

Brevetto europeo No. 2485751

Domanda di brevetto europeo No. 10822514.5

Data di deposito: 05 ottobre 2010

Classificazione Internazionale: A61K38/10, A61P25/22, A61P25/24

5 Priorità: Statunitense No. 20090248650P del 05 ottobre 2009

Titolo: "GLYX-13 PER L'USO IN UN METODO DI TRATTAMENTO DELLA DEPRESSIONE REFRATTARIA"

Richiedente: Northwestern University

633 Clark Street

Evanston, IL 60208

10 U.S.A.

Inventore: Moskal, Joseph.

Descrizione

RIFERIMENTO A DOMANDE CORRELATE

15 [0001] Questa domanda rivendica la priorità sulla Domanda di Brevetto U.S. No. 61/248650, depositata il 5 Ottobre 2009.

STATO DELL'ARTE

20 [0002] Il sistema nervoso centrale (CNS) dei mammiferi impiega molti peptidi neuroattivi per effettuare una trasmissione del segnale specializzata all'interno del cervello e del midollo spinale includendo i peptidi neuroattivi somatostatina, colecistochinina, VIP, sostanza P, encefalina, neuropeptide Y (NPY), neurotensina, TRH, CCK, e dinorfina. (vedere generalmente The Biochemical Basis of Neuropharmacology, Cooper, Bloom and Roth, 5^a ed., Oxford University Press, New York, 1986). L'attenta delucidazione delle complesse vie di trasmissione del segnale, che operano nel sistema nervoso centrale, ha portato alla identificazione di recettori specifici modulati da questi peptidi neuroattivi che presentano importanti bersagli terapeutici per svariati disordini associati con il CNS.

[0003] Il recettore di N-metil-D-aspartato (NMDA) (NMDAR), è uno di questi recettori che è stato implicato in disordini neurodegenerativi includendo morte delle cellule cerebrali correlata con ictus, disordini convulsivi, e in apprendimento e memoria. Il NMDAR svolge anche un ruolo centrale nella modulazione della trasmissione sinaptica normale, plasticità sinaptica, ed eccitotossicità nel sistema nervoso centrale. Il NMDAR è inoltre coinvolto nel potenziamento a lungo termine (LTP). Il LTP è il rafforzamento persistente delle connessioni neuronali che sono alla base dell'apprendimento e della memoria (vedere Bliss and Collingridge 1993, Nature 361: 31-39).

[0004] Nel sistema nervoso centrale (CNS) sono state caratterizzate due classi generali di recettori del glutammato. Esse sono i recettori del glutammato metabotropici, che appartengono alla famiglia dei recettori accoppiati alla proteina G di proteine di trasmissione del segnale ed i recettori del glutammato ionotropici (Muir and Lees, Stroke 1995, 26, 503-513). La classe degli ionotropici è ulteriormente suddivisa nei sottotipi dei recettori di AMPA, kainato, e NMDA mediante i ligandi selettivi che li attivano.

[0005] I recettori del glutammato ionotropici contengono un canale ionico dipendente dal ligando, che serve come un modulatore della trasmissione sinaptica. Il recettore di NMDA (NMDAR) è unico in quanto esso richiede entrambi il glutammato e la glicina per l'attivazione e la successiva apertura del canale ionico (Mothet et al., Proc. Nat. Acad. Sci., 2000, 97, 4926-4931). Recenti studi hanno dimostrato che il sito della glicina può servire per modulare l'attività di trasmissione sinaptica del glutammato al NMDAR. Pertanto, entrambi i siti del glutammato e della glicina possono essere utilizzati per la modulazione dell'attività di NMDAR.

[0006] Il NMDAR viene attivato dal legame di NMDA, glutammato (Glu) ed aspartato (Asp). Esso viene antagonizzato in maniera competitiva da D-2-ammino-5-fosfonovalerato (D-AP5, D-APV), ed antagonizzato in maniera non competitiva da fenilciclidina (PCP), e MK-801. Più interessante, il NMDAR viene co-attivato da glicina (Gly) (Kozikowski et al., 1990, Journal of Medicinal Chemistry 33: 1561-1571). Il legame della glicina si verifica in un sito di regolazione allosterico sul complesso di NMDAR, e questo aumenta sia la durata del tempo di apertura del canale, sia la frequenza dell'apertura del canale di NMDAR.

[0007] Recenti studi clinici umani hanno identificato NMDAR come un nuovo bersaglio di grande interesse per il trattamento della depressione. Questi studi condotti utilizzando gli antagonisti del NMDAR conosciuti CPC-

101606 e ketamina hanno mostrato significative riduzioni nel punteggio di classificazione della depressione di Hamilton in pazienti che soffrono di depressione refrattaria. Sebbene, l'efficacia sia stata significativa, gli effetti collaterali dell'utilizzo di questi antagonisti del NDMAR sono stati gravi.

5 [0008] Sono stati sviluppati composti agonisti ed antagonisti di piccola molecola che modulano il NMDA per il potenziale utilizzo terapeutico. Tuttavia, molti di questi sono associati con indici terapeutici molto stretti ed effetti collaterali indesiderati includendo allucinazioni, atassia, comportamento irrazionale, e tossicità significativa, i quali limitano tutti la loro efficacia e/o sicurezza.

10 [0009] Inoltre, il 50% o più dei pazienti con depressione non hanno una risposta terapeutica adeguata ai farmaci somministrati conosciuti. Nella maggior parte dei casi, sono necessarie 2 o più settimane di terapia farmacologica prima che venga osservato un miglioramento significativo, come osservato in uno studio in aperto sul trattamento farmacologico della depressione. (Rush et al., Am. J. Psychiatry 2006, 163: 1905). Attualmente non esiste alcun singolo trattamento efficace per la depressione, l'ansia, ed altre malattie correlate.

[0010] Pertanto, permane una necessità di trattamenti migliorati per la depressione, l'ansia e/o altre malattie correlate con composti che forniscano una efficacia incrementata ed effetti collaterali indesiderati ridotti.

15 **SOMMARIO**

[0011] La presente invenzione è definita nelle rivendicazioni. La presente invenzione si riferisce a GLYX-13 per l'utilizzo in un metodo di trattamento della depressione refrattaria in pazienti resistenti al trattamento che ne hanno bisogno, in cui GLYX-13 deve essere somministrato a detto paziente, per cui detto paziente è sostanzialmente alleviato in almeno un sintomo entro circa 14 giorni.

20 [0012] Di conseguenza, viene descritta la somministrazione di composti che interagiscono funzionalmente con il sito della glicina del NMDAR per il trattamento di depressione, ansia e altre malattie correlate.

[0013] Viene descritta anche la somministrazione di un composto peptidico di di-pirrolidina comprendente la sequenza Thr-Pro-Pro-Thr (SEQ ID NO: 13) esemplificato dalla Formula I (GLYX-13) per il trattamento di depressione, ansia e altre malattie correlate in mammiferi, includendo l'uomo.



[0014] Qui viene descritto anche un metodo di trattamento acuto di sintomi della depressione in un paziente che ne ha bisogno, comprendente la somministrazione di una quantità efficace di GLYX-13, per esempio, in una singola dose unitaria. Tali metodi possono alleviare il paziente in almeno un sintomo della depressione circa 2 settimane o meno, 1 settimana o meno, 1 giorno o meno, 1 ora o meno (per esempio 15 minuti o meno, mezz'ora o meno), dopo detta somministrazione.

[0015] Inoltre qui viene descritto un metodo di trattamento della depressione refrattaria in pazienti resistenti ad altri antidepressivi, in cui al paziente viene somministrata una quantità efficace di GLYX per alleviare almeno un sintomo della depressione. In alcune forme di realizzazione, il paziente resistente al trattamento viene identificato come uno che è stato trattato con almeno due tipi di trattamenti antidepressivi prima della somministrazione di GLYX-13. In altre forme di realizzazione, il paziente resistente al trattamento è uno che viene identificato come riluttante o incapace a tollerare un effetto collaterale di almeno un tipo di trattamento antidepressivo.

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

[0016]

La Figura 1 mostra peptidi di GLYX esemplificativi;

La Figura 2 mostra i risultati dei test di Porsolt condotti al fine di avere accesso all'azione antidepressiva di GLYX-13;

La Figura 3 mostra i risultati dei test di Porsolt condotti al fine di avere accesso all'azione antidepressiva di GLYX-13 in un intervallo di concentrazioni mediante somministrazione o endovenosa o sottocutanea;

La Figura 4 mostra i risultati dei test di Porsolt condotti al fine di avere accesso all'azione antidepressiva di GLYX-13 somministrato alla corteccia prefrontale mediale;

La Figura 5 mostra i risultati dei test di Porsolt condotti al fine di valutare l'azione antidepressiva di GLYX-13 rispetto ad un peptide mescolato;

La Figura 6 mostra i risultati dei test in campo aperto condotti al fine di avere accesso all'azione ansiolitica di GLYX-13;

La Figura 7 mostra i risultati dei test in campo aperto condotti al fine di avere accesso all'azione ansiolitica di GLYX-13 in un intervallo di concentrazioni mediante somministrazione o endovenosa o sottocutanea;

La Figura 8 mostra i risultati dei test di Porsolt e dei test in campo aperto condotti al fine di determinare la lunghezza di tempo in cui permane l'azione antidepressiva ed ansiolitica di GLYX-13;

5 La Figura 9 mostra l'analisi di qRT-PCR dell'espressione di mRNA corticale di NDMA in seguito al gioco di lotta (RTP);

La Figura 10 mostra che un comportamento di RTP suscita tassi elevati di vocalizzazioni ultrasoniche a 50 kHz ed una sconfitta sociale suscita tassi elevati di vocalizzazioni ultrasoniche a 22 kHz di segno opposto; e

La Figura 11 mostra gli effetti di GLYX-13 su RTP in ratti.

10 DESCRIZIONE DETTAGLIATA

[0017] La depressione è un problema psicologico comune e si riferisce ad uno stato mentale di umore basso ed avversione all'attività. I vari sintomi associati con la depressione includono sentimenti ansiosi o tristi persistenti, sentimenti di impotenza, disperazione, pessimismo, e/o inutilità, bassa energia, irrequietezza, irritabilità, stanchezza, perdita di interesse nelle attività piacevoli o nei passatempi, sonno eccessivo, alimentazione eccessiva, perdita di appetito, insonnia, pensieri di suicidio, e tentativi di suicidio. La presenza, la gravità, la frequenza e la durata dei sintomi menzionati sopra variano caso per caso.

[0018] Le condizioni di depressione più comuni includono il disordine depressivo maggiore e il disordine distimico. Altre condizioni di depressione si sviluppano in circostanze uniche. Tali condizioni di depressione includono ma non sono limitate a depressione psicotica, depressione post-partum, disordine affettivo stagionale (SAD), disordini dell'umore, depressioni causate da condizioni mediche croniche come cancro o dolore cronico, chemioterapia, stress cronico, disordini da stress post traumatico, e disordine bipolare (o depressione maniaco depressiva).

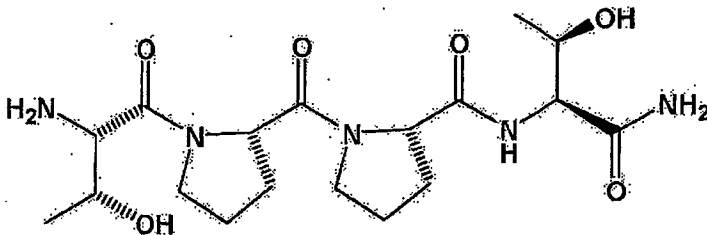
[0019] La depressione refrattaria si verifica in pazienti, che soffrono di depressione, che sono resistenti ai trattamenti farmacologici standard, inclusi antidepressivi triciclici, MAOI, SSRI, inibitori a doppio e triplo assorbimento e/o farmaci ansiolitici, così come trattamenti non farmacologici come psicoterapia, terapia elettroconvulsivante, stimolazione del nervo vago e/o stimolazione magnetica transcranica. Un paziente resistente al

trattamento può essere identificato come uno che non riesce ad ottenere una attenuazione di uno o più sintomi di depressione (per esempio, sentimenti ansiosi o tristi persistenti, sentimenti di impotenza, disperazione, pessimismo), nonostante sia sottoposto a uno o più trattamenti farmacologici o non farmacologici standard. In alcune forme di realizzazione, un paziente resistente al trattamento è uno che non riesce ad ottenere una attenuazione di uno o più sintomi di depressione, nonostante sia sottoposto a due farmaci antidepressivi differenti. In altre forme di realizzazione, un paziente resistente al trattamento è uno che non riesce ad ottenere una attenuazione di uno o più sintomi di depressione, nonostante sia sottoposto ad un trattamento con quattro farmaci antidepressivi differenti. Un paziente resistente al trattamento può anche essere identificato come uno che è riluttante o incapace a tollerare gli effetti collaterali di uno o più trattamenti farmacologici o non farmacologici standard. In alcune forme di realizzazione, l'invenzione si riferisce a metodi per il trattamento della depressione refrattaria mediante la somministrazione di una quantità efficace di GLYX-13 ad un paziente resistente al trattamento che ne ha bisogno.

Peptidi di GLYX

[0020] Come usato qui, il termine "peptide di GLYX" si riferisce ad un peptide avente una parziale attività di agonista/antagonista del sito della glicina di NMDAR. I peptidi di GLYX possono essere ottenuti mediante metodi ricombinanti o sintetici ben conosciuti come quelli descritti nei Brevetti U.S. 5,763,393 e 4,086,196 incorporati qui a titolo di riferimento. Peptidi esemplificativi vengono illustrati nella Figura 1. In alcune forme di attuazione, GLYX si riferisce ad un tetrapeptide avente la sequenza amminoacidica Thr-Pro-Pro-Thr (SEQ ID NO: 13), o L-treonil-L-prolil-L-prolil-L-treonina ammide.

[0021] Per esempio, GLYX-13 si riferisce al composto rappresentato come:



[0022] Sono anche contemplati polimorfi, idrati, solvati, basi libere, forme di sale di GLYX 13 adeguate come, ma non limitate a, il sale di acetato. Il peptide può essere in forma ciclizzata o non ciclizzata come ulteriormente descritto in US 5 763 393. Agonisti parziali del sito della glicina del NMDAR vengono divulgati in US 5 763 393, US 6 107 271, e Wood et al., NeuroReport, 19, 1059-1061, 2008.

5 **Metodi**

[0023] GLYX-13 può agire prevalentemente a NMDAR contenenti NR2B, e può non visualizzare gli effetti collaterali classici dei modulatori di NMDAR conosciuti come CPC-101606 e ketamina. Per esempio, gli studi in vitro mostrano che GLYX-13 può elevare in maniera marcata il potenziamento a lungo termine (LTP) e contemporaneamente ridurre la depressione a lungo termine (LTD) in colture organotipiche ippocampali di ratto.

10 [0024] In aggiunta, GLYX-13 può avere una migliore penetrazione della barriera ematoencefalica (BBB) rispetto a molti dei ligandi del sito della glicina precedenti (Leeson & Iversen, J. Med. Chem. 37: 4053-4067, 1994) e può attraversare la BBB prontamente. In alcune forme di realizzazione, GLYX-13 o una composizione comprendente GLYX-13 può fornire una migliore potenza i.v. in vivo e/o concentrazione a livello cerebrale, rispetto ai livelli plasmatici.

15 [0025] In aggiunta, GLYX-13 può avere un ampio indice terapeutico rispetto ad altri antagonisti del sito della glicina, come L-701324, o altri antagonisti del sito della glicina che hanno indici terapeutici ristretti, cosa che ha come risultato un intervallo di dose molto ristretto tra effetti terapeutici ed atassia. Per esempio, L-701324 ha avuto effetti anticonvulsivanti a dosi che hanno prodotto atassia (Bristow, et al., JPET 279: 492-501, 1996). In maniera simile, una serie di composti di Merz hanno avuto effetti anticonvulsivanti a dosi che hanno prodotto atassia (Parsons, et al.,
20 JPET283: 1264-1275, 1997).

[0026] GLYX-13 può fornire un indice terapeutico elevato. Per esempio, GLYX-13 può essere terapeuticamente efficace per depressione e/o ansia con un intervallo di dose i.v. da circa 1 a circa 10 mg/kg. In alcune forme di realizzazione, non si verifica alcuna atassia, a per esempio una dose di 500 mg/kg, i.v.

25 [0027] Inoltre viene descritto l'uso di un peptide o peptidi di GLYX da soli o in combinazione con uno o più altri trattamenti antidepressivi, come, antidepressivi tricyclici, MAO-I, SSRI ed inibitori a doppio e triplo assorbimento

e/o farmaci ansiolitici per la fabbricazione di un medicinale per il trattamento di depressione, ansia e/o altre malattie correlate, ivi incluse la fornitura di sollievo da depressione, ansia e la prevenzione di ricadute di depressione ed ansia. Farmaci esemplificativi che possono essere utilizzati in combinazione con un peptide di GLYX includono Anafranil, Adapin, Aventyl, Elavil, Norpramin, Pamelor, Pertofrane, Sinequan, Surmontil, Tofranil, Vivactil, Parnate, Nardil, 5 Marplan, Celexa, Lexapro, Luvox, Paxil, Prozac, Zoloft, Wellbutrin, Effexor, Remeron, Cymbalta, Desyrel (trazodone), e Ludiomill.

[0028] Qui vengono anche descritti metodi di trattamento della depressione che, includono la somministrazione di peptidi di GLYX in combinazione con (per esempio, simultaneamente o sequenzialmente) altri trattamenti non farmacologici, come psicoterapia, terapia elettroconvulsivante, stimolazione del nervo vago e/o 10 stimolazione magnetica transcranica.

[0029] Ci si attende che una varietà di condizioni di depressione vengano trattate secondo questo aspetto dell'invenzione, senza influenzare il comportamento o la coordinazione motoria, e senza indurre o promuovere attività di crisi. Le condizioni di depressione esemplificative che ci si attende vengano trattate secondo questo aspetto dell'invenzione includono, ma non sono limitate a, disordine depressivo maggiore, disordine distimico, depressione 15 psicotica, depressione post-partum, sindrome premestruale, disordine disforico premestruale, disordine affettivo stagionale (SAD), ansia, disordine dell'umore, depressione causata da condizioni mediche croniche come cancro o dolore cronico, chemioterapia, stress cronico, disordini da stress post-traumatico, e disordine bipolare (o disordine maniaco depressivo). In aggiunta, i pazienti che sono affetti da qualsiasi forma di depressione spesso sperimentano l'ansia. I vari sintomi associati con l'ansia includono paura, panico, palpitazioni cardiache, mancanza di respiro, 20 affaticamento, nausea e mal di testa tra gli altri. È atteso che i metodi della presente condizione possano essere utilizzati per trattare l'ansia o uno qualsiasi dei suoi sintomi.

[0030] In aggiunta, ci si attende che una varietà di altre condizioni neurologiche siano trattate secondo i metodi dell'invenzione. Condizioni esemplificative includono, ma non sono limitate a, un disordine dell'apprendimento, disordine autistico, disordine di iperattività da deficit dell'attenzione, sindrome di Tourette, fobia, disordine da stress 25 post-traumatico, demenza, demenza da AIDS, malattia di Alzheimer, malattia di Parkinson, malattia di Huntington,

spasticità, mioclono, spasmo muscolare, disordine bipolare, disordine da abuso di sostanze, incontinenza urinaria, e schizofrenia.

[0031] Qui vengono anche descritti metodi di trattamento della depressione in pazienti resistenti al trattamento o depressione refrattaria al trattamento, per esempio, pazienti che soffrono di un disordine di depressione che non lo fa rispondere, e/o non ha risposto a cure adeguate con almeno uno, o almeno due, altri composti antidepressivi o terapeutici. Per esempio, qui viene descritto un metodo di trattamento della depressione in un paziente resistente al trattamento, comprendente a) facoltativamente identificare il paziente come resistente al trattamento e b) somministrare una dose efficace di GLYX-13 a detto paziente.

[0032] In una forma di realizzazione, qui vengono descritti metodi di trattamento acuto di sintomi della depressione in un paziente che ne ha bisogno, comprendenti la somministrazione di una quantità efficace di GLYX-13, per esempio, in una singola dose unitaria. Tali metodi possono alleviare il paziente in almeno un sintomo di depressione circa 2 settimane o meno, 1 settimana o meno, 1 giorno o meno, 1 ora o meno (per esempio 15 minuti o meno, mezz'ora o meno), dopo detta somministrazione. Per esempio, qui viene fornito un metodo comprendente la somministrazione di una quantità efficace di GLYX-13 ad un paziente che soffre di depressione, in cui detto paziente è sostanzialmente alleviato in almeno un sintomo di depressione dopo la prima somministrazione di GLYX-13, sostanzialmente prima rispetto allo stesso paziente a cui viene somministrato un composto antidepressivo non GLYX-13.

[0033] I sintomi della depressione, e il sollievo degli stessi, possono essere accertati da un medico o uno psicologo, per esempio, mediante un esame dello stato mentale. I sintomi includono pensieri di disperazione, autolesionismo o suicidio e/o una assenza di pensieri positivi o di progetti.

Dosaggi

[0034] Il dosaggio di qualsiasi composizione descritta qui varierà a seconda dei sintomi, dell'età e del peso corporeo del paziente, della natura e della gravità del disordine che deve essere trattato o prevenuto, della via di somministrazione, e della forma della composizione di oggetto. Una qualsiasi delle formulazioni di oggetto può essere somministrata in una singola dose o in dosi divise. I dosaggi per le composizioni possono essere facilmente determinati mediante tecniche conosciute dai tecnici competenti nell'arte o come insegnato qui.

[0035] Una quantità terapeuticamente efficace di peptide di GLYX richiesta per l'uso in terapia varia con la forma della condizione di depressione in trattamento, la lunghezza del tempo di trattamento desiderata, l'età e la condizione del paziente, e in ultima analisi, viene determinata dal medico curante. In generale, tuttavia, le dosi impiegate per il trattamento di un uomo adulto tipicamente sono nell'intervallo da circa 0,01 mg/kg a circa 1000 mg/kg al giorno. La dose può essere da circa 0,1 mg/kg a circa 100 mg/kg al giorno. La dose desiderata può essere somministrata comodamente in una singola dose o come dosi multiple somministrate ad intervalli appropriati, per esempio come due, tre, quattro o più sotto-dosi al giorno.

[0036] Una dose o quantità efficace, e ogni possibile influenza sul tempo di somministrazione della formulazione, possono dover essere identificate per una qualsiasi composizione particolare della presente invenzione. Questo può essere compiuto mediante un esperimento ordinario come descritto qui, utilizzando uno o più gruppi di animali (preferibilmente almeno 5 animali per gruppo), o in sperimentazioni umane, se appropriato. L'efficacia di qualsiasi composizione di oggetto e metodo di trattamento o prevenzione può essere valutata somministrando la composizione e valutando l'effetto della somministrazione mediante la misurazione di uno o più indici applicabili, e confrontando i valori dopo il trattamento di questi indici con i valori degli stessi indici prima del trattamento.

[0037] Il tempo esatto di somministrazione e la quantità di qualsiasi composizione di oggetto particolare, che produrranno il trattamento il più efficace in un dato paziente dipenderanno dall'attività, dalla farmacocinetica, e dalla biodisponibilità di una composizione di oggetto, dalla condizione fisiologica del paziente (ivi inclusi l'età, il sesso, il tipo e lo stadio di malattia, la condizione fisica generale, la capacità di risposta ad un determinato dosaggio e tipo di medicinale), la via di somministrazione, e simili. Le linee guida presentate qui possono essere usate per ottimizzare il trattamento, per esempio, determinando il tempo e/o la quantità di somministrazione ottimali, cosa che richiederà non più che una sperimentazione ordinaria che consiste nel monitoraggio del soggetto e nella regolazione del dosaggio e/o dei tempi.

[0038] Mentre il soggetto viene trattato, la salute del paziente può essere monitorata misurando uno o più degli indici rilevanti in momenti prestabiliti durante il periodo di trattamento. Il trattamento, ivi inclusi la composizione, le quantità, i tempi di somministrazione e la formulazione, può essere ottimizzato in base ai risultati di un tale



monitoraggio. Il paziente può essere rivalutato periodicamente per determinare l'entità del miglioramento misurando gli stessi parametri. Regolazioni della(e) quantità della composizione di oggetto somministrata ed, eventualmente, del tempo di somministrazione possono essere effettuate sulla base di queste rivalutazioni.

5 [0039] Il trattamento può essere iniziato con dosaggi più piccoli che sono inferiori rispetto alla dose ottimale del composto. Successivamente, il dosaggio può essere incrementato di piccoli incrementi fino a quando viene raggiunto l'effetto terapeutico ottimale.

[0040] L'utilizzo delle composizioni di oggetto può ridurre il dosaggio richiesto per qualsiasi singolo agente contenuto nelle composizioni dal momento che l'insorgenza e la durata dell'effetto dei diversi agenti possono essere complementari.

10 [0041] La tossicità e l'efficacia terapeutica di composizioni di oggetto possono essere determinate mediante procedure farmaceutiche standard in colture cellulari o animali sperimentali, per esempio, per determinare la LD50 e la ED50.

15 [0042] I dati ottenuti dai saggi di coltura cellulare e dagli studi su animali possono essere usati nella formulazione di un intervallo di dosaggio per l'uso nell'uomo. Il dosaggio di qualsiasi composizione di oggetto si trova preferibilmente all'interno di un intervallo di concentrazioni circolanti che includono la ED50 con poca o nessuna tossicità. Il dosaggio può variare all'interno di questo intervallo a seconda della forma di dosaggio impiegata e della via di somministrazione utilizzata. Per composizioni della presente invenzione, la dose terapeuticamente efficace può essere stimata inizialmente da saggi di coltura cellulare.

Formulazioni

20 [0043] I peptidi di GLYX possono essere somministrati mediante svariati mezzi, a seconda della loro destinazione d'uso, come è ben conosciuto nell'arte. Per esempio, se le composizioni devono essere somministrate per via orale, esse possono essere formulate come compresse, capsule, granulati, polveri o sciroppi. Alternativamente, le formulazioni possono essere somministrate per via parenterale come iniezioni (endovenosa, intramuscolare o sottocutanea), preparazioni di infusione a goccia, o supposte. Per l'applicazione mediante la via della membrana di
25 mucosa oftalmica, le composizioni della presente invenzione possono essere formulate come colliri o pomate oculari.

Queste formulazioni possono essere preparate mediante mezzi convenzionali, e, se desiderato, le composizioni possono essere miscelate con qualsiasi additivo convenzionale, come un eccipiente, un legante, un agente disgregante, un lubrificante, un correttivo, un agente solubilizzante, un aiuto di sospensione, un agente emulsionante o un agente di rivestimento.

5 [0044] Il DNA che codifica per i peptidi di GLYX, incorporato in un vettore di espressione, può anche essere somministrato, utilizzando uno qualsiasi dei metodi di somministrazione conosciuti, per esprimere i peptidi di GLYX *in vivo*.

10 [0045] Nelle formulazioni descritte qui, agenti bagnanti, emulsionanti e lubrificanti, come il sodio lauril solfato e lo stearato di magnesio, così come agenti coloranti, agenti di rilascio, agenti di rivestimento, dolcificanti, aromatizzanti e agenti profumanti, conservanti e antiossidanti possono essere presenti negli agenti formulati.

15 [0046] Le composizioni di oggetto possono essere adeguate per una somministrazione orale, topica (includendo buccale e sublinguale), rettale, vaginale, per aerosol e/o parenterale. Le formulazioni possono essere convenientemente presentate in forma di dosaggio unitario e possono essere preparate mediante qualsiasi metodo ben conosciuto nell'arte farmaceutica. La quantità di composizione che può essere combinata con un materiale trasportatore per produrre una singola dose varia a seconda del soggetto che deve essere trattato, e della particolare modalità di somministrazione.

20 [0047] I metodi di preparazione di queste formulazioni includono la fase di portare in associazione le composizioni della presente invenzione con il trasportatore e, facoltativamente, uno o più ingredienti accessori. In generale, le formulazioni vengono preparate portando uniformemente e intimamente in associazione gli agenti trasportatori liquidi, o trasportatori solidi finemente suddivisi, o entrambi, e quindi, se necessario, modellando il prodotto.

25 [0048] Le formulazioni adeguate per una somministrazione orale possono essere nella forma di capsule, cachet, pillole, compresse, pastiglie (usando una base aromatizzata, solitamente saccarosio e acacia o gomma adragante), polveri, granuli, o come una soluzione o una sospensione in un liquido acquoso o non acquoso, o come una emulsione liquida di olio in acqua o acqua in olio, o come un elisir o uno sciroppo, o come pasticche (usando una base

inerte, come gelatina e glicerina, o saccarosio e acacia), ciascuna contenente una quantità predeterminata di una sua composizione soggetto come un principio attivo. Le composizioni della presente invenzione possono anche essere somministrate come un bolo, elettuario, o impasto.

5 [0049] In forme di dosaggio solide per la somministrazione orale (capsule, compresse, pillole, confetti, polveri, granuli e simili), la composizione di oggetto viene miscelata con uno o più trasportatori accettabili da un punto di vista farmaceutico, come citrato di sodio o fosfato bicalcico, e/o uno dei seguenti: (1) riempitivi o amplificatori di volume, come amidi, lattosio, saccarosio, glucosio, mannitolo, e/o acido silicico; (2) leganti, come, per esempio, carbossimetilcellulosa, alginati, gelatina, polivinile pirrolidone, saccarosio e/o gomma arabica; (3) umettanti, come glicerolo; (4) agenti disgreganti, come agar-agar, carbonato di calcio, amido di patate o di tapioca, acido alginico, alcuni
10 silicati, e carbonato di sodio; (5) agenti ritardanti la soluzione, come paraffina; (6) acceleratori dell'assorbimento, come composti di ammonio quaternario; (7) agenti bagnanti, come, per esempio, alcol acetilico e monostearato di glicerolo; (8) adsorbenti, come caolino e bentonite; (9) lubrificanti, come talco, stearato di calcio, stearato di magnesio, polietilenglicoli solidi, sodio lauril solfato, e loro miscele; e (10) agenti coloranti. Nel caso di capsule, compresse e pillole, le composizioni possono anche comprendere agenti di tamponamento. Composizioni solide di un tipo simile
15 possono anche essere utilizzate come riempitivi in capsule di gelatina molli e dure piene utilizzando eccipienti come lattosio o zuccheri del latte, così come polietilenglicoli ad elevato peso molecolare e simili.

[0050] Una compressa può essere prodotta mediante compressione o stampaggio, facoltativamente con uno o più ingredienti accessori. Le compresse pressate possono essere preparate utilizzando legante (per esempio, gelatina o idrossipropilmetilcellulosa), lubrificante, diluente inerte, conservante, disgregante (per esempio, glicolato di amido di sodio o carbossimetilcellulosa di sodio reticolata), tensioattivo o agente disperdente. Le compresse stampate possono
20 essere prodotte mediante lo stampaggio in una macchina adeguata di una miscela di composizione di oggetto inumidita con un diluente liquido inerte. Compresse, e altre forme di dosaggio solide, come confetti, capsule, pillole e granuli, possono facoltativamente essere incise o preparate con rivestimenti e coperture, come rivestimenti enterici e altri rivestimenti ben conosciuti nell'arte della formulazione farmaceutica.

[0051] Le forme di dosaggio liquide per la somministrazione orale includono emulsioni, microemulsioni, soluzioni, sospensioni, sciroppi ed elisir accettabili da un punto di vista farmaceutico. In aggiunta alla composizione di oggetto, le forme di dosaggio liquide possono contenere diluenti inerti comunemente usati nell'arte, come, per esempio, acqua o altri solventi, agenti solubilizzanti ed emulsionanti, come alcool etilico, alcool isopropilico, carbonato di etile, acetato di etile, alcool benzilico, benzoato di benzile, propilene glicole, 1,3-butilene glicole, oli (in particolare, oli di semi di cotone, arachidi, mais, germoglio, oliva, ricino e sesamo), glicerolo, alcool di tetraidrofurile, polietilenglicoli ed esteri di acidi grassi di sorbitano, ciclodestrine e loro miscele.

[0052] Le sospensioni, in aggiunta alla composizione di oggetto, possono contenere agenti di sospensione come, per esempio, alcoli isostearilici etossilati, sorbitolo di poliossietilene ed esteri di sorbitano, cellulosa microcristallina, metaidrossido di alluminio, bentonite, agar-agar e gomma adragante, e loro miscele.

[0053] Le formulazioni per la somministrazione rettale o vaginale possono essere presentate come una supposta, che può essere preparata miscelando una composizione di oggetto con uno o più eccipienti o trasportatori non irritanti adeguati comprendenti, per esempio, burro di cacao, polietilene glicole, una cera per supposte o un salicilato, e che è solido a temperatura ambiente ma liquido a temperatura corporea e di conseguenza si scioglierà nella cavità del corpo e rilascerà l'agente attivo. Le formulazioni che sono adeguate per la somministrazione vaginale includono anche pessari, tamponi, creme, gel, paste, schiume o formulazioni a spruzzo contenenti tali trasportatori come sono conosciuti nell'arte per essere appropriati.

[0054] Le forme di dosaggio per la somministrazione transdermica di una composizione di oggetto includono polveri, spray, unguenti, paste, creme, lozioni, gel, soluzioni, e cerotti.

[0055] Per la somministrazione topica oculare, le composizioni di questa invenzione possono assumere la forma di soluzioni, gel, unguenti, sospensioni o inserti solidi, formulati in modo tale che un dosaggio unitario comprenda una quantità terapeuticamente efficace del componente attivo o un suo multiplo nel caso di una terapia combinata.

[0056] Le composizioni farmaceutiche adeguate per la somministrazione parenterale comprendono una composizione oggetto in combinazione con una o più soluzioni sterili isotoniche acquose o non acquose, dispersioni,

sospensioni o emulsioni, o polveri sterili che possono essere ricostituite in soluzioni o dispersioni iniettabili sterili appena prima dell'uso, accettabili da un punto di vista farmaceutico, che possono contenere antiossidanti, tamponi, batteriostatici, soluti che rendono la formulazione isotonica con il sangue del destinatario o agenti di sospensione o addensanti.

5 [0057] Esempi di trasportatori acquosi e non acquosi adeguati che possono essere impiegati nelle composizioni farmaceutiche includono acqua, etanolo, polioli (come glicerolo, glicole propilenico, glicole polietilenico, e simili), e loro miscele adeguate, oli vegetali, come olio d'oliva, ed esteri organici iniettabili, come oleato di etile e ciclodestrine. La fluidità corretta può essere mantenuta, per esempio, mediante l'uso di materiali di rivestimento, come
10 lecitina, mediante il mantenimento della dimensione di particella richiesta nel caso di dispersioni e mediante l'uso di tensioattivi.

[0058] La presente invenzione ha molteplici aspetti, illustrati dai seguenti esempi non limitativi.

ESEMPI

Azione antidepressiva di GLYX-13 in ratti

Esempio 1

15 Metodi

[0059] Per la valutazione delle azioni antidepressive di GLYX-13, è stato esaminato l'effetto di GLYX-13 nel test di Porsolt della depressione in ratti. Il test di Porsolt è il test usato più comunemente per la valutazione della depressione in animali modello. Il test di Porsolt, conosciuto anche come il test di nuoto forzato, è basato su una caratteristica comportamentale che è sensibile a cambiamenti nello stato affettivo. Durante questo test, l'animale viene
20 posto in una vasca (18 cm di altezza x 45 cm di diametro), riempita fino a 30 cm con acqua a 22-23°C. Dopo aver posizionato l'animale nella vasca, viene misurata la quantità di tempo in cui il ratto è immobile quando esso smette di dibattersi. Il test di Porsolt è basato sul fatto che gli antidepressivi aumentano la latenza all'immobilità e diminuiscono il tempo per il quale il ratto è immobile. Nella maggior parte dei casi, questo si verifica a dosi di antidepressivo che non incrementano l'attività locomotoria per conto proprio. L'interpretazione del test di Porsolt è che gli antidepressivi
25 reintegrano i meccanismi di adeguamento attivi e diminuiscono l'immobilità passiva evocata da stress.

[0060] Al fine di valutare l'efficacia di GLYX-13 come antidepressivo, ratti FBNF1 di tre mesi sono stati separati in due gruppi di 9 animali. Il primo gruppo di ratti è stato iniettato per via endovenosa con GLYX-13 10 mg/kg ed il secondo gruppo di animali è stato iniettato per via endovenosa con veicolo di PBS (1 ml/kg) in modo cieco tramite porte di accesso alla vena femorale subdurale croniche. Entrambi i gruppi di animali sono stati iniettati da 10 a 15 minuti prima dell'inizio del test.

[0061] Per il test di Porsolt, agli animali è stato dato un ambientamento pre-test di 15 minuti nella vasca per indurre una impotenza acquisita il primo giorno. Successivamente, il giorno seguente, gli animali sono stati iniettati con GLYX-13 o veicolo 10-15 minuti prima di essere posti nella vasca per una sessione di test di 5 minuti. Dopo aver posizionato gli animali nella vasca, è stata misurata la quantità di tempo in cui ciascun animale è immobile quando esso smette di dibattersi (tempo di immobilità medio). La diminuzione di tempo di immobilità medio è una misura dell'efficacia dell'antidepressivo.

Risultati

[0062] Come mostrato in Figura 2, il tempo di immobilità medio del gruppo di animali pretrattati con iniezioni i.v. di veicolo di PBS (1 ml/kg) è stato più elevato rispetto al tempo di immobilità medio del gruppo di ratti pretrattati con iniezioni IV di GLYX-13 (10 mg/kg) (Fig. 1). GLYX-13 ha prodotto un effetto tipo antidepressivo nel test di Porsolt con una riduzione del $56,4 \pm 4,6\%$ (media \pm SEM) nel galleggiamento rispetto al veicolo di PBS ($P < 0,0001$). Di conseguenza, i dati dal test di Porsolt predicono l'efficacia di GLYX-13 come antidepressivo.

Esempio 2

Metodi

[0063] Un secondo esperimento è stato effettuato nello stesso modo dell'Esempio 1, ad eccezione del fatto che sono stati usati ratti Sprague-Dawley di 2-3 mesi, e trattati con iniezioni endovenose (1, 3, 10, 32 mg/kg), sottocutanee (1,3, 10, 32, 56, 100 mg/kg) di GLYX-13 o veicolo di soluzione salina (1 mg/ml) 15 (i.v.) o 20 (s.c.) minuti prima dell'inizio della sessione di test finale di 5 min. Ketamina (10 mg/kg i.p.) è stata somministrata 60 minuti prima dell'inizio del test (Garcia et al., (2008) Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 32, 140-144). La

somministrazione sottocutanea di ketamina 10 mg/kg seguita dal test successivamente, 20 min dopo il dosaggio, ha prodotto gravi effetti collaterali dissociativi, come mostrato nella Figura 3.

Risultati

5 [0064] Il tempo di immobilità medio del gruppo di ratti pretrattati con iniezioni IV o somministrazione sottocutanea di veicolo di PBS è stato più elevato rispetto al tempo di immobilità medio del gruppo di ratti pretrattati con iniezioni IV di GLYX-13 (Fig. 3; 0: $127,7 \pm 20,4$; 2: $84,9 \pm 15,0$; 3: $66,14 \pm 27,53$; 10: $60,6 \pm 14,7$; 32: $87,19 \pm 17,85$). GLYX-13 somministrato per via endovenosa ha prodotto un effetto di tipo antidepressivo nel test di Porsolt a tutte le concentrazioni, con una riduzione massima del $50 \pm 10\%$ (media \pm SEM) del galleggiamento rispetto al veicolo di soluzione salina ($P < 0,01$). GLYX-13 somministrato per via sottocutanea ha prodotto un effetto di tipo
10 antidepressivo nel test di Porsolt a tutte le concentrazioni, con una riduzione massima del $43 \pm 7\%$ (media \pm SEM) del galleggiamento rispetto al veicolo di soluzione salina ($P < 0,01$) (0: $142,4 \pm 15,6$; 1: $135,5 \pm 22,0$; 3: $100,2 \pm 15,7$; 10: $76,9 \pm 9,7$; 32: $87,19 \pm 11,6$). La diminuzione di tempo di immobilità medio è una misura dell'efficacia dell'antidepressivo; pertanto GLYX-13 funziona come un antidepressivo quando somministrato per via endovenosa o sottocutanea.

15 **Esempio 3**

Metodi

[0065] Per determinare se GLYX-13 agisce in una zona del cervello che è clinicamente rilevante per la depressione, GLYX-13 è stato somministrato o alla corteccia prefrontale mediale (MPFC), che è associata con l'umore e la depressione, o alla corteccia motoria (Fig. 4). Il tempo trascorso immobile medio nel test di Porsolt è stato
20 determinato per gruppi di 10 ratti maschio Fisher Brown Norway F1 (FBNF1) di tre mesi pretrattati con una singola iniezione di GLYX-13 (1, 10 $\mu\text{g/lato}$) o una singola iniezione di veicolo di soluzione salina (0,5 $\mu\text{l/1 min}$) bilateralmente nella corteccia prefrontale mediale o nella corteccia motoria (controllo dorsale) in animali con cannule permanenti croniche impiantate chirurgicamente finalizzate alla MPFC. Le microiniezioni sono state fatte 1 settimana dopo l'intervento chirurgico, e il test di Porsolt è stato condotto 20 minuti dopo l'iniezione. Gli animali hanno ricevuto
25 una singola seduta di nuoto di allenamento di 15 min un giorno prima del dosaggio.

Risultati

[0066] Come mostrato in Fig. 4, GLYX-13 iniettato nella MPFC ha prodotto un effetto di tipo antidepressivo nel test di Porsolt con una riduzione del $50 \pm 5\%$ (media \pm SEM) del galleggiamento rispetto ad un controllo di soluzione salina od a GLYX-13 iniettato nella corteccia motoria (controllo dorsale) (Figura 4 0: $115,2 \pm 10,89$; 0,1: $108,77 \pm 12,34$; 1: $53,46 \pm 10,65$; 10: $62,54 \pm 8,7$; Veicolo di controllo dorsale: $119,3 \pm 10,6$; GLYX-13 $113,7 \pm 13,1$; media \pm SEM) Questi risultati indicano che l'effetto antidepressivo del GLYX-13 può essere mediato attraverso la MPFC, una zona del cervello associata con l'umore e la depressione.

Esempio 4

Metodi

[0067] Per determinare se l'effetto antidepressivo del GLYX-13 è specifico per la sequenza del peptide di GLXY-13, il tempo medio trascorso galleggiando (sec) nel test di Porsolt è stato determinato in gruppi di 12 ratti Sprague Dawley di tre mesi somministrati con GLYX-13 (TPPT-NH2; 3 mg/kg, i.v. nella vena della coda), un peptide mescolato (PTPT-NH3; 3 mg/Kg i.v. nella vena della coda), o veicolo di soluzione salina allo 0,9% (1 ml/kg, i.v. nella vena della coda). La somministrazione è avvenuta 60 minuti prima della sessione di test di 5 min. Gli animali hanno ricevuto una sessione di nuoto di addestramento di 15 min., un giorno prima del dosaggio.

Risultati

[0068] Gli animali somministrati con GLYX-13 hanno mostrato una riduzione nel tempo di galleggiamento medio del $70 \pm 5\%$ (media \pm SEM) rispetto ad animali che hanno ricevuto una iniezione di soluzione salina o un peptide mescolato (Fig. 5). Di conseguenza, l'effetto antidepressivo è specifico per GLYX-13 e non rappresenta un artefatto della somministrazione di un peptide in generale.

Discussione

[0069] I dati rappresentati nelle Figure 2-5 mostrano che GLYX-13 visualizza significative proprietà di tipo antidepressivo nei ratti in una gamma di dosi e di vie di somministrazione. Al contrario degli inibitori selettivi della ricaptazione della serotonina (SSRI), l'insorgenza d'azione di GLYX-13 è stata entro pochi minuti di una singola dose. Questi risultati insieme con le recenti sperimentazioni cliniche di molecole di NMDAR conosciute, e il fatto che

GLYX-13 ha un indice terapeutico eccezionale, soprattutto rispetto ad altri modulatori della funzione di NMDA, rendono GLYX-13 un candidato attraente per il trattamento della depressione.

[0070] Questi risultati mostrano che agonisti parziali del sito della glicina di NMDAR possono essere ottimi candidati terapeutici per il trattamento della depressione.

5 **Azione ansiolitica di GLYX-13**

Esempio 5

[0071] Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare l'azione di GLYX-13 sull'ansia. Al fine di misurare l'effetto di GLYX-13 nei ratti, è stato condotto il test dell'ansia in campo aperto. Il test in campo aperto è un test neofobico dell'ansia ampiamente usato (vedere, Treit D, Fundytus M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. Pharmacol Biochem Behav 1989;31: 959-62).

[0072] La zona di campo aperto utilizzata per il test in campo aperto è generalmente costituita da una arena quadrata (o rettangolare) vuota e luminosa, circondata da mura. Per questo studio, è stato utilizzato un campo aperto di 45 cm X 35 cm X 20 cm di altezza. Il ratto è stato posto al centro dell'arena e il suo comportamento registrato in un periodo di tempo predefinito (di solito compreso tra 2 e 15 min). Il test in campo aperto è basato sulla naturale tendenza dei ratti ad evitare gli spazi aperti. Il test in campo aperto è basato sul conflitto tra l'ansia innata che i ratti hanno della zona centrale dello spazio aperto contro il loro desiderio di esplorare nuovi ambienti. Quando i ratti sono in uno stato ansioso, essi hanno una naturale tendenza a stare vicino alle pareti. Questa tendenza naturale dei ratti a stare vicino alle pareti si chiama tigmotassi. In questo contesto, il comportamento correlato con l'ansia viene misurato dal grado al quale il ratto evita il centro del test in campo aperto. La determinazione della propensione del ratto ad evitare il campo aperto può essere determinata misurando il numero di attraversamenti del centro effettuati dai ratti su un intervallo di tempo predefinito, oppure determinando il tempo in cui il ratto rimane al centro del campo.

[0073] Al fine di valutare l'efficacia di GLYX-13 come un ansiolitico, sono stati utilizzati due gruppi di ratti FBNF1 di tre mesi. Il primo gruppo è stato composto da 13 ratti e il secondo gruppo è stato composto da 11 ratti. Il primo gruppo di ratti è stato iniettato per via endovenosa con GLYX-13 10 mg/kg ed il secondo gruppo di ratti è stato iniettato per via endovenosa con veicolo di PBS (1 ml/kg) in modo cieco tramite porte di accesso alla vena subdurale

femorale croniche. Entrambi i gruppi di ratti sono stati iniettati da 10 a 15 minuti prima dell'inizio del test. Dopo le iniezioni di GLYX-13, entrambi i gruppi di ratti sono stati testati in campo aperto.

[0074] Per il test in campo aperto, i ratti sono stati abituati al campo aperto per 2 minuti ogni giorno per tre giorni consecutivi prima della sessione di test di 2 minuti finale in cui è stato somministrato GLYX-13 o un veicolo.

5 L'attività in campo aperto è stata registrata da una telecamera montata sopra la zona di campo aperto, ed è stato misurato il numero di attraversamenti del centro nel campo aperto.

Risultati

10 [0075] Effetti dei farmaci di tipo ansiolitico sono stati misurati mediante gli attraversamenti del centro incrementati nel campo aperto dai ratti pretrattati con iniezioni IV di GLYX-13 (Fig. 6). GLYX-13 (10 mg/kg i.v.) ha prodotto un effetto di tipo ansiolitico nel test in campo aperto con un aumento del $172,6 \pm 34,3\%$ (media \pm SEM) negli attraversamenti del centro rispetto al veicolo ($P < 0,005$).

Esempio 6

15 [0076] Un secondo esperimento è stato effettuato nello stesso modo dell'Esempio 3, ad eccezione del fatto che i gruppi di 8-10 maschi Sprague-Dawley di da due a tre mesi sono pretrattati con iniezioni endovenose (1, 3, 10, 32 mg/kg), sottocutanee (1, 3, 10, 32, 56, 100 mg/kg) di GLYX-13, ketamina (10 mg/kg i.p.) o veicolo di soluzione salina (1 mg/ml) 15 min (i.v.), 20 (s.c.) o 60 (i.p.) min prima dell'inizio della sessione di test di 5 min. Ciascun punto di dati rappresenta un gruppo di 8-10 ratti. È stata misurata la quantità media di tempo che gli animali hanno trascorso nel centro del campo.

Risultati

20 [0077] Gli effetti dei farmaci di tipo ansiolitico sono stati misurati mediante gli attraversamenti del centro incrementati nel campo aperto dai ratti pretrattati con IV o iniezioni sottocutanee di GLYX-13 (Fig. 7). La somministrazione endovenosa di GLYX-13 ha prodotto un effetto di tipo ansiolitico nel test in campo aperto con un aumento del $42 \pm 5\%$ (media \pm SEM) della quantità di tempo trascorso nel centro del campo rispetto al veicolo ($P < 0,05$). La somministrazione sottocutanea di GLYX-13 ha prodotto un effetto di tipo ansiolitico in un test in campo

aperto con un aumento del $36 \pm 5\%$ (media \pm SEM) della quantità di tempo trascorso nel centro del campo rispetto al veicolo ($P < 0,05$).

Discussione

5 [0078] I dati riportati qui mostrano che GLYX-13 visualizza proprietà di tipo ansiolitico significative nei ratti in una gamma di dosi e vie di somministrazione. I risultati con GLYX-13 mostrano che agonisti parziali del sito della glicina di NMDAR possono essere eccellenti candidati terapeutici per il trattamento dell'ansia.

Valutazione della persistenza d'azione degli effetti anti-depressivi e ansiolitici di GLYX-13

Esempio 7

Metodi

10 [0079] Per valutare se gli effetti anti-depressivi e ansiolitici di GLYX-13 persisterebbero al di là di un paio d'ore, ratti sono stati testati nel test di Porsolt e nel test in campo aperto, descritti sopra. Gruppi di 10-11 ratti Sprague-Dawley di tre mesi sono stati pretrattati con iniezione di GLYX-13 (3 mg/kg i.v.), ketamina (10 mg/kg i.v.) o veicolo di soluzione salina (1 mg/ml i.v. nella vena della coda) 96 ore prima dell'inizio del test. Gli animali hanno ricevuto una
15 singola sessione di nuoto di addestramento di 15 min., un giorno prima del dosaggio. Gli animali sono stati testati 96 ore dopo il dosaggio del farmaco nel test di Porsolt senza alcun test durante il periodo interposto. Il test in campo aperto è stato condotto senza pre-abitudine 1 giorno dopo il test di Porsolt (vale a dire 120 ore dopo il dosaggio del farmaco). Sono stati determinati il tempo medio (\pm SEM) (sec.) trascorso galleggiando nel test di Porsolt, il tempo trascorso nel compartimento centrale (sec.), e gli attraversamenti di linea nel test in campo aperto.

Risultati

20 [0080] I risultati del test di Porsolt hanno mostrato che gli animali somministrati con GLYX-13 hanno mostrato una riduzione dell' $82\% \pm 2$ (media \pm SEM) del tempo di galleggiamento medio rispetto agli animali somministrati con una soluzione salina di controllo (Fig. 8, pannello di sinistra). I risultati del test in campo aperto mostrano che gli animali somministrati con GLYX-13 hanno mostrato un incremento del $125\% \pm 5$ (media \pm SEM) del tempo medio trascorso nel centro rispetto agli animali di controllo somministrati con una soluzione salina (Fig. 8,

pannello centrale). Il tempo trascorso nel centro è una misura di ansia. Gli attraversamenti di linea sono una misura dell'attività locomotoria, e possono essere utilizzati come un controllo.

Discussione

5 [0081] Questi risultati mostrano che gli effetti antidepressivi di una singola somministrazione di GLYX-13 durano fino a 4 giorni, e che gli effetti ansiolitici persistono fino a 5 giorni. Pertanto, anche se gli effetti di GLYX-13 possono essere visti entro pochi minuti, l'effetto di una singola somministrazione persiste anche per almeno diversi giorni.

Comprensione del consolidamento molecolare di affezione positiva indotta dal gioco di lotta (RTP) e valutazione dell'effetto edonistico di GLYX-13

10 Esempio 8

Comprensione del consolidamento molecolare di RTP

15 [0082] Al fine di comprendere il consolidamento molecolare di RTP, sono state condotte quattro sessioni di RTP di 30 minuti ciascuna con i ratti. Ratti di controllo utilizzati per questo studio hanno ricevuto una gestione identica a tutti i gruppi di test di RTP, ad eccezione del fatto che essi sono stati testati in isolamento. In seguito a queste sessioni di RTP, sono stati misurati i cambiamenti di espressione genica di corteccia frontale e corteccia parietale nei ratti mediante micromatrice. Questi cambiamenti di espressione genica sono stati esaminati 6 ore dopo la fine di quattro sessioni di RTP di 30 minuti.

20 [0083] RTP ha incrementato l'espressione della famiglia di geni di NMDA (in particolare: NMDA NR1, sub-unità NR2AD). La sovra-regolazione della sub-unità di NMDAR è stata corroborata mediante qRT-PCR ed i risultati sono stati presentati nella Figura 9.

Valutazione degli effetti edonistici di GLYX-13

25 [0084] Per valutare l'effetto edonistico di GLYX-13 in questo studio, è stato esaminato nei ratti il modello di vocalizzazioni ad ultrasuoni a 50 kHz di affezione positiva (vedere, Burgdorf, J., Panksepp, J., Brudzynski, S.M., Kroes, R.A. & Moskal, J.R. (2008). The effect of selective breeding for differential rates of 50-kHz ultrasonic vocalizations on emotional behavior in rats. *Devel. Psychobiology*, 51, 34-46.).



[0085] Secondo il modello di vocalizzazioni ultrasoniche a 50 kHz di affezione positiva, il comportamento di RTP nei ratti ha dimostrato di essere gratificante e suscitare alti tassi di vocalizzazioni ultrasoniche a 50 kHz che a loro volta sono state mostrate riflettere stati affettivi positivi (Fig 10).

5 [0086] Come parte dello studio, sono stati utilizzati due gruppi di ratti FBNF1 di tre mesi. Il primo gruppo è stato composto da 13 ratti e il secondo gruppo è stato composto da 11 ratti. Il primo gruppo di ratti sono stati iniettati per via endovenosa con GLYX-13 10 mg/kg e il secondo gruppo di ratti sono stati iniettati per via endovenosa con veicolo di PBS (1 ml/kg) in modo cieco tramite porte di accesso alla vena femorale subdurale croniche. Entrambi i gruppi di ratti sono stati iniettati da 10 a 15 minuti prima dell'inizio del test.

10 [0087] Per le vocalizzazioni ultrasoniche edonistiche (USV), gli animali hanno ricevuto 2 minuti di abitudine di RTP eterospecifico prima della sessione di test finale di 2 minuti.

Risultati

[0088] L'iniezione diretta di dosi di GLYX-13 (10 mg/kg i.v.) ha incrementato le vocalizzazioni ultrasoniche a 50 kHz indotte da RTP edonistico. GLYX-13 ha aumentato i tassi di USV a 50 kHz positive affettive indotte dal gioco del $178,5 \pm 48,3\%$ (media \pm SEM) rispetto a veicolo ($P < 0,01$) (Figura 11).

15 Discussione

[0089] Questi risultati suggeriscono che il recettore del NMDA può svolgere un ruolo funzionale in stati affettivi positivi indotti da RTP. GLYX-13 può essere una terapia utile per aumentare la resistenza alla depressione e all'ansia.

EQUIVALENTI

20 [0090] Anche se forme di realizzazione specifiche della divulgazione di oggetto sono state discusse, la descrizione specifica di cui sopra è esemplificativa e non restrittiva. Molte variazioni della divulgazione risulteranno evidenti ai tecnici competenti nell'arte dopo la visione di questa descrizione specifica. Il campo di applicazione intero della divulgazione dovrebbe essere determinato mediante il riferimento alle rivendicazioni, e alla descrizione specifica.

25 [0091] Salvo diversa indicazione, tutti i numeri che esprimono quantità di ingredienti, condizioni di reazione, parametri, caratteristiche descrittive e così via, usati nella descrizione specifica e nelle rivendicazioni, devono essere

intesi come essere modificati in tutti casi dal termine "circa". Di conseguenza, salvo indicazione contraria, i parametri numerici esposti in questa descrizione specifica e nelle rivendicazioni allegate sono approssimazioni che possono variare a seconda delle proprietà desiderate ricercate che devono essere ottenute dalla presente invenzione.

ELENCO DI SEQUENZE

- 5 [0092]
- <110> Northwestern University
- <120> METODI DI TRATTAMENTO DELLA DEPRESSIONE E DI ALTRE MALATTIE CORRELATE
- <130> P54862EP-K
- <140> EP10822514.5
- 10 <151> 2010-10-05
- <150> US 61/248,650
- <151> 2009-10-05
- <160> 13
- <170> PatentIn versione 3.4
- 15 <210> 1
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> Artificiale
- <220>
- 20 <223> Peptide sintetico
- <400> 1

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Thr Val Ala
1 5 10

5
<210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificiale
<220>
<223> Peptide sintetico
<400> 2

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5

10
<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificiale
<220>
<223> Peptide sintetico
15
<400> 3

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Pro Thr
1 5

20
<210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificiale

<220>

<223> Peptide sintetico

<400> 4

Val Tyr Tyr Ser Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Pro Thr
1 5 10

5

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificiale

<220>

10

<223> Peptide sintetico

<400> 5

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Ser Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Pro
1 5 10 15

Thr

<210> 6

<211> 22

15

<212> PRT

<213> Artificiale

<220>

<223> Peptide sintetico

<400> 6

Ser Val Gln Ala Glu Leu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Ser Gln Gln His
1 5 10 15

Tyr Ser Thr Pro Pro Thr
20

<210> 7

<211> 26

<212> PRT

5

<213> Artificiale

<220>

<223> Peptide sintetico

<400> 7

Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Leu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr
1 5 10 15

Ser Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Pro Thr
20 25

10

<210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificiale

<220>

15

<223> Peptide sintetico

<400> 8



Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly
1 5 10

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

5

<213> Artificiale

<220>

<223> Peptide sintetico

<400> 9

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
1 5 10 15

Glu

10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificiale

<220>

15

<223> Peptide sintetico

<220>

<221> DISOLFURO

<222> (1)..(11)

<400> 10

Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Pro Thr Cys
1 5 10

- <210> 11
- <211> 11
- <212> PRT
- 5 <213> Artificiale
- <220>
- <223> Peptide sintetico
- <400> 11

Ser Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Pro Thr Ser
1 5 10

- 10 <210> 12
- <211> 5
- <212> PRT
- <213> Artificiale
- <220>
- 15 <223> Peptide sintetico
- <400> 12

Gln Gln His Tyr Ser
1 5

- <210> 13

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificiale

<220>

5

<223> Peptide sintetico

<400> 13

**Thr Pro Pro Thr
1**

10

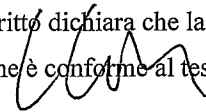
15



RIVENDICAZIONI

1. GLYX-13 per l'utilizzo in un metodo di trattamento della depressione refrattaria in un paziente resistente al trattamento che ne ha bisogno, in cui GLYX-13 deve essere somministrato a detto paziente, per cui detto paziente è sostanzialmente alleviato in almeno un sintomo entro circa 14 giorni.
- 5 2. GLYX-13 per l'utilizzo secondo la rivendicazione 1, in cui detta depressione viene selezionata dal gruppo che consiste in disordine depressivo maggiore, disordine distimico, depressione psicotica, depressione post-partum, disordine affettivo stagionale, disordine bipolare, disordine dell'umore, depressioni causate da condizioni mediche croniche come cancro o dolore cronico, chemioterapia, stress cronico, disordini da stress post-traumatico e disordine maniaco depressivo.
- 10 3. GLYX-13 per l'utilizzo secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui GLYX-13 deve essere somministrato in una quantità da 0,01 mg/kg a 1000 mg/kg al giorno.
4. GLYX-13 per l'utilizzo secondo in una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3, in cui GLYX-13 deve essere somministrato in un intervallo di dose i.v. da 1 a 10 mg/kg.
- 15 5. GLYX-13 per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 4, in cui il paziente resistente al trattamento viene identificato come uno che è stato trattato con almeno due tipi di trattamenti antidepressivi prima della somministrazione di GLYX-13.
6. GLYX-13 per l'utilizzo secondo la rivendicazione 5, in cui il paziente resistente al trattamento viene identificato come uno che è riluttante o incapace di tollerare un effetto collaterale di almeno un tipo di trattamento antidepressivo.
- 20 7. Uso di GLYX-13 nella produzione di un medicinale per il trattamento della depressione refrattaria in un paziente resistente al trattamento che ne ha bisogno, in cui GLYX-13 deve essere somministrato a detto paziente, per cui detto paziente è sostanzialmente alleviato in almeno un sintomo entro circa 14 giorni.

Il sottoscritto dichiara che la presente
traduzione è conforme al testo originale.



25



TAVOLA I

Tabella 1

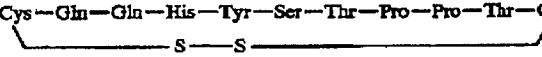
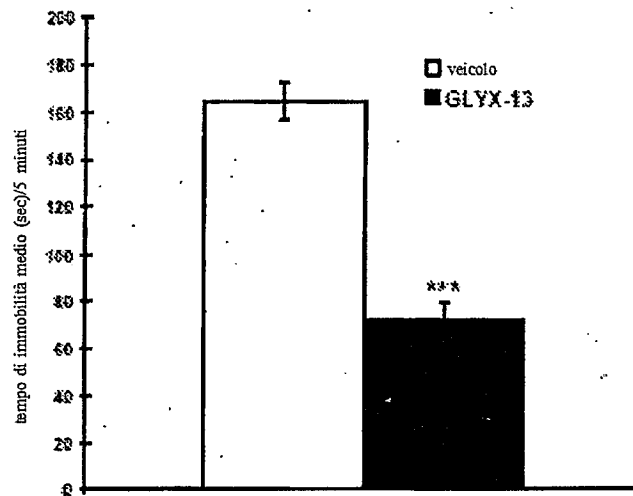
nome	SEQ ID NO	sequenza amminoacidica
NT-1:	SEQ ID. NO:1.	Lys-Ala-Ser-Gln-Asp-Val-Ser-Thr-Thr-Val-Ala
NT-2:	SEQ ID. NO:2.	Ser-Ala-Ser-Tyr-Arg-Tyr-Thr
NT-3:	SEQ ID. NO:3.	Gln-Gln-His-Tyr-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr
NT-4:	SEQ ID. NO:4.	Val-Tyr-Tyr-Ser-Gln-Gln-His-Tyr-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr
NT-5:	SEQ ID. NO:5.	Glu-Asp-Leu-Ala-Val-Tyr-Tyr-Ser-Gln-Gln-His-Tyr-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr
NT-6:	SEQ ID. NO:6.	Ser-Val-Gln-Ala-Glu-Leu-Asp-Leu-Ala-Val-Tyr-Tyr-Ser-Gln-Gln-His-Tyr-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr
NT-7:	SEQ ID. NO:7.	Phe-Thr-Ile-Ser-Ser-Val-Gln-Ala-Glu-Leu-Asp-Leu-Ala-Val-Tyr-Tyr-Ser-Gln-Gln-His-Tyr-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr
NT-8:	SEQ ID. NO: 8.	Gln-Gln-His-Tyr-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr-Phe-Gly-Gly-Gly
NT-9:	SEQ ID. NO:9.	Gln-Gln-His-Tyr-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr-Phe-Gly-Gly-Gly-Thr-Lys-Leu-Glu
NT-10:	SEQ ID. NO:10	Cys-Gln-Gln-His-Tyr-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr-Cys 
NT-11:	SEQ ID. NO:11	Ser-Gln-Gln-His-Tyr-Ser-Thr-Pro-Pro-Thr-Ser
NT-12:	SEQ ID. NO:12	Gln-Gln-His-Tyr-Ser
NT-13:	SEQ ID. NO:13	Thr-Pro-Pro-Thr
NT-14:	SEQ ID. NO:14	Thr-Pro-Pro
NT-15:	SEQ ID. NO:15	Pro-Pro-Thr
NT-16:	SEQ ID. NO:16	Pro-Pro
NT-17:	SEQ ID. NO:17	Thr-Pro-Thr
NT-18:	SEQ ID. NO:18	Thr

FIGURA 1

TAVOLA II

GLYX-13 è antidepressivo nel test di nuoto di Porsolt di ratto



tempo trascorso immobile medio (\pm SEM) nel test di nuoto di Porsolt usando ratti di 3 mesi pretrattati con iniezioni IV di 10,0 mg/kg di GLYX-13 (n = 9) o veicolo di PBS (n = 9) 10-15 minuti prima dell'inizio del test. ***P<0,001, t-test tra soggetti.

FIGURA 2

TAVOLA III

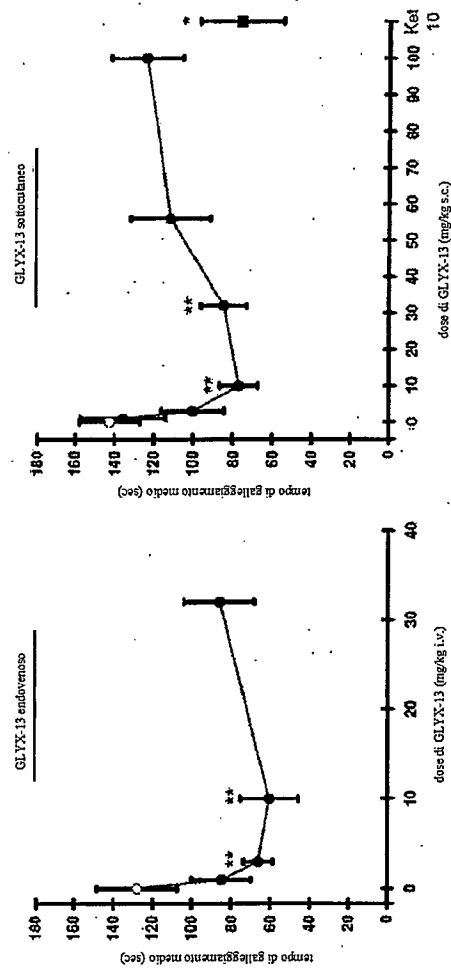


FIGURA 3

TAVOLA IV

5

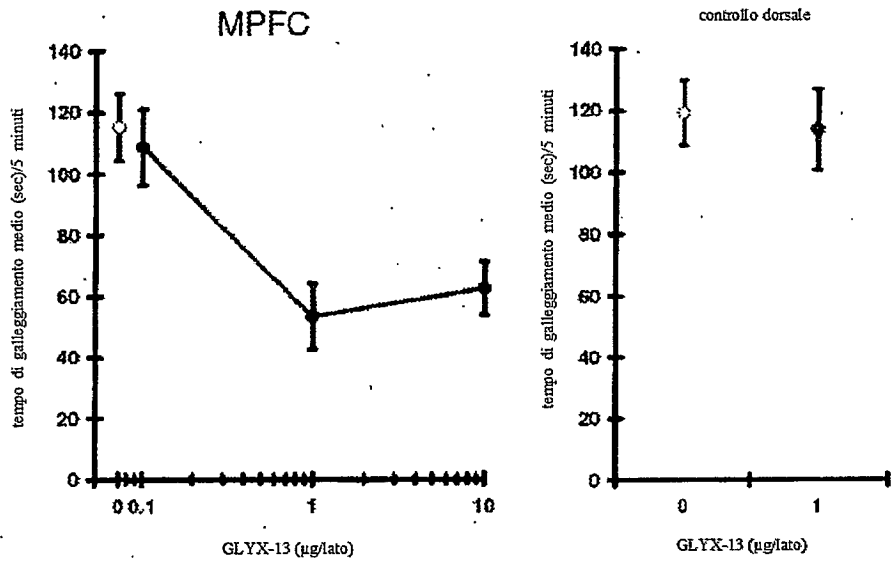


FIGURA 4

TAVOLA V

5

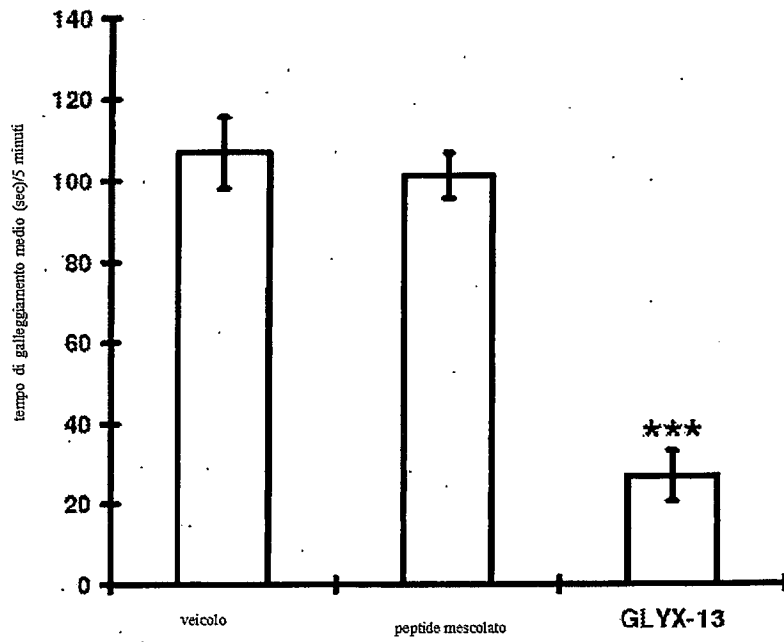
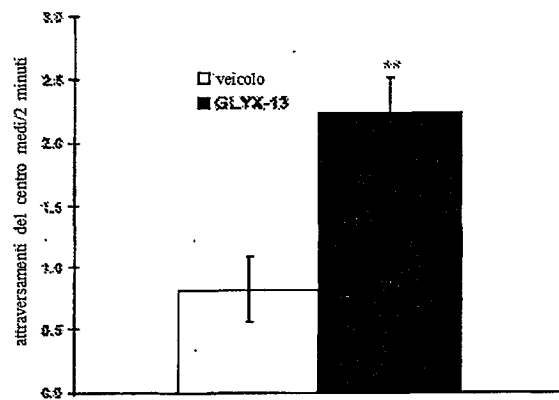


FIGURA 5

TAVOLA VI

5

GLYX-13 è ansiolitico nel test in campo aperto di ratto



attraversamenti medi (\pm SEM) nel compartimento centrale del campo aperto durante il test di gioco in ratti di tre mesi pretrattati con iniezioni IV di 10,0 mg/kg di GLYX-13 (n = 13) o veicolo di PBS (n = 11) 10-15 minuti prima dell'inizio del test. ***P<0,01, t-test tra soggetti.

FIGURA 6

TAVOLA VII

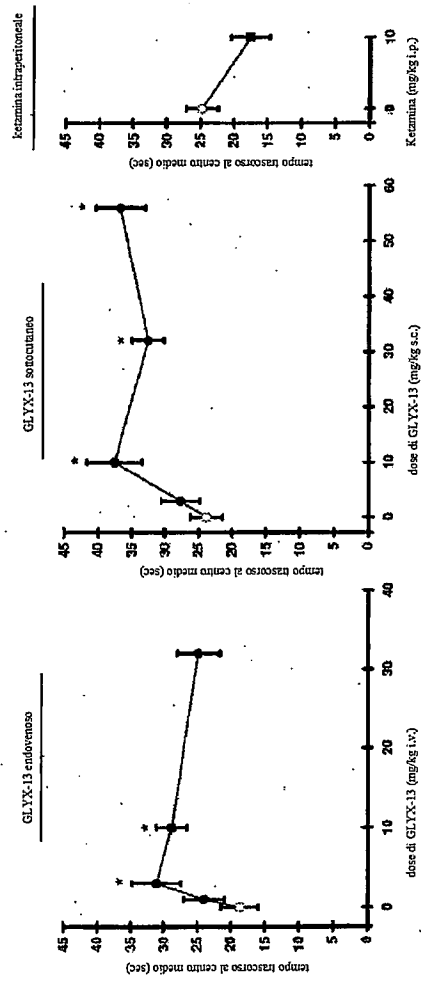


FIGURA 7

TAVOLA VIII

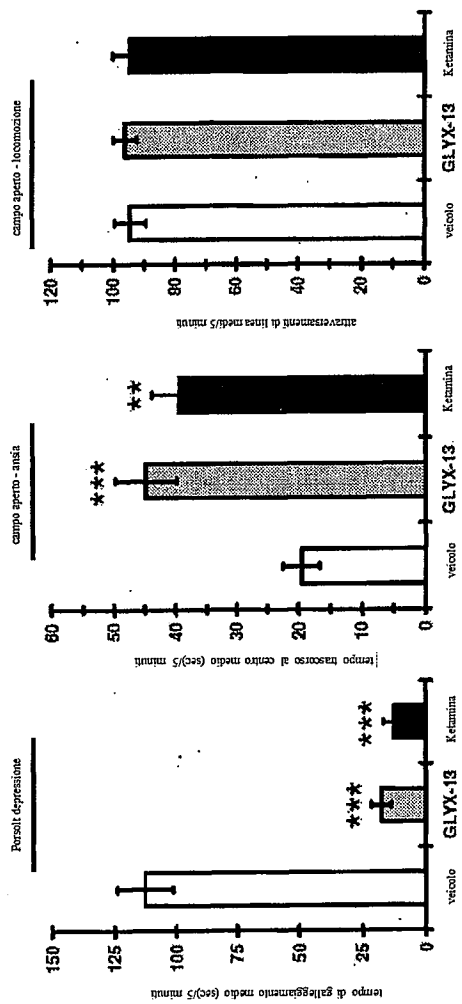
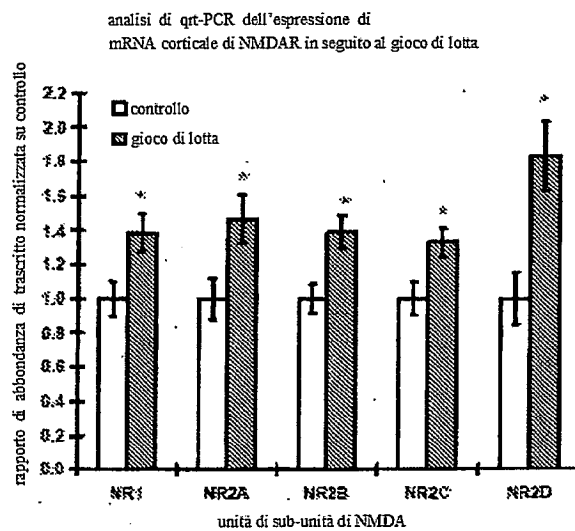


FIGURA 8

TAVOLA IX

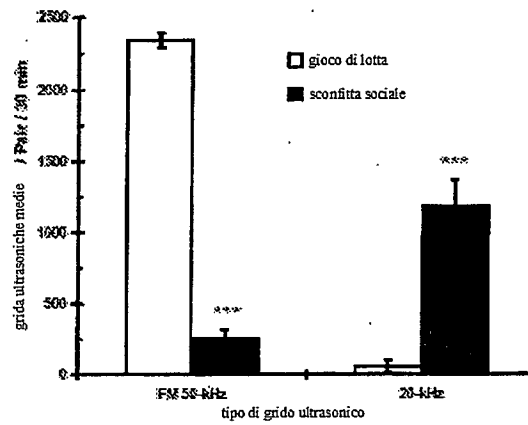


rapporto di media \pm SEM di livelli di mRNA di sub-unità di NMDAR (pg di trascritto/cDNA) normalizzati a livelli di controllo 6 ore dopo 30 minuti di gioco di lotta o 30 minuti da solo in una nuova gabbia (controllo). L'espressione genica per l'mRNA di NMDAR è aumentata in seguito al gioco nella corteccia frontale e posteriore rispetto ai controlli. I valori di controllo di media \pm SEM (μ g di trascritto/ pg di cDNA) sono stati NR1 $3,6 \pm 0,4 \times 10^{-4}$, NR2A $1,6 \pm 0,2 \times 10^{-5}$, NR2B $1,0 \pm 0,1 \times 10^{-4}$, NR2C $7,2 \pm 0,7 \times 10^{-5}$, NR2D $3,4 \pm 0,6 \times 10^{-5}$, *P< 0,05 gioco contro controllo

FIGURA 9

TAVOLA X

Il comportamento di gioco di lotta suscita in maniera massima USV a 50 kHz FM edonistiche ed una sconfitta sociale suscita in maniera massima USV a 22 kHz di segno opposto

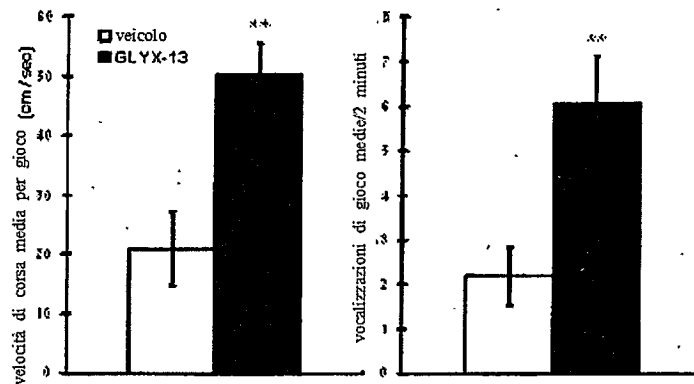


media (\pm SEM) di USV a 50 kHz e 22 kHz a frequenza modulata durante 30 minuti di gioco di lotta (n = 23 coppie) a 1 mese di età rispetto a 30 minuti di sconfitta sociale (n = 18 coppie) a 3 mesi di età. ***P < 0,001 t-test tra soggetti, a due code.

FIGURA 10

TAVOLA XI

L'agonista parziale di NDMA
GLYX-13 aumenta USV a 50 kHz edonistiche indotte da RTP e
ricompensa



tassi medi (\pm SEM) di vocalizzazioni di gioco prima del gioco (destra) e il valore di ricompensa di gioco mediante velocità di corsa per gioco (sinistra) durante il test di gioco in ratti di tre mesi pretrattati con iniezioni IV di 10,0 mg/kg di GLYX-13 (n = 13) o veicolo di PBS (n = 11) 10-15 minuti prima dell'inizio di test. **P<0,01 t-test tra soggetti.

FIGURA 11