

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 493 316**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/10** (2006.01)

**A61P 25/22** (2006.01)

**A61P 25/24** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.10.2010 E 10822514 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014 EP 2485751**

54 Título: **GLYX-13 para uso en un método para tratar depresión que no responde al tratamiento**

30 Prioridad:

**05.10.2009 US 248650 P**

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

**11.09.2014**

73 Titular/es:

**NORTHWESTERN UNIVERSITY (100.0%)  
633 Clark Street  
Evanston, IL 60208, US**

72 Inventor/es:

**MOSKAL, JOSEPH**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 493 316 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

GLYX-13 para uso en un método para tratar depresión que no responde al tratamiento

5 **Referencia a solicitudes relacionadas**

Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente de EE.UU. n.º 61/248.650, presentada el 5 de octubre de 2009.

10 **Antecedentes**

15 El sistema nervioso central (SNC) de mamíferos emplea muchos péptidos neuroactivos para realizar una señalización especializada dentro del cerebro y la médula espinal, incluyendo los péptidos neuroactivos somatostatina, colecistocinina, VIP, sustancia P, encefalina, neuropeptido Y (NPY), neurotensina, TRH, CCK y dinorfina (véase generalmente *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*, Cooper, Bloom y Roth, 5ª ed., Oxford University Press, Nueva York, 1986). El cuidadoso esclarecimiento de las complejas rutas de señalización, que funcionan en el SNC, ha conducido a la identificación de receptores específicos modulados por estos péptidos neuroactivos que presentan importantes dianas terapéuticas para diversos trastornos asociados con el SNC.

20 El receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) (NMDAR), es un receptor de este tipo que se ha implicado en trastornos neurodegenerativos incluyendo muerte de neuronas relacionada con accidente cerebrovascular, trastornos convulsivos, y aprendizaje y memoria. NMDAR también desempeña un papel central en la modulación de la transmisión sináptica normal, plasticidad sináptica y excitotoxicidad en el sistema nervioso central. El NMDAR está implicado además en la potenciación a largo plazo (LTP). LTP es el refuerzo persistente de conexiones neuronales que subyace al aprendizaje y la memoria (véase Bliss y Collingridge, 1993, *Nature* 361:31-39).

25 Se han caracterizado dos clases generales de receptores de glutamato en el sistema nervioso central (SNC). Son los receptores de glutamato metabotrópicos, que pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G de proteínas de señalización, y los receptores de glutamato ionotrópicos (Muir y Lees, *Stroke*, 1995, 26, 503-513). La clase ionotrópica se subdivide además en los subtipos de receptores de AMPA, kainato y NMDA por los ligandos selectivos que los activan.

30 Los receptores de glutamato ionotrópicos contienen un canal de iones dependiente de ligando, que sirve como modulador de la transmisión sináptica. El receptor de NMDA (NMDAR) es único porque requiere tanto glutamato como glicina para su activación y posterior apertura del canal de iones (Mothet *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 2000, 97, 4926-4931). Recientes estudios han demostrado que el sitio de glicina puede servir para modular la actividad de transmisión sináptica de glutamato en el NMDAR. Por tanto, pueden usarse los sitios tanto de glutamato como de glicina para la modulación de la actividad de NMDAR.

35 El NMDAR se activa mediante la unión de NMDA, glutamato (Glu) y aspartato (Asp). Se antagoniza de manera competitiva por D-2-amino-5-fosfonovalerato (D-AP5; D-APV), y se antagoniza de manera no competitiva por fenilciclidina (PCP) y MK-801. Lo más interesante es que el NMDAR se coactiva mediante glicina (Gly) (Kozikowski *et al.*, 1990, *Journal of Medicinal Chemistry* 33:1561-1571). La unión de glicina se produce en un sitio regulador alostérico en el complejo de NMDAR, y esto aumenta tanto la duración del tiempo de apertura del canal como la frecuencia de la apertura del canal de NMDAR.

40 Recientes estudios clínicos con seres humanos han identificado NMDAR como diana novedosa de alto interés para el tratamiento de la depresión. Estos estudios realizados usando antagonistas de NMDAR conocidos, CPC-101,606 y ketamina, han mostrado reducciones significativas en la puntuación de clasificación de la depresión de Hamilton en pacientes que padecen depresión que no responde al tratamiento. Aunque la eficacia fue significativa, los efectos secundarios de usar estos antagonistas de NDMAR fueron graves.

45 Se han desarrollado compuestos agonistas y antagonistas de molécula pequeña que modulan NMDA para su posible uso terapéutico. Sin embargo, muchos de ellos están asociados con índices terapéuticos muy estrechos y efectos secundarios indeseables incluyendo alucinaciones, ataxia, comportamiento irracional y toxicidad significativa, limitando todos ellos su eficacia y/o seguridad.

50 Además, el 50% o más de los pacientes con depresión no experimentan una respuesta terapéutica adecuada a fármacos administrados conocidos. En la mayoría de los casos, se necesitan 2 o más semanas de terapia farmacológica antes de observar una mejora significativa, tal como se indica en un estudio abierto sobre el tratamiento farmacológico de la depresión (Rush *et al.*, *Am. J. Psychiatry* 2006, 163: 1905). Actualmente no hay ningún tratamiento eficaz individual para la depresión, ansiedad y otras enfermedades relacionadas.

55 Por tanto, sigue existiendo una necesidad de tratamientos mejorados de la depresión, ansiedad y/u otras enfermedades relacionadas con compuestos que proporcionen una eficacia aumentada y efectos secundarios indeseables reducidos.

**Sumario**

5 La presente invención se define en las reivindicaciones. La presente invención se refiere a GLYX-13 para uso en un método para tratar depresión que no responde al tratamiento en un paciente resistente al tratamiento que lo necesita, en el que GLYX-13 debe administrarse a dicho paciente, mediante lo cual se alivia sustancialmente al menos un síntoma en dicho paciente en el plazo de aproximadamente 14 días.

10 Por consiguiente, se describe la administración de compuestos que interaccionan funcionalmente con el sitio de glicina de NMDAR para el tratamiento de la depresión, ansiedad y otras enfermedades relacionadas.

15 También se describe la administración de un compuesto peptídico de di-pirrolidina que comprende la secuencia Thr-Pro-Pro-Thr (SEQ ID NO: 13) mostrada a modo de ejemplo por la fórmula I (GLYX-13) para el tratamiento de la depresión, ansiedad y otras enfermedades relacionadas en mamíferos, incluyendo seres humanos.

20 También se describe en el presente documento un método de tratamiento de manera aguda de síntomas de depresión en un paciente que lo necesita, que comprende administrar una cantidad eficaz de GLYX-13, por ejemplo, en una única dosis unitaria. Tales métodos pueden aliviar al menos un síntoma de depresión del paciente aproximadamente 2 semanas o menos, 1 semana o menos, 1 día o menos, 1 hora o menos (por ejemplo 15 minutos o menos, media hora o menos) tras dicha administración.

25 Además se describe en el presente documento un método de tratamiento de la depresión que no responde al tratamiento en un paciente resistente a otros antidepresivos, en el que se le administra al paciente una cantidad eficaz de GLYX para aliviar al menos un síntoma de depresión. En determinadas realizaciones, el paciente resistente al tratamiento se identifica como uno que se ha tratado con al menos dos tipos de tratamientos antidepresivos antes de la administración de GLYX-13. En otras realizaciones, el paciente resistente al tratamiento es uno que se identifica como que no está dispuesto o no puede tolerar un efecto secundario de al menos un tipo de tratamiento antidepresivo.

30 **Breve descripción de las figuras**

La figura 1 muestra péptidos de GLYX a modo de ejemplo;

35 la figura 2 muestra los resultados de pruebas de Porsolt realizadas con el fin de acceder a la acción antidepresiva de GLYX-13;

40 la figura 3 muestra los resultados de pruebas de Porsolt realizadas con el fin de acceder a la acción antidepresiva de GLYX-13 a lo largo de un intervalo de concentraciones mediante administración o bien intravenosa o bien subcutánea;

la figura 4 muestra los resultados de pruebas de Porsolt realizadas con el fin de acceder a la acción antidepresiva de GLYX-13 administrado a la corteza prefrontal media;

45 la figura 5 muestra los resultados de pruebas de Porsolt realizadas con el fin de evaluar la acción antidepresiva de GLYX-13 en comparación con un péptido desordenado;

la figura 6 muestra los resultados de pruebas en campo abierto realizadas con el fin de acceder a la acción ansiolítica de GLYX-13;

50 la figura 7 muestra los resultados de pruebas de campo abierto realizadas con el fin de acceder a la acción ansiolítica de GLYX-13 a lo largo de un intervalo de concentraciones mediante administración o bien intravenosa o bien subcutánea;

55 la figura 8 muestra los resultados de pruebas de Porsolt y pruebas de campo abierto realizadas con el fin de determinar el periodo de tiempo que persiste la acción antidepresiva y ansiolítica de GLYX-13;

la figura 9 muestra análisis mediante qrt-PCR de la expresión de ARNm cortical de NMDA tras juegos activos y bruscos (RTP);

60 la figura 10 muestra que el comportamiento de RTP provoca altas tasas de vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz y que la derrota social provoca altas tasas de vocalizaciones ultrasónicas de 22 kHz aversivas; y

la figura 11 muestra efectos de GLYX-13 sobre RTP en ratas.

65

### Descripción detallada

La depresión es un problema psicológico común y se refiere a un estado mental de estado de ánimo bajo y aversión a la actividad. Diversos síntomas asociados con depresión incluyen sentimientos de tristeza o ansiedad persistentes, sentimientos de impotencia, desesperanza, pesimismo y/o inutilidad, poca energía, inquietud, irritabilidad, fatiga, pérdida de interés en actividades o hobbies agradables, dormir en exceso, comer en exceso, pérdida de apetito, insomnio, pensamientos de suicidio e intentos de suicidio. La presencia, gravedad, frecuencia y duración de los síntomas mencionados anteriormente pueden variar de un caso a otro.

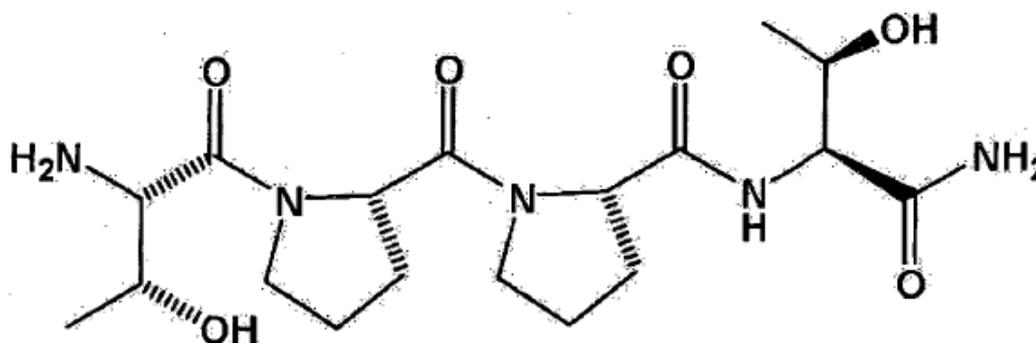
Los estados de depresión más comunes incluyen trastorno depresivo mayor y trastorno distímico. Otros estados de depresión se desarrollan en circunstancias únicas. Tales estados de depresión incluyen, pero no se limitan a, depresión psicótica, depresión posparto, trastorno afectivo estacional (SAD), trastorno del estado de ánimo, depresiones provocadas por estados médicos crónicos tales como cáncer o dolor crónico, quimioterapia, estrés crónico, trastornos de estrés postraumático y trastorno bipolar (o trastorno depresivo maníaco).

La depresión que no responde al tratamiento se produce en pacientes que padecen depresión que resisten a tratamientos farmacológicos convencionales, incluyendo antidepresivos tricíclicos, MAOI, SSRI e inhibidores de captación dobles y triples y/o fármacos ansiolíticos, así como tratamientos no farmacológicos tales como psicoterapia, terapia electroconvulsiva, estimulación del nervio vago y/o estimulación magnética transcraneal. Un paciente resistente al tratamiento puede identificarse como uno que no logra experimentar alivio de uno o más síntomas de depresión (por ejemplo, sentimientos de tristeza o ansiedad persistentes, sentimientos de impotencia, desesperanza, pesimismo) a pesar de someterse a uno o más tratamientos farmacológicos o no farmacológicos convencionales. En determinadas realizaciones, un paciente resistente al tratamiento es uno que no logra experimentar alivio de uno o más síntomas de depresión a pesar de someterse a tratamiento con dos fármacos antidepresivos diferentes. En otras realizaciones, un paciente resistente al tratamiento es uno que no logra experimentar alivio de uno o más síntomas de depresión a pesar de someterse a tratamiento con cuatro fármacos antidepresivos diferentes. Un paciente resistente al tratamiento también puede identificarse como uno que no está dispuesto o que no puede tolerar los efectos secundarios de uno o más tratamientos farmacológicos o no farmacológicos convencionales. En determinadas realizaciones, la invención se refiere a métodos para tratar la depresión que no responde al tratamiento mediante la administración de una cantidad eficaz de GLYX-13 a un paciente resistente al tratamiento que lo necesita.

### Péptidos de GLYX

Tal como se usa en el presente documento, el término "péptido de GLYX" se refiere a un péptido que tiene actividad agonista/antagonista parcial del sitio de glicina de NMDAR. Pueden obtenerse péptidos de GLYX mediante métodos recombinantes o de síntesis bien conocidos tales como los descritos en las patentes estadounidenses 5.763.393 y 4.086.196 incorporadas en el presente documento como referencia. En la figura 1 se ilustran péptidos a modo de ejemplo. En algunas realizaciones, GLYX se refiere a un tetrapéptido que tiene la secuencia de aminoácidos Thr-Pro-Pro-Thr (SEQ ID NO: 13), o L-treonil-L-prolil-L-prolil-L-treonina-amida.

Por ejemplo, GLYX-13 se refiere al compuesto representado como:



Fórmula I

También se contemplan polimorfos, hidratos, solvatos, bases libres, formas de sal adecuadas de GLYX 13 tales como, pero sin limitarse a, la sal de acetato. El péptido puede ser una forma ciclada o no ciclada tal como se describe adicionalmente en el documento US 5.763.393. Se dan a conocer agonistas parciales del sitio de glicina de NMDAR en los documentos US 5.763.393, US 6.107.271, y Wood *et al.*, NeuroReport, 19, 1059-1061, 2008.

Métodos

5 GLYX-13 puede actuar principalmente en NMDAR que contienen NR2B, y puede no presentar los efectos secundarios clásicos de moduladores de NMDAR conocidos tales como CPC-101,606 y ketamina. Por ejemplo, estudios *in vitro* muestran que GLYX-13 puede aumentar notablemente la potenciación a largo plazo (LTP) al tiempo que reduce simultáneamente la depresión a largo plazo (LTD) en cultivos organotípicos de hipocampo de rata.

10 Adicionalmente, GLYX-13 puede tener una mejor penetración de la barrera hematoencefálica (BBB) en comparación con muchos de los ligandos del sitio de glicina anteriores (Leeson & Iversen, J. Med. Chem. 37:4053-4067, 1994) y puede atravesar fácilmente la BBB. En algunas realizaciones, GLYX-13 o una composición que comprende GLYX-13 puede proporcionar una mejor potencia *in vivo* i.v. y/o concentración de nivel en el cerebro, con respecto a los niveles en plasma.

15 Adicionalmente, GLYX-13 puede tener un amplio índice terapéutico en comparación con otros antagonistas del sitio de glicina tales como L-701,324, u otros antagonistas del sitio de glicina que tienen índices terapéuticos estrechos, que dan como resultado un intervalo de dosis muy estrecho entre efectos terapéuticos y ataxia. Por ejemplo, L-701,324 tenía efectos anticonvulsivos a dosis que producían ataxia (Bristow, *et al*, JPET 279:492-501, 1996). De manera similar, una serie de compuestos de Merz tenían efectos anticonvulsivos a dosis que producían ataxia (Parsons, *et al.*, JPET283:1264-1275, 1997).

20 GLYX-13 puede proporcionar un alto índice terapéutico. Por ejemplo, GLYX-13 puede ser terapéuticamente eficaz para la depresión y/o ansiedad con un intervalo de dosis i.v. de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/kg. En algunas realizaciones, no se produce ataxia, por ejemplo a una dosis de 500 mg/kg, i.v.

25 También se describe el uso de un péptido o péptidos de GLYX solos o en combinación con uno o más de otros tratamientos antidepresivos, tales como, antidepresivos tricíclicos, MAO-I, SSRI e inhibidores de la captación dobles y triples y/o fármacos ansiolíticos para la fabricación de un medicamento para tratar la depresión, ansiedad y/u otras enfermedades relacionadas que incluye proporcionar alivio de la depresión, ansiedad y prevenir la recidiva de la depresión y ansiedad. Los fármacos a modo de ejemplo que pueden usarse en combinación con un péptido de GLYX incluyen Anafranil, Adapin, Aventyl, Elavil, Norpramin, Pamelor, Pertofrane, Sinequan, Surmontil, Tofranil, Vivactil, Parnate, Nardil, Marplan, Celexa, Lexapro, Luvox, Paxil, Prozac, Zoloft, Wellbutrin, Effexor, Remeron, Cymbalta, Desyrel (trazodona) y Ludiomill.

35 También se describen en el presente documento métodos de tratamiento de la depresión que incluyen administrar péptidos de GLYX en combinación con (por ejemplo simultánea o secuencialmente) otros tratamientos no farmacológicos tales como psicoterapia, terapia electroconvulsiva, estimulación del nervio vago y/o estimulación magnética transcraneal.

40 Se espera tratar una variedad de estados de depresión según este aspecto de la invención sin afectar al comportamiento ni a la coordinación motora, y sin inducir ni promover actividad convulsiva. Los estados de depresión a modo de ejemplo que se espera tratar según este aspecto de la invención incluyen, pero no se limitan a, trastorno depresivo mayor, trastorno distímico, depresión psicótica, depresión posparto, síndrome premenstrual, trastorno disfórico premenstrual, trastorno afectivo estacional (SAD), ansiedad, trastorno del estado de ánimo, depresiones provocadas por estados médicos crónicos tales como cáncer o dolor crónico, quimioterapia, estrés crónico, trastornos de estrés postraumático, y trastorno bipolar (o trastorno maníaco-depresivo). Además, los pacientes que padecen cualquier forma de depresión con frecuencia experimentan ansiedad. Diversos síntomas asociados con la ansiedad incluyen miedo, pánico, palpitaciones cardíacas, dificultad para respirar, fatiga, náuseas y cefaleas entre otros. Se espera que los métodos del presente estado puedan usarse para tratar la ansiedad o cualquiera de los síntomas de la misma.

50 Además, se espera tratar una variedad de otros estados neurológicos según los métodos de la invención. Los estados a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, un trastorno del aprendizaje, trastorno autista, trastorno por déficit de atención con hiperactividad, síndrome de Tourette, fobia, trastorno de estrés postraumático, demencia, demencia por SIDA, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, espasticidad, mioclonía, espasmo muscular, trastorno bipolar, un trastorno por drogadicción, incontinencia urinaria y esquizofrenia.

60 También se describen en el presente documento métodos de tratamiento de la depresión en pacientes resistentes al tratamiento o tratamiento de la depresión que no responde al tratamiento, por ejemplo, pacientes que padecen un trastorno de depresión que no responde, y/o no ha respondido, a ciclos adecuados de al menos otro, o al menos otros dos, compuestos o agentes terapéuticos antidepresivos. Por ejemplo, en el presente documento se describe un método de tratamiento de la depresión en un paciente resistente al tratamiento, que comprende a) opcionalmente identificar el paciente como resistente al tratamiento y b) administrar una dosis eficaz de GLYX-13 a dicho paciente.

65 En el presente documento, en una realización, se describen métodos de tratamiento de manera aguda de síntomas de depresión en un paciente que lo necesita, que comprenden administrar una cantidad eficaz de GLYX-13, por ejemplo, en una única dosis unitaria. Tales métodos pueden aliviar al menos un síntoma de depresión del paciente

aproximadamente 2 semanas o menos, 1 semana o menos, 1 día o menos, 1 hora o menos (por ejemplo 15 minutos o menos, media hora o menos) tras dicha administración. Por ejemplo, en el presente documento se proporciona un método que comprende administrar una cantidad eficaz de GLYX-13 a un paciente que padece depresión, en el que se alivia sustancialmente al menos un síntoma de depresión en dicho paciente sustancialmente antes tras la primera administración de GLYX-13, en comparación con el mismo paciente al que se le administra un compuesto antidepresivo distinto de GLYX-13.

Los síntomas de depresión, y el alivio de los mismos, puede determinarlos un médico o psicólogo, por ejemplo mediante un examen del estado mental. Los síntomas incluyen pensamientos de desesperanza, autolesión o suicidio y/o una ausencia de pensamientos o planes positivos.

#### Dosificaciones

La dosificación de cualquier composición descrita en el presente documento variará dependiendo de los síntomas, la edad y el peso corporal del paciente, la naturaleza y gravedad del trastorno que va a tratarse o prevenirse, la vía de administración, y la forma de la composición objeto. Cualquiera de las formulaciones objeto puede administrarse en una única dosis o en dosis divididas. Las dosificaciones para las composiciones pueden determinarse fácilmente mediante técnicas conocidas por los expertos en la técnica o tal como se enseña en el presente documento.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de péptido de GLYX requerida para uso en terapia varía con la forma del estado de depresión que está tratándose, el periodo de tiempo de tratamiento deseado, la edad y el estado del paciente, y en última instancia la determina el médico encargado. Sin embargo, en general, las dosis empleadas para el tratamiento de seres humanos adultos están normalmente en el intervalo de aproximadamente 0,01 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg al día. La dosis puede ser de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg al día. La dosis deseada puede administrarse convenientemente en una única dosis, o como múltiples dosis administradas a intervalos apropiados, por ejemplo como dos, tres, cuatro o más subdosis al día.

Puede necesitarse identificar una cantidad o dosis eficaz, y cualquier posible efecto sobre el momento de la administración de la formulación, para cualquier composición particular de la presente invención. Esto puede lograrse mediante experimentos rutinarios tal como se describe en el presente documento, usando uno o más grupos de animales (preferiblemente al menos 5 animales por grupo) o en ensayos con seres humanos si es apropiado. La eficacia de cualquier composición objeto y método de tratamiento o prevención puede evaluarse administrando la composición y evaluando el efecto de la administración midiendo uno o más índices aplicables, y comparando los valores tras el tratamiento de estos índices con los valores de los mismos índices antes del tratamiento.

El momento preciso de administración y la cantidad de cualquier composición objeto particular que proporcionarán el tratamiento más eficaz en un paciente dado dependerán de la actividad, farmacocinética y biodisponibilidad de una composición objeto, el estado fisiológico del paciente (incluyendo edad, sexo, tipo y estadio de enfermedad, estado físico general, sensibilidad a una dosificación dada y tipo de medicación), la vía de administración y similares. Las directrices presentadas en el presente documento pueden usarse para optimizar el tratamiento, por ejemplo, determinando el momento y/o la cantidad óptimos de administración, lo que no requerirá más que experimentación de rutina que consiste en monitorizar al sujeto y ajustar la dosificación y/o el momento.

Mientras se trata al sujeto, puede monitorizarse la salud del paciente midiendo uno o más de los índices relevantes en momentos predeterminados durante el periodo de tratamiento. El tratamiento, incluyendo la composición, cantidades, momentos de administración y formulación, puede optimizarse según los resultados de tal monitorización. Puede reevaluarse periódicamente al paciente para determinar el grado de mejora midiendo los mismos parámetros. Pueden realizarse ajustes en la(s) cantidad(es) de la composición objeto administrada y posiblemente en el momento de la administración basándose en estas reevaluaciones.

Puede iniciarse el tratamiento con dosificaciones menores que son inferiores a la dosis óptima del compuesto. Posteriormente, puede aumentarse la dosificación en incrementos pequeños hasta que se alcanza el efecto terapéutico óptimo.

El uso de las composiciones objeto puede reducir la dosificación requerida para cualquier agente individual contenido en las composiciones porque la aparición y la duración del efecto de los diferentes agentes pueden ser complementarias.

La toxicidad y la eficacia terapéutica de las composiciones objeto pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, para determinar la DL50 y la DE50.

Los datos obtenidos a partir de los ensayos de cultivo celular y estudios con animales pueden usarse para formular un intervalo de dosificación para uso en seres humanos. La dosificación de cualquier composición objeto se encuentra preferiblemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE50 con poca o

ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. Para las composiciones de la presente invención, la dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular.

## 5 Formulaciones

Los péptidos de GLYX pueden administrarse por diversos medios, dependiendo de su uso previsto, tal como se conoce bien en la técnica. Por ejemplo, si deben administrarse las composiciones por vía oral, pueden formularse como comprimidos, cápsulas, gránulos, polvos o jarabes. Alternativamente, pueden administrarse formulaciones por vía parenteral como inyecciones (intravenosas, intramusculares o subcutáneas), preparaciones para infusión por goteo o supositorios. Para la aplicación mediante la vía de la membrana mucosa oftálmica, pueden formularse composiciones de la presente invención como colirios o pomadas para los ojos. Estas formulaciones pueden prepararse mediante medios convencionales, y, si se desea, pueden mezclarse las composiciones con cualquier aditivo convencional, tal como un excipiente, un aglutinante, un agente disgregante, un lubricante, un correctivo, un agente solubilizante, un adyuvante de suspensión, un agente emulsionante o un agente de recubrimiento.

También puede administrarse ADN que codifica para los péptidos de GLYX, incorporado en un vector de expresión, usando cualquiera de los métodos de administración conocidos, para expresar los péptidos de GLYX *in vivo*.

En las formulaciones descritas en el presente documento, pueden estar presentes agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes, en los agentes formulados.

Las composiciones objeto pueden ser adecuadas para la administración oral, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal, como aerosol y/o parenteral. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquier método bien conocido en la técnica de farmacia. La cantidad de composición que puede combinarse con un material portador para producir una única dosis puede variar dependiendo del sujeto que está tratándose y del modo de administración particular.

Los métodos de preparación de estas formulaciones incluyen la etapa de poner en asociación las composiciones de la presente invención con el portador y, opcionalmente, uno o más componentes auxiliares. En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación, de manera uniforme e íntima, agentes con portadores líquidos, o portadores sólidos finamente divididos, o ambos, y entonces, si es necesario, conformando el producto.

Las formulaciones adecuadas para la administración oral pueden estar en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, pastillas para chupar (usando una base aromatizada, habitualmente sacarosa y goma arábica o tragacanto), polvos, gránulos, o como una disolución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o de agua en aceite, o como un elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica), conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de una composición objeto de la misma como principio activo. Las composiciones de la presente invención también pueden administrarse como bolo, electuario o pasta.

En las formas de dosificación sólidas para la administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), se mezcla la composición objeto con uno o más portadores farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato de dicalcio, y/o cualquiera de los siguientes: (1) cargas o diluyentes, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábica; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, determinados silicatos y carbonato de sodio; (5) agentes retardadores de la disolución, tales como parafina; (6) aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como, por ejemplo, alcohol acetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los mismos; y (10) agentes colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones también pueden comprender agentes tamponantes. También pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando excipientes tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Puede prepararse un comprimido mediante compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más componentes auxiliares. Pueden prepararse comprimidos sometidos a compresión usando agente aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo, glicolato sódico de almidón o carboximetilcelulosa sódica reticulada), tensioactivo o dispersante. Pueden prepararse comprimidos moldeados mediante moldeo en una máquina adecuada de una mezcla de la composición objeto humedecida con un diluyente líquido inerte. Opcionalmente, los comprimidos, y otras formas de dosificación sólidas, tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, pueden ranurarse o prepararse con recubrimientos y cubiertas,

tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación farmacéutica.

Las formas de dosificación líquidas para la administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, disoluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de la composición objeto, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente usados en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano, ciclodextrinas y mezclas de los mismos.

Las suspensiones pueden contener, además de la composición objeto, agentes de suspensión tales como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, polioxietilensorbitol y ésteres de sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y goma tragacanto, y mezclas de los mismos.

Las formulaciones para la administración rectal o vaginal pueden presentarse como supositorio, que puede prepararse mezclando una composición objeto con uno o más excipientes o portadores no irritantes adecuados que comprenden, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera para supositorios o un salicilato, y que es sólida a temperatura ambiente, pero líquida a la temperatura corporal y, por tanto, se fundirá en la cavidad del cuerpo y liberará el agente activo. Las formulaciones que son adecuadas para la administración vaginal también incluyen óvulos vaginales, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen portadores tales como se conoce en la técnica que son apropiados.

Las formas de dosificación para la administración transdérmica de una composición objeto incluyen polvos, pulverizaciones, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, disoluciones y parches.

Para la administración ocular tópica, las composiciones de esta invención pueden adoptar la forma de disoluciones, geles, pomadas, suspensiones o productos de inserción sólidos, formuladas de modo que una dosificación unitaria comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del componente activo o algún múltiplo de la misma en el caso de una terapia de combinación.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral comprenden una composición objeto en combinación con una o más disoluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones isotónicas estériles acuosas o no acuosas, o polvos estériles que pueden reconstituirse para dar disoluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, farmacéuticamente aceptables, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos, solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor apropiado o agentes de suspensión o espesantes.

Los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo y ciclodextrinas. Puede mantenerse una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

La presente invención tiene múltiples aspectos, ilustrados por los siguientes ejemplos no limitativos.

## Ejemplos

### Acción antidepresiva de GLYX-13 en ratas

#### EJEMPLO 1

##### Métodos

Para la evaluación de las acciones antidepresivas de GLYX-13, se examinó el efecto de GLYX-13 en la prueba de depresión de Porsolt en ratas. La prueba de Porsolt es la prueba más comúnmente usada para la evaluación de la depresión en un modelo animal. La prueba de Porsolt, también conocida como prueba de natación forzada, se basa en un rasgo de comportamiento que es sensible a cambios en el estado afectivo. Durante esta prueba, se coloca el animal en un tanque (18 cm de diámetro x 45 cm de altura) lleno hasta 30 cm con agua a 22-23°C. Tras colocar el animal en el tanque, se mide la cantidad de tiempo durante el cual la rata permanece inmóvil cuando deja de luchar. La prueba de Porsolt se basa en el hecho de que los antidepresivos aumentan la latencia hasta la inmovilidad y disminuyen el tiempo durante el cual la rata está inmóvil. En la mayoría de los casos, esto se produce a dosis de antidepresivo que no aumentan la actividad locomotriz por sí mismas. La interpretación de la prueba de Porsolt es que los antidepresivos reinstauran mecanismos de enfrentamiento activos y disminuyen la inmovilidad pasiva provocada por el estrés.

Con el fin de evaluar la eficacia de GLYX-13 como antidepresivo, se separaron ratas FBNF1 de tres meses de edad en dos grupos de 9 animales. Al primer grupo de ratas se les inyectó por vía intravenosa GLYX-13 10 mg/kg y al segundo grupo de animales se les inyectó por vía intravenosa vehículo de PBS (1 ml/kg) de manera ciega a través de orificios de acceso crónicos en la vena femoral subdural. A ambos grupos de animales se les administraron inyecciones de 10 a 15 minutos antes del inicio de las pruebas.

Para las pruebas de Porsolt, se proporcionó a los animales una habituación previa a la prueba de 15 minutos en el tanque para inducir impotencia aprendida en el día uno. Después de esto, al día siguiente, se les inyectó a los animales GLYX-13 o vehículo 10-15 minutos antes de colocarlos en el tanque para una sesión de prueba de 5 minutos. Tras colocar los animales en el tanque, se midió la cantidad de tiempo durante la cual cada animal permanece inmóvil cuando deja de luchar (tiempo de inmovilidad medio). La disminución en el tiempo de inmovilidad medio es una medida de la eficacia del antidepresivo.

## Resultados

Tal como se muestra en la figura 2, el tiempo de inmovilidad medio del grupo de animales tratados previamente con inyecciones i.v. de vehículo de PBS (1 ml/kg) fue superior en comparación con el tiempo de inmovilidad medio del grupo de ratas tratadas previamente con inyecciones i.v. de GLYX-13 (10 mg/kg) (figura 1). GLYX-13 produjo un efecto de tipo antidepresivo en la prueba de Porsolt con una reducción del  $56,4 \pm 4,6\%$  (media  $\pm$  EEM) en la flotación en comparación con el vehículo de PBS ( $P < 0,0001$ ). Por tanto, los datos de la prueba de Porsolt predicen la eficacia de GLYX-13 como antidepresivo.

## EJEMPLO 2

### Métodos

Se realizó un segundo experimento de la misma manera que el ejemplo 1, excepto porque se usaron ratas Sprague-Dawley de 2-3 meses, y se trataron con inyecciones o bien intravenosas (1, 3, 10, 32 mg/kg) o bien subcutáneas (1,3, 10, 32, 56, 100 mg/kg) de GLYX-13 o vehículo de solución salina (1 mg/ml) 15 (i.v.) o 20 (s.c.) min antes del inicio de la sesión de prueba de 5 min final. Se administró ketamina (10 mg/kg i.p.) 60 min antes del inicio de las pruebas (García *et al.*, (2008) *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 32, 140-144). La administración subcutánea de ketamina 10 mg/kg seguida por pruebas tras 20 min tras la dosificación produjo efectos secundarios disociativos graves, tal como se muestra en la figura 3.

### Resultados

El tiempo de inmovilidad medio del grupo de ratas tratadas previamente con inyecciones i.v. o administración subcutánea de vehículo de PBS fue superior en comparación con el tiempo de inmovilidad medio del grupo de ratas tratadas previamente con inyecciones i.v. de GLYX-13 (figura 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 administrado por vía intravenosa produjo un efecto de tipo antidepresivo en la prueba de Porsolt a todas las concentraciones, con una reducción máxima del  $50 \pm 10\%$  (media  $\pm$  EEM) en la flotación en comparación con vehículo de solución salina ( $P < 0,01$ ). GLYX-13 administrado por vía subcutánea produjo un efecto de tipo antidepresivo en la prueba de Porsolt a todas las concentraciones, con una reducción máxima del  $43 \pm 7\%$  (media  $\pm$  EEM) en la flotación en comparación con vehículo de solución 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:  $84,7,19 \pm 11,6$ ). La disminución en el tiempo de inmovilidad medio es una medida de la eficacia del antidepresivo; por tanto GLYX-13 funciona como antidepresivo cuando se administra por vía intravenosa o subcutánea.

## EJEMPLO 3

### Métodos

Para determinar si GLYX-13 actúa en una zona del cerebro que es clínicamente relevante para la depresión, se administró GLYX-13 o bien a la corteza prefrontal media (MPFC), que está asociada con el estado de ánimo y la depresión, o bien a la corteza motora (figura 4). Se determinó el tiempo medio pasado inmóvil en la prueba de Porsolt para grupos de 10 ratas Fisher Brown Norway F1 (FBNF1) macho de tres meses de edad tratadas previamente con una única inyección de GLYX-13 (1, 10 ug/lado) o una única inyección de vehículo de solución salina (0,5 ul/1 min) de manera bilateral en la corteza prefrontal media o la corteza motora (control dorsal) en animales con cánulas permanentes crónicas implantadas mediante cirugía dirigidas a la MPFC. Se realizaron microinyecciones 1 semana tras la cirugía, y se realizaron pruebas de Porsolt 20 min tras la inyección. Los animales recibieron una única sesión de natación de entrenamiento de 15 min un día antes de la dosificación.

## Resultados

Tal como se muestra en la figura 4, GLYX-13 inyectado en la MPFC produjo un efecto de tipo antidepresivo en la prueba de Porsolt con una reducción de  $50 \pm 5\%$  (media  $\pm$  EEM) en la flotación en comparación con control de solución salina o con GLYX-13 inyectado en la corteza motora (control dorsal). (Figura 4, 0:  $115,2 \pm 10,89$ ; 0,1:  $108,77 \pm 12,34$ ; 1:  $53,46 \pm 10,65$ ; 10:  $62,54 \pm 8,7$ ; vehículo de control dorsal:  $119,3 \pm 10,6$ ; GLYX-13  $113,7 \pm 13,1$ ; media  $\pm$  EEM). Estos resultados indican que el efecto antidepresivo de GLYX-13 puede estar mediado a través de la MPFC, una zona del cerebro asociada con el estado de ánimo y la depresión.

## 10 EJEMPLO 4

## Métodos

Para determinar si el efecto antidepresivo de GLYX-13 era específico de la secuencia del péptido de GLXY-13, se determinó el tiempo medio (s) pasado flotando en la prueba de Porsolt en grupos de 12 ratas Sprague Dawley de tres meses de edad a las que se les administró GLYX-13 (TPPT-NH<sub>2</sub>; 3 mg/kg, i.v. en la vena de la cola), un péptido desordenado (PTPT-NH<sub>3</sub>; 3 mg/kg i.v. en la vena de la cola) o vehículo de solución salina al 0,9% (1 ml/kg, i.v. en la vena de la cola). La administración se produjo 60 min antes de la sesión de prueba de 5 min. Los animales recibieron una sesión de natación de entrenamiento de 15 min un día antes de la dosificación.

20

## Resultados

Los animales a los que se les administró GLYX-13 mostraron una reducción en el tiempo de flotación medio del  $70 \pm 5\%$  (media  $\pm$  EEM) en comparación con los animales que recibieron una inyección de solución salina o un péptido desordenado (figura 5). Por tanto, el efecto antidepresivo es específico de GLYX-13 y no representa un artefacto de la administración de un péptido de manera general.

25

## Discusión

Los datos representados en las figuras 2-5 muestran que GLYX-13 desempeña propiedades de tipo antidepresivas significativas en ratas a lo largo de un intervalo de dosis y vías de administración. Al contrario que los inhibidores de la recaptación de serotonina selectivos (SSRI), la aparición de la acción de GLYX-13 se produjo en el plazo de minutos desde una única dosis. Estos resultados junto con los recientes ensayos clínicos de moléculas de NMDAR conocidas, y el hecho de que GLYX-13 tiene un índice terapéutico espectacular, especialmente en comparación con otros moduladores de la función de NMDA, hacen que GLYX-13 sea un candidato atractivo para el tratamiento de la depresión.

30

35

Estos resultados muestran que agonistas parciales del sitio de glicina de NMDAR pueden ser candidatos terapéuticos excelentes para el tratamiento de la depresión.

40

Acción ansiolítica de GLYX-13

## EJEMPLO 5

El propósito de este estudio fue evaluar la acción de GLYX-13 sobre la ansiedad. Con el fin de calibrar el efecto de GLYX-13 en ratas, se realizó la prueba de campo abierto de ansiedad. La prueba de campo abierto es una prueba neofóbica de ansiedad ampliamente usada (véase, Treit D, Fundytus M. Thigmotaxis as a test for anxiolytic activity in rats. Pharmacol Biochem Behav 1989; 31:959-62).

45

50

La zona de campo abierto para la prueba de campo abierto consiste generalmente en un recinto cuadrado (o rectangular) vacío y brillante, rodeado por paredes. Para el estudio actual, se usó un campo abierto de 45 cm X 35 cm X 20 cm de altura. Se colocó la rata en el centro del recinto y se registró su comportamiento a lo largo de un periodo de tiempo predefinido (habitualmente entre 2 y 15 min). La prueba de campo abierto se basa en la tendencia natural de las ratas a evitar espacios abiertos. La prueba de campo abierto se basa en el conflicto entre la ansiedad innata que tienen las ratas a la zona central del espacio abierto frente a su deseo de explorar nuevos entornos. Cuando las ratas están en un estado de ansiedad, tienen una tendencia natural a quedarse cerca de las paredes. Esta tendencia natural de las ratas a quedarse cerca de las paredes se denomina tigmotaxis. En este contexto, se mide el comportamiento relacionado con la ansiedad mediante el grado en el que la rata evita el centro de la prueba de campo abierto. La determinación de la propensión de la rata a evitar el campo abierto puede determinarse midiendo el número de cruces por el centro realizados por las ratas a lo largo de un intervalo de tiempo predefinido, o determinando la cantidad de veces que la rata permanece en el centro del campo.

55

60

Con el fin de evaluar la eficacia de GLYX-13 como ansiolítico, se usaron dos grupos de ratas FBNF1 de tres meses de edad. El primer grupo estaba compuesto por 13 ratas y el segundo grupo estaba compuesto por 11 ratas. Al primer grupo de ratas se les inyectó por vía intravenosa GLYX-13 10 mg/kg y al segundo grupo de ratas se les

65

inyectó por vía intravenosa vehículo de PBS (1 ml/kg) de manera ciega a través de orificios de acceso crónicos en la vena femoral subdural. A ambos grupos de ratas se les administraron inyecciones de 10 a 15 minutos antes del inicio de las pruebas. Tras las inyecciones de GLYX-13, se sometieron a prueba ambos grupos de ratas en el campo abierto.

5 Para la prueba de campo abierto, se habituaron las ratas al campo abierto durante 2 minutos cada día durante tres días consecutivos antes de la sesión de prueba de 2 minutos final en la que se administró GLYX-13 o vehículo. Se registró la actividad de campo abierto mediante una cámara de vídeo montada encima del entorno de campo abierto, y se midió el número de cruces por el centro en el campo abierto.

10 Resultados

Se midieron los efectos del fármaco de tipo ansiolítico mediante un aumento de los cruces por el centro en el campo abierto por las ratas tratadas previamente con inyecciones i.v. de GLYX-13 (figura 6). GLYX-13 (10 mg/kg i.v.) produjo un efecto de tipo ansiolítico en la prueba de campo abierto con un aumento del  $172,6 \pm 34,3\%$  (media  $\pm$  EEM) en los cruces por el centro en comparación con vehículo ( $P < 0,005$ ).

#### EJEMPLO 6

20 Se realizó un segundo experimento de la misma manera que en el ejemplo 3, excepto porque se trataron previamente grupos de 8-10 ratas Sprague-Dawley macho de dos a tres meses de edad con inyecciones o bien intravenosas (1, 3, 10, 32 mg/kg) o bien subcutáneas (1, 3, 10, 32, 56, 100 mg/kg) de GLYX-13, ketamina (10 mg/kg i.p.) o vehículo de solución salina (1 mg/ml) 15 min (i.v.), 20 (s.c.) o 60 (i.p.) min antes del inicio de la sesión de prueba de 5 min. Cada punto de datos representa un grupo de 8-10 ratas. Se midió la cantidad promedio (media) de tiempo que pasan los animales en el centro del campo.

25 Resultados

30 Se midieron los efectos del fármaco de tipo ansiolítico mediante el aumento de los cruces por el centro en el campo abierto por las ratas tratadas previamente con inyecciones i.v. o subcutáneas de GLYX-13 (figura 7). La administración de GLYX-13 intravenosa produjo un efecto de tipo ansiolítico en la prueba de campo abierto con un aumento del  $42 \pm 5 \%$  (media  $\pm$  EEM) en la cantidad de tiempo pasado en el centro del campo en comparación con vehículo ( $P < 0,05$ ). La administración de GLYX-13 subcutánea produjo un efecto de tipo ansiolítico en la prueba de campo abierto con un aumento del  $36 \pm 5 \%$  (media  $\pm$  EEM) en la cantidad de tiempo pasado en el centro del campo en comparación con vehículo ( $P < 0,05$ ).

35 Discusión

40 Los datos notificados en este caso muestran que GLYX-13 desempeña propiedades de tipo ansiolítico significativas en ratas a lo largo de un intervalo de dosis y vías de administración. Los resultados con GLYX-13 muestran que los agonistas parciales del sitio de glicina de NMDAR pueden ser candidatos terapéuticos excelentes para el tratamiento de la ansiedad.

45 Evaluación de la persistencia de la acción de los efectos antidepresivos y ansiolíticos GLYX-13

#### EJEMPLO 7

Métodos

50 Para evaluar si los efectos antidepresivos y ansiolíticos de GLYX-13 persistirían más allá de unas pocas horas, se sometieron a prueba ratas en la prueba de Porsolt y la prueba de campo abierto, descritas anteriormente. Se trataron previamente grupos de 10-11 ratas Sprague-Dawley de tres meses de edad con inyección de GLYX-13 (3 mg/kg i.v.), ketamina (10 mg/kg i.v.) o vehículo de solución salina (1 mg/ml i.v., vena de la cola) 96 h antes del inicio de las pruebas. Los animales recibieron una única sesión de natación de entrenamiento de 15 min un día antes de la dosificación. Se sometieron a prueba los animales 96 h tras la dosificación en la prueba de Porsolt sin ninguna prueba durante el periodo intermedio. Las pruebas de campo abierto se realizaron sin habituación previa 1 día tras las pruebas de Porsolt (es decir 120 h tras la dosificación). Se determinaron el tiempo medio ( $\pm$  EEM) (s) pasado flotando en la prueba de Porsolt, el tiempo pasado en el compartimento central (s) y los cruces de línea en la prueba de campo abierto.

60 Resultados

65 Los resultados de la prueba de Porsolt mostraron que los animales a los que se les administró GLYX-13 mostraron una reducción del  $82\% \pm 2$  (media  $\pm$  EEM) en el tiempo de flotación medio en comparación con los animales a los que se les administró un control de solución salina (figura 8, panel izquierdo). Los resultados de las pruebas de

campo abierto muestran que los animales a los que se les administró GLYX-13 mostraron un aumento del  $125\% \pm 5$  (media  $\pm$  EEM) en el tiempo en el centro medio en comparación con los animales a los que se les administró un control de solución salina (figura 8, panel central). El tiempo en el centro es una medida de la ansiólisis. Los cruces de línea son una medida de la actividad locomotriz, y pueden usarse como control.

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60

Discusión

Estos resultados muestran que los efectos antidepresivos de una única administración de GLYX-13 duran hasta 4 días, y que los efectos ansiolíticos persisten durante hasta 5 días. Por tanto, aunque los efectos de GLYX-13 pueden observarse en el plazo de minutos, el efecto de una única administración también persiste durante al menos varios días.

Comprensión del fundamento molecular del afecto positivo inducido por juegos activos y bruscos (RTP) y evaluación del efecto hedónico de GLYX-13

EJEMPLO 8

Comprensión del fundamento molecular de RTP

Con el fin de comprender el fundamento molecular de RTP, se llevaron a cabo cuatro sesiones de RTP de 30 minutos cada una con ratas. Las ratas control usadas para este estudio recibieron un manejo idéntico que los grupos de pruebas de RTP excepto porque se sometieron a prueba en aislamiento. Tras estas sesiones de RTP, se midieron cambios en la expresión génica en la corteza frontal y corteza parietal en ratas mediante micromatriz. Estos cambios en la expresión génica se examinaron 6 horas tras el final de cuatro sesiones de RTP de 30 minutos.

RTP aumentó la expresión de la familia de genes de NMDA (específicamente: subunidades NR1, NR2AD de NMDA). La regulación por incremento de subunidades de NMDAR se corroboró mediante qrt-PCR y los resultados se han presentado en la figura 9.

Evaluación del efecto hedónico de GLYX-13

Para evaluar el efecto hedónico de GLYX-13 en este estudio, se examinó el modelo de vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz de afecto positivo en ratas (véase, 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).

Según el modelo de vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz de afecto positivo, se ha mostrado que el comportamiento de RTP en ratas proporciona recompensa y provoca altas tasas de vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz que a su vez se ha mostrado que reflejan estados afectivos positivos (figura 10).

Como parte del estudio, se usaron dos grupos de ratas FBNF1 de tres meses de edad. El primer grupo estaba compuesto por 13 ratas y el segundo grupo estaba compuesto por 11 ratas. Al primer grupo de ratas se les inyectó por vía intravenosa GLYX-13 10 mg/kg y al segundo grupo de ratas se les inyectó por vía intravenosa vehículo de PBS (1 ml/kg) de manera ciega a través de orificios de acceso crónicos en la vena femoral subdural. A ambos grupos de ratas se les administraron inyecciones de 10 a 15 minutos antes del inicio de la prueba.

Para las vocalizaciones ultrasónicas (USV) hedónicas, los animales recibieron 2 minutos de habituación de RTP heteroespecífica antes de la sesión de prueba de 2 minutos final.

Resultados

La inyección directa de una dosis de GLYX-13 (10 mg/kg i.v.) aumentó las vocalizaciones ultrasónicas de 50 kHz inducidas por RTP hedónico. GLYX-13 aumentó las tasas de USV de 50 kHz afectivas positivas inducidas por juego en el  $178,5 \pm 48,3\%$  (media  $\pm$  EEM) en comparación con vehículo ( $P < 0,01$ ) (figura 11).

Discusión

Estos resultados sugieren que el receptor de NMDA puede desempeñar un papel funcional en estados afectivos positivos inducidos por RTP. GLYX-13 puede ser un agente terapéutico útil para aumentar la resistencia a la depresión y a la ansiedad.

Equivalentes

Aunque se han comentado realizaciones específicas de la descripción objeto, la memoria descriptiva anterior es ilustrativa y no restrictiva. Muchas variaciones de la descripción resultarán evidentes para los expertos en la técnica

tras la revisión de esta memoria descriptiva. El alcance completo de la descripción debe determinarse mediante referencia a las reivindicaciones y la memoria descriptiva.

5 A menos que se indique lo contrario, debe entenderse que todos los números que expresan cantidades de componentes, condiciones de reacción, parámetros, características descriptivas, etcétera, usados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones están modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busca obtener mediante la presente invención.

10

#### Lista de secuencias

<110> Northwestern University

<120> MÉTODOS DE TRATAMIENTO DE LA DEPRESIÓN Y OTRAS ENFERMEDADES RELACIONADAS

15

<130> P54862EP-K

<140> Documento EP10822514.5

<141> 05-10-2010

<150> Documento PCT/US2010/051415

<151> 05-10-2010

20

<150> Documento US 61/248.650

<151> 05-10-2009

<160> 13

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

25

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

30

<400> 1

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

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

35

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 2

**Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr**  
**1 5**

40

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

45

<223> Péptido sintético

<400> 3

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

<210> 4

<211> 13

50

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 4

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

55

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

60

<220>

<223> Péptido sintético

<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

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<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**

10 **20**

<210> 7

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Péptido sintético

<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 **20**

<210> 8

20 <211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

25 <400> 8

**Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly**

**1 5 10**

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 9

**Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu**

**1 5 10 15**

**Glu**

35 <210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

40 <223> Péptido sintético

<220>

<221> DISULFURO

<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> Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <400> 11  
**Ser Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Pro Thr Ser**  
**1 5 10**  
 10 <210> 12  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 15 <223> Péptido sintético  
 <400> 12  
**Gln Gln His Tyr Ser**  
**1 5**  
 <210> 13  
 <211> 4  
 20 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <400> 13  
**Thr Pro Pro Thr**  
 25 **1**

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. GLYX-13 para uso en un método para tratar depresión que no responde al tratamiento en un paciente resistente al tratamiento que lo necesita, en el que GLYX-13 debe administrarse a dicho paciente, mediante lo cual se alivia sustancialmente al menos un síntoma en dicho paciente en el plazo de aproximadamente 14 días.
- 10 2. GLYX-13 para uso según la reivindicación 1, en el que dicha depresión se selecciona del grupo que consiste en trastorno depresivo mayor, trastorno distímico, depresión psicótica, depresión posparto, trastorno afectivo estacional, trastorno bipolar, trastorno del estado de ánimo, depresiones provocadas por estados médicos crónicos tales como cáncer o dolor crónico, quimioterapia, estrés crónico, trastornos de estrés postraumático y trastorno maníaco-depresivo.
- 15 3. GLYX-13 para uso según la reivindicación 1 ó 2, en el que GLYX-13 debe administrarse en una cantidad de 0,01 mg/kg a 1000 mg/kg al día.
- 20 4. GLYX-13 para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que GLYX-13 debe administrarse en un intervalo de dosis i.v. de 1 a 10 mg/kg.
- 25 5. GLYX-13 para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el paciente resistente al tratamiento se identifica como uno que se ha tratado con al menos dos tipos de tratamientos antidepresivos antes de la administración de GLYX-13.
6. GLYX-13 para uso según la reivindicación 5, en el que el paciente resistente al tratamiento se identifica como uno que no está dispuesto o no puede tolerar un efecto secundario de al menos un tipo de tratamiento antidepresivo.
7. Uso de GLYX-13 en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de depresión que no responde al tratamiento en un paciente resistente al tratamiento que lo necesita, en el que GLYX-13 debe administrarse a dicho paciente, mediante lo cual se alivia sustancialmente al menos un síntoma en dicho paciente en el plazo de aproximadamente 14 días.

TABLA 1

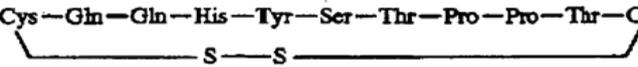
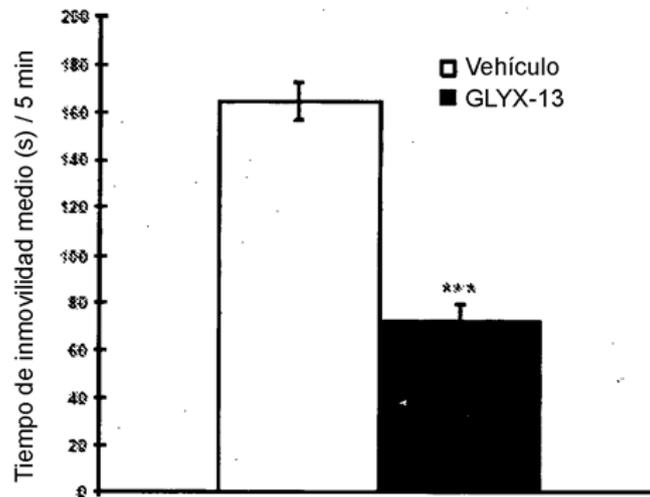
Nombre SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos
NT-1: SEQ ID. NO:1.	Lys—Ala—Ser—Gln—Asp—Val—Ser—Thr—Thr—Val—Ala
NT-2: SEQ ID. NO:2.	Ser—Ala—Ser—Tyr—Arg—Tyr—Thr
NT-3: SEQ ID. NO:3.	Gln—Gln—His—Tyr—Ser—Thr—Pro—Pro—Thr
NT-4: SEQ ID. NO:4.	Val—Tyr—Tyr—Ser—Gln—Gln—His—Tyr—Ser—Thr—Pro—Pro— Thr
NT-5: SEQ ID. NO:5.	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

GLYX-13 es antidepresivo en la prueba de natación de Porsolt de ratas



Tiempo medio ( $\pm$  EEM) pasado inmóvil en la prueba de natación de Porsolt usando ratas de 3 meses de edad tratadas previamente con inyecciones i.v. de 10,0 mg/kg de GLYX-13 (n = 9) o vehículo de PBS (n = 9) 10-15 min antes del inicio de las pruebas. \*\*\* P < 0,001, prueba de la t entre sujetos.

FIGURA 2

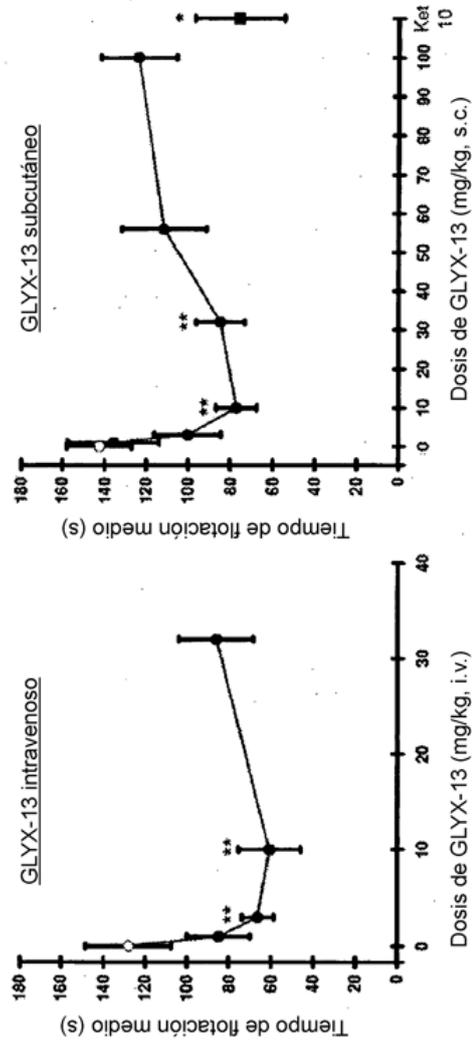


FIGURA 3

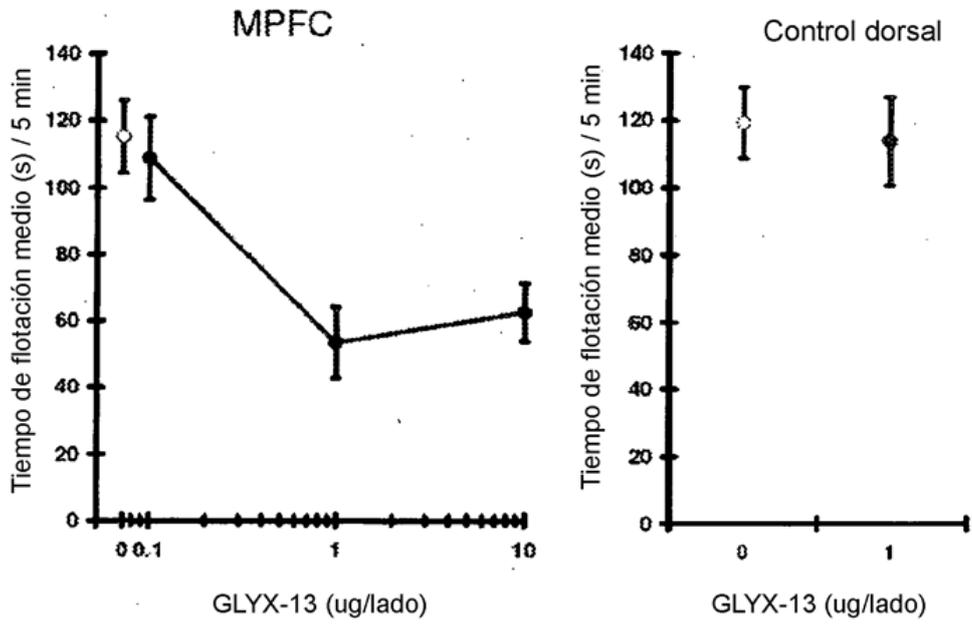


FIGURA 4

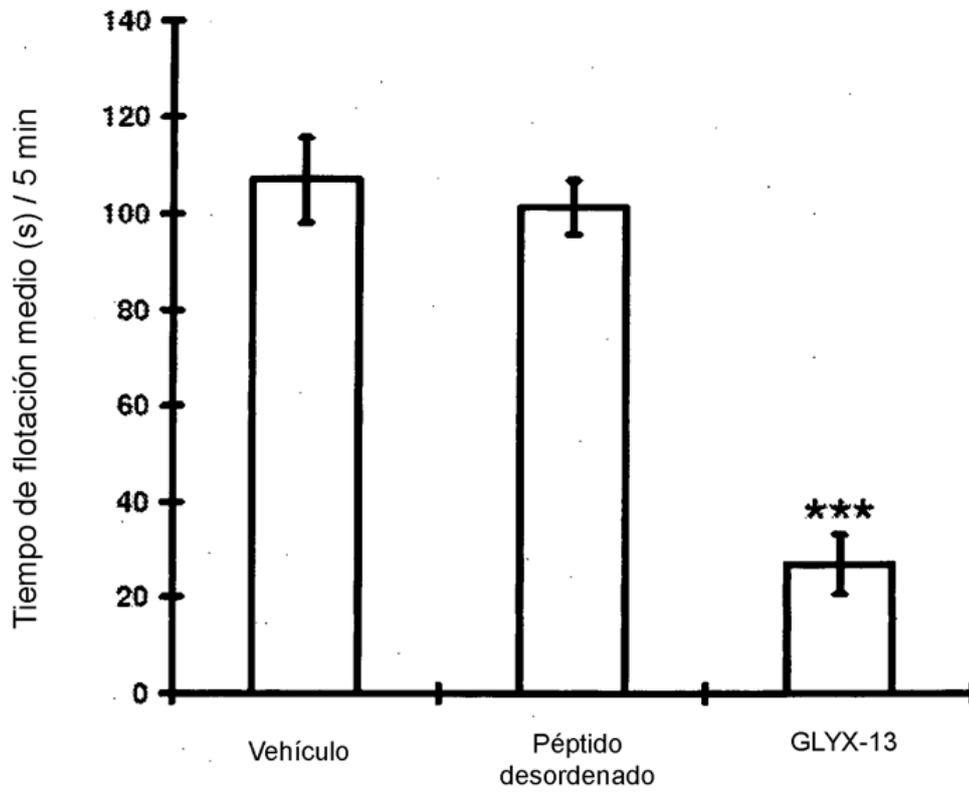
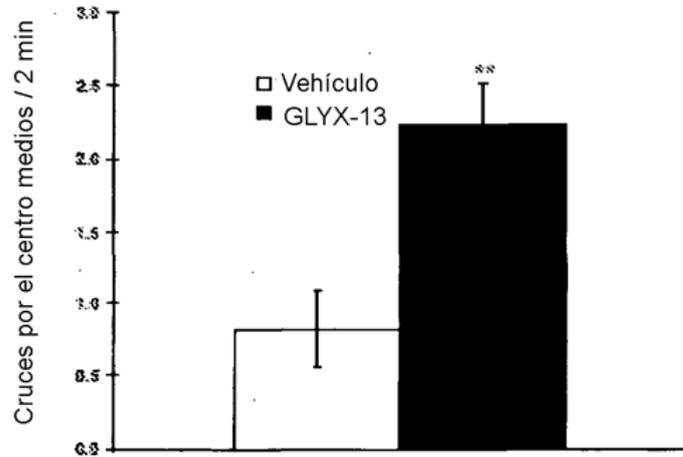


FIGURA 5

GLYX-13 es ansiolítico en la prueba de campo abierto de ratas



Cruces medios ( $\pm$  EEM) en el compartimento central del campo abierto durante las pruebas de juegos en ratas de 3 meses de edad tratadas previamente con inyecciones i.v. de 10,0 mg/kg de GLYX-13 (n = 13) o vehículo de PBS (n = 11) 10-15 min antes del inicio de las pruebas. \*\*\* P < 0,01, prueba de la t entre sujetos.

FIGURA 6

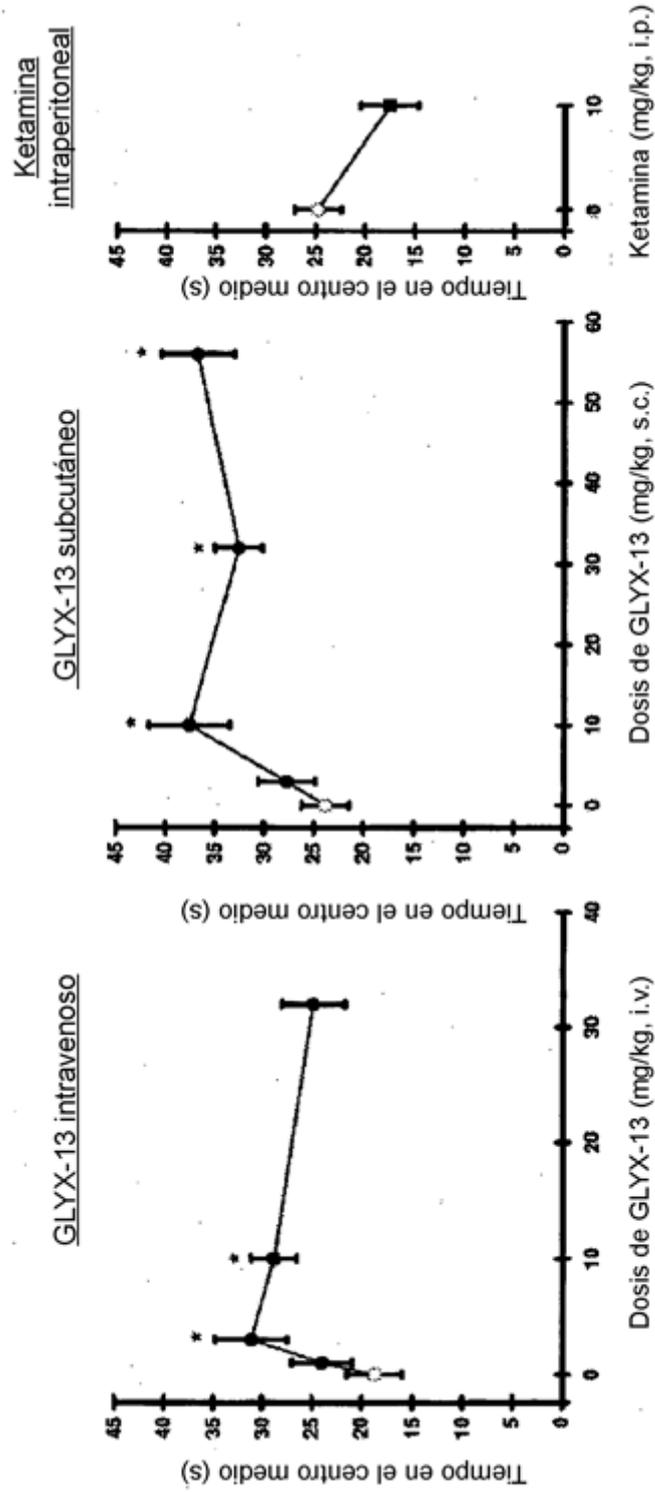


FIGURA 7

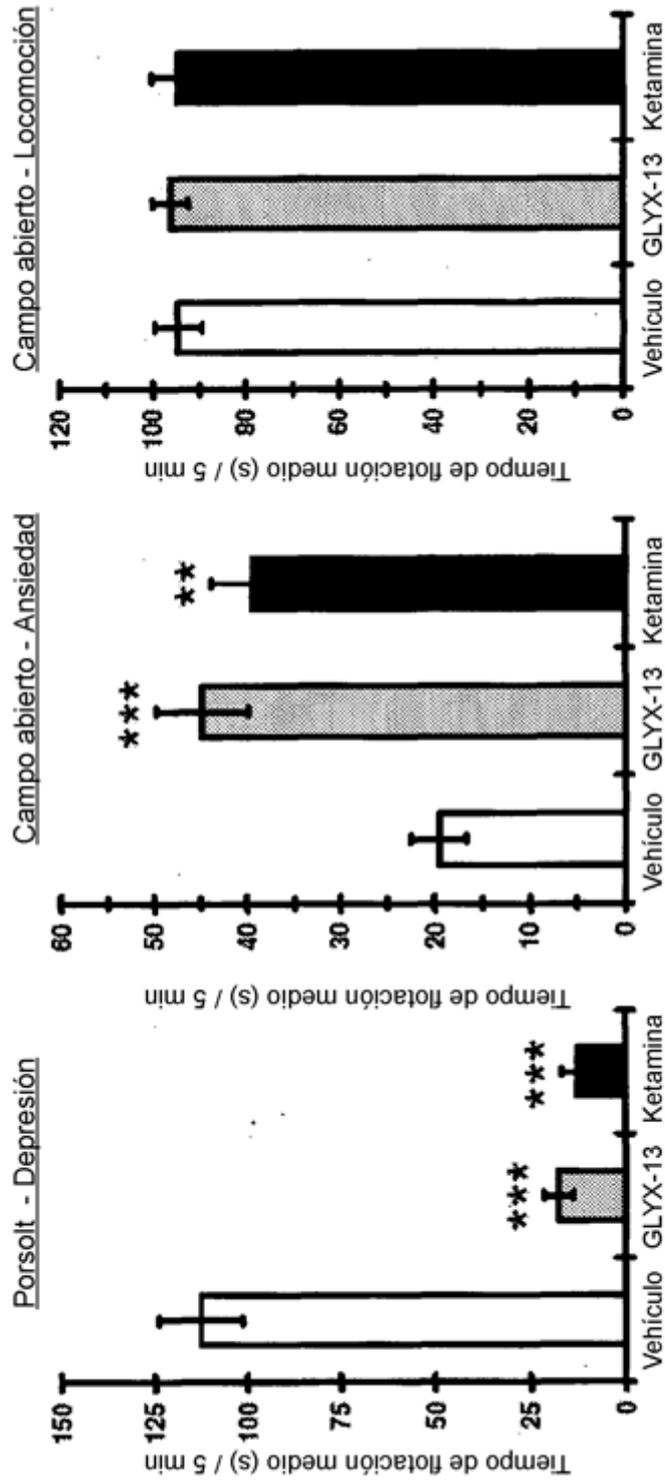
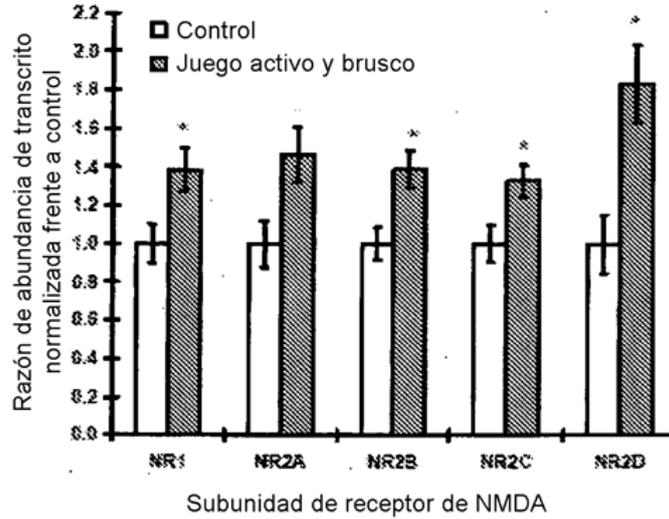


FIGURA 8

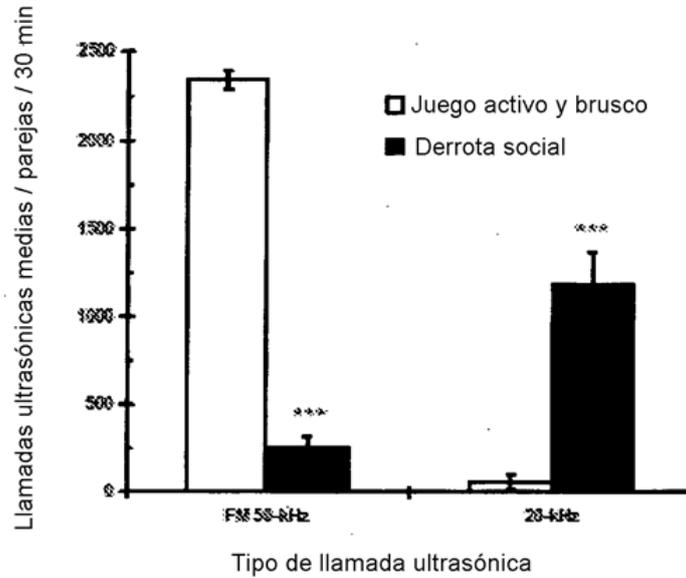
Análisis mediante qrt-PCR de la expresión de ARNm cortical de NMDAR tras juego activo y brusco



Razón media  $\pm$  EEM de niveles de ARNm de subunidades de NMDAR (pg de transcrito / ADNc) normalizada a niveles de control 6 horas tras 30 min de juego activo y brusco o 30 min sola en una jaula novedosa (control). La expresión génica para el ARNm de NMDAR aumentó tras el juego en la corteza frontal y posterior con respecto a los controles. Los valores de control medios  $\pm$  EEM (pg de transcrito / pg de ADNc) fueron: 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  $7,2 \pm 0,7 \times 10^{-6}$ , NR2D  $3,4 \pm 0,5 \times 10^{-6}$ . \*P < 0,05 de juego frente a control

FIGURA 9

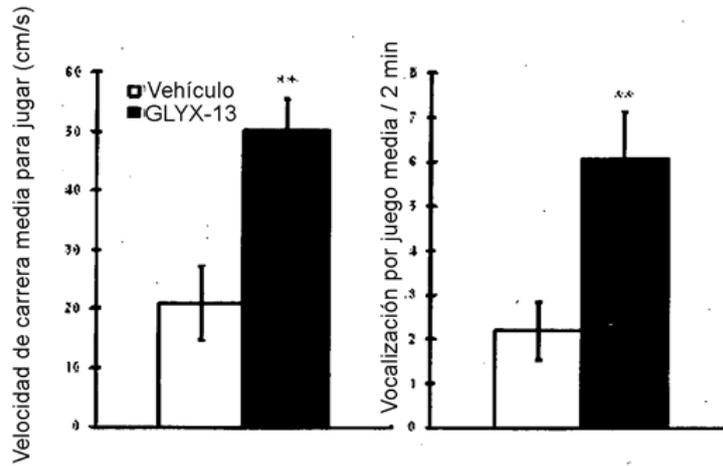
El comportamiento de juego activo y brusco provoca un máximo de USV de FM 50 kHz hedónicas y la derrota social provoca un máximo de USV de 22 kHz aversivas



Media ( $\pm$  EEM) de USV de frecuencia modulada 50 kHz y 20 kHz durante 30 min de juego activo y brusco ( $n = 23$  parejas) a 1 mes de edad en comparación con 30 min de derrota social ( $n = 18$  parejas) a 3 meses de edad. \*\*\*  $P < 0,001$  entre prueba de la  $t$  bilateral de sujetos

FIGURA 10

El agonista parcial de NMDA, GLYX-13, aumenta las USV de 50 kHz hedónicas inducidas por RTP y la recompensa



Tasas medias ( $\pm$  EEM) de vocalización por juego en anticipación de juego (derecha) y el valor de recompensa del juego indexado por la velocidad de carrera para jugar (izquierda) durante pruebas de juego en ratas de 3 meses de edad tratadas previamente con inyecciones i.v. de 10,0 mg/kg de GLYX-13 (n = 13) o vehículo de PBS (n = 11) 10-15 min antes del inicio de las pruebas. \*\* P < 0,01, entre prueba de la t de sujetos.

FIGURA 11