂量(对于70kg哺乳动物)为约0.01mg/kg(即0.70mg)至约50mg/kg(即3.5g) ;更优选地,(对于70kg哺乳动物而言)治疗有效日剂量为约1mg/kg(即70mg)至约25mg/kg(即1.75g)。在一些实施方式中,主题化合物的(R)-对映异构体(或在某些实施方式中,去乙芬氟拉明外消旋体)的治疗有效日剂量为(对于70kg哺乳动物)为约0.5mg/kg至约2.5mg/kg,例如0.75mg/kg至约2.25mg/kg、1mg/kg至约2mg/kg,或约1mg/kg或约2mg/kg。

[0109] 本文提供的有效剂量范围无意为限制性的,而是代表优选的剂量范围。然而,如相关领域的技术人员所理解和确定的,最优选的剂量将针对个体受试者量身定制(参见,例如,Berkow等人,编辑,《默克手册》,(The Merck Manual),第19版,Merck和Co.,Rahway, N.J.,2011;Brunton等人,编辑,古德曼和吉尔曼的治疗学的药理基础(Goodman和Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics),第12版,McGraw-Hill2011;艾利的药物治疗:临床药理学和治疗学的原理和实践(Avery's Drug Treatment:Principles and Practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics),第3版,ADIS出版社,LTD., Williams和Wilkins,巴尔的摩,MD.(1987),Ebadi,Pharmacology,Little,Brown and Co.,波士顿,(1985);Osolci等,编辑,雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences),当前版本,Mack Publishing Co.,Easton,PA;Katzung,基础和临床药理学(Basic and Clinical Pharmacology),Appleton和Lange,诺沃克,CT(1992))。

[0110] 如果需要,可以在一天中以多次剂量或以单次剂量给予每种治疗所需的总剂量。通常,以较小的剂量开始治疗,该剂量小于化合物的最佳剂量。此后,以小增量增加剂量,直到达到该情况下的最佳效果。本发明的药物化合物或组合物可以单独施用或与针对该病理或针对该病理的其他症状的其他诊断和/或药物联合施用。本公开的主题化合物的(或在某些实施方式中,去乙芬氟拉明外消旋体)(R)-对映异构体或药物组合物的有效量为约0.1 μ g至约100mg/kg体重,以间隔4-72小时施用,为期2小时至1年,和/或其中的任何范围或值,例如0.0001-0.001、0.001-0.01、0.01-0.1、0.1-1.0、1.0-10、5-10、10-20、20-50和50-100mg/kg,间隔1-4、4-10、10-16、16-24、24-36、24-36、36-48、48-72小时1-14、14-28或30-44天或1-24周的时间段,或其中的任何范围或值。

[0111] 本公开的主题化合物的(R)-对映异构体(或在某些实施方式中,去乙芬氟拉明外消旋体)和/或药物组合物的施用的接受者可以是任何哺乳动物,包括灵长类动物的哺乳动物(包括人,猿类和猴子)、偶蹄动物(包括马、山羊、牛、绵羊、猪)、啮齿动物(包括老鼠、大鼠和仓鼠)、兔类(包括兔子)和食肉动物(包括猫和狗)。最优选的接受者是人类。

5.5联合疗法

[0112] 主题化合物的(R)-对映异构体(或在某些实施方式中,去乙芬氟拉明外消旋体)可有效地与一种或多种其他治疗剂或其任何组合组合,用于治疗或预防(如本文所提供的)哺乳动物,优选人类中的癫痫或其他癫痫性发作疾病。例如,主题化合物的(R)-对映异构体(或在某些实施方式中,去甲芬氟拉明外消旋体)可以与其他治疗剂同时、依次或分别给予,包括但不限于:

- TAAR1激动剂,例如芬特明(phentermine)(根据非限制性理论,其可以增加去甲肾上腺素的释放,作为对例如本文所述的(R)-去乙芬氟拉明对5HT_{2C}和/或5HT_{2A}受体的影响的补偿或补充;

- 阿片类镇痛药,例如吗啡、海洛因、可卡因、羟吗啡酮、左啡烷、左丙啡烷、羟考

酮、可待因、二氢可待因、丙氧芬、纳美芬、芬太尼、氢可酮、氢吗啡酮、美利替丁、美沙酮、吗啡酮、纳尔吗啡、纳洛酮、纳曲酮、丁丙诺啡、布托啡诺、纳布啡和喷他佐辛；

- 非鸦片类止痛药，例如对乙酰氨基酚、水杨酸盐（例如阿司匹林）；
- 非甾体类抗炎药（NSAIDs），例如布洛芬、萘普生、非诺洛芬、酮洛芬、塞来昔布、双氯芬酸、双氟尿酸、依托度酸、芬布芬、非诺洛芬、氟芬沙尔、氟比洛芬、布洛芬、吲哚美辛、克洛阿米芬、酮酸酸、美洛昔康、萘丁美酮、萘普生、尼美舒利、硝基氟比洛芬、奥沙拉嗪、奥沙普嗪、苯基丁酮、吡罗昔康、柳氮磺吡啶、舒林酸、托美汀和索非拉克；
- 抗惊厥药，例如卡马西平、奥卡西平、拉莫三嗪、丙戊酸盐、托吡酯、加巴喷丁和普瑞巴林；
- 抗抑郁药，例如三环类抗抑郁药，例如阿米替林、氯米帕明、去甲丙咪嗪（despramine）、丙咪嗪和去甲替林，
- COX-2选择性抑制剂，例如塞来考昔、罗非考昔、帕瑞昔布、伐地昔布、德拉考昔、依托昔布和鲁米昔布；
- α -肾上腺素，例如，多沙唑嗪、坦洛新、可乐定、胍法辛、右美托咪定、莫达非尼和4-氨基-6,7-二甲氧基-2-(5-甲磺酰胺基-1,2,3,4-四氢异喹啉-2-基)-5-(2-吡啶基)喹啉；
- 巴比妥酸盐镇静剂，例如阿莫巴比妥、戊巴比妥、丁巴比妥、布他比妥、甲巴比妥、甲乙比妥、甲氧西他汀、戊巴比妥、苯巴比妥、司可巴比妥、他布比妥、乙酰胺和硫喷妥钠；
- 速激肽（NK）拮抗剂，尤其是NK-3、NK-2或NK-1拮抗剂，例如， $(\alpha R, 9R)$ -7-[3,5-双(三氟甲基)苄基]-8,9,10,11-四氢-9-甲基-5-(4-甲基苄基)-7H-[1,4]二重氮[2,1-g][1,7]-萘啶-6-13-二酮（TAK-637）、5-[[2R,3S)-2-[(1R)-1-[3,5-双(三氟甲基)苄基]乙氧基-3-(4-氟苄基)-4-吗啉基]-甲基]-1,2-二氢-3H-1,2,4-三唑-3-酮（MK-869）、阿瑞匹坦、莱恩匹坦、达菲坦或3-[[[2-甲氧基5-(三氟甲氧基)]苄基]-甲基氨基]-2-苯基哌啶（2S,3S）；
- 煤焦油止痛剂，例如对乙酰氨基酚；
- 血清素再摄取抑制剂，例如帕罗西汀、舍曲林、去甲氟西汀（氟西汀去甲基代谢物）、代谢物去甲基舍曲林、3氟伏沙明、帕罗西汀、西酞普兰、西酞普兰代谢物去甲基西酞普兰、依西酞普兰、d,1-苯氟西汀、达泊西汀、奈法唑酮、西立拉敏、曲唑酮和氟西汀；
- 去甲肾上腺素（norepinephrine）再摄取抑制剂，例如，马普替林、洛非拉明、米氮西平、奥沙普林、非索拉明、托莫西汀、米安色林、安非他酮、安非他酮代谢物羟基安非他酮、诺米芬斯汀和维拉沙汀（Vivalan®），特别是选择性去甲肾上腺素再摄取抑制剂，例如瑞波西汀，尤其是（S,S）-瑞波西汀和文拉法辛度洛西汀抗精神病药镇静剂/抗焦虑药；
- 5-羟色胺-去甲肾上腺素再摄取抑制剂，如文拉法辛、文拉法辛代谢物O-去甲基文拉法辛、氯米帕明、氯米帕明代谢物去甲基氯米帕明、度洛西汀、米那普仑和丙米拉明；
- 乙酰胆碱酯酶抑制剂，如多奈哌齐；
- 5-HT₃拮抗剂，如恩丹西酮；
- mGluR的谷氨酸的代谢型谷氨酸受体（mGluR）拮抗剂或激动剂或变构增效剂；
- 局部麻醉药，如美西律和利多卡因；

- 皮质类固醇,例如地塞米松;
- 抗心律失常药,例如美西律和苯妥英钠;
- 毒蕈碱拮抗剂,例如托特罗定、普罗普林、曲司氯铵(tropium chloride)、达利福星、索非那新、替米弗林和异丙托铵;
- 毒蕈碱受体的毒蕈碱激动剂或乙酰胆碱的变构增效剂
- 大麻素受体的大麻素或内啡肽的变构增效剂;
- 香草类受体激动剂(例如树脂费拉托毒素(resiniferatoxin))或拮抗剂(例如辣椒碱)
- 镇静剂,例如戊乙酰亚胺、丙酸氨基甲酸酯、甲喹酮和二氯苯甲酮;
- 抗焦虑药,例如苯二氮草类药物,
- 抗抑郁药,例如米氮平,
- 局部制剂(例如,利多卡因、辣椒素和树脂费拉托毒素);
- 肌肉松弛剂,例如苯并二氮杂草、巴氯芬、卡立普多、氯唑沙宗、环苯扎林、美沙巴莫尔和奥格列汀;
- 抗组胺药或H1拮抗剂;
- NMDA受体拮抗剂;
- 5-HT受体激动剂/拮抗剂;
- PDEV抑制剂;
- **Tramadol®**;
- 胆碱能(烟碱)镇痛药;
- α -2- δ 配体;
- 前列腺素E2亚型拮抗剂;
- 白三烯B4拮抗剂;和
- 5-脂氧合酶抑制剂。

[0113] 如本文所用,“组合”是指主题化合物的(R)-对映异构体(或在某些实施方式中,去乙芬氟拉明外消旋体)与一种或多种另外的治疗剂的任何混合或排列(permutation)。除非上下文另有明确说明,否则“组合”可以包括将本发明化合物的(R)-对映异构体(或在某些实施方式中,去乙芬氟拉明外消旋体)与一种或多种治疗剂,包括其他主题化合物的(R)-对映异构体同时或依次递送。除非上下文另有明确说明,否则“组合”可以包括本发明化合物(或在某些实施方式中,去乙芬氟拉明外消旋体)的(R)-对映异构体与另一种治疗剂的剂型。除非上下文另有明确说明,否则“组合”可以包括本发明化合物的(R)-对映异构体(或在某些实施方式中,去乙芬氟拉明外消旋体)与另一种治疗剂的给药途径。除非上下文另有明确说明,否则“组合”可以包括本发明化合物的(R)-对映异构体(或在某些实施方式中,去乙芬氟拉明外消旋体)与另一种治疗剂的制剂。剂型、给药途径和药物组合物包括但不限于本文所述的那些。

[0114] 在一个实施方式中,本公开涉及本文描述的方法,该方法包括与芬特明(phentermine)同时、顺序或分开施用治疗有效量的主题化合物的(R)-对映异构体(或在某些实施方式中,去乙芬氟拉明外消旋体)。同样,本公开涉及本文所述主题化合物的(R)-对映异构体(或在某些实施方式中,去甲芬氟拉明外消旋体)同时、顺序或分别与芬特明组合

使用。

5.6 部件试剂盒

[0115] 本公开还提供了包含本文所述药物组合物的试剂盒。试剂盒还包括使用药物组合物治疗或预防(如本文所提供的)癫痫或另一种癫痫性发作疾病的说明。优选地,试剂盒将包含一个或多个单位剂量的药物组合物。例如,这种单位剂量可以是足以制备静脉内注射剂的量。对于本领域普通技术人员显而易见的是,这种对光和/或空气敏感的组合可能需要特殊的包装和/或配制。例如,可以使用对光不透明和/或密封以免与周围空气接触和/或用合适的包衣或赋形剂配制的包装。

5.7 本发明的(R)-对映异构体的制备

A. (R)-芬氟拉明和(S)-芬氟拉明的制备。

[0116] (R)-芬氟拉明和(S)-芬氟拉明可以使用手性合成子(chiral synthons)或手性试剂通过本领域技术人员已知的方法来制备,或者可以使用常规技术,例如使用手性柱的HPLC,从芬氟拉明中拆分出来。芬氟拉明通过结晶光学拆分成其(R)-对映异构体和(S)-对映异构体在例如Coquerel等人,化学快报(Chemistry Letters)(1988),第1081-1084页中公开。

B. (R)-去乙芬氟拉明和(S)-去乙芬氟拉明的制备。

[0117] (R)-去乙芬氟拉明和(S)-去乙芬氟拉明可以通过本领域技术人员已知的方法使用手性合成子或手性试剂制备,或者由去乙芬氟拉明(可商购,例如,从多伦多的北达科他州多伦多市购得)使用常规技术,例如使用手性柱的HPLC拆分。

[0118] (R)-去乙芬氟拉明和(S)-去乙芬氟拉明也可以根据以下反应方案1和2中公开的方法制备,其中使用以下缩写:

雷尼Ni是指雷尼镍(Raney Nickel);

atm是指大气;

AcOH是指乙酸;

MeOH是指甲醇;

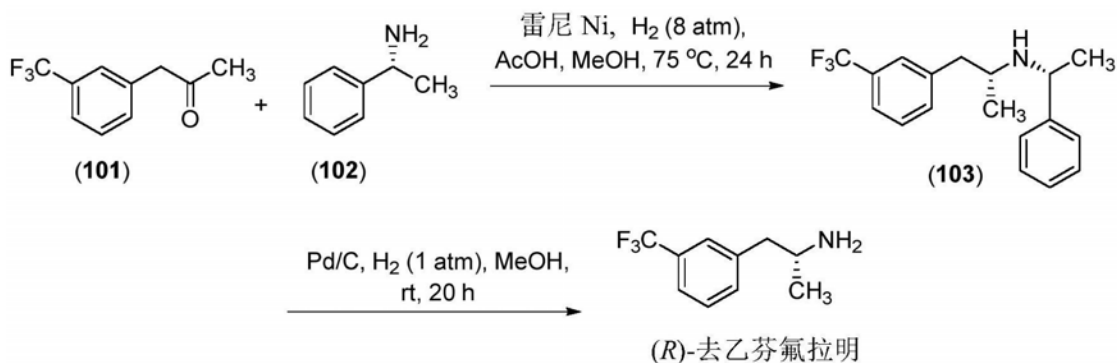
h表示小时;

Pd/C是指钯碳;和

rt是指室温。

[0119] 反应方案1显示了(R)-去乙芬氟拉明的制备:

反应方案1.

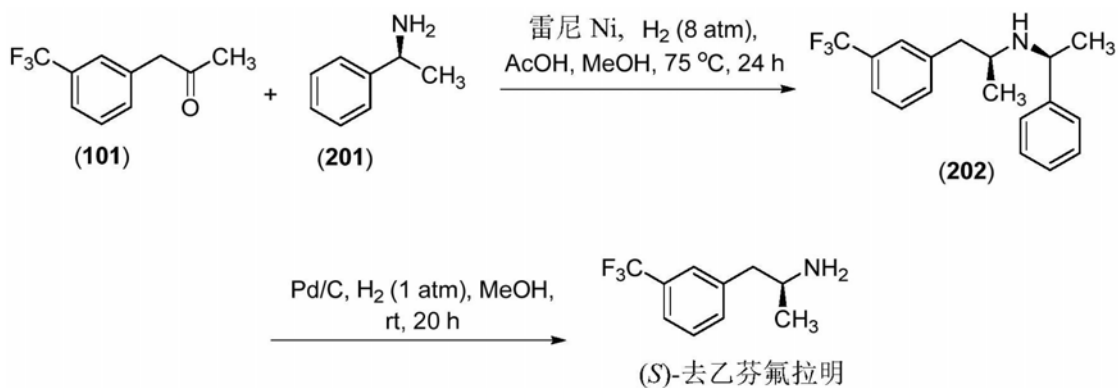


[0120] 化合物101和102可商购获得或可以通过本领域技术人员已知的方法制备。

[0121] 通常, (R)-去乙芬氟拉明可以通过反应方案1中所示的方法制备, 首先在标准还原胺化条件下用化合物102处理化合物101以形成化合物103, 然后在标准催化氢化条件下对其进行处理以形成(R)-去乙芬氟拉明。

[0122] 以类似的方式, 如以下反应方案2所示制备(S)-去乙芬氟拉明, 其中化合物101和201可商购:

反应方案2.



C. (R)-苯氟雷司和(S)-苯氟雷司的制备。

[0123] 可以通过EP 1321445中公开的方法由(R)-去乙芬氟拉明和(S)-去乙芬氟拉明制备(R)-苯氟雷司和(S)-苯氟雷司。具体地, 该方法包括(R)-去乙芬氟拉明和(S)-去乙芬氟拉明与环氧乙烷反应形成相应的氨基醇, 然后用苯甲酰氯酰化醇部分。

5.8编号的实施方式

[0124] 实施方式1一种治疗患有癫痫性发作疾病或有患癫痫性发作疾病风险的哺乳动物的方法, 该方法包括对哺乳动物施用治疗有效量的以下一种、两种或全部三种:

- (i) (R)-芬氟拉明或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药;
- (ii) (R)-去乙芬氟拉明或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药, 和
- (iii) (R)-苯氟雷司或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药,

其中(R)-芬氟拉明基本不含(S)-芬氟拉明、(R)-去乙芬氟拉明基本不含(S)-去乙芬氟拉明和(R)-苯氟雷司基本不含(S)-苯氟雷司。

[0125] 实施方式2一种治疗患有癫痫性发作疾病或有患癫痫性发作疾病风险的哺乳动物的方法, 包括同时或依次和以任何顺序向该哺乳动物给药:

- (A) 治疗有效量的下述一种、两种或三种:
 - (i) (R)-芬氟拉明或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药;
 - (ii) (R)-去乙芬氟拉明或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药, 和
 - (iii) (R)-苯氟雷司或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药; 和
- (b) 治疗有效量的芬特明或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药,

其中(R)-芬氟拉明基本不含(S)-芬氟拉明、(R)-去乙芬氟拉明基本不含(S)-去乙芬氟拉明和(R)-苯氟雷司基本不含(S)-苯氟雷司。

[0126] 实施方式3如实施方式1或实施方式2中任一项的方法, 其中癫痫性发作疾病是Dravet综合征。

[0127] 实施方式4如实施方式1或实施方式2中任一项的方法, 其中癫痫性发作疾病选自

光敏性癫痫、自我诱发的晕厥、顽固性癫痫、天使 (Angelman) 综合征、良性罗兰多 (rolandic) 癫痫、CDKL5 疾病、儿童和青少年失神癫痫、Dravet 综合征、额叶癫痫、Glut1 缺乏综合征、下丘脑错构瘤、婴儿痉挛/Wests 综合征、少年肌阵挛性癫痫、失语综合征、Lennox-Gastaut 综合征 (LGS)、肌阵挛缺失的癫痫、大田原综合征、帕纳约托普洛斯 (Panayiotopoulos) 综合征、PCDH19 癫痫、进行性肌阵挛性癫痫、拉斯穆森 (Rasmussens) 综合征、20 号环状染色体综合征、反射性癫痫、颞叶癫痫、拉福拉 (Lafora) 进行性肌阵挛性癫痫、神经皮肤综合症、结节性硬化症、婴儿早期癫痫性脑病、早发性癫痫性脑病、全身性癫痫伴高热惊厥 (GEFS+)、Rett 综合征、多发性硬化症、阿尔茨海默氏病、自闭症、共济失调、肌张力减退、阵发性运动障碍、局灶性发作、全身性发作、无神志发作、Jeavons 综合征、癫痫性脑病、向日葵综合征、脆性 X 综合征、交替性偏瘫、夜间黑色显性遗传额叶癫痫 (ADNFLE) 良性罗兰多癫痫、Doose 综合征、早期肌阵挛性脑病、婴儿期癫痫伴局灶性癫痫发作、全身性强直阵挛性癫痫发作、无肌阵挛性癫痫、持续性睡眠刺激波癫痫性脑病、青少年失神发作、进行性肌阵挛性癫痫、SCN2A 相关性癫痫、KCNQ2 相关性癫痫和 TBC1 域含激酶 (TBCK) 相关性智力障碍 (ID) 综合征。

[0128] 实施方式5一种治疗患有癫痫性发作疾病或有患癫痫性发作疾病风险的哺乳动物的方法,该方法包括向该哺乳动物给予治疗有效量的外消旋去乙芬氟拉明 [(R,S) -1- (3- (三氟甲基) 苯基) 丙烷-2-胺]。

[0129] 实施方式6一种治疗患有癫痫性发作疾病或有患癫痫性发作疾病风险的哺乳动物的方法,包括同时或依次和以任何顺序向该哺乳动物给药:

(a) 治疗有效量的外消旋去乙芬氟拉明 [(R,S) -1- (3- (三氟甲基) 苯基) 丙-2-胺]; 和

(b) 治疗有效量的芬特明或其药学上可接受的盐、溶剂化物或前药。

[0130] 实施方式7如实施方式5或实施方式6中任一项的方法,其中癫痫性发作疾病是 Dravet 综合征。

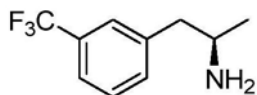
[0131] 实施方式8如实施方式5或实施方式6中任一项的方法,其中癫痫性发作疾病选自光敏性癫痫、自我诱发的晕厥、顽固性癫痫、天使 (Angelman) 综合征、良性罗兰多 (rolandic) 癫痫、CDKL5 疾病、儿童和青少年失神癫痫、Dravet 综合征、额叶癫痫、Glut1 缺乏综合征、下丘脑错构瘤、婴儿痉挛/Wests 综合征、少年肌阵挛性癫痫、失语综合征、Lennox-Gastaut 综合征 (LGS)、肌阵挛缺失的癫痫、大田原综合征、帕纳约托普洛斯 (Panayiotopoulos) 综合征、PCDH19 癫痫、进行性肌阵挛性癫痫、拉斯穆森 (Rasmussens) 综合征、20 号环状染色体综合征、反射性癫痫、颞叶癫痫、拉福拉 (Lafora) 进行性肌阵挛性癫痫、神经皮肤综合症、结节性硬化症、婴儿早期癫痫性脑病、早发性癫痫性脑病、全身性癫痫伴高热惊厥 (GEFS+)、Rett 综合征、多发性硬化症、阿尔茨海默氏病、自闭症、共济失调、肌张力减退、阵发性运动障碍、局灶性发作、全身性发作、无神志发作、Jeavons 综合征、癫痫性脑病、向日葵综合征、脆性 X 综合征、交替性偏瘫、夜间黑色显性遗传额叶癫痫 (ADNFLE) 良性罗兰多癫痫、Doose 综合征、早期肌阵挛性脑病、婴儿期癫痫伴局灶性癫痫发作、全身性强直阵挛性癫痫发作、无肌阵挛性癫痫、持续性睡眠刺激波癫痫性脑病、青少年失神发作、进行性肌阵挛性癫痫、SCN2A 相关性癫痫、KCNQ2 相关性癫痫和 TBC1 域含激酶 (TBCK) 相关性智力障碍 (ID) 综合征。

[0132] 下列实施例涉及主题化合物对映异构体的合成。提供以下生物学实施例作为指导,以帮助实施本发明方法和本主题化合物的使用,而无意于限制所要求保护的发明的范围。

6. 实施例

6.1 合成实施例1

[0133] (R)-去乙芬氟拉明((R)-1-((3-三氟甲基)苯基)丙-2-胺)的合成

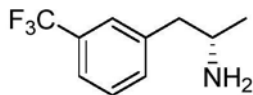


[0134] A. 向1-(3-(三氟甲基)苯基)丙-2-酮(10.0g, 49.5mmol)在甲醇(60mL)中的混合物中加入(R)-1-苯基乙-1-胺(6.00g, 49.5mmol)、雷尼镍(800mg的50%w/w水溶液)和冰醋酸(1.49g)。将混合物用氢气吹扫5分钟,加热至75℃并在氢气气氛(8atm)下搅拌24h。使混合物冷却至环境温度,并通过硅藻土垫过滤。通过添加浓盐酸(5mL)将滤液的pH调节至pH~1。加入水(30mL),并将混合物在40℃下搅拌1h。然后将混合物冷却至5℃,并在该温度下静置20分钟,在此期间沉淀出无色沉淀物。过滤收集固体,并用甲醇和水的混合物(1:1v/v, 200mL)洗涤,得到(R)-N-((R)-1-苯乙基)-1-(3-(三氟甲基)苯基)丙-2-胺(7.65g, 22.2mmol, 45%),为其相应的盐酸盐。将滤液真空浓缩至干,并将残余物用乙醚(3×30mL)洗涤,得到另外量的(R)-N-((R)-1-苯乙基)-1-(3-(三氟甲基)苯基)丙-2-胺(4.52g, 13.1mmol, 26%),为其相应的盐酸盐。总产率为71%。

[0135] B. (R)-N-((R)-1-苯乙基)-1-(3-(三氟甲基)苯基)丙-2-胺盐酸盐(2.23g, 6.50mmol)的甲醇(25mL)溶液用干燥的氮气吹扫10分钟。加入碳钯(0.44g, 10%w/w Pd)。用干燥氮气吹扫混合物10分钟,然后用氢气吹扫10分钟。然后将混合物在氢气气氛(1atm, 气球)下搅拌20小时,并通过硅藻土垫过滤。将滤液真空浓缩至干,并将残余物溶于0.2M盐酸(20mL)。将所得溶液用己烷(3×20mL)洗涤,然后通过添加氢氧化钠(~1g)将水层的pH调节至pH~12。混合物用乙酸乙酯(3×20mL)萃取,合并的有机萃取物用饱和氯化钠水溶液(50mL)洗涤,用无水硫酸钠干燥并真空浓缩至干,得到(R)-去乙芬氟拉明((R)-1-((3-三氟甲基)苯基)丙-2-胺)(1.12g, 5.52mmol, 85%),为无色油。¹H NMR(400MHz, CDCl₃): δ7.52-7.39(m, 4H), 3.22-3.18(m, 1H), 2.80-2.73(m, 1H), 2.63-2.56(m, 1H), 1.13(d, J=6.0Hz, 3H); MS(ES+) 204.2(M+H); [α]_D²⁰-16.0°(c=1.0, CHCl₃)。

6.2 合成实施例2

[0136] (S)-去乙芬氟拉明((S)-1-((3-三氟甲基)苯基)丙-2-胺)的合成



[0137] A. 向1-(3-(三氟甲基)苯基)丙-2-酮(10.0g, 49.5mmol)的甲醇(60mL)混合物中加入(S)-1-苯基乙-1-胺(6.00g, 49.5mmol)、雷尼镍(800mg的50%w/w水溶液)和冰醋酸(1.49g)。将混合物用氢气吹扫5分钟,加热至75℃并在氢气气氛(8atm)下搅拌24h。使混合物冷却至环境温度,并通过硅藻土垫过滤。通过添加浓盐酸(5mL)将滤液的pH调节至

pH~1。加入水(30mL),并将混合物在40℃下搅拌1h。然后将混合物冷却至5℃,并在该温度下静置20分钟,在此期间沉淀出无色沉淀物。通过过滤收集固体,并用甲醇和水的混合物(1:1v/v,200mL)洗涤,得到(S)-N-((S)-1-苯乙基)-1-(3-(三氟甲基)苯基)丙-2-胺(8.01g,23.3mmol,47%),为其相应的盐酸盐。将滤液真空浓缩至干,并将残余物用乙醚(3×30mL)洗涤,得到另外量的(S)-N-((S)-1-苯乙基)-1-(3-(三氟甲基)苯基)丙-2-胺(4.78g,13.9mmol,28%),为其相应的盐酸盐。总产率为75%。

[0138] B. (S)-N-((S)-1-苯乙基)-1-(3-(三氟甲基)苯基)丙-2-胺盐酸盐(2.23g,6.50mmol)的甲醇(25mL)溶液用干燥的氮气吹扫10分钟。加入碳钯(0.44g,10%w/w Pd)。用干燥氮气吹扫混合物10分钟,然后用氢气吹扫10分钟。然后将混合物在氢气氛(1atm,气球)下搅拌20小时,并通过硅藻土垫过滤。将滤液真空浓缩至干,并将残余物溶于0.2M盐酸(20mL)。将所得溶液用己烷(3×20mL)洗涤,然后通过添加氢氧化钠(~1g)将水层的pH调节至pH~12。混合物用乙酸乙酯(3×20mL)萃取,合并的有机萃取物用饱和氯化钠水溶液(50mL)洗涤,用无水硫酸钠干燥并真空浓缩至干,得到(S)-去乙芬氟拉明((S)-1-((3-三氟甲基)苯基)丙-2-胺)(1.16g,5.72mmol,88%),为无色油。¹H NMR(400MHz,CDCl₃):δ7.52-7.39(m,4H),3.22-3.18(m,1H),2.80-2.73(m,1H),2.63-2.56(m,1H),1.13(d,J=6.0Hz,3H);MS(ES+)204.2(M+H);[α]_{D20}+16.0°(c=1.0,CHCl₃)。

6.3生物测定

[0139] 用于测试本发明的(R)-对映异构体的活性的各种技术是本领域已知的。为了可以更充分地理解本文所述的发明,阐述了以下生物学测定法。应当理解,这些实施例仅用于说明目的,而不应以任何方式解释为限制本发明。

6.3.1生物实例1.Dravet综合征小鼠模型

[0140] Dravet综合征,一种癫痫性脑病,是由编码神经元特异性电压门控钠通道SCN1A的基因中的杂合性功能缺失(LOF)突变引起的。具有编码SCN1A的基因的杂合靶向缺失的小鼠概括了Dravet综合征的许多特征,并提供了一种有用的疾病模型,其中可以测试本文所述的芬氟拉明和与芬氟拉明相关的化合物,包括此类化合物的分离的对映异构体。杂合子Scn1a基因敲除(Scn1a^{+/-})小鼠也有癫痫发作,是Dravet综合征的模型。

[0141] 例如,品系129S6/SvEvTac和C57BL/6J的Scn1a^{+/-}-F1小鼠表现出严重的癫痫病和过早的致死率,被认为是人类Dravet综合征的哺乳动物模型。在F1 Scn1a^{+/-}小鼠的海马中间神经元中描述了,钠电流(INa)密度降低,以及动作电位放电受损,导致动作电位依赖性抑制GABA能神经传递减少,神经元兴奋性增强(Han等人,2012年,自然(Nature)489:385;Mistry等人,2014年神经生物学(Neurobiol.Dis.)65:1)。这些小鼠从生命的第三周开始就易感热诱发的癫痫发作,根据Oakley等人(2009)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.(美国国家科学院院刊)106(10):3994-3999;Oakley等,(2013年)药理学与实验治疗学杂志(J.Pharmacol.Exp.Ther.)345(2):215-224)。

[0142] 氟替尔癫痫发作的诱导。将5至12周龄的Scn1a^{+/-}-F1小鼠放在透明的Plexiglas™(聚(甲基丙烯酸酯),PMMA),腔室,和氟替尔(2,2,2-三氟乙基醚)(Sigma-Aldrich,圣路易斯)中通过注射泵以20ml/min的速率将其缓慢地引入腔室中,并使其挥发。癫痫发作阈值是通过测量到第一个MJ(肌阵挛性抽搐)和到GTCS(全身性强直性阵挛性癫痫发作)的潜伏期来确定的。当向小鼠给药溶媒对照或在溶媒中施用的活性化合物(例如,分离出的芬氟拉明

对映异构体)时,可以测量癫痫发作阈值。MJ是第一个可观察到的行为反应,其特征是肩膀和/或颈部的短暂抽搐。GTCS的特征是全身惊厥和姿势丧失。还对小鼠的GTCS向强直性后肢伸展的进展进行评分。

[0143] KA诱发癫痫发作.向3至4个月大的Scn1a+/-F1小鼠腹膜内(i.p.)注射15、20或30mg/kg红藻氨酸KA(海洋产品国际(Ocean Produce International),Shelburne,Nova Scotia,Canada)。为了获得合适的注射体积,将KA溶于0.9% (wt/vol) 的盐水中至2.5mg/ml的浓度。所有小鼠在中午12点至下午4点之间注射,以最大程度的减少由于昼夜节律引起的行为差异。注射KA后,观察小鼠2小时,并根据改良的Racine量表评分(Racine,R.J.1972年电子致癌剂临床神经生理学(Electroencephalogr.Clin.Neuropsychol.) 32(3):281-294)。修改后的量表基于以下标准:阶段0-无响应;阶段1-凝视;阶段2-点头;阶段3-前肢阵挛;阶段4-直立(rearing)和跌倒;阶段5-GTCS;阶段6-死亡。比较了单独施用溶媒的小鼠(对照)和接受活性芬氟拉明衍生化合物的小鼠的改良Racine量表评分。

[0144] 温度诱导的癫痫发作测定.癫痫发作是通过在Scn1a+/-F1小鼠幼崽中诱导体温过高而实现的。将P14到P22的小鼠放在Plexiglas™PMMA室中,该室的底部衬有吸收性纸。通过连接到啮齿动物温度控制器的直肠温度探针监测小鼠的中心体温,使小鼠适应PMMA测试室10分钟,将其中心体温保持在37.0℃。然后,通过使用位于测试室上方的加热灯,每2分钟将中心体温升高0.5℃,直到表明癫痫发作的行为或身体的中心体温达到42.5℃。记录癫痫发作时的中心体温、行为和时间。热疗的最长持续时间为22分钟。

[0145] 实验和临床终点:癫痫发作被定义为肌阵挛性抽搐、前爪的阵挛和/或四肢的强直性伸展。记录发作的潜伏期和持续时间。具有前惊厥活性的化合物可降低癫痫发作的潜伏期,而具有抗惊厥活性的化合物则可增加癫痫发作的潜伏期。热疗的总体暴露时间为22分钟,所有动物均在试验结束时被安乐死。

[0146] 热诱导和EEG.在一组Scn1a+/-F1小鼠中,每只动物的中心体温都由直肠温度探测器连续监测,并由与加热灯相连的反馈电路控制。每隔2分钟以0.5℃的步长升高体温,直到发生癫痫发作或达到42℃的温度。癫痫发作阈值通过第一次发作的潜伏期来测量,并在给小鼠给药溶媒(对照)或在溶媒中施用的活性化合物时进行比较。然后将动物冷却并返回其居住笼。在P22上进行热诱导,并通过视频监控记录诱导过程和由此引起的癫痫发作。在自发性癫痫发作记录和分析中,使用与下文所述相同的标准对Racine量表评分。

[0147] 自发性癫痫发作记录和分析.从P19到P27对Scn1a+/-F1小鼠进行连续视频监控。例如,以~8×的速度查看生成的视频文件。然后以降低的速度(例如以2倍的速度)检查可疑的癫痫发作事件,并根据Racine评分系统将癫痫发作的严重程度从1分为5:1,嘴巴和脸部动作;2,点头;3,前肢阵挛,通常为单侧;4,前肢阵挛伴直立;5,全身性强直阵挛性癫痫发作(GTC)、直立、阵挛和跌倒。比较单独施用溶媒的小鼠(对照)与在溶媒中施用活性化合物的小鼠(测试)的Racine评分。

[0148] 在C57BL/6J (B6) 背景下,50%的Scn1a+/-空杂合子会在生命的第三周开始出现自发性癫痫发作和偶发性死亡(Yu等人,2006年,自然神经科学杂志(Nat.Neurosci.) 9:1142-1149;Mistry等人,2014年疾病神经生物学(Neurobiol.Dis.) 65:1-11)。将P17-P20杂合小鼠(n=2-4)置于记录室中。随意提供食物和水。使用连接到DVR记录仪或计算机的模拟相机(每个隔室一个),每天24小时连续记录鼠标行为,持续10到14天。最后一次记录后五个小时

内处死小鼠。在任何测试候选AED对自发性癫痫发作功效的研究中均包括仅用溶媒处理的对照组小鼠。根据化合物的性质,根据制造商的说明(Alzet Inc.,Cupertino,CA,美国)每天或使用渗透泵长期施用化合物。

[0149] 视频文件分析:研究人员不知道实验组的状态(对照组与受试化合物)分析视频,手动或使用癫痫发作检测软件(Ethovision XT,Noldus Information Technology,Leesburg,VA)扫描行为发作。

[0150] 统计分析.对于参数数据集,使用学生t检验进行统计分析。使用Fisher精确检验分析(Fisher Exact test)二分数数据集(表现出GTCS的小鼠数量和死亡率)的统计显著性,同时使用Mann-Whitney秩和检验分析(Mann-Whitney Rank Sum)非参数数据(KA发作阶段)。

[0151] 下列实施例描述了其他体内癫痫模型,其中用于测试本发明的(R)-对映异构体。

6.3.2生物实例2.6Hz癫痫发作测试

[0152] 该测定法测试了受试化合物阻断长期持续的低频(6Hz)刺激诱发的精神运动性癫痫发作的能力,并提供了一种广为接受的治疗难治性部分性癫痫发作模型(Brown等人,1953,药理学与实验治疗学杂志(J.Pharmacol.Exp.Therapeut.),107(3):273-283;White HS,Woodhead JH,Wilcox KS,一般原则:抗癫痫药的发现和临床前开发(General principles:discovery and preclinical development of antiepileptic drugs),在:Levy RH,Mattson RH,Meldrum BS,Perucca E,编辑。抗癫痫药(Antiepileptic drugs)第五版,费城:利平科特·威廉姆斯和威尔金斯;2002年,第36-48页;Hartman等人,2008癫痫(Epilepsia)49(2):334-339)。

[0153] 研究性化合物,例如本文所述的本发明的(R)-对映异构体(例如,测试化合物),包括在最大电击癫痫发作(MES)中均无活性的那些化合物(Suzuki等,1995神经科学(Neuroscience)64(3):665-674;Bouilleret等人,1999神经科学89(3):717-729;Riban等人,2002神经科学112(1):101-111)或皮下卡地阿唑(sctra Met)(Swinyard,EA,1969年,癫痫症10(2):107-119)测试中,筛选了它们阻断由低频(6Hz),长持续时间(3sec)通过角膜电极传递的刺激引起的精神运动性癫痫发作的能力。例如,早在二十世纪50年代,左乙拉西坦非常有效(ED₅₀:腹腔注射30分钟后为19mg/kg(Toman等人,1952年得克萨斯州生物学与医学报告(Texas Reports on Biology and Medicine)10:96;Swinyard,E.A.在癫痫实验模型中电诱发的惊厥(Electrically induced convulsions,in Experimental Models of Epilepsy)Purpura等,编辑,1972年,乌鸦出版社:纽约,443-458页;E.A.Swinyard,癫痫的实验模型:实验室工作人员手册,电诱发的惊厥(Experimental Models of Epilepsy:A Manual for the Laboratory Worker,in Electrically Induced Convulsions),编辑J.K.P.D.P Purpura,D.Tower,D.M.Woodbry,R.Walter.1972年,纽约:Raven Press,第433-438页),但在MES测试中无效(Barton等人,2001年,癫痫病研究,47(3):217-227)。此外,6Hz测试证明对包括许多AED的已知Na⁺通道阻滞剂具有部分或完全抵抗性,因此使该测试可用作候选AED的早期鉴定和分化筛选。因此,发现在这种低频(6Hz)持续时间测定中有效的化合物可能治疗难治的部分性癫痫有效。

[0154] 方法.用剂量为20-100mg/kg的测试化合物对成年雄性CF1小鼠(18-25g)进行腹膜内(i.p.)预处理。如果在腹膜内施用在不同剂量下测试化合物时,在预试验筛查中发现毒

性作用,应调整剂量以避免明显的毒性作用。在用测试化合物处理后的五个时间点(1/4、1/2、1、2和4小时)中的一个或多个时间检查每个处理组($n=4-16$ 只小鼠/组)的抗惊厥作用。预处理后,每只小鼠的每只眼睛都将滴入0.5%盐酸丁卡因。然后,通过低频(6Hz)刺激通过角膜电极传递3秒钟攻击小鼠。低频、长持续时间的刺激最初以32mA的强度传递。刺激后立即手动固定动物并释放动物,并观察其是否存在癫痫发作活动。如果测试化合物在32mA筛选中有效,则执行额外的测定,其中将刺激电流增加至44mA,否则使用与上述相同的程序。对于剂量反应研究,每剂量使用 n 为8只小鼠,在特定刺激强度下达到峰值效应(TPE)时会生成剂量反应曲线。

[0155] 通常,6Hz刺激会导致癫痫发作,其特征最小的阵挛期,其后是刻板的自动行为,包括下颌阵挛、前肢阵挛、触须抽搐和/或管状尾(Straub-tail)。没有表现出这种行为的动物被认为是受保护的。癫痫评分可以用作研究性化合物功效的另一项指标(Racine, R.J.1972年电子致癌剂临床神经生理学(Electroencephalogr.Clin.Neurophysiol.) 32(3):281-294)。通过Mann-Whitney U检验分析数据, $p<0.05$ 被确定为具有统计学意义。对于在每个时间点获得的数据,结果表示为一段时间内测试的动物总数中受保护的动物总数(例如,2/4代表4只测试小鼠中有2只是受保护的)。

[0156] 产生抗惊厥作用的测试化合物(例如,在两个或两个以上时间点至少受到2/4受保护的)在其他慢性癫痫或药物抗性模型中进行测试,包括角膜点燃(kindled)的小鼠试验(Rowley和White 2010癫痫研究(Epilepsy Res.) 92(2-3):163-169),海马体点燃大鼠试验(the hippocampal kindled rat test)(Lothman,E.W.1988年癫痫病研究(Epilepsy Res.) 2(6):367-379)或耐拉莫三嗪的杏仁核点燃大鼠试验(Srivastava和White,2013年,癫痫病研究(Epilepsy Res.) 104:26)。

[0157] 由6Hz模型诱发的典型癫痫发作表现为最初的瞬时眩晕,其后立即有前肢阵挛、触须抽搐和管状尾(Barton等,2001)。这些行为提供了平移相关性,因为它们最初被描述为与部分发作的人类患者的先兆相似(Toman等人,1952年得克萨斯生物学和医学报告(Texas Reports on Biology and Medicine);10:96;Roman,JEP,1951年神经病学(Neurology) 1:444)。6Hz癫痫发作对苯二氮草类、琥珀酰胺、巴比妥酸盐、丙戊酸和其他会升高癫痫发作阈值的AED敏感(Barton等,2001)。

6.3.3生物实例3.海马体点燃大鼠模型

[0158] 该模型测试在海马体点燃的局灶性癫痫大鼠模型中测试化合物阻断行为性癫痫发作和/或减少后放电持续时间(ADD)的能力。点燃模型已成为更传统的抗惊厥试验的有用辅助,可用于确定受试物质在治疗复杂的部分性癫痫发作中的潜在效用。海马体点燃的大鼠提供了继发全身性的局灶性癫痫发作的实验模型,例如,Lothman及其同事描述的海马体点燃模型(Lothman,E.W.1988)。

[0159] 方法.首先通过外科手术准备动物以获得点燃。成年雄性Sprague-Dawley大鼠(275-300g)手术植入双极电极(Lothman,E.W.1988)。简而言之,在氯胺酮-甲苯噻嗪麻醉下,将双极电极立体定位植入腹侧海马体(AP-3.6,ML-4.9,VD-5.0,来自硬脑膜,门齿杆(incisor bar)+5.0)。开始点燃方案前,允许动物恢复一周。快速海马体点燃范例包括在交替的几天中应用重复的刺激方案,总共刺激5天,如前所述(Lothman和Williamson,1994年,大脑研究(Brain Res.) 649(1-2):71-84)。在刺激方案中,每30分钟发送一次50Hz,

10sec的1ms双相200 μ A脉冲序列,持续6小时,从而每个刺激日产生12次刺激。一旦激发动物持续出现第5阶段行为性癫痫发作,就在一周的无刺激期后评估测试化合物改变完全表达的点燃性癫痫发作的能力和后放电持续时间。在试验之间,每只被点燃的大鼠至少要经过五天的时间,才能在试验后“洗掉”任何研究性化合物。

[0160] 海马体点燃大鼠的局灶性癫痫发作。评估候选物质在点燃获取后阻止完全点燃的继发全身性癫痫发作的能力 (Lothman, E.W. 1988)。行为癫痫评分 (BSS) 根据以下标准进行评分 (Racine, R.J. 1972) :

阶段1-口腔和面部阵挛

阶段2-阶段1加上点头

阶段3-阶段2加前肢阵挛

阶段4-阶段3加直立

阶段5-阶段4加上反复的直立和跌倒

[0161] 对于以下测试 (“测试11”、“测试12”、测试13”), 计算出后放电持续时间 (ADD) 的平均值和S.E.M., p值由学生的t检验 (Student's t-test) 确定。通过非参数Mann-Whitney U检验确定了对照组和处理组BSS的显著差异, $p < 0.05$ 被确定为具有统计学意义。

[0162] 测试11: 鉴定神经毒性和阻断海马体点燃局灶性癫痫发作的能力。

[0163] 在准备海马体点燃的大鼠测试时, 应确定适当剂量的候选AED (无最小运动障碍 (MMI))。对于MMI研究, 每个时间点三组, 每组两只大鼠, 分别以300、100和30mg/kg的剂量施用测试化合物, 并在旷场试验在1/4、1/2、1、2和4小时内监测MMI。根据MMI研究的结果, 然后给两只点燃的大鼠施用无毒剂量的受试药物, 并在施用药物后的15、45、75、105、135、165和195分钟时给予点燃的刺激。记录处理对其BSS和后放电持续时间的影响。如果此初始筛选的结果表明候选AED具有针对完全表达的点燃性癫痫发作的活性, 则将组大小增加到八只大鼠以进行后续测试 (测试12和13)。

[0164] 对于每个时间组, 结果表示为一段时间内受测试的动物总数中受保护的动物总数 (例如, 每2个中有2个受保护)。产生抗惊厥作用的试验化合物 (e.g., 在两个或两个以上时间点至少1/2被保护) 将被重新筛选, 并增加n (例如 $n = 6-8$)。然后, 活性化合物将成为其他药物抗药性模型的候选药物, 包括6Hz试验 (同上) 和抗拉莫三嗪的杏仁核点燃大鼠试验 (Srivastava和White 2013癫痫研究 (Epilepsy Res.) 104:26)

[0165] 测试13: 基于BSS定量评估候选抗癫痫药阻止局灶性癫痫发作的能力。

[0166] 根据测试11 (同上) 的结果, 单独分组的点燃大鼠 ($n = 6-8$) 接受递增剂量的候选AED。然后在给药后第15、45、75、105、135、165和195分钟对大鼠进行测试。记录每只大鼠的BSS和ADD, 并计算平均值和S.E.M. 癫痫评分为3或更低的动物被认为是受保护的。这些数据用于建立剂量反应曲线和随后的ED50。还记录了ADD的重大变化。当观察到候选AED (测试药物) 显著降低癫痫发作评分 (3或更低) 和后放电持续时间 (ADD) 时, 就开始剂量反应研究。每个剂量的BSS和ADD在达到峰值效应 (TPE) 时取平均值, 并将平均值和S.E.M. 通过非参数Mann-Whitney U检验将其与对照值进行比较。量化候选AED降低癫痫发作严重程度的能力, 并通过概率分析确定ED50。

[0167] 每种候选AED剂量的BSS和ADD在TPE取平均值, 计算S.E.M., 并与对照值进行比较。候选物质降低癫痫发作严重程度的能力通过从证明保护作用的几剂剂量 ($BSS \leq 3$) 中收集

的结果进行量化,ED50通过概率分析确定。

[0168] 测试12:对海马体点燃大鼠后放电阈值的影响。

[0169] 该动物模型试验评估了候选抗癫痫药(AED)提高完全点燃大鼠的后放电阈值(ADT)的能力。初始刺激以20 μ A的强度进行。刺激强度每1-2分钟以10 μ A的增量增加,直到引起后放电。在确定药物前阈值后十五分钟,将单剂量的测试药物施用于两只动物中的每只。然后在不同的时间为每只大鼠重新测定ADT,例如,给药后1/4、1、2和4小时。在每个测试时间点都记录了BSS和ADD。癫痫发作分数和ADD也记录在ADT中。根据上述标准对行为性癫痫发作进行评分(Racine,R.J.1972)。记录个人癫痫发作分数,并记录ADD和ADT。对于表现出假定的AED活性的候选药物(试验药物),使用四只或更多只动物,然后将结果取平均值,并计算出组平均值和S.E.M.。

6.3.4生物实例4.化学惊厥模型

[0170] 该模型评估了候选AED对已知的化学惊厥药、双小分子和微毒素的影响。在该领域公认的动物模型中,癫痫发作是由GABA A受体(GABAA)拮抗剂、双小分子(BIC),和GABAA氯通道阻断剂、微毒素(PIC)引起的(参见,White等人,2012年,癫痫症(Epilepsia) 53(1):134-146;Shih等人,2001毒理学(Toxicology) 162(1):35-42;White等人,1997年,癫痫病研究(Epilepsy Res.) 28:167;Swinyard等,1993年,癫痫病研究15(1):35-45;Coleman等人,1985年,生命科学(Life Sci.) 37(8):749-755;Wood,J.D.1975年,神经生物学进展(Prog.Neurobiol.) 5:77-95;斯诺德格拉斯(Snodgrass)1992年儿童神经病学杂志(J.Child Neurol.) 7(1):77-86;Newland and Cull-Candy 1992生理学期刊(J.Physiol.) 447(1):191-213)。

[0171] 方法.在最初的研究中,将测试药物(候选AED)以适当的溶媒以各种剂量施用于实验小鼠,以评估其预防通过皮下(sc)注射BIC(2.7mg/kg)或PIC(2.5mg/kg)产生的阵挛性癫痫发作的能力;对照组接受溶媒和BIC或PIC,或仅接受溶媒。施用BIC后,将CF1小鼠置于隔离笼中,观察30分钟是否有癫痫发作;由于惊厥药PIC的吸收较慢,因此接受PIC者的观察持续45分钟。BIC和PIC诱发的癫痫发作通常包括前肢和后肢、下颌和触须的阵挛性痉挛发作。BIC诱导的阵挛性癫痫发作通常是后肢强直性伸展和死亡。

[0172] 对于在初始研究中具有预防、延迟发作或减轻阵挛性发作严重程度的剂量的候选AED化合物,在随后的八只动物的中对活性进行定量,通过概率分析确定测试化合物的ED50和95%置信区间。

6.3.5生物实例5.斑马鱼模型

[0173] 该模型在采用本领域可接受的突变斑马鱼(Danio rerio)模型中,评估在完整脊椎动物生物体中AED效应的行为和电生理特征,评估了候选AED在体内的作用(Danday等人,2015NEURO 2(4))e0068-15.2015 1-19)。神经元电压门控钠通道scn1Lab的突变纯合的斑马鱼概括了Dravet综合征样表型,表现为癫痫发作、早死和对几种AED的抗性。纯合突变体scn1Lab斑马鱼的繁殖和选择方法如下(Dinday等,2015)。

[0174] 癫痫发作监测.为了评估候选AED对斑马鱼行为的影响,将单个纯合突变体scn1Lab幼体(受精后5-6天)放置在含有亚甲蓝的胚胎培养基(Dinday等人,2015)中平底96孔板的各个孔中,在不存在或存在1-500 μ M(例如100 μ M)候选AED的情况下,使用带有运动绘图软件的运动检测视频设备(如Id.)监控游泳活动。活动的等级为零(很少或没有游泳活

动),阶段I(简短的游泳活动),阶段II(绕圈快速游泳)阶段III(阵发性全身惊厥,短暂姿势丧失)。将活性水平从阶段II或阶段III降低到零级或阶段I而没有毒性的候选AED被认为具有潜在的抗癫痫发作活性,可用于后续的电生理。

[0175] 电生理学.对至少在两项游泳活动测试的独立试验中观察到明显的AED抗癫痫发作活性且无毒的相同生物体进行电生理测试(Dinday等人,2015)。简而言之,斑马鱼被 α -邦加毒素(α -bungarotoxin) (1mg/ml) 短暂性瘫痪并固定在1.2%琼脂糖中,并将所需的特定前脑结构(例如,远脑、视神经顶盖等)与局部场电极接触以进行脑电图检查,在不存在或存在所述候选AED(Id.)的情况下评估癫痫样电图放电活性。

[0176] 生物实例6.体内6Hz癫痫发作测试中的抗惊厥作用

[0177] 在该实施例中,使用6Hz癫痫发作测试在小鼠中测试了候选AED的体内抗惊厥作用。基本上如上文生物学实施例2中所述进行6Hz癫痫发作测试,如此处所述进行轻微修改,包括在施用候选AED后一小时的时间点收集数据。

[0178] 材料和方法.

[0179] 化合物:除非另有说明,否则按上述方法制备候选AED化合物,如下所示:

外消旋的芬氟拉明([rac]-芬氟拉明盐酸盐);

(R)-芬氟拉明([R]-(-)-芬氟拉明盐酸盐);

外消旋去乙芬氟拉明([rac]-去乙芬氟拉明)购自加拿大安大略省北约克的多伦多研究化学品公司;

(R)-去乙芬氟拉明([R]-(-)-去乙芬氟拉明。

[0180] 动物:从Harlan-Envigo(新泽西州东米尔斯通(East Millstone),NJ)购买的成年雄性CF-1白化病小鼠(25-35克)。在整个实验过程中,每笼将小鼠圈养四只,并可以随意使用过滤水和食物。

[0181] 化合物的制备和给药:将所有四种化合物溶解在无菌盐水溶液(0.9%NaCl)中。在测定前一小时,以10ml/kg体积通过腹膜内(IP)注射将化合物施用至动物(每个处理组中的16只小鼠)。对照动物仅接受溶媒(盐水)。

[0182] 6Hz分析:在给药后一小时测试动物,筛选候选AED化合物阻断通过角膜电极输送的低频(6Hz)交流电(44mA),长持续时间(3sec)刺激引起的精神运动性癫痫发作的能力。据信这些癫痫发作可模拟在人类中观察到的部分癫痫发作。在输送电流之前,将0.5%的阿尔卡因(Alcaine)溶液滴在每只动物眼睛的角膜上。随后将连接至稳压电源的电极(57800型电惊厥治疗仪,Ugo Basile Srl,Gemonio,意大利)轻轻地放在动物的眼睛上,并使用脚踏板执行器通过触发三秒钟的电流脉冲来引发电击(6Hz,44mA)。用手固定动物,并在传递电击后并开始癫痫发作时将其轻轻释放。通常,癫痫发作的特征是最初的短暂性眩晕,其后立即为下颌阵挛、前肢阵挛、触须抽搐和管状尾持续至少一秒钟。没有表现出这种行为的动物被认为是“受保护的”。

[0183] 药理分布和生物分析。在6Hz分析中表征癫痫发作行为后,立即人道处死动物并收集脑和血浆样品,以分析所施用化合物在这些组织区室中的分布。

[0184] 脑样本均质化.将预先称重的整个小鼠大脑融化,并将1mL去离子水和1mL乙腈添加到每个包含脑组织的样品瓶中。使用手持式Omni™TH均质机(美国乔治亚州肯尼索的欧姆尼国际公司(Omni International,Kennesaw,GA,USA))将样品均质化,直至获得均匀的浆

料。将1mL等分试样的浆液转移至干净的1.5mL塑料Eppendorf管中,然后将管以13,000rpm (15,871x g) 离心20分钟。收集上清液,并在-80℃下保存在干净的带有标记的塑料Eppendorf小瓶中。

[0185] 小鼠血浆和脑匀浆样品制备。通过蛋白沉淀提取小鼠脑匀浆和小鼠血浆样品,以及从对照(“空白”)未经处理的小鼠血浆中制备的校准标准品和QC样品。简要地说,将50μL每种脑匀浆和小鼠血浆样品(以及每种校准标准品、QC样品和空白小鼠血浆样品)与50μL内标溶液[2500ng/mL的(S)-5-((1-苄基吡咯烷-3-基)(甲基)氨基)-6-甲基-N-(噻唑-4-基)吡啶-2-磺酰胺在去离子水/乙腈中(1:1v/v)]中的溶液混合,然后加入50μL6%(v/v)磷酸水溶液。随后加入200μL乙腈。将样品涡旋30秒,然后以13,000rpm (15,871x g) 离心20分钟。在分析之前,将上清液进一步用乙腈:水(1:1v/v)稀释四倍,并转移到96孔板中。在空白K2EDTA小鼠血浆中制备校准和QC样品,浓度范围为2.3ng/mL至4800ng/mL以及QC样品,包括低QC (14ng/mL),中QC (225ng/mL) 和高QC (3600ng/mL)。

[0186] UHPLC-ESI-MS/MS分析。然后使用配备Shimadzu Nexera™UHPLC泵、柱室和自动进样器(岛津仪器公司,(Shimadzu Scientific Instruments,Inc.),哥伦比亚,MD,US)的Sciex™TQ-5500 (AB Sciex™LP,康科德,ON,加拿大)质谱仪通过超高压液相色谱/电喷雾串联质谱(UHPLC-ESI MS/MS)分析样品,采用二元梯度洗脱,从80%水(A)/20%乙腈(B)开始,两种溶剂都包含0.1%甲酸。0.6分钟后,将流动相B线性增加至100%至1分钟,并以100%流动相B洗脱至1.5分钟,然后以80%流动相A和20%流动相B的初始比例重新平衡,总运行时间为2.5分钟,流速为0.4mL/min。使用的色谱柱为ACE Excel™2C18-PFP(i.d.2.1mm x长度5.0毫米,粒径2μm)(先进色谱技术有限公司(Advanced Chromatography Technologies Ltd),阿伯丁,苏格兰)。通过电喷雾以正离子模式将分析物和内标离子化,并使用表1中列出的转变通过多重反应监控(MRM)进行检测。

表格1:芬氟拉明、去乙芬氟拉明和内标物的多反应监测(MRM)

化合物	前体离子 (m/z)	碎片离子 (m/z)	DP(V)	CE(eV)	CXP(V)	保留时间 (分钟)
芬氟拉明	232.0	158.9	300	30	10	1.49
去乙芬氟拉明	204.1	158.8	300	25	10	1.44
内标	464.02	91.0	776	67	12	1.42

DP=去簇电压,CE=碰撞能量,CXP=出口电压,RT=保留时间

[0187] 结果。将动物随机分为溶媒(n=16)或不同剂量组(每剂量n=16),并由不了解处理条件的实验者进行6Hz检测。当以20mg/kg的剂量施用于动物时,(rac)-芬氟拉明和(R)-芬氟拉明都显示出了保护精神运动性癫痫发作的小鼠百分比相似的趋势(图1)。受(rac)-芬氟拉明保护的动物百分比为37.5%(通过Fishers精确检验p=0.018),受(R)-芬氟拉明保护的动物百分比为31.3%(p=0.043),溶媒(对照)仅为0%。类似地,以20mg/kg对动物施用(rac)-去乙芬氟拉明和(R)-去乙芬氟拉明对精神运动性癫痫发作显示出相似的保护水

平(图1)。受(rac)-去乙芬氟拉明保护的动物的百分比为50%(Fishers精确检验为 $p=0.002$)，受(R)-去乙芬氟拉明保护的动物百分比为20% ($p=0.002$)，溶媒(对照)仅为0%。

[0188] 在6Hz分析中进行功效测试后立即收集小鼠的脑和血浆样品进行UHPLC-ESI-MS/MS分析，发现所施用化合物的总脑和血浆浓度如下(表2)：

表2. 芬氟拉明/去乙芬氟拉明体内生物分布分析

化合物 (20mg/kg)	脑	等离子体
(rac)-芬氟拉明	146.5 μ M (33870ng/g)	10.74 μ M (2484ng/g)
(R)-芬氟拉明	193.7 μ M (44797ng/g)	15.02 μ M (3474ng/g)
(rac)-去乙芬氟拉明	151.2 μ M (30718ng/g)	12.97 μ M (2636ng/g)
(R)-去乙芬氟拉明	179.6 μ M (36501ng/g)	17.73 μ M (3604ng/g)

[0189] 总之，在6Hz的精神运动性癫痫发作试验中，芬氟拉明和去乙芬氟拉明都对癫痫发作具有保护活性。与芬氟拉明和去乙芬氟拉明的外消旋制剂相比，芬氟拉明和去乙芬氟拉明的对映异构体在6Hz检测中提供了相似的癫痫发作保护水平。

6.3.7生物实例7. (R/S)-芬氟拉明和(R)-芬氟拉明在听源性癫痫发作试验中的抗惊厥作用

[0190] DBA/2是一种广泛使用的小鼠近交系，其易受asp2突变引起的音源性癫痫发作的困扰。几乎100%的小鼠DBA/2品系对音源性癫痫发作具有年龄依赖性，表现出狂奔，继而发生阵挛性惊厥和强直性伸展，暴露于高强度声音时通常会导致呼吸骤停和死亡(DeSarro等，2017癫痫行为(Epilepsy Behav.) 71:165-173)。这项研究的目的是评估(R/S)-芬氟拉明的抗惊厥活性，并将其与DBA/2小鼠中的(R)-芬氟拉明进行比较。

[0191] 该方法遵循Dürmüller等人，神经报告(Neuroreport) 71(6):683-686中描述的方法。将小鼠(DBA/2, 3-4周龄)从准备室中单独转移(间隔3-5分钟)到相邻的实验室中，并放入装有电铃(110-120dB)的Plexiglas™广口瓶中(直径=40cm;高度=35cm)。激活铃铛后，会测量野外奔跑，阵挛性和强直性癫痫发作的发生和潜伏期。还记录了死亡数。给每只小鼠的听觉反应评分分别为0(无癫痫发作)，1(狂奔)，2(阵挛性惊厥)(Clonic Convulsion)，3(强直性伸展)或4(死亡)。铃铛被触发直到发生强直性癫痫发作或最多持续60秒。每组研究十(10)只小鼠。该测试是盲试进行的。将所有测试化合物溶解在0.9%的盐水(溶媒)中，并以10mL/kg的剂量体积通过腹膜内(IP)注射给药。诱发癫痫发作前60分钟单独服用(R/S)-芬氟拉明(15或30mg/kg)或(R)-芬氟拉明(30mg/kg)。诱发癫痫发作前30分钟给予阳性参考化合物(丙戊酸盐;180mg/kg)。

[0192] 图2和图3显示了在使用雄性DBA/2小鼠($n=10$ /组)的小鼠视听性发作试验中，(R/S)-芬氟拉明和(R)-芬氟拉明的抗惊厥作用的结果。

[0193] 在溶媒对照中，所有DBA/2小鼠表现出狂奔，随后发生阵挛性和强直性惊厥。观察到惊厥症状的平均潜伏期在触发铃响后的 2.8 ± 0.4 到 8.1 ± 0.8 秒之间。在测试的10只小鼠中有两只死亡。总体听觉反应评分为 3.2 ± 0.13 。(R/S)-芬氟拉明(15和30mg/kg)剂量依赖性地减少表现为阵挛性惊厥(分别为-40%和-90%)和强直性惊厥(每剂量-100%)的小鼠数量，并增加了阵挛性(分别为+441%和+853%)和强直性(每剂量+641%)惊厥的潜伏期。在15和30mg/kg时，总体听觉反应评分分别降低了50%和72%。(R)-芬氟拉明(30mg/kg)减少了表现为阵挛性惊厥的小鼠数量(-40%)，完全抑制了强直性惊厥(-100%)并增加了对

阵挛性和强直性惊厥的潜伏期(分别为+450%和+641%)。总体听觉反应评分降低了50%。

[0194] 这些结果表明,在DBA/2小鼠的音源性癫痫发作试验中,对于(R/S)-芬氟拉明(15和30mg/kg)和(R)-芬氟拉明(30mg/kg)具有明显的抗惊厥活性。抗惊厥作用的量级在15mg/kg的(R/S)-芬氟拉明和30mg/kg的(R)-芬氟拉明之间是相当的。

表3. 在使用雄性DBA/2小鼠的小鼠音源性癫痫发作试验中,(R/S)-芬氟拉明或(R)-芬氟拉明的抗惊厥作用概述(n=10/组)

治疗	剂量 (mg/kg)	音源反 应评分	狂奔		阵挛性惊厥		强直性伸展	
			发 生 率 (%)	潜伏期 (s)	发 生 率(%)	潜伏期 (s)	发生率 (%)	潜伏期 (s)
溶媒	0	3.2 ± 0.13	100	2.8 ± 0.4	100	5.8 ± 0.7	100	8.1 ± 0.8
(R/S)- 芬	15	1.6 ± 0.16	100	4.0 ± 0.7	60	31.4 ± 7.8	0	60.0 ± 0.0
	30	0.9 ± 0.18	80	16.6 ± 7.4	10	55.3 ± 4.8	0	60.0 ± 0.0
(R)-芬	30	1.6 ± 0.16	100	5.0 ± 1.4	60	31.9 ± 7.7	0	60.0 ± 0.0
丙戊酸	180	0.4 ± 0.16	40	38.1 ± 9.0	0	60.0 ± 0.0	0	60.0 ± 0.0

声源反应评分和潜伏期数据以平均值±SEM表示。

[0195] 本说明书中提及的所有美国专利、美国专利申请公开、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非-专利出版物均通过引用全文并入本文,包括2018年2月27日提交的美国临时申请号62/711,051。

[0196] 尽管已经详细描述了前述化合物、组合物、方法和用途以促进理解,但是显而易见的是,可以在所附权利要求的范围内进行某些改变和修改。因此,所描述的实施方式应被认为是说明性的而不是限制性的,并且所要求保护的发明不限于本文给出的细节,而是可以在所附权利要求的范围和等同范围内进行修改。

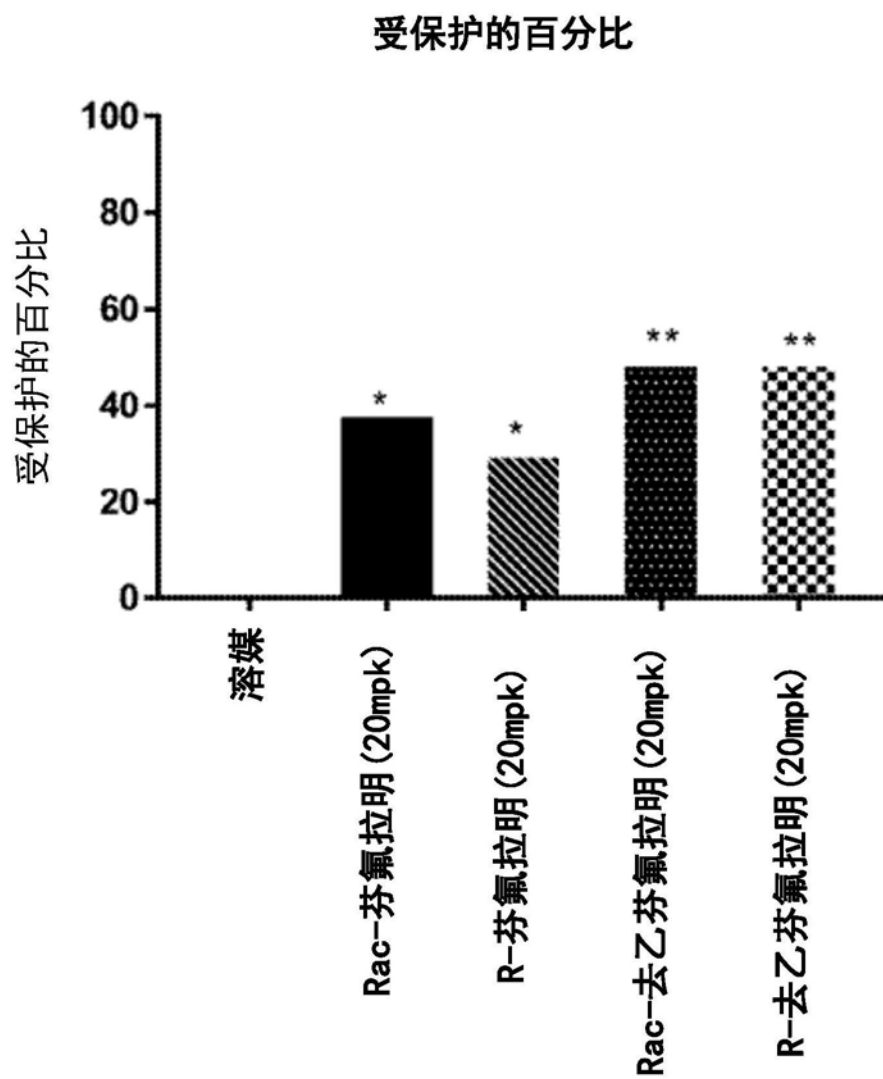


图1

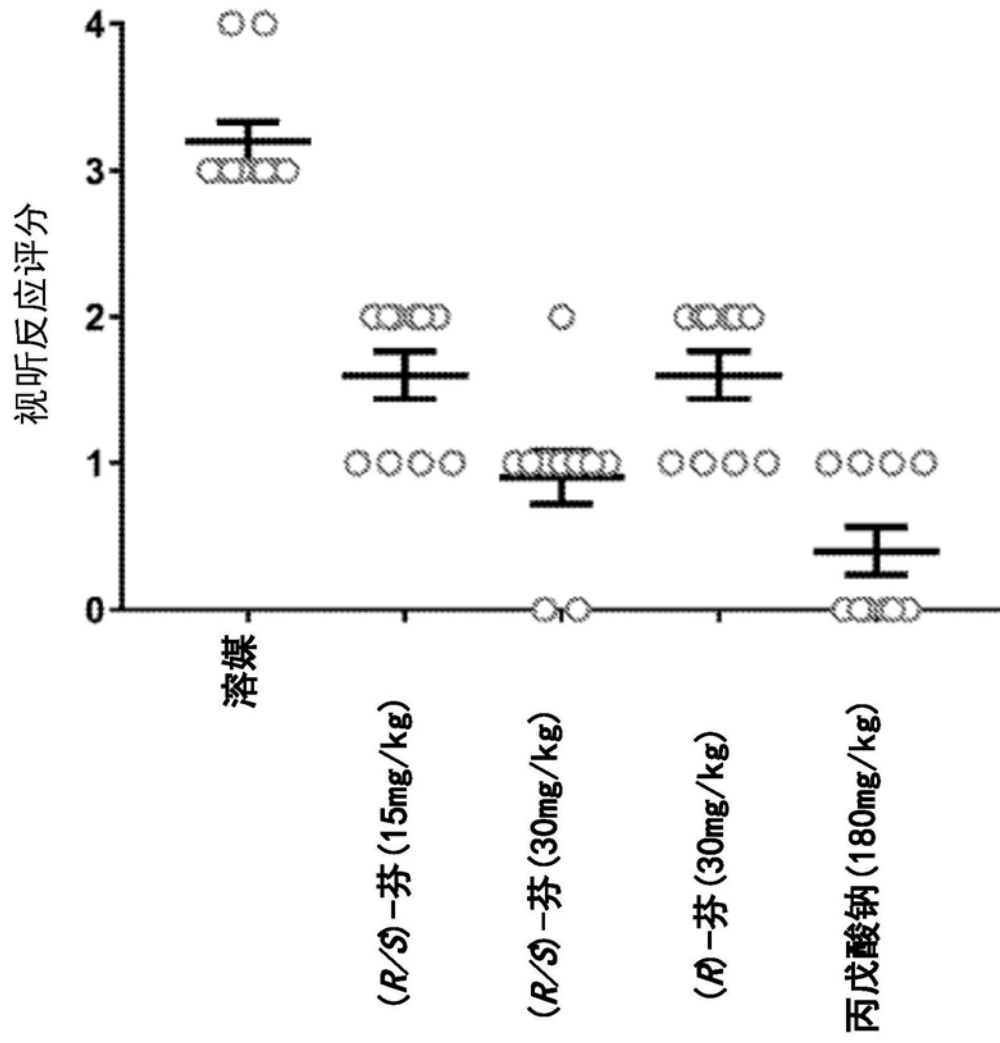


图2