



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115397804 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 25

(21) 申请号 202080097944.9

(22) 申请日 2020.12.30

(30) 优先权数据

62/956,839 2020.01.03 US

62/963,874 2020.01.21 US

62/993,188 2020.03.23 US

63/010,391 2020.04.15 US

63/031,785 2020.05.29 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.09.01

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/067498 2020.12.30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/138443 EN 2021.07.08

(71) 申请人 帕多瓦大学

地址 意大利帕多瓦

申请人 生物医学研究所

保罗·L·曼弗雷蒂

查尔斯·E·因图里西

(72) 发明人 保罗·L·曼弗雷蒂

查尔斯·E·因图里西 S·德马丁

A·马塔雷 J·斯格里尼亚尼

A·卡瓦利

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

专利代理师 过晓东

(51) Int.Cl.

C07C 221/00 (2006.01)

C07C 213/00 (2006.01)

C07C 225/16 (2006.01)

权利要求书5页 说明书130页 附图147页

按照条约第19条修改的权利要求书6页

(54) 发明名称

右美沙酮用于神经精神障碍和疾病的疾病
改善治疗

(57) 摘要

用于改善神经精神障碍的病程和严重程度的方法和组合物。该方法包括向患有神经精神障碍的受试者施用组合物,其中该组合物包含选自右美沙酮、右美沙酮代谢物、d-美沙多、d- α -乙酰美沙多、d- α -去甲美沙多、l- α -去甲美沙多及其药学上可接受的盐的物质。

1. 一种改善神经精神障碍的病程和严重程度的方法,所述方法包括:

将组合物施用于患有神经精神障碍的受试者,所述神经精神障碍选自重度抑郁症、持续性抑郁症、破坏性情绪失调障碍、经前焦虑症、产后抑郁症、双相障碍、轻躁狂和躁狂症、广泛性焦虑障碍、社交焦虑障碍、躯体性症状障碍、丧亲抑郁症、调整性抑郁症、创伤后应激障碍、强迫症、慢性疼痛障碍、膀胱过度活动症和物质使用障碍;

其中所述组合物包含选自右美沙酮、右美沙酮代谢物、d-美沙多、d- α -乙酰美沙多、d- α -去甲美沙多、l- α -去甲美沙多及其药学上可接受的盐的物质。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述物质是用于治疗所述神经精神障碍的所述组合物中的唯一活性剂。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述物质是从其对映异构体中分离出来或从头合成的。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组合物的施用是在所述物质有效结合所述受试者的NMDA受体的条件下进行并且通过改变所述神经精神障碍的病程和严重程度使所述受试者得到缓解。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述缓解选自所述神经精神障碍的治愈、所述神经精神障碍的预防、所述神经精神障碍的严重程度的降低、以及所述神经精神障碍的持续时间的减少。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组合物的施用作为单一疗法发生。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组合物的施用作为第二物质的辅助治疗的一部分发生。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组合物的施用发生在对离子通道、神经递质系统、神经递质通路或选自离子型谷氨酸受体、5-HT_{2A}受体、5-HT_{2C}受体、阿片受体、AChR、SERT、NET、sigma1受体、K通道、Na通道和Ca通道的受体作用有效的条件下。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述组合物的施用发生在对离子型谷氨酸受体的作用有效的条件下,并且其中所述离子型谷氨酸受体是NMDAR。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中对所述离子型谷氨酸受体的作用包括对由细胞膜表达的NMDAR的电压依赖性通道阻断。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中对所述离子型谷氨酸受体的作用包括对由细胞膜表达的NMDAR的电压依赖性通道阻断,所述电压依赖性通道阻断对含有NR2C和NR2D亚基的NMDAR具有优先作用。

12. 根据权利要求9所述的方法,其中对所述离子型谷氨酸受体的作用包括诱导NMDAR亚基或有助于神经元可塑性并有助于突触蛋白的膜表达的其他突触蛋白的合成。

13. 根据权利要求1所述的方法,其中所述受试者是脊椎动物。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述脊椎动物是人。

15. 根据权利要求1所述的方法,其中所述物质是右美沙酮。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述右美沙酮是药学上可接受的盐的形式。

17. 根据权利要求15所述的方法,其中所述右美沙酮以0.1mg至5000mg的总日剂量递送。

18. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组合物的施用改善受试者中所述神经精神障

碍的病程和严重程度,并且其中所述缓解在选自首次施用所述物质后两周或更短、首次施用所述物质后7天或更短、首次施用所述物质后4天或更短以及首次施用所述物质后2天或更短的时间段内开始。

19. 根据权利要求15所述的方法,其中由施用所述组合物产生的右美沙酮的治疗效果在2期临床试验中达到大于或等于0.3的效应值或在2期临床试验中达到大于或等于0.5的效应值,或在2期临床试验中达到大于或等于0.7的效应值。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述治疗效果在停止治疗后持续至少一周。

21. 根据权利要求19所述的方法,其中在停止治疗后所述治疗效果的持续时间等于或大于所述治疗的持续时间。

22. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组合物的施用是除了向所述受试者施用一种或多种抗抑郁药物之外发生,或者与向所述受试者施用一种或多种抗抑郁药物组合发生。

23. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组合物的施用是除了向所述受试者施用镁、锌或锂中的一种或多种之外发生,或者与向所述受试者施用镁、锌或锂中的一种或多种组合发生。

24. 根据权利要求15所述的方法,其中施用所述组合物导致所述神经精神障碍的疾病改善。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述受试者的体重指数等于或小于35。

26. 根据权利要求1所述的方法,其中施用所述组合物用于改善认知功能、改善社交功能、改善睡眠、改善性功能、改善工作执行能力或改善社交活动的动机。

27. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组合物的施用是口服、含服、舌下、直肠、阴道、鼻腔、通过气溶胶、透皮、肠胃外、静脉内、皮下、硬膜外、鞘内、耳内、眼内或局部地实施。

28. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组合物的施用以每天25mg的剂量发生。

29. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组合物的施用包括施用负荷剂量的所述组合物,然后施用日剂量的所述组合物。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中所述组合物的负荷剂量包括的所述物质的量大于所述组合物的每个日剂量中存在的所述物质的量。

31. 根据权利要求30所述的方法,其中在施用所述组合物的第一天达到处于或高于稳态的血浆水平。

32. 根据权利要求30所述的方法,其中在施用所述组合物的4小时内达到处于或高于稳态的血浆水平。

33. 根据权利要求1所述的方法,其中在施用所述组合物后,所述物质在所述受试者中的总血浆水平为5ng/ml至3000ng/ml。

34. 根据权利要求1所述的方法,其中在施用所述组合物之后,所述物质在所述受试者中的未结合水平为0.1nM至1500nM。

35. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组合物的施用作为间歇治疗方案发生,所述间歇治疗方案选自每隔一天、每三天一次、每周一次、每隔一周、每隔两周、每月一周、每隔一个月、每隔2个月、每隔3个月、每年1周和每年1个月。

36. 根据权利要求35所述的方法,其中所述组合物的施用与所选择的间歇治疗方案中的安慰剂交替。

37. 根据权利要求36所述的方法, 其中代替安慰剂或除了安慰剂之外, 所述方法包括施用镁、锌或锂中的一种或多种。

38. 根据权利要求1所述的方法, 进一步与数字应用程序相关联以监测所述障碍的病程, 包括对症状和体征以及功能和残疾结果的数字监测。

39. 根据权利要求8所述的方法, 其中所述受体是阿片受体并且选自MOR、KOR和DOR。

40. 一种用于治疗神经精神障碍的方法, 所述方法包括:

诊断患有选自重度抑郁症、持续性抑郁症、破坏性情绪失调障碍、经前焦虑症、产后抑郁症、双相障碍、轻躁狂和躁狂症、广泛性焦虑障碍、社交焦虑障碍、躯体性症状障碍、丧亲抑郁症、调整性抑郁症、创伤后应激障碍、强迫症、慢性疼痛障碍和物质使用障碍的神经精神障碍的个体;

制定治疗所述个体的神经精神障碍的过程; 以及

向所述个体施用物质作为治疗所述个体的MDD的所述过程的至少一部分, 所述物质选自右美沙酮、右美沙酮代谢物、d-美沙多、d- α -乙酰美沙多、d- α -去甲美沙多、l- α -去甲美沙多和其药学上可接受的盐。

41. 一种治疗MDD的方法, 所述方法包括:

诊断患有MDD的个体;

制定治疗所述个体的MDD的过程; 以及

将右美沙酮施用于所述个体作为治疗所述个体的MDD的过程的至少一部分。

42. 一种治疗神经精神障碍的方法, 所述方法包括:

在受试者中诱导NMDAR亚基、AMPA亚基或有助于神经元可塑性和组装的NMDAR通道的其他突触蛋白的转录、合成和膜表达;

其中所述受试者患有神经精神障碍, 所述神经精神障碍选自重度抑郁症、持续性抑郁症、破坏性情绪失调障碍、经前焦虑症、产后抑郁症、双相障碍、轻躁狂和躁狂症、广泛性焦虑障碍、社交焦虑障碍、躯体性症状障碍、丧亲抑郁症、调整性抑郁症、创伤后应激障碍、强迫症、慢性疼痛障碍、膀胱过度活动症和物质使用障碍; 以及

其中诱导NMDAR亚基、AMPA亚基或有助于神经元可塑性的其他突触蛋白的转录、合成和膜表达是通过向受试者施用选自右美沙酮、右美沙酮代谢物、d-美沙多、d- α -乙酰美沙多、d- α -去甲美沙多、l- α -去甲美沙多及其药学上可接受的盐的物质来完成的。

43. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述神经精神障碍的治疗导致所述神经精神障碍的缓解, 所述缓解选自所述神经精神障碍的治愈、所述神经精神障碍的预防、所述神经精神障碍的严重程度的降低, 以及所述神经精神障碍的发病率的降低。

44. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述受试者是脊椎动物。

45. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述脊椎动物是人。

46. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述物质是右美沙酮。

47. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述右美沙酮是药学上可接受的盐的形式。

48. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述右美沙酮以0.1mg至5000mg的总日剂量递送。

49. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述受试者从所述神经精神障碍中的缓解开始于首次施用所述物质后两周或更短时间内。

50. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述受试者从所述神经精神障碍中的缓解开始于首次施用所述物质后7天或更短时间内。

51. 根据权利要求42所述的方法, 其中右美沙酮的治疗效果在2期临床试验中达到大于或等于0.3的效应值或在2期临床试验中达到大于或等于0.5的效应值, 或在2期临床试验中达到大于或等于0.7的效应值。

52. 根据权利要求51所述的方法, 其中所述治疗效果在停止治疗后持续至少一周。

53. 根据权利要求51所述的方法, 其中在停止治疗后所述治疗效果的持续时间等于或大于所述治疗的持续时间。

54. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述组合物的施用与向所述受试者施用抗抑郁药物组合发生。

55. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述组合物的施用与向所述受试者施用镁、锌或锂中的一种或多种组合发生。

56. 根据权利要求46所述的方法, 其中右美沙酮用作疾病调节剂或用于治疗诊断为MDD和相关神经精神障碍且体重指数等于或小于35的患者。

57. 根据权利要求42所述的方法, 其中施用所述组合物用于改善认知功能、改善社交功能、改善睡眠、改善性功能、改善工作执行能力。

58. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述组合物的施用是口服、含服、舌下、直肠、阴道、鼻腔、通过气溶胶、透皮、肠胃外、静脉内、皮下、硬膜外、鞘内、耳内、眼内或局部地实施。

59. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述组合物的施用以每天0.01-1000mg的剂量发生。

60. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述组合物的施用包括施用负荷剂量的所述组合物, 然后施用日剂量的所述组合物。

61. 根据权利要求60所述的方法, 其中所述组合物的负荷剂量包含的所述物质的量是所述组合物的每个日剂量中存在的所述物质的量的两倍或更多。

62. 根据权利要求42所述的方法, 其中在施用所述组合物的第一天达到稳态。

63. 根据权利要求42所述的方法, 其中在施用所述组合物的4小时内达到稳态。

64. 根据权利要求42所述的方法, 其中在施用所述组合物后, 所述物质在受试者中的未结合水平为5ng/ml至3000ng/ml。

65. 根据权利要求42所述的方法, 其中在施用所述组合物后, 所述物质在受试者中的未结合水平为0.5nM至1500nM。

66. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述组合物的施用作为间歇治疗方案发生, 所述间歇治疗方案选自每周一次、每隔一天、每三天一次、每周一次、每隔一周、每隔两天、每隔三天、每两周一次和每隔一月。

67. 根据权利要求66所述的方法, 其中所述组合物的施用与所选择的间歇治疗方案中的安慰剂交替。

68. 根据权利要求67所述的方法, 其中代替安慰剂或除了安慰剂之外, 它包括镁、锌或锂中的一种或多种。

69. 根据权利要求42所述的方法, 进一步与数字应用程序相关联以监测所述障碍的病程, 包括症状和体征以及功能和残疾结果。

70. 一种治疗以离子通道功能障碍为特征的疾病或障碍的方法,所述方法包括:

诊断患有以离子通道功能障碍为特征的疾病或障碍的个体;

制定治疗所述个体的所述疾病或障碍的过程,其中治疗所述疾病或障碍的过程涉及所述离子通道功能障碍的解决;以及

向所述个体施用物质作为解决所述离子通道功能障碍的所述过程的至少一部分,所述物质选自右美沙酮、右美沙酮代谢物、d-美沙多、d- α -乙酰美沙多、d- α -去甲美沙多、l- α -去甲美沙多及其药学上可接受的盐。

71. 根据权利要求70所述的方法,其中所述离子通道是一个或多个NMDAR的组成部分。

72. 根据权利要求70所述的方法,其中所述离子通道是包含GluN2C亚基的NMDAR的组成部分。

73. 根据权利要求70所述的方法,其中所述离子通道是包含GluN2D亚基的NMDAR的组成部分。

74. 根据权利要求70所述的方法,其中所述离子通道是包含GluN2B亚基的NMDAR的组成部分。

75. 根据权利要求70所述的方法,其中所述离子通道是包含GluN2A亚基的NMDAR的组成部分。

76. 根据权利要求70所述的方法,其中所述离子通道是包含GluN3A亚基的NMDAR的组成部分。

77. 一种将障碍诊断为由病理性过度活跃的NMDAR通道引起、恶化或维持的障碍的方法,所述方法包括:

向受试者施用组合物,所述组合物包括选自右美沙酮、右美沙酮代谢物、d-美沙多、d- α -乙酰美沙多、d- α -去甲美沙多、l- α -去甲美沙多及其药学上可接受的盐的物质,所述受试者已被诊断患有至少一种病理生理学不明确的障碍,所述障碍选自神经障碍、神经精神障碍、眼科障碍、耳科障碍、代谢障碍、骨质疏松症、泌尿生殖系统障碍、肾功能不全、不孕症、卵巢功能早衰、肝脏病症、免疫性疾病、肿瘤疾病、心血管疾病;

通过在施用所述组合物之前和之后测量每种障碍特有的终点来确定所述组合物在所述至少一种障碍中的有效性;以及

诊断表现出特定终点改善的受试者具有由病理性过度活跃的NMDAR通道引起、恶化或维持的障碍。

右美沙酮用于神经精神障碍和疾病的疾病改善治疗

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年5月29日提交的美国专利第63/031,785号申请、2020年4月15日提交的美国专利第63/010,391号申请、2020年3月23日提交的美国专利第62/993,188号申请、2020年1月21日提交的美国专利第62/963,874号申请和2020年1月3日提交的美国专利第62/956,839号申请的权益,其公开的全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及各种疾病和障碍的治疗,并且涉及用于所述治疗的化合物和/或组合物。

背景技术

[0004] 本部分旨在向读者介绍可能与以下描述和/或要求保护的本发明的各个方面相关的技术的各个方面。该讨论被认为有助于为读者提供背景信息以帮助更好地理解本发明的各个方面。因此,应该理解,这些陈述是从这个角度来理解的,而不是承认现有技术。

[0005] 许多神经精神障碍是对个体生活的各个方面产生负面影响的重要临床状况。例如,重度抑郁症(MDD)是一种重要的临床状况,会影响情绪、行为、认知、动力、精力、社交和工作能力以及诸如食欲、性活动和睡眠的基本功能。这是一种精神障碍,通常以至少两周的情绪低落为特征,在大多数情况下都存在。它经常伴随着自尊心低,对正常愉快的活动失去兴趣,包括饮食和性活动,认知功能下降,精力不足,疼痛和/或没有明确原因的痛苦。MDD会对个体的个人家庭和社交生活、工作生活和/或教育-以及睡眠、饮食、性习惯和一般健康-产生负面影响,并可能导致自杀。

[0006] MDD被认为是由遗传和环境因素共同引起的。风险因素包括家族病史、重大生活变化、健康问题、某些医疗状况、某些药物和物质滥用。大量风险被认为与遗传有关。MDD的诊断基于个人报告的经历和经过培训的医疗保健提供者的检查。可以进行测试以排除可能导致类似状况的身体症状。MDD比抑郁症的孤立症状(抑郁情绪)更严重且持续时间更长,抑郁症是一种悲伤或抑郁的感觉,可能是独立的且短暂的,通常不会影响认知功能和精力水平,并且基本不会严重损害工作或社交能力。

[0007] 用于诊断抑郁症和疾病的最广泛使用的标准可见于美国精神病学会的精神疾病诊断和统计手册(DSM-5),以及世界卫生组织的疾病和相关健康问题的国际统计分类(ICD-10),前者通常在美国和非欧洲国家使用,而后者通常用于欧洲国家。

[0008] MDD在DSM-5中被分类为情绪障碍。诊断取决于是否存在单一或反复的重度抑郁发作。进一步的限定词用于对发作本身和障碍的进程进行分类。ICD-10系统列出了类似的抑郁发作诊断标准(轻度、中度或重度)。

[0009] 更具体地,要在DSM-5下被诊断患有MDD,受试者必须具有以下症状中的5种或更多,并且在超过2周的时间内每天至少经历一次:(1)几乎每天大部分时间感到悲伤或易怒;(2)对曾经享受过的大多数活动不感兴趣;(3)体重突然增加或减少,或食欲改变;(4)难以

入睡或比平时想睡得更多；(5) 焦躁不安的感觉；(6) 异常疲倦或精神不振；(7) 毫无价值或内疚的感觉，经常是关于通常不会让受试者有这种感觉的事情；(8) 难以集中注意力、思考或决策；(9) 有自残或自杀的念头。

[0010] MDD和其他神经精神障碍的一个新出现的特征是某些脑细胞(例如，神经元和星形胶质细胞)的分子功能功能障碍，导致神经元回路(即，通过突触互连的多个神经元，例如，是内啡肽系统的一部分的细胞)。根据本申请，这种神经元回路功能障碍可以特别表征或由离子通道[例如，对N-甲基-D-天冬氨酸受体(“NMDAR”)不可或缺的离子通道]的功能障碍引起。

[0011] 患有MDD的患者通常用标准的抗抑郁药物和/或心理咨询来治疗，初级保健提供者采取的初始步骤通常是抗抑郁药物的处方。此类药物包括选择性5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRI)[包括众所周知的药物，例如氟西汀(Prozac)和西酞普兰(Celebra)]、5-羟色胺和去甲肾上腺素再摄取抑制剂(SNRI)和安非他酮。5-羟色胺是一种大脑化学物质，被认为是调节情绪的核心。MDD患者被认为5-羟色胺水平较低。因此，增加可用的5-羟色胺的量被广泛认为可用于治疗这些患者。

[0012] 虽然SSRI和SNRI的确切作用机制尚不清楚，但假定的机制是抑制内向转运蛋白，同时突触连接处选择的神经递质(5-羟色胺和/或去甲肾上腺素)增加。这些药物的有效性，无论是急性的还是慢性的，都是高度不可预测的。作用于不同受体和/或通路的非典型抗抑郁药具有相同的反应不可预测性。在MDD的情况下，这些治疗的效应值往往很低(大约0.3)，在SSRI(对于MDD目前的标准治疗)的情况下，治疗效果通常会延迟4-8周(超过50%的患者对一线抗抑郁药没有反应)，并且通常需要数月的长期治疗。总之，在MDD以及慢性疾病(例如慢性疼痛障碍、焦虑障碍和其他神经精神障碍(包括精神分裂症))中直接调节神经递质受体和通路的尝试令人失望，并且目前的治疗在很大程度上是不成功的并且基于对症方法(导致5-羟色胺增加的药物，一种被认为可以控制情绪的化学物质)。

[0013] 例如，虽然一些精神症状可以通过调节针对特定的一种或多种症状选择的神经递质通路(例如，通过用于抑郁症的SSRI药物调节5-羟色胺通路)而暂时改善，但这种调节也可能干扰大脑的其他回路或区域(或甚至在其他组织中，例如，额外的CNS组织)中的其他神经元的功能，这些神经元也至少部分地通过相同的神经递质通路起作用，但可能没有功能障碍。此外，药理学引起的突触间隙神经递质浓度的急性变化可能会触发具有不可预测的长期后果的补偿性生物反馈机制。因此，这些目前使用的药物，尤其是长期使用时，由于分子反馈机制，可能会导致不良和不可预测的长期结果。由于其作用机制中隐含的非选择性，一些神经递质通路调节药物(例如，SSRI)也会对神经系统以外的通路产生影响，并引起额外的副作用，诸如性功能障碍和代谢副作用，诸如体重增加、糖耐量受损、糖尿病和脂质代谢功能障碍。

[0014] 此外，对于多种不同的内源性神经递质/受体系统，一个神经递质系统(或少量的神经递质系统)的操作可以以一种可以改善选择的目标症状的方式调节功能障碍的回路的功能，但对该回路的功能障碍(例如，NMDAR过度活跃)的主要原因没有作用(或不太可能作用)。因此，这种药物不太可能恢复生理细胞和回路功能。因此，尽管(并且通常是因为)药理学诱导的周围的神经递质水平发生变化，但触发和维持障碍的功能障碍的细胞将继续功能障碍。氟西汀和其他归类为治疗MDD的SSRI的药物是这种用于5-羟色胺/5-HT受体系统的神

经递质途径调节药物的示例。在临床试验中,它们通常表现出较弱的效应值和延迟、不可预测且通常不可持续的功效。

[0015] 此外,在停用SSRI后,患者可能会出现戒断症状,就像大多数影响神经递质及其通路的药物一样。并且对症药物的突然停用甚至可能导致症状加重的现象(与治疗前基线相比症状恶化)。在某些情况下,经过一定时间后,即使继续使用对症药物而不是停用(例如,在多巴胺激动剂的情况下),也可能出现加重。

[0016] 尽管当前药物治疗的这些缺点是众所周知的,但临床医生继续使用这些药物,因为它们有很少(如果有的话)有效的替代选择用于管理对抗抑郁药物疗法的反应不足。此外,迄今为止,对MDD和相关神经精神障碍表面下的分子机制的理解有限。因此,当一线抗抑郁药不能成功缓解MDD的表现时,临床医生可能会最大化初始标准抗抑郁药的剂量,换用不同的抗抑郁药,诉诸电休克疗法,或使用没被临床试验认可的药物加强治疗-即使考虑到在与这些疗法相关的所有缺点。虽然一些患者通过后续或加强治疗方法出现症状改善,但缓解的可能性会随着额外的治疗步骤而降低,并且那些在无症状之前接受更多治疗步骤的患者更有可能复发。当第一种或第二种治疗方法成功时,可以实现最大的患者利益,但目前的治疗方法通常无法获得这种成功。

[0017] 此外,目前可用治疗的缓慢起效和副作用也导致患者依从性差。迄今为止,美国食品和药品管理局(FDA)仅批准了3种药物作为抗抑郁药的辅助疗法来治疗MDD。这三种药物都是第二代非典型抗精神病药(阿立哌唑、喹硫平缓释剂和依匹哌唑),并且会增加神经阻滞剂恶性综合征、迟发性运动障碍和代谢副作用(包括糖尿病、血脂异常和体重增加)的风险。此外,标准抗抑郁药的延迟起效与自杀风险有关。

[0018] 用于治疗MDD(和其他障碍)的当前方法和组合物的另一个问题是某些个体可能对治疗有抗性。难治性抑郁症(treatment-resistant depression, TRD)是临床精神病学中使用的一个术语,用于描述影响患有MDD(和其他类似疾病)的患者的状况,这些患者在一定时间内对适当的抗抑郁药物疗程没有充分反应。TRD的标准定义各不相同。出于监管目的(FDA),TRD目前被定义为在当前的重度抑郁发作中对至少两次使用标准抗抑郁药的充分试验没有反应。传统上,反应不足被定义为没有任何临床反应(例如,抑郁症状没有改善)。然而,许多临床医生认为,如果个体没有完全缓解症状,则反应不足。对抗抑郁药治疗反应不充分的TRD个体有时被称为假耐药。导致治疗不充分的一些因素是:早期停止治疗、药物剂量不足、患者不依从、误诊和并发的神经精神障碍。TRD病例也可以根据患者耐药的药物进行分类(例如:SSRI耐药)。在TRD中,截至2020年,通过添加心理治疗、锂或非典型抗精神病药物等进一步治疗所实现的临床益处和生活质量改善的支持不足。

[0019] 因此,迄今为止,对诸如MDD和TRD(以及与MDD类似的其他疾病,如持续性抑郁症、产后抑郁症和社交恐惧症等)的治疗不是最理想的。最近,已经提出了用于治疗影响情绪的孤立症状(诸如抑郁的孤立症状)的治疗(除了上述那些)。

[0020] 例如,本发明人先前已公开右美沙酮可用于治疗疼痛和成瘾的症状(参见美国专利第6,008,258号),并可用于治疗选择的孤立的心理和/或精神症状(参见美国专利第9,468,611号),这是因为目前包含在阿片类药物中的分子的选择的对映异构体,及其衍生物在剂量和或浓度上对NMDAR的调节并不具有临床意义的阿片类受体效应,而且这些选择的对映体可能用于治疗疼痛和孤立的精神症状。

[0021] 然而,MDD是一种明确的障碍,其作为一种病理实体比孤立的精神症状(例如抑郁症的孤立症状)更复杂和严重。如上所述,专家们一致认为孤立的精神症状不能定义神经精神障碍,并且孤立症状的治疗不会转化为影响临床神经精神障碍的进程。因此,针对抑郁症的孤立症状的治疗(例如美国专利第9,468,611号中的那些)不被视为可转化为治疗MDD,并且因此尚未用于治疗MDD。此外,在障碍没有改善的情况下,情绪的改善可能不会影响动力、认知、社交和工作能力或睡眠的改善。

[0022] 在这方面,DSM-5将神经精神障碍定义为“以个体的认知、情绪调节或行为中的临床显著病症为特征的综合征,其反映了心理功能潜在的心理、生物学或发育过程中的功能障碍。”ICD-11的最终草案(ICD-10的后续版本)包含一个非常相似的定义。专家们一致认为,孤立的精神症状不能定义DSM5和ICD-11定义的神经精神障碍。例如,精神症状可能是个体的孤立特征,而不是疾病或障碍的实际部分。此外,精神症状可能是由其他原发性障碍引起的,例如,癌症或贫血患者的疲劳,或嗜铬细胞瘤患者的焦虑,或甲状腺功能减退患者中的情绪低落。此外,孤立症状的治疗不一定会影响神经精神障碍的进程。因此,迄今为止,对孤立的精神症状的治疗(例如,抑郁症的孤立症状的治疗)从未被视为可转化为神经精神障碍(例如,MDD),因为虽然此类治疗可以缓解症状(如抑郁症状),但它们不被视为对定义的神经精神障碍的进程具有治疗效果。迄今为止,没有治疗MDD的方法已显示出对其进程有治疗作用。

[0023] 如上所述,MDD被认为是由遗传和环境因素的组合引起的。对于神经精神障碍,遗传+环境范式(G+E)变得越来越复杂。迄今为止,超过100种独立的遗传变异与发展为MDD的风险增加有关[Howard DM,Adams MJ,Clarke TK,Hafferty JD,Gibson J,Shirali M等。(2019年3月),“抑郁症的全基因组荟萃分析确定了102个独立变体并强调了前额脑区域的重要性”,《自然神经科学》,22(3):343-352]。其中一些变异可能包括离子通道中的遗传异常,包括NMDAR。MDD与(1)选定大脑区域的神经元丢失和萎缩有关,包括内侧前额叶皮层(mPFC)和海马体[Kempton MJ,Salvador Z,MunafòMR,Geddes JR,Simmons A,Frangou S,Williams SC(2011),“Structural neuroimaging studies in major depressive disorder.Meta-analysis and comparison with bipolar disorder”,Archives of General Psychiatry,68(7):675-690],和(2)改变的神经元回路(Korgaonkar MS,Goldstein-Piekarski AN,Fornito A,Williams LM.Intrinsic connectomes are a predictive biomarker of remission in major depressive disorder,Mol Psychiatry,2019年11月6日)。此外,MDD与心血管风险、癌症和肥胖症的增加有关(Howard等人,2019年)。这些相关和/或关联的疾病、全身炎症的实验室指标,以及上面提到的暗示大脑结构变化(神经元萎缩和细胞凋亡)的影像学,是远远超出个体症状的障碍的一部分,并且单纯的对症治疗不太可能显著改善这种疾病。现有的治疗,包括SSRI、SNRI、安非他酮、非典型抗精神病药物,尚未显示会影响疾病进程。SSRI、SNRI、安非他酮和非典型抗精神病药物在疾病进程早期或晚期给药时显示出相似的效果,这是对症治疗的特征指示(而有可能通过纠正其发病机制来潜在有利地改变疾病进程的治疗-一种疾病改善治疗-在疾病进程的早期施用时会更有效)。

[0024] 因此,MDD和TRD以及其他神经精神障碍不仅仅由诸如抑郁、焦虑、疲劳和情绪不稳定等症状的存在来定义。虽然抑郁、焦虑、疲劳和情绪不稳定的症状可能是诊断MDD和TRD的

组成部分,但仅抑郁的情绪不足以诊断MDD。因此,从症状上改善抑郁情绪且没有其他作用的药物可能不会对MDD、TRD或其他神经精神障碍的进程产生显著影响。对神经精神障碍(包括MDD和其他疾病和障碍)进行有效的疾病改善治疗需要一种药物,其效果超出对一种或多种精神症状的对症治疗。这种疾病改善治疗将是非常需要的,但迄今为止这种治疗是未知的。即使对于最近批准的药物艾氯胺酮,由于认知和其他副作用而仅限于TRD,也没有证明其疾病改善效果。

发明内容

[0025] 下面阐述本发明的某些示例性方面。应当理解,呈现这些方面仅仅是为了向读者提供本发明可能采取的某些形式的简要概述,并且这些方面不是旨在限制本发明的范围。实际上,本发明可以涵盖以下可能未明确阐述的多个方面。

[0026] 如上所述,目前对MDD和其他神经精神障碍的治疗是不充分的。当前给药方案的有效性是高度不可预测的,并且在MDD以及其他慢性障碍(诸如慢性疼痛症、焦虑症和包括精神分裂症的其他神经精神障碍)中直接调节神经递质受体和通路的尝试令人失望。其中注意到的问题包括(1)当前用于靶向神经元回路功能障碍的药物可能会触发反馈分子作用,从而导致或加重神经精神症状和障碍;(2)这些药物还可能干扰同一神经递质通路内的非功能障碍神经元回路;(3)现有药物的非选择性作用导致对神经系统以外的组织产生影响,导致额外的副作用;(4)目前的药物可能会以改善症状的方式改变功能障碍回路的功能,但不会作用于功能障碍的主要原因;(5)患者在停用目前使用的药物后可能会出现戒断反应;以及(6)患者在停用目前使用的药物后实际上可能会出现症状恶化。

[0027] 此外,如上所述,虽然存在针对个体症状(例如抑郁症的孤立症状)的治疗,但认为此类治疗(例如,用于对症治疗的化合物和/或组合物)被认为对治疗诸如MDD的疾病没有用。例如,虽然某些对抑郁症的孤立症状有积极作用的药物已被证明具有良好的安全性、耐受性和药代动力学特征(参见Bernstein G,Davis K,Mills C,Wang L,McDonnell M,Oldenhof J,et al.Characterization of the safety and pharmacokinetic profile of D-methadone,a novel N-methyl-D-aspartate receptor antagonist in healthy,opioid-naive subjects:results of two phase 1 studies.J Clin Psychopharmacol.2019;39:226-37),没有关于此类药物对MDD或任何神经精神障碍的疗效的教导或建议,也没有关于在没有认知副作用的情况下对MDD的疗效的教导或建议。

[0028] 尽管进一步的研究表明,在抑郁样行为的动物模型中,像右美沙酮这样的药物通过mTORC1介导的mPFC中类似于氯胺酮的突触可塑性诱导快速的抗抑郁作用(参见例如Fogaça MV,Fukumoto K,Franklin T,et al.N-Methyl-D-aspartate receptor antagonist d-methadone produces rapid,mTORC1-dependent antidepressant effects.Neuropsychopharmacology.2019;44(13):2230-2238),这些发现仅限于解释在小鼠模型中实验诱导的抑郁样行为。但这从未被视为可转化为像MDD这样的神经精神障碍,因为这些抑郁样行为的小鼠模型被用来确定化学物质发挥行为改善的潜力,这可能转化为人类的抗抑郁作用。并且这仅表明药物对抑郁症的孤立症状有用(如上所述,它与MDD的临床障碍是分开的,并且治疗不被视为可在两者之间转化)。

[0029] 然而,本发明的方面减少和/或消除当前治疗MDD和其他这种障碍的问题。一般而

言,本发明的首要方面提供针对MDD和其他症状的疾病改善治疗。如本文所用,“疾病改善”治疗或具有“疾病改善”潜力的治疗包括具有通过补救其发病机制而有利地改变疾病进程的潜力的药物治疗。因此,疾病改善治疗具有潜在的治愈作用。相比之下,对症治疗通常只是缓和剂——它们缓解状况,但不能直接解决疾病的分子原因。

[0030] 在本文中,在讨论由本发明人开发的新型疾病改善治疗时,可以使用术语“疾病”和“障碍”。一般来说,“疾病”具有明确的(或更好定义的)病理生理学,而在“障碍”中,对病理生理学的解释不足或缺乏。MDD(和本文讨论的其他障碍)由本领域技术人员定义为“一种障碍”或“多种障碍”,因为缺乏对病理生理学的明确解释。然而,本发明人的工作(本文公开)首次阐明了MDD的病理生理学(一般而言-通过NMDAR(例如,含有GluN2C和GluN2D亚基的强直性活跃NMDAR)的过量 Ca^{2+} 流入神经元中,这些神经元是某些回路(例如,内啡肽回路)的一部分,并且这种过度流入直接损害形成神经元连接(例如,“健康”的情绪记忆可以代替病理性情绪记忆)所必需的神经可塑性(例如,突触蛋白的产生,诸如GluN1亚基和其他NMDAR亚基)。随着本发明人对这种病理生理学的阐明,尽管在本申请中提出的实施例,但是MDD(和其他具有相似病理生理学的障碍)现在可以被认为是一种疾病而不是一种障碍。并且因此,在讨论这些疾病时,术语“疾病”和“障碍”在本文中可以互换使用。

[0031] 因此,本发明的一个方面涉及一种治疗神经精神障碍的方法,该方法包括向患有神经精神障碍的受试者施用组合物,其中所述组合物包含治疗该障碍的物质(以表现出疾病改善效果的方式)。在这方面,所述物质可以选自右美沙酮、右美沙酮代谢物、d-美沙多、d- α -乙酰美沙多、d- α -去甲美沙多、l- α -去甲美沙多及其药学上可接受的盐。待治疗的神经精神障碍可以选自(但不限于)重度抑郁症、持续性抑郁症、破坏性情绪失调障碍、经前焦虑症、产后抑郁症、双相障碍、轻躁狂和躁狂症、广泛性焦虑障碍、社交焦虑障碍、躯体性症状障碍、丧亲抑郁症、调整性抑郁症、创伤后应激障碍、强迫症、慢性疼痛障碍、物质使用障碍和膀胱过度活动症。

[0032] 本发明的另一方面涉及一种治疗神经精神障碍的方法,该方法包括(1)诊断患有神经精神障碍的个体,(2)制定治疗个体的神经精神障碍的过程,和(3)作为治疗个体神经精神障碍的所述过程的至少一部分,向个体施用物质。在这方面,所述物质可以选自右美沙酮、右美沙酮代谢物、d-美沙多、d- α -乙酰美沙多、d- α -去甲美沙多、l- α -去甲美沙多及其药学上可接受的盐。待治疗的神经精神障碍可以选自(但不限于)重度抑郁症、持续性抑郁症、破坏性情绪失调障碍、经前焦虑症、产后抑郁症、双相障碍、轻躁狂和躁狂症、广泛性焦虑障碍、社交焦虑障碍、躯体性症状障碍、丧亲抑郁症、调整性抑郁症、创伤后应激障碍、强迫症、慢性疼痛障碍、物质使用障碍和膀胱过度活动症。

[0033] 本发明的这个方面的一个实施方案可以包括一种治疗MDD的方法,包括(1)诊断患有MDD的个体,(2)制定治疗个体MDD的过程,和(3)作为治疗个体的MDD的过程的至少一部分,向所述个体施用右美沙酮。

[0034] 本发明的另一方面涉及一种治疗神经精神障碍的方法,该方法包括诱导受试者中NMDAR亚基、AMPA亚基或其他突触蛋白的合成和膜表达,这些蛋白有助于神经元可塑性和组装的NMDAR通道。在这方面,受试者患有神经精神障碍(此类神经精神障碍的示例包括重度抑郁症、持续性抑郁症、破坏性情绪失调障碍、经前焦虑症、产后抑郁症、双相障碍、轻躁狂和躁狂症、广泛性焦虑障碍、社交焦虑障碍、躯体性症状障碍、丧亲抑郁症、调整性抑郁

症、创伤后应激障碍、强迫症、慢性疼痛障碍、物质使用障碍和膀胱过度活动症)。在本发明的这个方面,诱导有助于神经元可塑性的NMDAR亚基、AMPA亚基或其他突触蛋白的合成是通过向受试者施用选自d-美沙酮、d-美沙酮代谢物、d-美沙多、d- α -乙酰美沙多、d- α -去甲美沙多、l- α -去甲美沙多及其药学上可接受的盐的物质来完成的。

[0035] 本发明的另一方面涉及治疗以离子通道功能障碍为特征的疾病或障碍的方法,该方法包括(1)诊断患有以离子通道功能障碍为特征的疾病或障碍的个体,(2)制定治疗个体的疾病或障碍的过程,其中治疗疾病或障碍的过程涉及离子通道功能障碍的消除,以及(3)作为消除离子通道功能障碍的进程的一部分,向个体施用物质。所使用的物质可以选自右美沙酮、右美沙酮代谢物、d-美沙多、d- α -乙酰美沙多、d- α -去甲美沙多、l- α -去甲美沙多及其药学上可接受的盐。

[0036] 本发明的另一方面涉及一种用于将障碍诊断为由病理性过度活跃的NMDAR通道引起、恶化或维持的障碍的方法。该方面的方法包括将组合物施用于已被诊断患有至少一种病理生理学不明确的障碍的受试者,所述障碍选自神经障碍、神经精神障碍、眼科障碍、耳科障碍、代谢障碍、骨质疏松症、泌尿生殖系统障碍、肾功能不全、不孕症、卵巢功能早衰、肝脏病症、免疫性疾病、肿瘤疾病、心血管疾病。该组合物包含选自右美沙酮、右美沙酮代谢物、d-美沙多、d- α -乙酰美沙多、d- α -去甲美沙多、l- α -去甲美沙多及其药学上可接受的盐的物质。然后通过施用组合物之前和之后测量每种障碍的特异性终点来确定所述组合物在至少一种障碍中的有效性,如果受试者表现出特定终点的改善,则诊断受试者患有由病理性过度活跃的NMDAR通道引起、恶化或维持的障碍。由于所述终点对于特定障碍可能是特异性的,因此在施用组合物后终点的测量允许人们确定要诊断的特定障碍。

[0037] 基于上述确定,通过某些脑细胞内的NMDAR,可以诊断出由过量 Ca^{2+} 内流引起的疾病。所述障碍可以选自神经障碍、神经精神障碍、眼科障碍、耳科障碍、代谢障碍、骨质疏松症、泌尿生殖系统障碍(包括膀胱过度活动症)、肾损伤、不育症、卵巢功能早衰、肝脏病症、免疫性疾病、肿瘤疾病、心血管疾病(包括心律失常、心力衰竭和心绞痛)、炎症性疾病、以及由病理性过度活跃的NMDAR引发、维持或恶化的其他疾病和障碍。

[0038] 为支持本发明的这些和其他方面,本发明人现在首次公开右美沙酮对MDD(并因此可能对其他神经精神障碍和TRD)具有快速、稳健、持续和具有较大效应值的统计学显著的疗效,并且在MDD-有效剂量下没有认知副作用。证明这一点的讨论和数据显示在下面的实施例中(特别是在实施例3中),并且只有本申请实施例中的数据才能得出右美沙酮可以对诸如MDD的神经精神障碍具有疾病改善效果的结论。本发明人还确定,右美沙酮诱导这种持续的治疗反应,没有副作用,也没有戒断或反弹的证据,表明了以前未识别的特定疾病改善效果机制。

[0039] 关于本发明人的这一新发现和公开,即右美沙酮对诊断为MDD和/或TRD的患者具有快速、稳健、持续和统计学显著的疗效以及效果大:如将更详细地描述下面,发明人公开了一项双盲、安慰剂对照、前瞻性、随机的临床试验,临床试验表明,在先前抗抑郁治疗失败的患者中,右美沙酮可以诱导超过30%的疾病缓解,相比之下,随机接受安慰剂的患者缓解率为5%(疾病缓解定义为MADRS评分为10分或更低;MADRS评分量表不仅测量抑郁情绪,还提供动力、集中注意力的认知能力、睡眠、食欲、社交能力和自杀风险的测量)。此外,这种缓解发生在治疗的第一周内,早在第二天就看到了改善,到第四天就达到了统计学意义。值得

注意的是,在停止治疗后缓解持续了至少一周,并且对某些患者来说可能更长。不存在戒断或甚至反弹迹象或症状,如实施例3中描述的使用特别量表准确测量的那样。

[0040] 作为一般规则(如上所述),对症药物对慢性疾病的效果将迅速降低或停药后突然停止(尤其是突然停用后);对症药物突然停用甚至可能导致出现戒断症状和迹象的现象,甚至症状加重(即与治疗前基线相比症状恶化)。与此相反,本发明人现在发现,在治疗周期完成后,右美沙酮的改善持续存在,这首次表明右美沙酮的疾病改善效果。右美沙酮在MDD患者中引起的缓解在停止治疗后持续存在这一事实表明右美沙酮的作用并非纯粹是对症的,即右美沙酮不会简单地提升患者的情绪,这种作用会在停药停止(例如,使用阿片类药物或酒精,甚至使用所有目前批准的标准抗抑郁治疗将会发生)。因此,这种疾病的持续缓解表明右美沙酮具有以前未被认识到的疾病改善效果机制(例如,对调节神经可塑性的主要作用,在停止治疗后仍然存在),而不仅仅是对症治疗。

[0041] 本发明人的这一发现创造了本发明涉及使用右旋美沙酮治疗MDD以及其他神经精神障碍(与对症治疗相反)的疾病改善治疗的方面。如上所述,孤立状况的治疗不一定会影响神经精神障碍的进程。对于神经精神障碍,遗传+环境范式(G+E)变得越来越复杂。迄今为止,已有超过100种独立的遗传变异与患MDD的风险增加有关(Howard DM等,2019)。其中一些变异可能包括离子通道中的遗传异常,包括NMDAR。此外,已发现MDD和TRD与炎状态有关[Milenkovic VM, Stanton EH, Nothdurfter C, Rupprecht R, Wetzel CH, The Role of Chemokines in the Pathophysiology of Major Depressive Disorder, Int J Mol Sci. 2019; 20 (9) : 2283; Ho et al., 2017]。通过调节炎症,右美沙酮可以影响疾病的进程(即,表现出本发明人现在首次阐明的疾病/障碍改善效果)。

[0042] MDD与选定大脑区域的神经元损失和萎缩有关,包括内侧前额叶皮层(mPFC)和海马体(Kempton等人,2011),并且与改变的神经元回路有关(Korgaonkar等人,2019)。此外,MDD与心血管风险、癌症和肥胖症的增加有关(Howard等人,2019年)。这些相关和/或关联的疾病、全身炎症的实验室指标以及上述提到的大脑结构变化(神经元萎缩和细胞凋亡)的影像学提示,不太可能通过纯粹的对症治疗得到改善。所有上述情况,包括相关疾病、免疫异常和结构性CNS缺陷(无论是在可逆的神经元回路故障水平还是在不可逆的神经元凋亡水平)都可以改为通过如右美沙酮的疾病改善治疗来改善或治愈,正如下面实施例中显示的数据(特别是实施例3中显示和讨论的数据)强烈表明的那样。

[0043] 此外,对于多种不同的内源性神经递质/受体系统,一个神经递质系统(或甚至少量神经递质系统)的操纵可以调节功能障碍的回路的功能,并且正如假设的那样,这种调节可能会改善目前临床使用的一些药物的目标症状。然而,该药物不太可能作用于该回路功能障碍的主要原因(例如,NMDAR过度活跃),因此不太可能恢复生理细胞和回路功能。换句话说,尽管周围的神经递质水平发生变化,但触发和维持该障碍的功能障碍细胞将继续功能障碍(这是由于神经递质水平升高引发的生物反馈机制;并且因此,这些对症治疗虽然最初看起来很有帮助,但最终可能会使它们本应改善的疾病或障碍恶化)。如上所述,氟西汀和归类为用于MDD的SSRI的其他药物是此类用于5-羟色胺/5-HT受体系统的神经递质通路调节药物的示例。在临床试验中,它们通常表现出较弱的效应值和延迟且通常不完全和/或不持续的疗效(此外,在停用SSRI后,患者可能会出现戒断症状,就像大多数直接影响神经递质浓度和由这些神经递质调节通路的药物一样)。因此,如前所述,这些当前的治疗方法

并没有表现出疾病改善效果。然而,迄今为止,本领域技术人员继续使用此类药物,因为尚未发现或公开更有效的治疗方法。

[0044] 然而,基于本文公开的新数据,本发明人现在能够公开右美沙酮作为辅助治疗或作为单一疗法的潜在疗效。在这方面,本发明人公开了右美沙酮对患有MDD并且同时进行抗抑郁治疗的患者的作用非常强,这表明右美沙酮不仅对与MDD相关的CNS异常而且对可能与MDD治疗相关的CNS异常具有潜在的治疗作用。换句话说,右美沙酮对具有病理性过度活跃的NMDAR的选定神经元中过度 Ca^{2+} 内流的下调可能会在有或没有同时进行神经药理学治疗的情况下发生,并且可能发生在NMDAR过度活跃是原发于或继发于各种触发因素的障碍或疾病中,包括用抗抑郁药物治疗。

[0045] 鉴于以下实施例中呈现的本发明人的研究结果,本发明人公开了右美沙酮可用作接受抗抑郁治疗(并且对这些治疗反应不足)的患者的MDD的疾病改善治疗,并且还公开了右美沙酮对过量 Ca^{2+} 内流的选择性调节作用可能对尚未接受可能潜在地改变CNS神经递质路径的治疗的患者有用(右美沙酮作为最初的疾病改善治疗剂,即,右美沙酮单药治疗神经精神障碍)。此外,发明人公开了右美沙酮和行为心理治疗可以成功地联合治疗MDD和相关障碍:例如,某些患者可能只有在过度NMDAR活性下调后才能接受心理治疗(即,在具有过多 Ca^{2+} 内流的病理性开放NMDAR通道下调后)。

[0046] 本发明人揭示了右美沙酮疗法作为NMDAR离子通道调节剂的全部潜力,这代表了对包括MDD在内的多种神经精神疾病和障碍的分子理解的范式转变,并且因此用于治疗多种障碍和疾病,将治疗性预防和诊断临床和研究设备从目前可用的对症神经精神药物扩展到针对分子病理生理学的疾病改善药物。作为选定的CNS回路(或额外的CNS组织)的一部分的细胞(神经元或其他细胞)中过量 Ca^{2+} 内流的下调将允许细胞恢复功能并自动调节神经递质合成量(和其他突触和突触外蛋白)及其膜表达(包括突触支架和结构)和/或释放(例如,NGF,包括BDNF)。

[0047] 当用于选定受体的神经递质或激动剂/拮抗剂药物(例如,多巴胺、GABA、阿片受体的药物激动剂)直接由药物调节时,这种精细调节实际上是不可能的。虽然直接靶向受体的药物可能对许多症状的急性治疗非常有效(例如,用于急性疼痛的阿片类药物、用于恐慌发作的苯二氮平类药物和用于精神病事件的多巴胺阻滞剂),并且它们的短期副作用已被充分理解和接受,但这些相同的药物效果较差,对其长期效果的了解较少且难以预测,并且因此它们的使用不仅不能治愈疾病,而且当治疗是慢性的时也是有害的。用阿片类药物长期治疗慢性疼痛,或用苯二氮平类药物长期治疗焦虑突出的慢性障碍(例如,GAD、PTSD、OCD),或用多巴胺阻滞剂长期治疗精神病的慢性病,通常会导致严重且有时是不可逆的副作用,包括原发性疾病恶化。发明人在此公开的关于右美沙酮的新数据,以及在此新揭示的右美沙酮的作用机制,允许更好地靶向治疗诸如MDD、MDD相关障碍、其他神经精神疾病,甚至额外的CNS疾病的障碍。

[0048] 参考附图和下面的详细描述,本申请的这些和其他优点对于本领域技术人员将是显而易见的。

附图说明

[0049] 并入本说明书并构成本说明书一部分的附图示出了本发明的实施方案,并且与上

文给出的本发明的一般描述和下文给出的实施方案的详细描述一起,用于解释本发明的原理。

[0050] 图1是示出在10 μ M甘氨酸存在下,细胞系GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D的L-谷氨酸CRC的图。数据报告为平均值 $\pm$ SEM,n=5。

[0051] 图2A是示出100nM L-谷氨酸对GluN2A的影响的图。

[0052] 图2B是示出100nM L-谷氨酸对GluN2B影响的图。

[0053] 图2C是示出100nM L-谷氨酸对GluN2C的影响的图。

[0054] 图2D是示出100nM L-谷氨酸对GluN2D的影响的图。

[0055] 图2E是示出100nM L-谷氨酸对GluN2C(具有低表达水平的细胞)的影响的图。

[0056] 图3A是示出右美沙酮对GluN1-GluN2A型受体中L-谷氨酸浓度响应曲线(CRC)的影响的图。

[0057] 图3B是示出右美沙酮对GluN1-GluN2B型受体中L-谷氨酸CRC的影响的图。

[0058] 图3C是示出右美沙酮对GluN1-GluN2C型受体中L-谷氨酸CRC的影响的图。

[0059] 图3D是示出右美沙酮对GluN1-GluN2D型受体中L-谷氨酸CRC的影响的图。

[0060] 图4A是示出美金刚对GluN1-GluN2A型受体中L-谷氨酸CRC的影响的图。

[0061] 图4B是示出美金刚对GluN1-GluN2B型受体中L-谷氨酸CRC的影响的图。

[0062] 图4C是示出美金刚对GluN1-GluN2C型受体中L-谷氨酸CRC的影响的图。

[0063] 图4D是示出美金刚对GluN1-GluN2D型受体中L-谷氨酸CRC的影响的图。

[0064] 图5A是示出(±)-氯胺酮对GluN1-GluN2A型受体中L-谷氨酸CRC的影响的图。

[0065] 图5B是示出(±)-氯胺酮对GluN1-GluN2B型受体中L-谷氨酸CRC的影响的图。

[0066] 图5C是示出(±)-氯胺酮对GluN1-GluN2C型受体中L-谷氨酸CRC的影响的图。

[0067] 图5D是示出(±)-氯胺酮对GluN1-GluN2D型受体中L-谷氨酸CRC的影响的图。

[0068] 图6A是示出(±)-MK801对GluN1-GluN2A型受体中L-谷氨酸CRC的影响的图。

[0069] 图6B是示出(±)-MK801对GluN1-GluN2B型受体中L-谷氨酸CRC的影响的图。

[0070] 图6C是示出(±)-MK801对GluN1-GluN2C型受体中L-谷氨酸CRC的影响的图。

[0071] 图6D是示出(±)-MK801对GluN1-GluN2D型受体中L-谷氨酸CRC的影响的图。

[0072] 图7A是示出右美沙芬对GluN1-GluN2A型受体中L-谷氨酸CRC的影响的图。

[0073] 图7B是示出右美沙芬对GluN1-GluN2B型受体中L-谷氨酸CRC的影响的图。

[0074] 图7C是示出右美沙芬对GluN1-GluN2C型受体中L-谷氨酸CRC的影响的图。

[0075] 图7D是示出右美沙芬对GluN1-GluN2D型受体中L-谷氨酸CRC的影响的图。

[0076] 图8A是示出右美沙酮对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的4.6nM L-谷氨酸的%效果的图。

[0077] 图8B是示出右美沙酮对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的14nM L-谷氨酸的%效果的图。

[0078] 图8C是示出右美沙酮对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的41nM L-谷氨酸的%效果的图。

[0079] 图8D是示出右美沙酮对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的123nM L-谷氨酸的%效果的图。

[0080] 图8E是示出右美沙酮对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的370nM

L-谷氨酸的%效果的图。

[0081] 图8F是示出右美沙酮对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的1.1μM L-谷氨酸的%效果的图。

[0082] 图8G是示出右美沙酮对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的3.3μM L-谷氨酸的%效果的图。

[0083] 图8H是示出右美沙酮对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的10μM L-谷氨酸的%效果的图。

[0084] 图8I是示出右美沙酮对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的100μM L-谷氨酸的%效果的图。

[0085] 图8J是示出右美沙酮对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的1mM L-谷氨酸的%效果的图。

[0086] 图9A是示出(±)-氯胺酮对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的4.6nM L-谷氨酸的%效果的图。

[0087] 图9B是示出(±)-氯胺酮对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的14nM L-谷氨酸的%效果的图。

[0088] 图9C是示出(±)-氯胺酮对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的41nM L-谷氨酸的%效果的图。

[0089] 图9D是示出(±)-氯胺酮对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的123nM L-谷氨酸的%效果的图。

[0090] 图9E是示出(±)-氯胺酮对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的370nM L-谷氨酸的%效果的图。

[0091] 图9F是示出(±)-氯胺酮对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的1.1μM L-谷氨酸的%效果的图。

[0092] 图9G是示出(±)-氯胺酮对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的3.3μM L-谷氨酸的%效果的图。

[0093] 图9H是示出(±)-氯胺酮对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的10μM L-谷氨酸的%效果的图。

[0094] 图9I是示出(±)-氯胺酮对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的100μM L-谷氨酸的%效果的图。

[0095] 图9J是示出(±)-氯胺酮对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的1mM L-谷氨酸的%效果的图。

[0096] 图10A是示出美金刚对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的14nM L-谷氨酸的%效果的图。

[0097] 图10B是示出美金刚对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的41nM L-谷氨酸的%效果的图。

[0098] 图10C是示出美金刚对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的123nM L-谷氨酸的%效果的图。

[0099] 图10D是示出美金刚对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的370nM L-谷氨酸的%效果的图。

[0100] 图10E是示出美金刚对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的1.1 μ M L-谷氨酸的%效果的图。

[0101] 图10F是示出美金刚对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的3.3 μ M L-谷氨酸的%效果的图。

[0102] 图10G是示出美金刚对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的10 μ M L-谷氨酸的%效果的图。

[0103] 图10H是示出美金刚对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的100 μ M L-谷氨酸的%效果的图。

[0104] 图10I是示出美金刚对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的1mM L-谷氨酸的%效果的图。

[0105] 图11A是示出右美沙芬对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的4.6nM L-谷氨酸的%效果的图。

[0106] 图11B是示出右美沙芬对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的14nM L-谷氨酸的%效果的图。

[0107] 图11C是示出右美沙芬对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的41nM L-谷氨酸的%效果的图。

[0108] 图11D是示出右美沙芬对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的123nM L-谷氨酸的%效果的图。

[0109] 图11E是示出右美沙芬对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的370nM L-谷氨酸的%效果的图。

[0110] 图11F是示出右美沙芬对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的1.1 μ M L-谷氨酸的%效果的图。

[0111] 图11G是示出右美沙芬对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的3.3 μ M L-谷氨酸的%效果的图。

[0112] 图11H是示出右美沙芬对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的10 μ M L-谷氨酸的%效果的图。

[0113] 图11I是示出右美沙芬对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的100 μ M L-谷氨酸的%效果的图。

[0114] 图11J是示出右美沙芬对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的1mM L-谷氨酸的%效果的图。

[0115] 图12A是示出(±)-MK801对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的4.6nM L-谷氨酸的%效果的图。

[0116] 图12B是示出(±)-MK801对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的14nM L-谷氨酸的%效果的图。

[0117] 图12C是示出(±)-MK801对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的41nM L-谷氨酸的%效果的图。

[0118] 图12D是示出(±)-MK801对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的123nM L-谷氨酸的%效果的图。

[0119] 图12E是示出(±)-MK801对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的

370nM L-谷氨酸的%效果的图。

[0120] 图12F是示出(±)-MK801对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的1.1μM L-谷氨酸的%效果的图。

[0121] 图12G是示出(±)-MK801对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的3.3μM L-谷氨酸的%效果的图。

[0122] 图12H是示出(±)-MK801对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的10μM L-谷氨酸的%效果的图。

[0123] 图12I是示出(±)-MK801对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的100μM L-谷氨酸的%效果的图。

[0124] 图12J是示出(±)-MK801对用于GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D受体亚型的1mM L-谷氨酸的%效果的图。

[0125] 图13A是示出NMDAR1亚基在ARPE-19细胞中表达的照片。

[0126] 图13B是示出NMDAR2A亚基在ARPE-19细胞中表达的照片。

[0127] 图13C是示出NMDAR2B亚基在ARPE-19细胞中表达的照片。

[0128] 图14是示出在用单独的NMDAR激动剂L-谷氨酸(10mM L-Glu)或与右美沙酮联合处理后ARPE-19细胞的细胞活力的图。与用载体处理的对照细胞相比,***P<0.001(单向方差分析,然后是Tukey的事后检验)。

[0129] 图15A是示出NMDAR1亚基的蛋白质表达的图(对照=未处理的细胞;急性=24小时处理;慢性=6天处理)。数据表示为平均值±SEM。

[0130] 图15B是示出NMDAR2A亚基的蛋白质表达的图(对照=未处理的细胞;急性=24小时处理;慢性=6天处理)。数据表示为平均值±SEM。

[0131] 图15C是示出NMDAR2B亚基的蛋白质表达的图(对照=未处理的细胞;急性=24小时处理;慢性=6天处理)。数据表示为平均值±SEM。

[0132] 图16是示出在各种谷氨酸浓度下NR1亚基的假设值的图表。

[0133] 图17是示出MDD患者中两剂右美沙酮的2期研究中患者的筛选和给药方案的示意图。

[0134] 图18是治疗中出现的不良事件表-全面汇总安全人群。

[0135] 图19A和19B组合提供了按系统器官类别和首选项(preferred term)安全人群划分的治疗中出现的不良事件表。

[0136] 图20是按系统器官类别和首选项安全人群划分的特别关注的不良事件(AESI)表。

[0137] 图21是临床医生管理的分离状态量表评分的表格。

[0138] 图22是示出在第1天按剂量水平(25mg和50mg)划分的右美沙酮血浆浓度的图。

[0139] 图23是示出按剂量水平(25mg和50mg)划分的右美沙酮的血浆谷浓度水平的图。

[0140] 图24是示出从第4天到第14天,与安慰剂相比,2期研究的治疗组中的MADRS评分达到统计学显著差异的图表。

[0141] 图25是示出症状缓解者百分比的图表,MADRS<10分。

[0142] 图26是示出MADRS从基线降低>50%的响应者百分比的图表。

[0143] 图27A是示出10μM庆大霉素对用于表达含有GluN1和GluN2A的二异聚重组人NMDAR的细胞系的0.04μM L-谷氨酸的影响的图。

[0144] 图27B是示出10 μ M庆大霉素对用于表达含有GluN1和GluN2B的二异聚重组人NMDAR的细胞系的0.04 μ M L-谷氨酸的影响的图。

[0145] 图27C是示出10 μ M庆大霉素对用于表达含有GluN1和GluN2C的二异聚重组人NMDAR的细胞系的0.04 μ M L-谷氨酸的影响的图。

[0146] 图27D是示出10 μ M庆大霉素对用于表达含有GluN1和GluN2D的二异聚重组人NMDAR的细胞系的0.04 μ M L-谷氨酸的影响的图。

[0147] 图28A是示出10 μ M庆大霉素对用于表达含有GluN1和GluN2A的二异聚重组人NMDAR的细胞系的0.2 μ M L-谷氨酸的影响的图。

[0148] 图28B是示出10 μ M庆大霉素对用于表达含有GluN1和GluN2B的二异聚重组人NMDAR的细胞系的0.2 μ M L-谷氨酸的影响的图。

[0149] 图28C是示出10 μ M庆大霉素对用于表达含有GluN1和GluN2C的二异聚重组人NMDAR的细胞系的0.2 μ M L-谷氨酸的影响的图。

[0150] 图28D是示出10 μ M庆大霉素对用于表达含有GluN1和GluN2D的二异聚重组人NMDAR的细胞系的0.2 μ M L-谷氨酸的影响的图。

[0151] 图29A是示出10 μ M庆大霉素对用于表达含有GluN1和GluN2A的二异聚重组人NMDAR的细胞系的10 μ M L-谷氨酸的影响的图。

[0152] 图29B是示出10 μ M庆大霉素对用于表达含有GluN1和GluN2B的二异聚重组人NMDAR的细胞系的10 μ M L-谷氨酸的影响的图。

[0153] 图29C是示出10 μ M庆大霉素对用于表达含有GluN1和GluN2C的二异聚重组人NMDAR的细胞系的10 μ M L-谷氨酸的影响的图。

[0154] 图29D是示出10 μ M庆大霉素对用于表达含有GluN1和GluN2D的二异聚重组人NMDAR的细胞系的10 μ M L-谷氨酸的影响的图。

[0155] 图30是显示四种NMDA受体亚型 (GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D) 中每一种的喹啉酸CRC曲线的图。

[0156] 图31是示出四种NMDA受体亚型 (GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D) 中每一种的庆大霉素CRC曲线的图。

[0157] 图32A是示出在10 μ M甘氨酸存在下,使用GluN2A,100 μ M-1000 μ M喹啉酸和添加10 μ M右美沙酮的喹啉酸的效果的图。

[0158] 图32B是示出在10 μ M甘氨酸存在下,使用GluN2B,100 μ M-1000 μ M喹啉酸和添加10 μ M右美沙酮的喹啉酸的效果的图。

[0159] 图32C是示出在10 μ M甘氨酸存在下,使用GluN2C,100 μ M-1000 μ M喹啉酸和添加10 μ M右美沙酮的喹啉酸的效果的图。

[0160] 图32D是示出在10 μ M甘氨酸存在下,使用GluN2D,100 μ M-1000 μ M喹啉酸和添加10 μ M右美沙酮的喹啉酸的效果的图。

[0161] 图33A是示出在10 μ M甘氨酸存在下,使用GluN2A,40nM L-谷氨酸和添加100 μ M喹啉酸和/或10 μ M右美沙酮的L-谷氨酸的效果的图。

[0162] 图33B是示出在10 μ M甘氨酸存在下,使用GluN2B,40nM L-谷氨酸和添加100 μ M喹啉酸和/或10 μ M右美沙酮的L-谷氨酸的效果的图。

[0163] 图33C是示出在10 μ M甘氨酸存在下,使用GluN2C,40nM L-谷氨酸和添加100 μ M喹啉

酸和/或10 μ M右美沙酮的L-谷氨酸的效果的图。

[0164] 图33D示出在10 μ M甘氨酸存在下,使用GluN2D,40nM L-谷氨酸和添加100 μ M喹啉酸和/或10 μ M右美沙酮的L-谷氨酸的效果的图。

[0165] 图34A是示出在10 μ M甘氨酸存在下,使用GluN2A,40nM L-谷氨酸和添加1000 μ M喹啉酸和/或10 μ M右美沙酮的L-谷氨酸的效果的图。

[0166] 图34B是示出在10 μ M甘氨酸存在下,使用GluN2B,40nM L-谷氨酸和添加1000 μ M喹啉酸和/或10 μ M右美沙酮的L-谷氨酸的效果的图。

[0167] 图34C是示出在10 μ M甘氨酸存在下,使用GluN2C,40nM L-谷氨酸和添加1000 μ M喹啉酸和/或10 μ M右美沙酮的L-谷氨酸的效果的图。

[0168] 图34D是示出在10 μ M甘氨酸存在下,使用GluN2D,40nM L-谷氨酸和添加1000 μ M喹啉酸和/或10 μ M右美沙酮的L-谷氨酸的效果的图。

[0169] 图35A是示出在10 μ M甘氨酸存在下,使用GluN2A,200nM L-谷氨酸和添加100 μ M喹啉酸和/或10 μ M右美沙酮的L-谷氨酸的效果的图。

[0170] 图35B是示出在10 μ M甘氨酸存在下,使用GluN2B,200nM L-谷氨酸和添加100 μ M喹啉酸和/或10 μ M右美沙酮的L-谷氨酸的效果的图。

[0171] 图35C是示出在10 μ M甘氨酸存在下,使用GluN2C,200nM L-谷氨酸和添加100 μ M喹啉酸和/或10 μ M右美沙酮的L-谷氨酸的效果的图。

[0172] 图35D是示出在10 μ M甘氨酸存在下,使用GluN2D,200nM L-谷氨酸和添加100 μ M喹啉酸和/或10 μ M右美沙酮的L-谷氨酸的效果的图。

[0173] 图36A是示出在10 μ M甘氨酸存在下,使用GluN2A,200nM L-谷氨酸和添加1000 μ M喹啉酸和/或10 μ M右美沙酮的L-谷氨酸的效果的图。

[0174] 图36B是示出在10 μ M甘氨酸存在下,使用GluN2B,200nM L-谷氨酸和添加1000 μ M喹啉酸和/或10 μ M右美沙酮的L-谷氨酸的效果的图。

[0175] 图36C是示出在10 μ M甘氨酸存在下,使用GluN2C,200nM L-谷氨酸和添加1000 μ M喹啉酸和/或10 μ M右美沙酮的L-谷氨酸的效果的图。

[0176] 图36D是示出在10 μ M甘氨酸存在下,使用GluN2D,200nM L-谷氨酸和添加1000 μ M喹啉酸和/或10 μ M右美沙酮的L-谷氨酸的效果的图。

[0177] 图37A是示出在10 μ M甘氨酸存在下,使用GluN2A,1000 μ M喹啉酸和添加10g/ml庆大霉素和/或10 μ M右美沙酮的喹啉酸效果的图。

[0178] 图37B是示出在10 μ M甘氨酸存在下,使用GluN2B,1000 μ M喹啉酸和添加10g/ml庆大霉素和/或10 μ M右美沙酮的喹啉酸效果的图。

[0179] 图37C是示出在10 μ M甘氨酸存在下,使用GluN2C,1000 μ M喹啉酸和添加10g/ml庆大霉素和/或10 μ M右美沙酮的喹啉酸效果的图。

[0180] 图37D是示出在10 μ M甘氨酸存在下,使用GluN2D,1000 μ M喹啉酸和添加10g/ml庆大霉素和/或10 μ M右美沙酮的喹啉酸效果的图。

[0181] 图38A-H是MDARS CFB的散点图,其中图38A-D是用安慰剂或25mg右美沙酮(REL-1017)治疗的患者在第7天和第14天的MDARS CFB散点图(横条表示中值);以及图38E-H是用安慰剂或50mg右美沙酮(REL-1017)治疗的患者在第7天和第14天的MDARS CFB散点图(横条表示中值)。

[0182] 图39是示出测试项目应用方案图的图表。

[0183] 图40是示出测试项目对通过hGluN1/hGluN2C NMDAR的L-谷氨酸/甘氨酸引发的电流的影响的图。

[0184] 图41示出了在hGluN1/hGluN2C-CHO细胞中记录的样品电流,示出了在不存在或存在10 μ M右美沙酮(左)或1 μ M(±)-氯胺酮(右)的情况下,添加了10/10 μ M L-谷氨酸/甘氨酸的两种不同细胞记录的代表性电流迹线。

[0185] 图42包括示出10 μ M右美沙酮处理的细胞(左)或1 μ M(±)-氯胺酮处理的细胞(右)的测试项目起效和偏移动力学实验(offset kinetic experiment)的样本迹线的图表。

[0186] 图43是示出测试项目起效动力学实验的总结的图表,其中迹线表示对于10 μ M右美沙酮(中线;灰色阴影)、10 μ M(±)-氯胺酮(底线;黑色阴影)和1 μ M(±)-氯胺酮(顶线;浅灰色阴影)记录的%电流,而内部黑线是相对拟合。

[0187] 图44是示出实施例6第I部分的10 μ M右美沙酮(左栏)和1 μ M(±)-氯胺酮(右栏)实验的tau-on比较的图表。

[0188] 图45是示出测试项目偏移动力学实验的总结的图,其中迹线表示对于10 μ M右美沙酮(灰色阴影)、1 μ M(±)-氯胺酮(黑色阴影)和10 μ M(±)-氯胺酮(浅灰色阴影)记录的%电流,而内部黑线是相对拟合。

[0189] 图46是示出10 μ M右美沙酮(左栏)和1 μ M(±)-氯胺酮(右栏)实验的tau-off比较的图。

[0190] 图47是证明细胞内右美沙酮不改变10/10 μ M L-谷氨酸/甘氨酸诱导电流的图。

[0191] 图48是证明细胞内右美沙酮不增加细胞外右美沙酮电流阻断的图。

[0192] 图49是示出测试项应用方案图的图表。

[0193] 图50是示出测试项目样品迹线在捕获测定中的影响的图表。

[0194] 图51A-51C是示出由10 μ M右美沙酮(51A-C中的左列)或1 μ M(±)-氯胺酮(51A-C中的右列)产生的阻断(block)(图51A)、残留阻断(图51B)和捕获阻断(图51C)的图表。值报告为平均值 $\pm$ sem(对于右美沙酮,n=13,对于(±)-氯胺酮,n=11)。进行了非配对t检验。

[0195] 图52A-52C是示出在通过标准饮食、西方饮食、和西方饮食+d-美沙酮的大鼠肝脏进行qRT-PCR测量的与炎症有关的细胞因子[IL-6(图52A)、IL-10(图52B)和CCL2(图52C)]的基因表达的图。 $**p<0.01$ 、 $***p<0.001$ 和 $****p<0.0001$;单向方差分析,然后是Tukey的事后检验。

[0196] 图53A-53C是通过石蜡包埋的肝切片的苏木精-伊红染色对肝组织进行组织学分析的照片,证明用标准饮食喂养的大鼠表现出正常的肝脏结构(图53A),而在用西方饮食喂养的大鼠中观察到导致肝脏脂肪变性的具有典型气球样膨胀的脂质堆积(图53B,箭头),但在用d-美沙酮治疗的大鼠中可以观察到脂肪变性的减少(图53C)。放大10倍的照片。

[0197] 图54A-54B是通过qRT-PCR显示参与脂质代谢的两个基因[GPAT4(图54A)和SREPB2(图54B)]的表达的图,并且证明西方饮食管理显著增加了GPAT4和SREPB2的基因表达,而d-美沙酮治疗能够导致它们的表达显著下降。 $*p<0.05$ 、 $**p<0.01$ 、 $***p<0.001$ 和 $****p<0.0001$;单向方差分析,然后是Tukey的事后检验。

具体实施方式

[0198] 下面将描述本发明的一个或多个具体实施方案。为了提供对这些实施方案的简明描述,在说明书中可能不会描述实际实施的所有特征。应该理解,在任何此类实际实施的开发中,就像在任何工程或设计项目中一样,必须做出许多特定于实施的决策以实现开发人员的特定目标,例如遵守与系统相关和业务相关的约束,这可能因一种实施方式和另一种实施方式而异。此外,应当理解,这样的开发工作可能是复杂和耗时的,但对于受益于本公开的普通技术人员来说,这将是设计、制造和制作的常规设计任务。

[0199] 如本文所用,术语右美沙酮、艾美沙酮(esmethadone)、REL-1017、S-美沙酮、d-美沙酮、和(+)-美沙酮定义相同的化学分子并且可以互换。

[0200] 如本文所用,“疾病改善”治疗或具有“疾病改善”潜力的治疗包括具有通过补救其致病分子机制有利地改变疾病进程的潜力的药物治疗。因此,疾病改善治疗具有潜在的治愈作用。相反,对症治疗通常只是缓和剂,它们可以缓解症状,但不能解决疾病的分子原因。

[0201] 在右美沙酮和MDD的情况下,本发明人假设,至少对于一部分患者,MDD是由某些CNS细胞(例如,神经元或星形胶质细胞,是内啡肽通路的一部分)中的通过NMDAR的过量 Ca^{2+} 内流引起的。这些CNS细胞中这种过量的 Ca^{2+} 内流会激活细胞内下游信号,其损害各种突触蛋白的产生。这些突触蛋白的不可用性会阻碍神经元连接的形成(例如,形成情绪记忆所必需的神经元连接)并导致患有MDD的人出现抑郁表型。这种过量的 Ca^{2+} 内进优先通过在静息膜电位期间包含NR2c和NR2D亚基的NMDAR通道(含有GluN2c和GluN2D亚基的强直性和病理性过度活跃的NMDAR)。

[0202] 如发明人所公开的,右美沙酮携带正电荷,使其在其电压依赖性NMDAR通道阻断中类似于 Mg^{2+} ,将其自身插入NMDAR的孔中并且类似于 Mg^{2+} ,并下调过量的 Ca^{2+} 内流。将先前过量的 Ca^{2+} 内流减少到生理量会激活下游信号传递,其产生足够数量的突触蛋白,用于在选定的大脑回路中构建新的“健康”情绪记忆。因此,MDD通过治疗性分子机制得到缓解,而不是如先前对大多数对抑郁症的孤立症状有影响的药物所假设的那样,通过简单地直接作用于例如阿片受体或甚至5-羟色胺受体来缓解症状。

[0203] 因此,右美沙酮对于MDD和相关障碍,例如,由选定的CNS细胞群(包括选定回路的细胞部分)中的过量 Ca^{2+} 引起的障碍具有潜在的治疗作用,从而改善疾病。在MDD的情况下,发明人公开了内啡肽回路是相关的,并且右美沙酮的阿片类药物亲和力可以将分子导向结构上与内啡肽回路的神经元部分所表达的NMDAR(双受体,异质受体)相关的阿片类药物受体。本发明人公开的这种与阿片类药物受体的结合不会导致本领域普通技术人员迄今为止认为的典型的阿片类药物效应。这种在MDD有效剂量下缺乏典型的阿片类药物效应,是以前未知的,这与这些阿片类药物受体与NMDAR的结构关联有关,如下面的实施例中详述。

[0204] 如本文所用,“记忆”包括认知记忆、情绪记忆、社交记忆和运动记忆。术语“记忆”、“学习”、“(LTP)+(LTD)”、“神经可塑性”(“树突棘增大”+“树突棘生成”+“突触强化”+“轴突生长”+突触修剪)和“连接组”在这里可以互换使用。个体性和自我意识是记忆的形式。MDD和相关障碍可以看作是病理性情绪记忆的表现。

[0205] 如本文所用,“突触结构”可以包括存在于神经元突触处的所有元素,包括所有受体,包括兴奋性和抑制性受体,包括离子型和代谢型受体。包括突触前神经元中的突触小泡。并包括突触后密集区中的所有元素。并且包括突触间隙分子,包括粘附蛋白。

[0206] 如本文所用,“NMDAR框架(“framework”)”可以包括谷氨酸能系统的所有元素,包括NMDAR亚型相对和绝对密度,以及位置。它包括突触“热点”的框架(谷氨酸接受细胞的膜上的直径为100-200纳米的区域,最接近谷氨酸释放细胞的谷氨酸释放区域)。NMDAR亚型可以包括NR1-2A-D二异聚体和三异聚体,包括NR1-NR2A-D(例如,NR1-2A-2B)和三异聚体NR1-2A-D-3A-B(例如,NR1-2D-3A或NR1-NR3A-NR2C)和二异聚体NR1-NR3A-B。NMDAR膜位置可以包括突触(突触前和突触后)、突触周围、突触外和非神经元膜上,例如在星形胶质细胞或额外的CNS细胞群上。位置可以指大脑内的特定区域和/或特定的神经元回路,包括微回路,和/或特定的受体系统(例如,内啡肽系统)。在一些方面,NMDAR框架旨在包括其他谷氨酸受体(例如,AMPA和红藻氨酸受体以及代谢型NMDAR)。

[0207] 如本文所用,“正变构调节剂(PAM)”和“负变构调节剂(NAM)”是指内源性和外源性离子和分子(包括内源性和外源性毒素、肽、类固醇(包括激素)以及药物,和物理和化学刺激,其能够影响离子通道的开放,尤其是NMDAR的开放和关闭。庆大霉素包括在NMDAR的变构调节剂中。PAM和NAM在邻近结合时可能是非竞争性的,但在激动剂位点则是竞争性的。或者,当在远离激动剂位点的位点结合时,它们可能是非竞争性的,如右美沙酮和本文所述的其他通道孔阻滞剂的情况。

[0208] 如本文所用,“激动剂物质”是指内源性和能够通过NMDAR的激动剂位点(包括NMDA位点)结合来影响离子通道的开放,包括NMDAR的开放和关闭的外源分子。这种分子包括毒素和药物,以及诸如喹啉酸的内源性物质。

[0209] 如本文所用,“表观遗传密码”是指用于表观遗传指令的密码(其中一些可以通过Cam-CaMKII、CREB和m-ToR通路介导),其由通过NMDAR精确调节的 Ca^{2+} 内流的不同模式表示,进而调节细胞选择翻译、合成、蛋白质组装和分化、迁移和神经元可塑性,包括神经元连接组的不断重塑,包括NMDAR框架本身的调节(调节器的调节,以实时恒定的自我-学习范式)。这种表观遗传密码由精确且不断变化的(随后的刺激决定了不同的 Ca^{2+} 内流模式)通过NMDAR的 Ca^{2+} 内流的量组成,由具有NMDAR和NMDAR框架的所有物种共享。 Ca^{2+} 内流的这些不同模式调节并反过来受NMDAR框架的调节。密码(即 Ca^{2+} 内流的不同模式)在具有相同NMDAR亚基GluN1、GluN2A-D和GluN3A-B以及相关亚型和潜在亚型的物种内共享。GluN3A-B亚基可以通过不允许谷氨酸结合和通过形成对 Ca^{2+} 不可渗透或相对不可渗透的NMDAR亚型来充当LTP的制动器。当作为突触结构的一部分时,这些亚型充当 Ca^{2+} 内流的下调剂。因此,细胞(神经元和非神经元细胞)活性受跨不同离子通道的净 Ca^{2+} 内流调节,特别是包括NMDAR通道。

[0210] NMDAR介导的 Ca^{2+} 进入激活下游信号传递通路,例如:

[0211] (1) Cam-CaMKII-GIT1- β PIX-RAC1-PAK1(肌动蛋白重塑通路),

[0212] (2) RAS-MEK-ERK1-2-CREB(环状AMP反应元件结合蛋白(CREB)介导的转录基因表达途径),

[0213] (3) PI3K-AKT-REHB-mTOR[雷帕霉素(mTOR)依赖的可塑性相关蛋白(PRP)的mRNA翻译的机制性靶标],以及

[0214] (4) PRP通路。这些通路中的一种或多种的激活,以及其他下游效应,介导突触调节,包括突触维持和树突棘增大和记忆巩固。

[0215] 如上所述,虽然先前已经描述了对孤立的精神症状(例如,抑郁症的孤立精神症状)的治疗,但是到目前为止还没有针对神经精神障碍(例如MDD和相关障碍)的有效的疾病

改善治疗。疾病改善治疗需要一种或多种药物,这些药物超出了对一种或多种精神症状的对症治疗。本发明人现在已经解决了背景技术中描述的问题。在这方面,发明人现在公开右美沙酮出乎意料地在患有MDD的患者中诱导快速、强效和持续的潜在治愈性治疗效果。此外,这些效果是在没有认知副作用的剂量下实现的。这标志着一种以前未被认识的特定疾病调节作用机制,而不是精神症状的对症治疗。

[0216] 因此,本发明的一些方面减少和/或消除当前治疗MDD和其他此类障碍的问题。一般而言,本发明的首要方面提供针对MDD和其他障碍的疾病改善治疗。如本文所用,“疾病改善”治疗或具有“疾病改善”潜力的治疗包括具有通过补救其发病机制而有利地改变疾病进程的潜力的药物治疗。因此,疾病改善治疗具有潜在的治愈作用。相比之下,对症治疗通常只是缓和剂-它们可以缓解症状,但不能解决疾病的分子原因。

[0217] 因此,本发明的一个方面涉及一种治疗神经精神障碍的方法,该方法包括向患有神经精神障碍的受试者施用组合物,其中该组合物包括选自d-美沙酮、d-美沙酮代谢物、d-美沙多、d- α -乙酰美沙多、d- α -去甲美沙多、l- α -去甲美沙多及其药学上可接受的盐。神经精神障碍可以选自(但不限于)重度抑郁症、持续性抑郁症、破坏性情绪失调障碍、经前焦虑症、产后抑郁症、双相障碍、轻躁狂和躁狂症、广泛性焦虑障碍、社交焦虑障碍、躯体性症状障碍、丧亲抑郁症、调整性抑郁症、创伤后应激障碍、强迫症、慢性疼痛障碍、物质使用障碍和膀胱过度活动症)。

[0218] 本发明的另一方面涉及一种治疗神经精神障碍的方法,该方法包括(1)诊断患有神经精神障碍的个体,(2)制定治疗个体的神经精神障碍的过程,和(3)作为治疗个体神经精神障碍的所述过程的至少一部分,向个体施用物质。在这方面,所述物质可以选自右美沙酮、右美沙酮代谢物、d-美沙多、d- α -乙酰美沙多、d- α -去甲美沙多、l- α -去甲美沙多及其药学上可接受的盐。待治疗的神经精神障碍可以选自(但不限于)重度抑郁症、持续性抑郁症、破坏性情绪失调障碍、经前焦虑症、产后抑郁症、双相障碍、轻躁狂和躁狂症、广泛性焦虑障碍、社交焦虑障碍、躯体性症状障碍、丧亲抑郁症、调整性抑郁症、创伤后应激障碍、强迫症、慢性疼痛障碍、物质使用障碍和膀胱过度活动症。

[0219] 本发明的这一方面的一个实施方案可以包括一种治疗MDD的方法,包括(1)诊断患有MDD的个体,(2)制定治疗个体的MDD的过程,和(3)作为治疗个体的MDD的过程的至少一部分,向个体施用右美沙酮。

[0220] 本发明的另一方面涉及一种治疗神经精神障碍的方法,该方法包括诱导受试者中NMDAR亚基、AMPA亚基或其他突触蛋白的合成这些蛋白有助于神经元可塑性,和组装及表达的NMDAR通道。在这方面,受试者患有神经精神障碍(此类神经精神障碍的示例包括重度抑郁症、持续性抑郁症、破坏性情绪失调障碍、经前焦虑症、产后抑郁症、双相障碍、轻躁狂和躁狂症、广泛性焦虑障碍、社交焦虑障碍、躯体性症状障碍、丧亲抑郁症、调整性抑郁症、创伤后应激障碍、强迫症、慢性疼痛障碍、物质使用障碍和膀胱过度活动症)。在本发明的这个方面,诱导有助于神经元可塑性的NMDAR亚基、AMPA亚基或其他突触蛋白的合成是通过向受试者施用选自d-美沙酮、d-美沙酮代谢物、d-美沙多、d- α -乙酰美沙多、d- α -去甲美沙多、l- α -去甲美沙多及其药学上可接受的盐的物质来完成的。

[0221] 本发明的另一方面涉及治疗以离子通道功能障碍为特征的疾病或障碍的方法,该方法包括(1)诊断患有以离子通道功能障碍为特征的疾病或障碍的个体,(2)制定治疗个体

的疾病或障碍的过程,其中治疗疾病或障碍的过程涉及离子通道功能障碍的消除,和(3)作为消除离子通道功能障碍的进程的一部分,向个体施用物质。所使用的物质可以选自右美沙酮、右美沙酮代谢物、d-美沙多、d- α -乙酰美沙多、d- α -去甲美沙多、l- α -去甲美沙多及其药学上可接受的盐。在某些实施方案中,离子通道是一个或多个NMDAR的组成部分。在某些实施方案中,离子通道是包含GluN2C亚基的NMDAR的组成部分。在某些实施方案中,离子通道是包含GluN2D亚基的NMDAR的组成部分。在某些实施方案中,离子通道是包含GluN2B亚基的NMDAR的组成部分。在某些实施方案中,离子通道是包含GluN2A亚基的NMDAR的组成部分。在某些实施方案中,离子通道是包含GluN3A亚基的NMDAR的组成部分。

[0222] 本发明的另一方面涉及一种用于将障碍诊断为由病理性过度活跃的NMDAR通道引起、恶化或维持的障碍的方法。该方面的方法包括将组合物施用于已被诊断患有至少一种病理生理学不明确的障碍的受试者,所述障碍选自神经障碍、神经精神障碍、眼科障碍、耳科障碍、代谢障碍、骨质疏松症、泌尿生殖系统障碍、肾功能不全、不孕症、卵巢功能早衰、肝脏病症、免疫性疾病、肿瘤疾病、心血管疾病。该组合物包括选自右美沙酮、右美沙酮代谢物、d-美沙多、d- α -乙酰美沙多、d- α -去甲美沙多、l- α -去甲美沙多及其药学上可接受的盐的物质。然后通过施用组合物之前和之后测量每种障碍的特异性终点来确定组合物在至少一种障碍中的有效性,如果受试者表现出特定终点的改善,则诊断受试者患有由病理性过度活跃的NMDAR通道引起、恶化或维持的障碍。由于终点对于特定障碍可能是特异性的,因此在施用组合物后终点的测量允许人们确定要诊断的特定障碍。

[0223] 在某些实施方案中,基于上述本发明的方面,该物质是用于治疗所述神经精神障碍的组合物中的唯一活性剂。

[0224] 在某些实施方案中,基于上述本发明的方面,该物质从其对应异构体中分离或从头合成。

[0225] 在某些实施方案中,基于上述本发明的方面,组合物的施用发生在所述物质有效结合受试者的NMDA受体并通过改变所述神经精神障碍的进程和严重程度而使受试者缓解的条件下。在一些实施方案中,所述缓解选自所述神经精神障碍的治愈、所述神经精神障碍的预防、所述神经精神障碍的严重性降低和所述神经精神障碍的持续时间减少。

[0226] 在某些实施方案中,基于上述本发明的方面,组合物的施用作为单一疗法进行。

[0227] 在某些实施方案中,基于上述本发明的方面,组合物的施用作为第二物质的辅助治疗的一部分发生。

[0228] 在某些实施方案中,基于上述本发明的方面,组合物的施用发生在对离子通道、神经递质系统、神经递质通路、或选自离子型谷氨酸受体、5-HT_{2A}受体、5-HT_{2C}受体、阿片类药物受体的受体、AChR、SERT、NET、 σ 1受体、K通道、Na通道和Ca通道的作用有效的条件下。在某些实施方案中,受体是阿片类药物受体并且选自MOR、KOR和DOR。在其他实施方案中,组合物的施用发生在对离子型谷氨酸受体的作用有效的条件下,并且其中离子型谷氨酸受体是NMDAR。在其他实施方案中,对离子型谷氨酸受体的作用包括对由细胞膜表达的NMDARs的电压依赖性通道阻断。在其他实施方案中,对离子型谷氨酸受体的作用包括对由细胞膜表达的NMDAR的电压依赖性通道阻断,对含有NR2C和NR2D亚基的NMDAR具有优先作用。并且,在其他实施方案中,对离子型谷氨酸受体的作用包括诱导NMDAR亚基或有助于神经元可塑性和有助于所述突触蛋白的膜表达的其他突触蛋白的合成。

[0229] 在某些实施方案中,基于上述本发明的方面,受试者是脊椎动物。并且,在某些实施方案中,脊椎动物是人。

[0230] 在某些实施方案中,基于上述本发明的方面,所述物质是右美沙酮。在某些实施方案中,右美沙酮是药学上可接受的盐的形式。在某些实施方案中,右美沙酮以0.1mg至5000mg的总日剂量递送。

[0231] 在某些实施方案中,基于上述本发明的方面,组合物的施用改变受试者中所述神经精神障碍的进程和严重程度,并且其中所述缓解开始于选自首次施用所述物质后两周或更短时间、首次施用所述物质后7天或更短时间、首次施用所述物质后4天或更短时间,以及首次施用所述物质后2天或更短时间。

[0232] 在某些实施方案中,基于上述本发明的方面,由施用组合物产生的右美沙酮治疗效果在2期临床试验中达到大于或等于0.3的效应值,或在2期临床试验中达到大于或等于0.5的效应值,或在2期临床试验中大于或等于0.7的效应值。在某些实施方案中,治疗效果在停止治疗后持续至少一周。在一些实施方案中,停止治疗后治疗效果的持续时间等于或大于所述治疗的持续时间。

[0233] 在某些实施方案中,基于以上列举的本发明的方面,组合物的施用是除了向受试者施用一种或多种抗抑郁药物之外或与向受试者施用一种或多种抗抑郁药物组合发生的。

[0234] 在某些实施方案中,基于以上列举的本发明的方面,组合物的施用是除了向受试者施用镁、锌或锂中的一种或多种之外或与向受试者施用镁、锌或锂中的一种或多种组合发生的。

[0235] 在某些实施方案中,基于上述本发明的方面,受试者具有等于或小于35的体重指数。

[0236] 在某些实施方案中,基于上述本发明的方面,施用组合物用于改善认知功能、改善社交功能、改善睡眠、改善性功能、提高工作执行能力或提高社交活动的动力。

[0237] 在某些实施方案中,基于上述本发明的方面,组合物的施用是口服、含服、舌下、直肠、阴道、鼻腔、通过气溶胶、透皮、肠道外、静脉内、皮下、硬膜外、鞘内、耳内、眼内或局部地实施。

[0238] 在某些实施方案中,基于上述本发明的方面,组合物的施用以每天0.01-1000mg的剂量进行。

[0239] 在某些实施方案中,基于上述本发明的方面,组合物的施用以每天25mg的剂量进行。在某些实施方案中,基于上述本发明的方面,组合物的施用以每天50mg的剂量进行。

[0240] 在某些实施方案中,基于上述本发明的方面,组合物的施用包括施用负荷剂量的组合物,然后施用每日剂量的组合物。

[0241] 在某些实施方案中,基于上述本发明的方面,组合物的负荷剂量包括物质的量,该物质的量大于组合物的每个日剂量中存在的物质的量。

[0242] 在某些实施方案中,基于上述本发明的方面,在施用组合物的第一天达到处于或高于稳态的血浆水平。在某些实施方案中,在施用组合物的4小时内达到处于或高于稳态的血浆水平。

[0243] 在某些实施方案中,基于上述本发明的方面,在施用组合物后,受试者中物质的总血浆水平在5ng/ml至3000ng/ml的范围内。

[0244] 在某些实施方案中,基于上述本发明的方面,在施用组合物后,受试者中物质的未结合水平为0.5nM至1500nM。

[0245] 在某些实施方案中,基于上述本发明的方面,在施用组合物后,受试者中物质的未结合水平在0.1nM至1500nM的范围内。

[0246] 在某些实施方案中,基于上述本发明的方面,组合物的施用作为间歇治疗方案进行,该方案选自每隔一天、每三天一次、每周一次、每隔一周、每隔两周、一个月一周、每隔一个月、每隔两个月、每隔三个月、每年一周、每年一个月。

[0247] 在某些实施方案中,基于上述本发明的方面,组合物的施用与所选择的间歇治疗方案中的安慰剂交替。

[0248] 在某些实施方案中,基于上述本发明的方面,代替安慰剂或除了安慰剂之外,该方法包括镁、锌或锂中的一种或多种。

[0249] 在某些实施方案中,本发明的方面可以进一步与数字应用程序相关联以监测障碍的进程,包括对症状和体征以及功能和残疾结果的数字监测。

[0250] 此外,发明人还在本申请中首次公开了右美沙酮降低NAFLD和潜在的NASH并调节“西方饮食”大鼠中的炎症标志物(如下面实施例11所示)。发明人还在本申请中首次公开了右美沙酮具有调节患者中与MDD和TRD相关的生物标志物的潜力(如下文实施例7所示)。

[0251] 关于发明人发现(本文公开的)右美沙酮对诊断为MDD和/或TRD的患者具有快速、稳健、持续和具有大效应值的统计学显著的功效:如下文将更详细地描述,发明人公开了一项双盲、安慰剂对照、前瞻性、随机临床试验,该试验表明,在治疗的第一周内,右美沙酮可诱导超过30%的患者疾病缓解(定义为MADRS评分为10或更低),而随机分配至安慰剂的患者缓解率为5%。值得注意的是,停止治疗后缓解持续至少一周,一些患者的缓解时间更长。MADRS评定量表不仅可以测量抑郁情绪,还可以测量动力、集中注意力的认知能力、睡眠、食欲、社交能力和自杀风险。

[0252] 作为一般规则(如上所述),对症药物在停药后(尤其是突然停用后,如发明人公开的临床试验的情况)对慢性病的作用趋于迅速降低或突然停止;对症药物的突然停用甚至可能导致症状加重(与治疗前基线相比症状恶化)以及戒断症状的现象。与此相反,本发明人现在已经发现,由疾病改善治疗(例如本文公开的那些)产生的改善倾向于在治疗周期完成后持续存在。右美沙酮在患有MDD的患者中引起的缓解在停止治疗后持续存在这一事实表明,右美沙酮的作用并非纯粹是对症的(即,右美沙酮不会简单地提升患者的情绪,这种作用会在停药后停止,如在使用阿片类药物或酒精治疗MDD时可能发生的情况)。因此,这种疾病缓解的持续性表明右美沙酮具有以前未被认识到的疾病改善效果机制(例如,在停止治疗后持续存在的神经可塑性调节),而不是单纯的对症治疗(如先前所认为的)。

[0253] 此外,发明人公开了解释右美沙酮的这些疾病改善效果的新分子机制。这些机制在下面的实施例1-11中有更详细的描述。

[0254] 本发明人已经描述了NMDAR亚型的差异阻断,其包含两个不同的亚基:2A和2B。本发明人现在已经确定(1)差异NMDAR阻断延伸到所有测试的NMDAR亚型(亚型A、B、C和D),和特别是亚型C和D,和(2)该阻断是取决于谷氨酸的浓度,即使在谷氨酸浓度非常低的情况下也有活性(突触区域中的谷氨酸浓度受几个变量的影响,包括刺激的强度和时间;谷氨酸清除率等)。即使是非常低浓度的谷氨酸也可能产生下游后果,特别是如果长时间存在于细胞

外空间(补剂(tonic)环境谷氨酸)。发明人在这方面的工作在下面的实施例1中进行了详述。

[0255] 实施例1还公开了在所有具有已知NMDAR阻断活性的测试化合物(测试组分包括FDA批准的其他NMDAR通道阻滞剂和实验药物,诸如MK-801)中,右美沙酮具有最低的效力和最少的亚型。优选地,本发明人认为可以解释其有效性而没有副作用的特征。此外,本发明人注意到临床使用中的所有测试化合物都偏爱GluN2C,但MK-801(一种更高亲和力的NMDAR阻滞剂,由于其严重的认知副作用而没有临床用途)除外。选定的NMDAR非竞争性通道阻滞剂共享的这种GluN2C偏好,以及以前未公开的右美沙酮,现在提供了对Ca²⁺内流的不同模式的下游影响以及这类新药物在病理状态下的潜在治疗效果的理解。

[0256] 实施例2(下文)证明右美沙酮在ARPE-19视网膜色素细胞中诱导GluN1 mRNA,并且还公开了右美沙酮诱导形成NMDAR(包括GluN1,其对于NMDAR的膜表达是必需的)的选定蛋白质亚基的合成和表达。此外,现在(由本发明人)显示右美沙酮也影响GluN2C和2D mRNA的转录以及相关蛋白质、亚基2C和2D的合成。

[0257] 实施例2中详述的本发明人的工作现在还证明右美沙酮差异性地调节NMDAR亚基的合成(例如,它调节GluN2A亚基的合成而不是GluN2B亚基的合成)。在实施例2中的测试细胞系(ARPE-19)中表现出的这种选择性不仅表明右美沙酮的调节作用(并且因此表明右美沙酮调节的Ca²⁺内流的不同模式的调节作用),而且表明亚基选择性对形成NMDAR的蛋白质合成的影响。本发明人的这些发现揭示了生理和病理记忆形成基础的新方面,包括其与MDD(和具有类似病理生理基础的其他疾病)的关系。

[0258] 在这方面,NMDAR已被认为是脊椎动物记忆形成的中心和必需的,并且四种不同的亚型(GluN2A-D)已存在于所有脊椎动物物种中超过5亿年。这强调了扩大NMDAR亚型分化所提供的编码能力的进化重要性(微调形成表观遗传密码的不同Ca²⁺内流模式)。右美沙酮的NMDAR阻断作用和由此产生的Ca²⁺内流下调导致ARPE-19细胞中蛋白质转录和合成的调节(1)包括NMDAR蛋白,并且(2)对NMDAR亚型具有选择性,例如GluN1和GluN2A亚基与GluN2B亚基相比,并且因此对NMDAR亚型组装和在该细胞系中的表达具有选择性(如实施例2中所述)。这些机制导致诱导合成新NMDAR选择亚基(以及新NMDAR选择亚型的组装和表达),并表明右美沙酮可能具有突触调节/增强效果(例如,突触后NMDAR的调节)。

[0259] 发明人公开的这些新发现的机制(由本发明人公开)与在人类受试者中BDNF产生的影响是分开的,并且是除了在人类受试者中BDNF产生的影响(BDNF具有退化突触前强化和神经突生长作用)之外[De Martin S,Vitolo O,Bernstein G,Alimonti A,Traversa S,Inturrisi CE,Manfredi PL,The NMDAR Antagonist Dextromethadone Increases Plasma BDNF Levels in Healthy Volunteers Undergoing a 14-Day In-Patient Phase 1 Study,ACNP 57th Annual Meeting:Poster Session II.ACNP 57th Annual Meeting:Poster Session II.Neuropsychopharmacol.43,228-382(2018)]。虽然该研究可能显示右美沙酮在健康志愿者中提高了BDNF血浆水平,但受试者没有诊断出MDD,因此没有教导或建议使用右美沙酮治疗MDD。事实上,MDD患者的BDNF增强并未显示出与右美沙酮一致存在,因此诸如DeMartin的研究的教导从未应用于MDD(如背景中所述,使用右美沙酮的治疗已仅限于治疗独立的症状,而且这种治疗从未被视为可转化为神经精神障碍,如MDD)。然而,实施例2的公开内容(右美沙酮对突触后NMDAR的调节,通过诱导选定的NMDAR亚基的合成来

揭示)为右美沙酮诱导的BDNF神经可塑性提供了一种补充机制,并为BDNF的神经元转录、产生和释放的机制增加了新的理解水平。

[0260] 在实施例3中,发明人还公开了右美沙酮在MDD患者中的2a期试验的意外结果。本发明人的工作所揭示的突触强化的分子机制(并在整个实施例中进行了描述)可能解释了右美沙酮对患有MDD的患者的意想不到的疾病改善效果,并支持了在此应用中使用右美沙酮作为MDD和相关障碍(包括TRD)以及多种神经精神障碍和其他障碍的疾病改善治疗的新披露。

[0261] 本文对右美沙酮先前未知的分子效应和作用机制的公开另外表明其对多种神经精神、代谢和心血管疾病和障碍的潜在功效。本发明人现在能够公开(在某些患者亚群中)疾病和障碍是通过病理性过度活跃的NMDAR引起过量的 Ca^{2+} 内流触发或维持的。在本文公开的本发明人的工作之前,本领域普通技术人员认为,右美沙酮的主要作用方式是阻断NMDAR的膜内结构域的PCP位点处的过度活跃的NMDAR通道,并且右美沙酮的受体占据仅用于对独立的心理症状(如独立的疼痛、成瘾、抑郁和焦虑症状)的对症治疗。然而,实施例1-11中概述的发明人的工作和发现表明,右美沙酮可以治疗(作为疾病改善剂)多种疾病和障碍,包括MDD和相关障碍、睡眠障碍、焦虑症、和认知障碍,远远超出受体占据(因为持续的神经可塑性效应),因此,不仅仅是以前认为的对症药剂。

[0262] 正如现在所公开的,右美沙酮通过调节新的和功能性NMDAR的产生和膜表达来发挥其疾病改善治疗效果,从而潜在地重新平衡特定细胞的功能(例如,突触强度的产生,从而产生记忆)并重新确立它们在回路和组织中的作用(例如,连接性)。GluN1亚基对于受体表达是必不可少的。因此,右美沙酮不仅可以调节病理性过度活跃的NMDAR,还可以诱导新的功能性NMDAR的合成和表达,其然后允许作为特定回路一部分的特定神经元细胞的正常功能(即突触的突触前和突触后强化,以及记忆形成,包括情绪记忆的形成和调节)。右旋美沙酮和其他可能的NMDAR阻滞剂不仅通过阻断NMDAR的孔通道来改变 Ca^{2+} 进入模式(一种可能解释对症效应的作用),而且改变细胞膜上的NMDAR表达(一种由本发明人公开的新的作用机制,解释了其出乎意料的疾病改善的稳健、快速、持续的效果,由以下实施例3中特别说明的临床研究结果证明)。

[0263] 如上所述,发明人示出(在实施例2中)右美沙酮不仅诱导GluN1的mRNA,而且调节GluN1蛋白亚基和其他GluN2A蛋白亚基的产生。本发明人还发现,这些作用在暴露于低浓度右美沙酮一周的细胞中更为明显(与实施例3的临床方案相匹配,其中患者用相对低的药物剂量治疗一周)。尽管不受任何理论的束缚,但本发明人认为,在暴露于过度刺激(通过高浓度谷氨酸或例如通过过度光照)的ARPE-19细胞膜上表达的NMDAR会病理性地(即过度)开放,并且过量的 Ca^{2+} 内流导致细胞活性关闭(参见图16和实施例2),包括用于产生突触蛋白的基因关闭,包括NMDAR亚基的产生,并且包括NMDAR1和NMDAR2A-D的差异调节。

[0264] 当因过度刺激和/或 Ca^{2+} 内流而受损的细胞暴露于右美沙酮时,过量的 Ca^{2+} 进入被下调并且突触蛋白的产生恢复。在ARPE-19细胞的情况下,NMDAR1亚基(NMDAR的膜表达所必需)和例如GluN2A亚基(但不是GluN2B亚基)被诱导。这种选择性可能不是偶然的,但可能与ARPE-19细胞系在暴露于给定量的刺激(例如光)时的功能/特化有关。当将刺激应用于具有不同功能和不同的NMDAR膜表达结构的不同细胞系,以及不同回路或不同组织的一部分,甚至在应用不同刺激时(不同的谷氨酸浓度或不同的曝光强度或质量:不同的实验设置)在同

一细胞系中,NMDAR亚基的这种选择性调节会有所不同。

[0265] 除上述之外,本发明人(在实施例5中)在本文中还证明了右美沙酮在暴露于庆大霉素的细胞中下调 Ca^{2+} 内流,本发明人在本文中显示庆大霉素是NMDAR的正向变构调节剂(PAM)。庆大霉素对耳科毛细胞有毒,这些细胞将声音转化为电化学信号。为此,实施例5描述了右美沙酮的潜在疾病改善效果,不仅发生在当过量 Ca^{2+} 内流引起的兴奋性毒性是由过量的突触前谷氨酸释放引起时(例如,在长期的心理压力期间),而且发生当过量 Ca^{2+} 内流是由有毒的PAM引起的,谷氨酸浓度非常低(甚至生理浓度)时。

[0266] 有毒的PAM可以是多种不同化学实体中的一种,并且可以通过两种主要机制起作用:(1)增加对谷氨酸(aPAM)的最大响应和/或(2)将谷氨酸的ED50向左移动(bPAM)。在实施例5中,庆大霉素似乎作为aPAM通过机制(1)作用于GluN2B,并且作为bPAM通过机制(2)作用于GluN2A、GluN2C和GluN2D。由于所公开的右美沙酮的作用机制,含有NMDAR亚型的GluNC和GluND亚基的bPAM机制与本公开内容相关。如实施例1(对GluN1-GluN2C的偏好和GluN2D亚型的活性),以及实施例2、5和6所表明的,右美沙酮可以通过强直性 Ca^{2+} 可渗透GluN1-GluN2C和GluN1-GluN2D亚型(以及含有GluN3亚基的亚型)优先(选择性地)阻断 Ca^{2+} 内流。

[0267] 右美沙酮,由于其对NMDAR的强直性和病理性过度活跃的GluN1-GluN2C(和GluN1-GluN2D亚型和可能含有GluN3亚基的亚型)的选择性作用机制(阻断过度向内的 Ca^{2+} 电流),因此,无论原因如何(过量的谷氨酸或多种分子中的任何一种,作用于激动剂位点或作为PAM,包括外源性和内源性化学物质,包括抗体),本发明人现在确定对于由病理性和强直性过量 Ca^{2+} 可渗透的NMDAR触发或维持的多种疾病具有潜在的预防、治疗和/或诊断作用。在MDD的情况下,NMDAR激动剂(诸如喹啉酸)也可以通过不同的机制增加细胞外谷氨酸[Guillemin GJ,Quinolinic acid:neurotoxicity,FEBSJ.2012;279(8):1355],从而进一步过度激活NMDAR。如实施例5所示,右旋美沙酮还抵消了喹啉酸的附加神经毒性作用。因此,实施例1和2的结果,以及NMDARPAM庆大霉素和实施例5的激动剂喹啉酸的结果,以及MDD患者的2期结果显示实施例3中详述的快速、稳健和持续的功效,以及实施例6-11中详述的结果和公开内容,强烈表明右美沙酮对患有MDD和以NMDAR过度活跃为特征的其他疾病的患者的疾病改善效果。因此,MDD相关障碍,例如PPD(Maes M,et al.Depressive and anxiety symptoms in the early puerperium are related to increased degradation of tryptophan into kynurenine,a phenomenon which is related to immune activation.Life Sci.2002;71:1837-1848)和炎症状态[Capuron L,et al.Interferon-alpha-induced changes in tryptophan metabolism:relationship to depression and paroxetine treatment,Biol.Psychiatry.2003,54:906-914;Raison CL,et al.CSF concentrations of brain tryptophan and kynurenines during immune stimulation with IFN-alpha:relationship to CNS immune responses and depression,Mol.Psychiatry.2010,15:393-403;Du J,Li XH,Li YJ.Glutamate in peripheral organs:Biology and pharmacology,Eur J Pharmacol.2016;784:42-48]也可能是右美沙酮治疗的候选对象。

[0268] 患有CNS障碍的患者,包括脑病,与血清和/或CSF中喹啉酸水平升高有关,如莱姆病患者[Halperin JJ,Heyes MP.Neuroactive kynurenines in Lyme borreliosis,Neurology.1992;42(1):43-50],使用右美沙酮可能会得到改善。此外,对感染的免疫反应,

导致下丘脑-垂体-肾上腺轴的改变(如本发明人的第一阶段MAD研究中右美沙酮的降低BP作用所表明的那样)和抑郁症都可能受到右美沙酮及其通过过度刺激的NMDAR(例如,通过喹啉酸)下调过量的 Ca^{2+} 内流的积极影响,例如,通过喹啉酸[Ramírez LA,Pérez-Padilla EA,García-Oscos F,Salgado H,Atzori M,Pineda JC.A new theory of depression based on the serotonin/kynurenine relationship and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis,Biomedica.2018;38(3):437-450.Published 2018 Sep 1]。在本发明人的1期MAD研究中,右美沙酮的降低BP作用也表明了下丘脑-垂体-肾上腺轴的调节。

[0269] 在正常(生理)脑活动期间,突触前神经元的刺激和去极化导致其轴突在突触间隙中释放谷氨酸,伴随着AMPA的开放(伴随 Na^{+} 内流、突触后去极化和NMDAR电压依赖性 Mg^{2+} 阻断的释放)并伴随着NMDAR开放和 Ca^{2+} 内流。 Ca^{2+} 内流,在生理量下,通过突触后水平的CaMKII激活促进神经可塑性[通过在细胞外空间合成和释放BDNF,在突触后细胞以及突触后和突触前水平诱导突触蛋白的合成和加强突触,BDNF具有突触增强和对神经炎的营养(树突棘产生和生长)和营养(生长方向)作用]。突触前细胞上NMDARs的直接激活也可能有助于突触前水平的神经可塑性(Berretta N,Jones RS.Tonic facilitation of glutamate release by presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptors in the entorhinal cortex.Neuroscience 1996;75:339-344),例如,通过调节谷氨酸储存。

[0270] 实施例1-11中显示的本发明人的实验结果表明,当通过NMDAR的 Ca^{2+} 内流过量时,细胞停止突触蛋白和神经营养因子的产生(可能发展为细胞凋亡的兴奋性毒性的第一步)。右美沙酮通过下调过量的 Ca^{2+} 内流恢复神经可塑性机制(突触蛋白和神经营养因子的产生,包括BDNF)。这潜在地防止细胞功能障碍和细胞凋亡的进展,从而对MDD[以及与MDD相关的障碍和潜在地对由通过NMDAR在CNS和额外CNS中的选定细胞群、组织、回路的选定细胞中过量 Ca^{2+} 内流引发、维持或恶化的多种疾病,这些疾病(Duetal.,2016)]表现出疾病改善治疗。

[0271] Ca^{2+} 对LTP机制的下游影响遵循倒U型曲线: Ca^{2+} 内流有利于LTP达到一定量的 Ca^{2+} 内流,然后,当 Ca^{2+} 内流过多时,细胞变得功能障碍(兴奋性毒性)并且LTP被抑制。如果这种过量的 Ca^{2+} 内流继续进行,则细胞可能会受到永久性损坏。当具有过度刺激的NMDAR(LTP因兴奋性毒性而中断)的神经元是多个功能回路或组织中的一个(或多个)的一部分时,可能会导致受损回路或组织特有的障碍和疾病。

[0272] 因此,实施例中呈现的右美沙酮的分子效应为实施例3中看到的关于MDD的结果提供了潜在机制:即,在实施例3中详述的2a期研究中看到的出乎意料的强烈积极(具有大效应值的高度统计学意义的p值)、快速(25mg剂量的第一个功效信号出乎意料地在第二天开始,并且在第4天对两种剂量--25mg和50mg--都具有统计学意义)和持续/长期/持久(1周疗程突然中断后,具有统计学意义的临床意义的治疗效果和大效应值持续至少一周)。这些神经可塑性效应-包括NMDAR介导的LTP-也可以解释与接受50mg剂量(具有相应较高的右美沙酮血浆浓度,约600nM)的患者相比,随机接受25mg剂量(具有相应较低的右美沙酮血浆浓度,约300nM)的患者出现了意想不到的更好疗效的信号(见实施例3)。右美沙酮的治疗效果可能遵循倒U形曲线,类似于对其他NMDAR开放通道阻滞剂(诸如氯胺酮)的描述。最后,虽然右美沙酮的安全窗可能很宽(实施例3),但至少对MDD而言,治疗窗可以调整为5至100mg和/或12.5至75mg之间的日剂量,以及50-900ng/ml之间的血浆浓度和/或5-90的游离水平(参

见实施例3)。当在对2a期研究结果的子分析中考虑BMI时,下面将详细介绍这一方面。

[0273] 从这些稳健的功效结果(包括停药后的持续功效),现在第一次明显看出右美沙酮不简单地改善独立的症状。相反,右美沙酮显示出对患有MDD、MDD相关障碍的患者以及可能患有其他神经精神和代谢障碍,以及可能与NMDAR过度激活(包括下丘脑-垂体轴障碍,诸如高血压,以及潜在的心血管和代谢障碍以及Du等人,2016年描述的其他障碍,通过引用并入本文)和选定细胞中过量的 Ca^{2+} 内流有关的其他障碍的患者发挥疾病/障碍改善效果的强烈信号。

[0274] 这些出人意料的强烈积极和持续的效果在MDD试验中是前所未有的,这些药物不会引起拟精神病的副作用。此外,如下文详述,右美沙酮的极端耐受性和安全性(在非常有效的25mg每日口服剂量下,不良事件概况与安慰剂相似)表明右美沙酮对病理性过度活跃通道(过度活跃的NMDAR)的活性是高度选择性的(选择保留生理工作通道)。因此,右美沙酮的功效可以潜在地扩展到由过度活跃的NMDAR引起的细胞/回路功能障碍触发或维持的多种疾病和障碍(例如,谷氨酸或其他激动剂或PAM对NMDAR的过度刺激)。

[0275] 因此,虽然右美沙酮已用于治疗独立的症状,例如疼痛和抑郁(发明人在美国专利第6,008,258号和美国专利第9,468,611号中公开),但本发明人现在首次确定它能够表现出改善疾病的效果,因此也可用作由生理神经可塑性停止和/或其他生理细胞功能停止引起、维持或恶化的多种疾病和障碍的疾病改善治疗,这些生理神经可塑性停止和/或其他生理细胞功能停止是由选定细胞、选定亚群、组织和/或回路的一部分中的过量 Ca^{2+} 内流引起的(这在以前没有被认识到)。

[0276] 当过度活跃的NMDAR在特定结构和功能回路的选定细胞部分的膜上的选定位点表达时,NMDAR允许过量的 Ca^{2+} 内流,导致选定细胞和细胞系以及群体和组织回路中的细胞功能障碍(也称为兴奋性毒性)。在神经系统(NS)中,CNS细胞(包括神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞和其他神经胶质细胞,包括小神经胶质细胞)的功能障碍取决于时空因素(NS内的发育年龄和位置)和NS细胞亚型,导致选择回路中的大脑连接改变。患者可能将这种回路损伤表现为综合征、障碍或疾病,例如多种神经精神障碍中的一种。

[0277] 此类综合征、障碍或疾病可包括MDD(列于DMS5和ICD11)或以下中的一种或多种:阿尔茨海默氏病;早老性痴呆;老年性痴呆;血管性痴呆;路易体痴呆;认知障碍[包括与衰老和慢性疾病及其治疗相关的轻度认知障碍(MCI)]、帕金森病和帕金森相关疾病,包括但不限于帕金森痴呆;与 β 淀粉样蛋白积累相关的障碍(包括但不限于脑血管或tau蛋白及其代谢物的破坏,包括但不限于额颞叶痴呆及其变体、额叶变体、原发性进行性失语症(语义性痴呆和进行性非流利性失语症),皮质基底节变性、核上性麻痹;癫痫;NS创伤;NS感染;NS炎症[包括自身免疫性疾病引起的炎症(如NMDAR脑炎)和毒素(包括微生物毒素、重金属、杀虫剂等)引起的细胞病理学];中风;多发性硬化症;亨廷顿病;线粒体疾病;脆性X综合征;安琪儿综合征;遗传性共济失调;神经耳科和眼球运动障碍;视网膜神经退行性疾病,如青光眼、糖尿病视网膜病和年龄相关性黄斑变性;肌萎缩侧索硬化症;迟发性运动障碍;多动障碍;注意力缺陷多动障碍(“ADHD”)和注意力缺陷障碍;不宁腿综合征;妥瑞氏症;精神分裂症;孤独症谱系障碍;结节性硬化症;雷特综合征;威利综合征;脑瘫;奖赏系统障碍,包括但不限于饮食失调[包括神经性厌食症(“AN”)、神经性贪食症(“BN”)和暴食症(“BED”)]、拔毛症;搔抓症(dermotillomania);咬指甲;物质和酒精滥用和依赖;偏头痛;纤维肌痛症;和任

何病因的周围神经病变。

[0278] 本发明人将诊断为患有DMS5和ICD11中列出的神经精神障碍的患者亚群,正如实实施例3中描述的MDD患者,视为患有由过度活跃的NMDARs触发和/或维持的障碍。具有实施例1-7中公开的分子作用和实施例3中呈现的临床效果(疗效和安全性)的药物,如右美沙酮,对于被诊断患有DMS5和ICD11中列出的神经精神障碍的选定患者可能是安全和有效的,包括NMDAR脑炎和其他影响NMDAR的免疫疾病和Du等人在2016年描述的疾病和障碍(Du等人描述的那些疾病和障碍通过引用并入本文)。

[0279] 因此,右美沙酮不仅可以用作预防和/或治疗药物,而且还可以用作安全和有效的诊断工具,用于选择被诊断患有DMS5和ICD11中列出的神经精神障碍的患者,这些患者可能患有通过过度活跃的NMDAR触发和/或维持的障碍。因此,本发明人还公开了右美沙酮不仅作为一种预防或治疗药物,而且作为一种诊断工具,用于诊断多种疾病和障碍中的NMDAR功能障碍,包括神经障碍、神经精神障碍、眼科障碍(包括视力障碍)、耳科障碍(包括听力障碍、平衡障碍、眩晕、耳鸣)、代谢障碍(包括葡萄糖耐量降低和糖尿病、包括NAFLD和NASH的肝脏疾病、骨质疏松症)、免疫学、肿瘤学和心血管疾病(包括CAD、CHF、HTN)和其他疾病和障碍,例如上面列出的以及Du等人在2016年描述的那些。通过本文公开的任何途径施用右旋美沙酮将有助于诊断由脊椎动物、哺乳动物和人类中过度活跃的NMDAR引发或维持的疾病和障碍。

[0280] 基于本文公开的新实验数据,本发明人还公开了右美沙酮可以选择性地靶向特定的病理性过度活跃的NMDAR(例如,强直性过度活跃的NMDAR的亚群,例如NR1-GluN2C和/或NR1-GluN2D亚型和/或含有3A和/或3B亚基的亚型),并且仅在功能和结构上损害细胞的过度活跃的NMDAR通道中下调过量的 Ca^{2+} 内流。如实施例1的FLIPR实验所示,右美沙酮在NMDAR的作用根据突触前刺激的强度而不同(右美沙酮的阻断作用随着谷氨酸刺激的增加而增加)并且基于NMDAR亚型而不同。该实验不包括 Mg^{2+} ,并且因此它类似于由突触前谷氨酸释放诱导的AMPA去极化已经将 Mg^{2+} 从NMDAR释放到突触间隙的设置。体内 Mg^{2+} 的存在可能会降低右美沙酮的相关性(即,右美沙酮不太可能对失活的 Mg^{2+} 阻断通道产生阻断作用,因为它们已经被阻断且无活性,例如,GluN2A和B亚型当被 Mg^{2+} 阻断时,对 Ca^{2+} 不渗透)。然而,右美沙酮对A-D受体亚型的这些不同作用对于阐明其对强直性和病理性过度活跃通道的选择性作用很重要,例如NR1-NR2C(和NR1-NR2D亚型或含有3A-B亚基的亚型)。右美沙酮提供的通过开孔通道下调的 Ca^{2+} 内流来调节神经可塑性活性,包括诱导突触蛋白的产生,包括NR1、NR2A-D和NR3A-B亚基(实施例2),以及其他突触蛋白和人类的神经营养因子的产生。已知神经营养因子作用于突触后和突触前神经可塑性。

[0281] 本发明人在本文中公开了非竞争性开放通道阻滞剂右美沙酮直接和选择性地作用于病理性过度活跃的通道以调节 Ca^{+} 内流并因此在选定的细胞中重新激活突触前和突触后的生理神经可塑性。病理性过度活跃通道的阻断调节过量的 Ca^{2+} 内流,具有积极的下游后果,包括用于合成神经可塑性关键因子的基因激活,例如突触蛋白,包括GLUN1和2A亚基(实施例2),以及神经营养因子,包括BDNF。这种对神经元的合成神经可塑性活性的激活表明对异常的纠正,即过量的 Ca^{2+} 进入,该异常已导致细胞停止其神经可塑性肽的产生,从而导致生理神经可塑性的恢复。

[0282] 为了支持本发明人公开的作用机制,本发明人在临床上证明了这种细胞功能的重

新激活(对因过量 Ca^{2+} 内流而受损的细胞具有选择性)并因此受损的CNS回路的重新激活对患有MDD的患者的快速起效、稳健和持续效应(停止治疗后)的意外发现。这一发现(参见实施例3)不仅支持NMDAR过度激活(以及选定的神经元中过量的 Ca^{2+} 内流)是本发明人试验中登记的MDD的罪魁祸首(触发和/或维持因素)(一种新的MDD和相关障碍的发病机制),但表明右美沙酮也可能治愈MDD、与MDD相关的障碍和其他神经精神障碍,包括由病理性过度活跃的NMDAR和过量 Ca^{2+} 内流和神经可塑性的抑制或其他细胞功能的损伤触发和/或维持的下丘脑-垂体轴障碍(例如,参见实施例5,其中庆大霉素作为PAM,因此适用于Du等人在2016年描述的疾病和病症)。

[0283] 在CNS障碍的情况下,在兴奋性毒性发作之前,选定的神经元中过量的 Ca^{2+} 内流也可能导致过度的抑制活性,例如,投射到内侧前额叶皮层(mPFC)神经元的抑制性中间神经元。通过阻断病理性过度活跃的NMDAR通道,例如选定的强直性过度活跃的NMDAR,右美沙酮可以减少或停止中间神经元的过度抑制活性,从而缓解mPFC神经元的过度抑制。抑制活性通过相反的作用来控制1) GABA_AR分散,或2) GABA_AR聚集是刺激诱导的NMDAR活性的结果[Bannai H, Niwa F, Sherwood MW, Shrivastava AN, Arizono M, Miyamoto A, Sugiura K, Lévi S, Triller A, Mikoshiba K. Bidirectional control of synaptic GABA_AR clustering by glutamate and calcium. *Cell reports*. 2015 Dec 29; 13(12):2768-80]。因此,存在于脑网络稳态节律的抑制活性受由 Ca^{2+} 内流确定的NMDAR控制。当过量时,这些 Ca^{2+} 内向电流可能会受到右美沙酮的调节。因此,不仅兴奋性活动而且抑制性活动都受NMDAR和 Ca^{2+} 信号传导的调节。因此,NMDAR框架不仅可以控制兴奋性作用,而且还可以通过 Ca^{2+} 信号传导调节所有其他受体的框架,包括抑制性受体(诸如GABA_AR)而控制抑制性作用。

[0284] NMDAR因此承担中央调节位置,该位置接收环境输入并且通过控制和调节所有突触结构(经由 Ca^{2+} 信号传导及其下游效应),将该输入转化为精细调节的神经元可塑性。这种下游效应包括NGF和突触蛋白转录、合成、转运和组装,包括AMPA、NMDAR、GABA_AR和几乎所有其他CNS受体的受体亚基的转录。因此,NMDAR控制包括NMDAR在内的突触结构的生命周期演化,因为它是由环境刺激塑造的。

[0285] 因此,疾病和障碍可以通过过度激活由选定的神经元表达的一种或多种NMDAR亚型而被触发、维持或恶化,所述NMDAR亚型是多种不同回路之一的组成部分(例如,由谷氨酸介导的刺激引发的激活,包括通过生活压力源,或通过其他刺激,或通过内源性或外源性激动剂和/或内源性或外源性PAM,包括毒素)。这种过度的NMDAR激活导致过量的 Ca^{2+} 通过NMDAR流入突触后神经元。突触前谷氨酸受体在神经可塑性中也有作用(Baretta and Jones, 1996; Bouvier G, Bidoret C, Casado M, Paoletti P. Presynaptic NMDA receptors: Roles and rules. *Neuroscience*. 2015; 311:322-340)并且因此可能受到右美沙酮的调节。当流入到选定神经元中的 Ca^{2+} 过量时,它下调神经元可塑性活性并且减少或中断其连接,改变(减少突触机制和强度)其神经元回路的功能(如果兴奋性毒性向细胞凋亡发展,过量的 Ca^{2+} 内流甚至可能影响神经元的重要结构和功能)。像右美沙酮这样的药物,具有作为NMDAR阻滞剂的独特分子作用(实施例1和5),可下调病理性过度活跃的NMDAR中过量的 Ca^{2+} 细胞内流,而不影响生理功能的NMDAR(这在2a期试验中首次得到证实,显示在治疗剂量下缺乏认知副作用,实施例3)。因此,细胞(先前因兴奋性毒性而受损)恢复神经可塑性功能并恢复NS回路,并解决回路故障(不仅解决神经精神症状,还解决神经精神障碍):这种疾

病改善效果是由于神经可塑性和不仅由于受体占据和 Ca^{2+} 内流下调的暂时效应,如实施例3中所示的在突然停止治疗后的持续疗效结果和右美沙酮的血浆浓度降低和随之降低的受体占据率所显示的那样。

[0286] 一种药物,如右美沙酮,在改善疾病的有效剂量下具有良好的耐受性,如本申请(实施例3)中呈现的2a期结果首次在患者中证实,具有对不同浓度谷氨酸(包括非常低水平的谷氨酸)刺激的不同 Ca^{2+} 下调作用,包括在PAM和其他激动剂的存在下(实施例5)以及NMDAR亚型的差异和独特作用(实施例1、5)、独特的“开”-“关”NMDAR动力学(实施例6,第I部分)和“捕获”曲线(实施例6,第II部分)和在静息膜电位下存在的生理浓度的 Mg^{2+} 的独特效果(实施例6,第III部分),是对多种疾病和障碍的潜在疾病改善治疗。重要的是,右美沙酮在NMDAR通道上的阻断活性不会干扰有效剂量的生理活性(如在治疗剂量下没有副作用所证明,实施例3),如实施例1-11中公开的结果所示。因此,右美沙酮是一种探索大脑功能的新工具,无论是在生理操作期间还是在病理情况下。此外,研究人员和从业者将配备一种新的诊断工具,以选择导致或维持或恶化多种疾病和障碍中的一种的NMDAR功能亢进的患者亚群。

[0287] 基于在健康受试者和患有MDD的患者中使用右美沙酮在体外和体内的实验结果,发明人现在能够假设,在G+E范式的基础上,共享的表观遗传密码由诱导的刺激(环境刺激到达细胞)确定的[谷氨酸的突触前释放,由激动剂、PAM和NAM整合(例如,通过其他NMDAR调节剂或毒素激活NMDAR的多胺位点或其他变构或激动剂位点),从而确定 Ca^{2+} 细胞内流的不同模式,动力学由NMDAR框架决定。 Ca^{2+} 内流的这些不同模式决定了在健康和疾病中,在大脑中(对其他细胞/组织会有其他影响)、突触后和突触前神经可塑性调节中:例如,过量的 Ca^{2+} 内流会下调神经可塑性,和过量的 Ca^{2+} 内流的减少,例如,通过非竞争性通道阻滞剂右美沙酮,可能导致生理神经可塑性的恢复,这可以在整个应用中呈现的实验研究中看出。发明人已证明大脑活动的共享密码- Ca^{2+} 内流的不同模式-可调节NMDAR表达(NMDAR框架)(实施例2)。突触前释放谷氨酸后的突触后 Ca^{2+} 内流模式受突触后AMPA和NMDAR表达(以及突触前NMDAR表达,如Berretta和Jones,1996所示)的调节,而这种突触后AMPA和NMDAR受体表达(和突触前谷氨酸释放)反过来又受 Ca^{2+} 内流的调节。因此,NMDAR既是调节剂,又受 Ca^{2+} 内流的调节。这种通过刺激触发的 Ca^{2+} 内流(流经NMDAR)的不同模式对NMDAR表达(NMDAR框架)的调节是神经可塑性的基础,也是每个个体的独特连接组的基础。因此,与个体的每次环境相互作用都会影响不同的NMDAR框架,并导致不同量的 Ca^{2+} 内流,从而产生不同的下游后果。右美沙酮可以通过NMDAR纠正过量(病理性) Ca^{2+} 内流。

[0288] 实施例

[0289] 实施例1-使用GluN1-GluN2A、-2B、-2C、-2D细胞系对人NMDA受体的荧光成像读板仪(FIIPR)钙测定的作用模式

[0290] 以下是本实施例和本申请中使用的缩写的列表。

[0291]

缩写	定义或扩展术语
AUC	曲线下面积
CHO	中国仓鼠卵巢
CRC	浓度依赖性曲线
DMSO	二甲基亚砜

FLIPR	荧光成像读板仪
Gly	甘氨酸
GLP	良好实验室规范
K _B	估计的测试项目平衡解离常数
Log	以10为底的对数
L-glu	L-谷氨酸
MW	分子量
NA	不可用的
NMDA	N-甲基-D-天门冬氨酸
NMDAR	N-甲基-D-天门冬氨酸受体
QC	质量管理
SEM	标准平均误差
SOP	标准操作程序
α	估计的测试项目合作性项
τ	激动剂功效值

[0292] A. 介绍

[0293] 该实施例1展示了右美沙酮在NMDAR亚型中的作用机制和在每个通道亚型中的相对效力,并与其他通道阻滞剂进行了比较。它还告知右美沙酮影响由非常低的环境谷氨酸触发的Ca²⁺内流的能力。连同本文公开的其他证据,这证实了本发明人公开的MDD的新病理生理学(通过强直和病理激活的NMDAR的过量Ca²⁺内流)。

[0294] 本文所述的开始FLIPR-钙测定模式被设计为在四种人重组NMDA受体类型(GluN1-GluN2A、GluN1-GluN2B、GluN1-GluN2C、GluN1-GluN2D)中建立在6个选定浓度下对L-谷氨酸浓度响应曲线拟合参数的测试项目效应。

[0295] B. 测试和对照项目

[0296] 本研究选择了五个测试项目:盐酸右美沙酮(CAS#15284-15-8,由帕多瓦大学提供);盐酸美金刚(CAS#41100-52-1,由Bio-Techne Tocris提供);(±)-盐酸氯胺酮(CAS#1867-669,由Merck Sigma-Aldrich提供);马来酸(+)-MK 801(CAS#77086-22-7,由Bio-Techne Tocris提供);和右旋美沙芬(CAS#6700-34-1,由Merck Sigma-Aldrich提供)。

[0297] 使用的载体是DMSO(CAS#67-68-5;由Merck Sigma-Aldrich提供)。

[0298] 测试项目配方显示在下表1中。

[0299] 表1

[0300]

配方性质	DMSO 溶液
浓度 (在 DMSO 中 400X)	20 mM 5 mM 1.25 mM 312 μ M 78 μ M 19.5 μ M
储存条件	
溶解前 (作为固体):	对于盐酸右美沙酮 -20°C; 环境温度/避光保存用于剩余测试项目
溶解后	-20°C

[0301] C. 测试系统

[0302] 在FLIPR中评估了测试项目在四种表达二异聚人NMDA受体 (NMDAR) :GluN- /GluN2A-CHO、GluN1-GluN2B-CHO、GluN1-GluN2C-CHO、GluN1-GluN2D-CHO的CHO细胞系中调节L-谷氨酸和甘氨酸诱导的钙进入的能力。

[0303] D. 实验设计

[0304] 该研究旨在监测在固定的10 μ M甘氨酸浓度存在下五个测试项目对L-谷氨酸CRC的影响。

[0305] 对每个测试项目测试6个浓度:50 μ M、12.5 μ M、3.13 μ M、0.781 μ M、0.195 μ M和0.049 μ M。

[0306] L-谷氨酸11点CRC包括以下最终浓度:100mM、1mM、100 μ M、10 μ M、3.3 μ M、1.1 μ M、370nM、123nM、41nM、13.7nM和4.6nM。

[0307] 细胞内钙水平的FLIPR测定用作NMDAR激活的读数。

[0308] E. 方法和程序

[0309] 400x化合物板通过Echo Labcyte系统制备,每孔包含:300n1/孔的400 x L-谷氨酸/甘氨酸水溶液和300n1/孔的400 x DMSO中的测试项目溶液。400x化合物板在-20°C下储存直到FLIPR实验日。

[0310] 在FLIPR实验日,通过添加高达30 μ l/孔的化合物缓冲液从400x化合物板产生4x化合物板。4x L-谷氨酸溶液直接制备为仅400mM浓度,并分配在4x化合物板的第1列和第12列中。

[0311] FLIPR系统用于监测NMDAR细胞系中的细胞内钙水平,用Fluo-4预加载1小时,然后用测定缓冲液洗涤。

[0312] 在存在L-谷氨酸和甘氨酸的情况下,在添加测试项目之前10秒和之后5分钟监测细胞内钙水平。

[0313] F. 数据处理和分析

[0314] 通过ScreenWorks 4.1 (Molecular Devices) FLIPR软件测量荧光的AUC值,以监测添加测试项目后5分钟内的钙水平。然后,通过Excel 2013 (Microsoft Office) 软件对数据

进行标准化,使用添加10 μ M L-谷氨酸加10 μ M甘氨酸的孔(第23列)作为高对照,仅添加测定缓冲液的孔(第24列)作为低对照。

[0315] 为了评估板质量,在Excel中进行Z'计算。Z'的计算公式如下:

$$[0316] \quad Z' = 1 - 3(\sigma_h + \sigma_l) / |\mu_h - \mu_l|$$

[0317] 其中 μ 和 σ 分别是高(h)和低(l)对照的均值和标准差。

[0318] 在不同的实验条件下,在Prism 8(GraphPad)软件中使用四参数逻辑方程来计算L-谷氨酸EC₅₀和最大效应:

$$[0319] \quad Y = \text{底部} + (\text{顶部} - \text{底部}) / (1 + 10^{-(\text{LogEC}_{50} - \text{Log}[A]) * \text{HillSlope}})$$

[0320] 其中Y是L-谷氨酸的影响百分比,[A]是L-谷氨酸的摩尔浓度。

[0321] 变构调节剂的操作方程(Leach K, Sexton PM and Christopoulos A, Allosteric GPCR modulators: taking advantage of permissive receptor pharmacology, Trends Pharmacol. Sci. 28:382-389, 2007; Kenakin TP, Overview of receptor interaction of agonists and antagonists, Curr. Protoc. Pharmacol. Chapter 4: Unit 4.1, 2008, Kenakin TP, Biased signalling and allosteric machines: new vistas and challenges for drug discovery, Br. J. Pharmacol. 165:1659-1669, 2012) 在Prism 8 (GraphPad) 软件中创建,以估计每个测试项目的K_B和 α 参数,假设作为孔隙阻滞剂,每个测试项目都能够在足够高的浓度下产生激动剂反应的完全阻断:

$$[0322] \quad Y = E_{MAX} \frac{\frac{\tau[A]}{EC_{50}(\tau+1)}}{\left(\left(\left(\frac{[A]}{EC_{50}(\tau+1)} \right) + \left(\frac{\tau[A]}{EC_{50}(\tau+1)} \right) \right) * \left(1 + \frac{\alpha[B]}{K_B} \right) \right) + \frac{[B]}{K_B} + 1}$$

[0323] 其中Y是L-谷氨酸的%效果;[A]为L-谷氨酸摩尔浓度;E_{MAX}是最大可能的L-谷氨酸效应,由四参数逻辑方程估计;EC₅₀是最大有效L-谷氨酸浓度的一半,由四参数逻辑方程估计; τ 是NMDAR处的任意L-谷氨酸功效值(对于所有受体,设置 $\tau=100$,在人二异聚体NMDAR中L-谷氨酸解离平衡常数没有一致值的情况下,需要从EC₅₀估计 τ);[B]为测试项目摩尔浓度;K_B是估计的测试项目平衡解离常数; α 是估计的协同术语,表示测试项目对受体的L-谷氨酸解离平衡常数的影响(即, α 是不存在和存在测试项目时L-谷氨酸平衡解离常数之间的估计比率,并且对于影响激动剂平衡解离常数的负变构调节剂,预期为 $0 < \alpha \leq 1$)。

[0324] %亲和力比率是从估计的亲和力计算的,其是K_B的倒数,并考虑对NMDAR亚型的最高亲和力为100%。

[0325] G. 方案偏差

[0326] 由于L-谷氨酸在DMSO中的溶解度差,L-谷氨酸和甘氨酸的400x浓缩溶液的制备发生在H₂O中,而不是在DMSO中。这种方案偏差既不影响整体解释,也不损害研究的完整性。

[0327] H. 结果

[0328] 1、板Z'值

[0329] 用相同的化合物板测试每个细胞系(GluN1-GluN2A、GluN1-GluN2B、GluN1-GluN2C、GluN1-GluN2D)的5个细胞板,包含所有测试项目。

[0330] 所有细胞板的Z'值 >0.4 ,并被接受。

[0331] 板1至5的GluN1-GluN2A的Z'值为:0.82、0.80、0.83、0.83、0.83;板1至5的GluN1-GluN2B的Z'值为:0.80、0.77、0.77、0.81、0.83;板1至5的GluN1-GluN2C的Z'值为:0.73、

0.53、0.74、0.71、0.76;板1至5的GluN1-GluN2D的Z'值为:0.70、0.74、0.65、0.44、0.64。

[0332] 丢弃另外5个具有GluN1-GluN2C细胞的细胞板,因为该批次细胞中的低受体表达导致低荧光值。

[0333] 2、L-谷氨酸CRC

[0334] 对于每个细胞系,在10 μ M甘氨酸存在下获得L-谷氨酸CRC,并且相对GraphPad Prism图显示在图1中。数据报告为平均值 $\pm$ SEM,n=5。

[0335] 在100mM L-谷氨酸时,对于除GluN2D之外的所有细胞系,%荧光值明显较低,并且荧光的时间进程与所有其他浓度不同,初始瞬时峰值持续约90秒。这种短暂的峰值在所有细胞系中都可见,尤其是在GluN2C和GluN2D细胞系中,可能是由于这些细胞中NMDAR的表达水平较低,甚至在表达低水平NMDAR的GluN2C批次细胞中更为明显(参见图2A-2E中的迹线)。因此,在图表中报告了100mM L-谷氨酸,但从数据分析中删除。

[0336] 4种细胞系的最佳拟合值如下表2所示:

[0337] 表2

	GluN2A	GluN2B	GluN2C	GluN2D
LogEC ₅₀	-6.6	-6.9	-7.1	-7.5
EC ₅₀ (M)	2.5e-007	1.3e-007	8.7e-008	3.4e-008
HillSlope	1.0	1.3	1.5	1.6
底部	-0.62	1.7	0.88	5.3
顶部	106	111	106	105
量程	107	109	105	99

[0339] 3、右美沙酮

[0340] 右美沙酮对4种NMDA受体类型中的L-谷氨酸CRC的作用如图3A-3D所示。100mM L-谷氨酸值未被用于拟合。数据报告为平均值 $\pm$ SEM,n=5。

[0341] 右美沙酮四参数逻辑方程最佳拟合值获得的GraphPad Prism数据分析如下表3-6所示:

[0342] 表3

GluN2A	50 μ M	12.5 μ M	3.1 μ M	781 nM	195 nM	49 nM	0 nM
底部	-1.4	-3.1	-2.0	-0.087	0.37	-0.13	-0.62
顶部	35	84	98	103	98	103	106
LogEC ₅₀	-6.4	-6.4	-6.6	-6.6	-6.6	-6.7	-6.6
HillSlope	1.4	1.0	1.0	1.1	1.1	1.0	1.0
EC ₅₀ (M)	4.1e-7	3.8e-7	2.8e-7	2.6e-7	2.3e-7	2.1e-7	2.5e-7

[0344] 表4

[0345]

GluN2B	50 μ M	12.5 μ M	3.1 μ M	781 nM	195 nM	49 nM	0 nM
<u>底部</u>	-0.34	-2.3	-3.6	0.52	0.68	0.43	1.7
顶部	35	72	89	93	96	96	111
LogEC ₅₀	-6.4	-6.7	-6.9	-6.9	-6.9	-7.0	-6.9
HillSlope	1.1	1.3	1.1	1.2	1.2	1.2	1.3
EC ₅₀ (M)	3.7e-7	1.8e-7	1.3e-7	1.4e-7	1.4e-7	1.1e-7	1.3e-7

[0346] 表5

[0347]

GluN2C	50 μ M	12.5 μ M	3.1 μ M	781 nM	195 nM	49 nM	0 nM
<u>底部</u>	4.5	1.7	1.2	5.3	2.9	4.3	0.88
顶部	30	75	94	95	100	99	106
LogEC ₅₀	-6.6	-6.7	-6.8	-6.8	-6.8	-6.8	-7.1
HillSlope	1.7	1.5	1.4	2.2	1.4	1.3	1.5
EC ₅₀ (M)	2.5e-7	2.1e-7	1.5e-7	1.4e-7	1.5e-7	1.5e-7	8.7e-8

[0348] 表6

[0349]

GluN2D	50 μ M	12.5 μ M	3.1 μ M	781 nM	195 nM	49 nM	0 nM
<u>底部</u>	-0.55	-5.6	1.1	2.6	5.3	5.1	5.3
顶部	41	82	97	101	97	101	105
LogEC ₅₀	-6.9	-7.1	-7.4	-7.5	-7.5	-7.5	-7.5
HillSlope	0.49	1.1	1.5	1.7	1.3	1.3	1.6
EC ₅₀ (M)	1.1e-7	7.1e-8	4.2e-8	3.4e-8	3.0e-8	2.9e-8	3.4e-8

[0350] 变构调节剂的操作分析获得表7中所示的K_B、%亲和力比率和 α 值：

[0351] 表7

[0352]

细胞系	K _B (M)	%亲和力比率	α	
GluN2A	8.9e-6	51		0.22
GluN2B	6.1e-6	74		0.26
GluN2C	4.5e-6	100		0.17
GluN2D	7.8e-6	58		0.22

[0353] 4、美金刚

[0354] 美金刚对4种NMDA受体类型中的L-谷氨酸CRC的作用如图4A-4D所示。100mM L-谷氨酸值未被用于拟合。数据报告为平均值 $\pm$ SEM, n=5。

[0355] 美金刚四参数逻辑方程最佳拟合值获得的GraphPad Prism数据分析如下表8-11所示(不被认为是可靠拟合的值以粗体字输入并加下划线)：

[0356] 表8

[0357]

GluN2A	50 μ M	12.5 μ M	3.1 μ M	781 nM	195 nM	49 nM	0 nM
底部	1.5	-0.14	-0.58	1.1	1.3	0.84	-0.62
顶部	36	68	83	96	92	95	106
LogEC ₅₀	-6.1	-6.3	-6.4	-6.3	-6.5	-6.6	-6.6
HillSlope	1.6	1.3	1.1	1.2	1.2	1.1	1.0
EC ₅₀ (M)	8.0e-7	5.2e-7	4.0e-7	4.7e-7	3.4e-7	2.6e-7	2.5e-7

[0358] 表9

[0359]

GluN2B	50 μ M	12.5 μ M	3.1 μ M	781 nM	195 nM	49 nM	0 nM
底部	1.5	-0.073	-0.85	1.6	1.3	0.24	1.7
顶部	19	43	64	79	84	88	111
LogEC ₅₀	-6.4	-6.6	-6.6	-6.6	-6.7	-6.8	-6.9
HillSlope	2.1	1.5	1.1	1.7	1.4	1.1	1.3
EC ₅₀ (M)	4.3e-7	2.5e-7	2.3e-7	2.5e-7	1.8e-7	1.6e-7	1.3e-7

[0360] 表10

[0361]

GluN2C	50 μ M	12.5 μ M	3.1 μ M	781 nM	195 nM	49 nM	0 nM
底部	7.4	2.5	1.3	0.92	2.0	2.2	0.88
顶部	11	20	49	76	85	92	106
LogEC ₅₀	-6.3	-6.4	-6.5	-6.6	-6.9	-6.8	-7.1
HillSlope	6.1	1.1	1.2	1.4	1.5	1.4	1.5
EC ₅₀ (M)	5.5e-7	3.8e-7	3.0e-7	2.4e-7	1.3e-7	1.5e-7	8.7e-8

[0362] 表11

[0363]

GluN2D	50 μ M	12.5 μ M	3.1 μ M	781 nM	195 nM	49 nM	0 nM
底部	-97133	1.4	-1.3	1.1	-0.19	5.1	5.3
顶部	19	26	59	87	89	94	105
LogEC ₅₀	-37	-6.7	-7.1	-7.2	-7.3	-7.3	-7.5
HillSlope	0.14	1.5	1.3	1.4	1.3	1.4	1.6
EC ₅₀ (M)	1.6e-37	1.8e-7	8.0e-8	6.8e-8	4.8e-8	4.8e-8	3.4e-8

[0364] 变构调节剂的操作分析获得以下在表12中所示的K_B、%亲和力比率和 α 值:

[0365] 表12

[0366]

细胞系	K _B (M)	%亲和力比率	α	
GluN2A	3.6e-6	8		0.15
GluN2B	5.8e-7	48		0.094
GluN2C	2.8e-7	100		0.10
GluN2D	5.9e-7	47		0.13

[0367] 5、(±)-氯胺酮

[0368] (±)-氯胺酮对4种NMDA受体类型中的L-谷氨酸CRC的影响如图5A-5D所示。100mM L-谷氨酸值未被用于拟合。数据报告为平均值 $\pm$ SEM, n=5。

[0369] (±)-氯胺酮四参数逻辑方程最佳拟合值获得的GraphPad Prism数据分析如下表

13-16所示。

[0370] 表13

GluN2A	50 μ M	12.5 μ M	3.1 μ M	781 nM	195 nM	49 nM	0 nM
底部	0.99	0.48	-0.090	-0.20	0.62	0.98	-0.62
顶部	38	66	87	97	96	100	106
LogEC ₅₀	-6.2	-6.4	-6.4	-6.4	-6.5	-6.5	-6.6
HillSlope	1.9	1.3	1.1	1.0	1.2	1.2	1.0
EC ₅₀ (M)	6.7e-7	4.4e-7	4.0e-7	4.2e-7	2.8e-7	3.1e-7	2.5e-7

[0372] 表14

GluN2B	50 μ M	12.5 μ M	3.1 μ M	781 nM	195 nM	49 nM	0 nM
底部	1.4	0.50	-0.64	-0.79	1.7	0.90	1.7
顶部	24	44	70	80	92	98	111
LogEC ₅₀	-6.3	-6.6	-6.6	-6.7	-6.8	-6.7	-6.9
HillSlope	2.0	1.4	1.1	1.2	1.4	1.4	1.3
EC ₅₀ (M)	4.7e-7	2.3e-7	2.3e-7	2.0e-7	1.8e-7	1.8e-7	1.3e-7

[0374] 表15

GluN2C	50 μ M	12.5 μ M	3.1 μ M	781 nM	195 nM	49 nM	0 nM
底部	3.0	2.8	2.1	0.59	2.5	3.2	0.88
顶部	6.2	20	65	80	95	97	106
LogEC ₅₀	-6.4	-6.7	-6.6	-6.6	-6.8	-6.9	-7.1
HillSlope	2.5	2.0	1.2	1.3	1.5	1.5	1.5
EC ₅₀ (M)	4.1e-7	2.1e-7	2.3e-7	2.3e-7	1.6e-7	1.2e-7	8.7e-8

[0376] 表16

GluN2C	50 μ M	12.5 μ M	3.1 μ M	781 nM	195 nM	49 nM	0 nM
底部	4.5	1.7	1.2	5.3	2.9	4.3	0.88
顶部	30	75	94	95	100	99	106
LogEC ₅₀	-6.6	-6.7	-6.8	-6.8	-6.8	-6.8	-7.1
HillSlope	1.7	1.5	1.4	2.2	1.4	1.3	1.5
EC ₅₀ (M)	2.5e-7	2.1e-7	1.5e-7	1.4e-7	1.5e-7	1.5e-7	8.7e-8
EC ₅₀ (M)	1.9e-7	1.2e-7	7.5e-8	6.3e-8	4.7e-8	4.4e-8	3.4e-8

[0378] 变构调节剂的操作分析获得以下表17中所示的K_B、%亲和力比率和 α 值：

[0379] 表17

细胞系	K _B (M)	%亲和力比率	α
GluN2A	4.3e-6	11	0.17
GluN2B	1.1e-6	42	0.14
GluN2C	4.6e-7	100	0.13
GluN2D	1.4e-6	33	0.15

[0381] 6、(+)-MK801

[0382] (+)-MK 801在4种NMDA受体类型中对L-谷氨酸CRC的影响如图6A-6D所示。100mM L-谷氨酸值未被用于拟合。数据报告为平均值±SEM,n=5。

[0383] (+)-MK 801四参数逻辑方程最佳拟合值获得的GraphPad Prism数据分析如下表18-21所示(不被认为是可靠拟合的值以粗体字输入并加下划线)：

[0384] 表18

[0385]

GluN2A	50 μ M	12.5 μ M	3.1 μ M	781 nM	195 nM	49 nM	0 nM
底部	N.A.	-1.3	-1.5	-4.5	-7.4	-3.0	-0.62
顶部	N.A.	0.21	6.1	35	53	67	106
LogEC ₅₀	N.A.	-5.5	-5.6	-5.9	-6.4	-6.7	-6.6
HillSlope	N.A.	30	0.81	0.46	0.52	0.91	1.0
EC ₅₀ (M)	N.A.	3.4e-6	2.6e-6	1.3e-6	3.6e-7	2.0e-7	2.5e-7

[0386] 表19

[0387]

GluN2B	50 μ M	12.5 μ M	3.1 μ M	781 nM	195 nM	49 nM	0 nM
底部	1.7	-0.37	-1.3	-7.4	-0.47	-0.35	1.7
顶部	1.6	0.88	1.1	9.5	22	47	111
LogEC ₅₀	44	-4.9	-5.8	-7.2	-7.0	-7.0	-6.9
HillSlope	805	0.94	0.48	0.24	1.5	1.3	1.3
EC ₅₀ (M)	1.3e+44	1.2e-5	1.7e-6	6.6e-8	1.0e-7	9.5e-8	1.3e-7

[0388] 表20

[0389]

GluN2C	50 μ M	12.5 μ M	3.1 μ M	781 nM	195 nM	49 nM	0 nM
底部	8.4	4.9	-2.9	-1.6	2.2	2.8	0.88
顶部	11	2.5	12	33	67	83	106
LogEC ₅₀	-7.3	-6.9	-7.0	-6.9	-6.9	-6.9	-7.1
HillSlope	1.7	-18	0.36	0.97	1.9	1.6	1.5
EC ₅₀ (M)	5.0e-8	1.2e-7	1.0e-7	1.3e-7	1.2e-7	1.1e-7	8.7e-8

[0390] 表21

[0391]

GluN2D	50 μ M	12.5 μ M	3.1 μ M	781 nM	195 nM	49 nM	0 nM
底部	13	-1.0	-11	-20	1.1	1.5	5.3
顶部	116593	1.3	5.5	40	74	87	105
LogEC ₅₀	-23	-5.0	-7.7	-7.5	-7.3	-7.5	-7.5
HillSlope	-0.30	30	0.56	0.54	1.4	1.5	1.6
EC ₅₀ (M)	4.8e-24	9.6e-6	1.8e-8	3.4e-8	5.3e-8	3.1e-8	3.4e-8

[0392] 变构调节剂的操作分析获得以下表22中所示的K_B、%亲和力比率和 α 值：

[0393] 表22

[0394]

细胞系	K _B (M)	%亲和力比率	α		
GluN2A	1.1e-7	44		0.87	
GluN2B	4.8e-8	100		1.0	
GluN2C	1.4e-7	34		0.39	
GluN2D	1.5e-7	32		0.36	

[0395] 7、右美沙芬

[0396] 右美沙芬对4种NMDA受体类型中的L-谷氨酸CRC的作用如图7A-7D所示。100mM L-谷氨酸值未被用于拟合。数据报告为平均值±SEM, n=5。

[0397] 右美沙芬四参数逻辑方程最佳拟合值获得的GraphPad Prism数据分析如下表23-26所示(不被认为是可靠拟合的值以粗体字输入并加下划线)：

[0398] 表23

[0399]

GluN2A	50 μ M	12.5 μ M	3.1 μ M	781 nM	195 nM	49 nM	0 nM
<u>底部</u>	2.2	0.20	2.5	2.4	2.7	2.3	-0.62
<u>顶部</u>	44	79	88	99	92	98	106
LogEC ₅₀	-6.2	-6.4	-6.5	-6.4	-6.6	-6.6	-6.6
HillSlope	1.3	1.1	1.3	1.3	1.2	1.0	1.0
EC ₅₀ (M)	7.0e-7	3.8e-7	3.4e-7	3.8e-7	2.4e-7	2.6e-7	2.5e-7

[0400] 表24

[0401]

GluN2B	50 μ M	12.5 μ M	3.1 μ M	781 nM	195 nM	49 nM	0 nM
<u>底部</u>	0.49	-0.38	1.1	1.7	1.5	2.4	1.7
<u>顶部</u>	32	57	74	88	92	95	111
LogEC ₅₀	-6.2	-6.7	-6.7	-6.6	-6.7	-6.7	-6.9
HillSlope	0.83	1.2	1.3	1.3	1.1	1.2	1.3
EC ₅₀ (M)	5.9e-7	2.0e-7	2.1e-7	2.5e-7	2.1e-7	2.0e-7	1.3e-7

[0402] 表25

[0403]

GluN2C	50 μ M	12.5 μ M	3.1 μ M	781 nM	195 nM	49 nM	0 nM
<u>底部</u>	9.6	4.9	3.9	3.9	3.1	3.2	0.88
<u>顶部</u>	13	26	67	86	97	95	106
LogEC ₅₀	-6.8	-6.7	-6.7	-6.8	-6.8	-7.0	-7.1
HillSlope	3.0	1.5	1.6	1.6	1.4	1.3	1.5
EC ₅₀ (M)	1.6e-7	2.1e-7	1.9e-7	1.7e-7	1.5e-7	1.1e-7	8.7e-8

[0404] 表26

[0405]

GluN2D	50 μ M	12.5 μ M	3.1 μ M	781 nM	195 nM	49 nM	0 nM
底部	23	8.8	6.6	2.4	6.3	15	5.3
顶部	31	59	87	99	91	93	105
LogEC ₅₀	-6.8	-7.1	-7.3	-7.4	-7.5	-7.5	-7.5
HillSlope	1.9	1.7	1.9	1.7	1.4	1.7	1.6
EC ₅₀ (M)	1.6e-7	8.6e-8	5.6e-8	4.2e-8	3.1e-8	3.1e-8	3.4e-8

[0406] 变构调节剂的操作分析获得以下表27中所示的K_B、%亲和力比率和 α 值:

[0407] 表27

[0408]

细胞系	K _B (M)	%亲和力比率	α
GluN2A	9.6e-6	13	0.25
GluN2B	1.9e-6	63	0.13
GluN2C	1.2e-6	100	0.24
GluN2D	6.7e-6	18	0.34

[0409] I. 讨论

[0410] L-谷氨酸对钙动员的影响显示NMDAR异二聚体受体的差异性激活,EC₅₀等级顺序为GluN2A>GluN2B>GluN2C>GluN2D,EC₅₀值分别为2.5e-7、1.3e-7、8.7e-8和3.4e-8。获得的效力等级顺序与使用各种方法的文献中描述的一致(Paoletti P,Bellone C and Zhou Q, NMDA receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease, Nat.Rev.Neurosci, 14:383-400, 2013)。

[0411] 100mM L-谷氨酸在所有细胞系中显示出持续约90秒的钙瞬时峰,在表达低水平NMDAR的GluN2C批次细胞中更明显。可以假设100mM L-谷氨酸对细胞内钙水平的影响可能不是由NMDAR介导的,而是由渗透性细胞对如此高浓度的代谢物的反应介导的。涉及100mM L-谷氨酸诱导的细胞内钙增加的通路仍有待研究。

[0412] 研究了5个测试项目在6个选定浓度下对L-谷氨酸CRC的影响:右美沙酮、美金刚、(±)-氯胺酮、(+)-MK 801和右美沙芬。所有5个测试项目均显示出不可逾越的特征,这是FLIPR钙测定中NMDAR孔阻滞剂的典型特征。与其他测试项目相比,(+)-MK 801对所有NMDAR亚型具有最高的估计亲和力,能够将L-谷氨酸的%效果降低到小于50%,所有NMDAR亚型已经达到781nM。(+)-MK 801对任何NMDAR亚型的估计K_B≤150nM。美金刚和(±)-氯胺酮的K_B在微摩尔范围内,美金刚对GluN2B、GluN2C、GluN2D以及(±)-氯胺酮对GluN2C的K_B为亚微摩尔。右美沙酮和右美沙芬对任何NMDAR亚型的估计K_B在微摩尔范围内。

[0413] 没有一种化合物对含有特定GluN2亚基的NMDAR具有选择性,尽管它们大多表现出一些GluN2亚基偏好。在所有测试的化合物中,右美沙酮显示出最少的亚型偏好。与含有亚基GluN2A、B或D的其他亚型相比,除(+)-MK 801之外的所有化合物都显示出对含有GluN2C的亚型的偏好。(例如,考虑到对含有GluN2C的NMDAR的估计亲和力%为100%,然后对右美沙酮、右美沙芬、(±)-氯胺酮、美金刚而言,对含有GluN2A的NMDAR的估计亲和力%分别为51、13、11和8%。只有(+)-MK 801对含GluN2B的NMDAR表现出轻微偏好。

[0414] 表28-K_B表

测定项目	K _B (μM)			
	GluN1/2A	GluN1/2B	GluN1/2C	GluN1/2D
右美沙酮	8.9	6.1	4.5	7.8
[0415] 右美沙芬	9.6	1.9	1.2	6.7
(±)-氯胺酮	4.3	1.1	0.46	1.4
美金刚	3.6	0.58	0.28	0.59
(+)-MK 801 K _B	0.11	0.048	0.14	0.15

[0416] 荧光成像读板仪 (FLIPR) Ca²⁺测定:L-谷氨酸对钙动员的影响。本发明人检测了十个浓度下的L-谷氨酸效应:1mM、100μM、10μM、3.3μM、1.1μM、370nM、123nM、41nM、14nM和4.6nM。本发明人检测了5种化合物(MK-801、美金刚、氯胺酮、右美沙芬和右美沙酮)在6种浓度(50μM、12.5μM、3.1μM、781nM、195nM和49nM;还显示了0的浓度)下对以上列举的10种浓度(除了为0的浓度)的谷氨酸的影响。图8A-12J显示了在各种浓度下各种化合物对L-谷氨酸的影响%。

[0417] L-谷氨酸对钙动员的影响显示出NMDA异二聚体受体亚型的差异激活,EC₅₀等级顺序为GluN2A>GluN2B≥GluN2C>GluN2D。对于分别含有GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D的NMDAR而言,EC₅₀分别为2.5μM、1.3μM、870nM和340nM。效力等级顺序与采用各种方法的文献中描述的一致(Paoletti等,2013)。

[0418] 计算EC₅₀ e Hill斜率(H)的值,本发明人还使用以下公式计算ECF(其中0<F<100,例如5、10、20、30、40、90、95、99):

$$[0419] \quad ECF = \left(\frac{F}{100 - F} \right)^{\sqrt{H}} EC_{50}$$

[0420] 本发明人应用实施例1中针对NMDAR报告的EC₅₀ e Hill斜率值并获得表29中所示的以下ECF值:

[0421] 表29-ECF表

[0422]

F	R	ECF	H	Sub	ECF	H	Sub	ECF	H	Sub	ECF	H
5	2A	160nM	1	2B	140nM	1.3	2C	120nM	1.5	2D	54nM	1.6
10	2A	280nM	1	2B	240nM	1.3	2C	200nM	1.5	2D	86nM	1.6
20	2A	630nM	1	2B	450nM	1.3	2C	350nM	1.5	2D	140nM	1.6
30	2A	1.07μM	1	2B	680nM	1.3	2C	500nM	1.5	2D	200nM	1.6
40	2A	1.67μM	1	2B	950nM	1.3	2C	660nM	1.5	2D	260nM	1.6
50	2A	2.5μM	1	2B	1.3μM	1.3	2C	870nM	1.5	2D	340nM	1.6
90	2A	23μM	1	2B	7.05μM	1.3	2C	3.76μM	1.5	2D	1.34μM	1.6
95	2A	48μM	1	2B	13μM	1.3	2C	6.19μM	1.5	2D	2.14μM	1.6
99	2A	250μM	1	2B	45μM	1.3	2C	19μM	1.5	2D	6.01μM	1.6

[0423] 在生理情况下,兴奋性刺激后流入细胞的总Ca²⁺量是通过谷氨酸激活的不同NMDAR亚型的Ca²⁺内流的总和。此外,Ca²⁺内流通常随着L-谷氨酸浓度的增加而增加,达到最大效

应,如在本实施例1中所见。在本发明人的实验中,谷氨酸浓度对 Ca^{2+} 内流的最大(99%)影响为对于表达NMDAR亚型的GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D异源细胞,分别在250 μM 、45 μM 、19 μM 和6 μM 下观察到:在L-谷氨酸浓度高于最大效应浓度时, Ca^{2+} 内流没有增加,也与文献(Paoletti et al.,2013)一致。

[0424] 从ECF表(表29)可以看出,与GluN2A和GluN2B亚型相比,较低的谷氨酸浓度优先激活GluN2C和GluN2D亚型。右美沙酮对GluN2C的优先活性(K_{g} 表-表28)和大脑中GluN2C亚型的发育分布(Hansen等人,2019)可能支持强直性激活(在静息膜电位下,在低浓度谷氨酸存在下和在 Mg^{2+} 阻断存在下)的病理性过度活跃(正如缺乏认知副作用所揭示的那样,参见实施例3)的GluN2C通道(或GluN2D通道)的阻断的假设。功能障碍的星形胶质细胞(或功能性星形胶质细胞的数量减少)与谷氨酸/谷氨酰胺循环受损和过量残留的细胞外突触谷氨酸(即使在非常低的浓度下)可以确定过量的 Ca^{2+} 内流(特别是,如上所述,在GluN2C和GluN2D亚型中),其导致具有降低的神经可塑性的神经元损伤,神经元损伤可能触发和/或维持MDD和相关障碍(有或没有PAMs和激动剂)。通过优先靶向内啡肽通路的强直性和病理性激活的神经元部分(引领亲和力,实施例10),右美沙酮下调了选定NMDAR中的过量 Ca^{2+} 内流,并且细胞功能在内啡肽通路中得到恢复,从而改善了MDD,这可以从实施例3中看出。

[0425] 应该再次指出在荧光成像读板仪(FLIPR) Ca^{2+} 测定中,L-谷氨酸对钙动员的影响不能解释生理 Mg^{2+} 阻滞的影响,并且在1 mM^{2+} 的生理性存在下,开放通道阻滞剂对GluN2C和GluN2D的体内偏好增强了几倍(Kotermanski SE,Johnson JW. Mg^{2+} imparts NMDA receptor subtype selectivity to the Alzheimer's drug memantine.J Neurosci.2009;29(9):2774-2779)。此外,未测试NMDAR三异构体(例如,NR1-NR2A-NR2B)和含有NR3A-B亚基的三异构体和二异构体。也未测试NR1的不同剪接变体。这些额外的NMDAR潜在亚型和异构体增加了复杂性,但也增加了对 Ca^{2+} 内流的精细调节的潜力,具有越来越精确的下游结果[表观遗传密码,以上定义为环境诱导(刺激诱导)的 Ca^{2+} 细胞内流的不同模式,具有由NMDAR框架确定的动力学]。

[0426] 以下是可以从该FLIPR Ca^{2+} 测定和实施例2-7推断的九点:

[0427] (1) L-谷氨酸浓度依赖性(M)对 Ca^{2+} 动员的影响对于每个测试的NMDAR亚型A-D不同,根据亚型依赖性排名。其他NMDAR亚型和异构体,例如ad三异构体(如NR1-NR2A-NR2B)和含有NR3A-B亚基的二和三异构体,以及NR1的不同剪接变体也可能显示出对 Ca^{2+} 动员影响的不同排名。以下是已知和潜在的四聚体NMDAR亚型的示例(考虑到四聚体结构和至少2个NR1亚基的可能NMDAR亚型;每个可能的亚型都具有可能不同的功能特征以及发育和区域分布):

[0428] (NR1-NR1四同聚体)

[0429] NR1-NR2A二异聚体

[0430] NR1-NR2A-NR2B三异聚体

[0431] NR1-NR2A-NR2C三异聚体

[0432] NR1-NR2A-NR2D三异聚体

[0433] NR1-NR2B二异聚体

[0434] NR1-NR2B-NR2C三异聚体

[0435] NR1-NR2B-NR2D三异聚体

[0436] NR1-NR2C二异聚体

[0437] NR1-NR2C-NR2D三异聚体

[0438] NR1-NR2D二异聚体

[0439] NR1-NR3A二异聚体

[0440] NR1-NR2A-NR3A三异聚体

[0441] NR1-NR2B-NR3A三异聚体

[0442] NR1-NR2C-NR3A三异聚体

[0443] NR1-NR2D-NR3三异聚体

[0444] NR1-NR3B二异聚体

[0445] NR1-NR2A-NR3B三异聚体

[0446] NR1-NR2B-NR3B三异聚体

[0447] NR1-NR2C-NR3B三异聚体

[0448] NR1-NR2D-NR3B三异聚体

[0449] NR1-NR3A-NR3B三异聚体

[0450] (2) 给定突触处的总突触后 Ca^{2+} 内流量是突触间隙中L-谷氨酸(M)的浓度/时间的函数,即突触前轴突末端释放的谷氨酸的量(依赖于刺激)(和通过EAAT的清除)。

[0451] (3) 除了突触前谷氨酸释放的量外,突触后细胞中的 Ca^{2+} 内流也是突触间隙处突触后细胞膜表达的NMDAR(和AMPA,在生理情况下)的NMDAR框架(突触后谷氨酸受体的密度、亚型和位置,包括突触“热点”内的NMDAR密度和亚型,距离突触前谷氨酸释放最近的大约100nm区域)的函数(NMDAR框架与突触后密度密切相关)。AMPA的表达将决定NMDAR的电压依赖性激活(Mg^{2+} 阻断的释放):在本实验中, Mg^{2+} 的不存在假定电压门控已被超越或不需要(存在不依赖或较少依赖于 Mg^{2+} 阻断的NMDAR亚型,例如含有GluN2C、GluN2D和GluN3亚基的亚型:右美沙酮可能在这些亚型中具有活性,因为在静息膜电位时NMDAR通道孔的 Mg^{2+} 阻断不完全)。对于在突触前释放并存在于突触间隙一段给定的时间的给定数量的谷氨酸(例如,残留的环境谷氨酸和星形胶质细胞和EAAT的潜在故障),NMDAR框架将确定(微调特定量的 Ca^{2+} 流入)总 Ca^{2+} 内流量(表观遗传密码)。

[0452] (4) 更一般地,总 Ca^{2+} 内流与到达NMDAR框架的L-谷氨酸浓度和通过EAAT从突触间隙清除谷氨酸的时间常数有关。

[0453] (5) Ca^{2+} 内流的突触后模式决定了对神经可塑性的影响,即LTP和/或LTD,包括总 Ca^{2+} 内流对突触蛋白的相对表达的影响,包括谷氨酸受体组装所必需的那些,包括AMPA,更重要的是NMDAR(参见实施例2):因此,总 Ca^{2+} 内流受NMDAR调节并调节NMDAR。这一工作假设为神经可塑性(LTP/LTD、记忆、连接组、个体性、自我意识)提供了支持,更广泛地说,通过微调的 Ca^{2+} 内流,作为从受孕到死亡的持续过程,为以NMDAR为中心的遗传密码表观遗传调控提供了支持。

[0454] (6) 如果 Ca^{2+} 内流过多,(高浓度/长时间谷氨酸暴露或谷氨酸+PAM或谷氨酸盐+激动剂或谷氨酸清除缺陷),细胞功能受损(包括突触蛋白的产生和因此神经可塑性),并且如果这种过量的 Ca^{2+} 内流量达到一定水平,则细胞可能会发生凋亡(兴奋性毒性)。

[0455] (7) Ca^{2+} 内流(Ca^{2+} 在给定突触处通过不同NMDAR进入的总和)的不同模式调节下游效应。在一些神经元中, Ca^{2+} 流入突触后(以及突触前)神经元的x mEq[例如,x=由阶段性谷

氨酸的EC100确定的 Ca^{2+} 内流的mEq量(例如,1mM,由突触前细胞释放的生理量,或甚至低至6 μM 的量,如本发明人的上面针对GluN2D亚型的ECF表(表29),可以决定完全激活)]决定LTP,即突触强化。在相同的神经元中, Ca^{2+} 内流超过 Ca^{2+} 的x mEq[例如,x=由EC100谷氨酸确定的 Ca^{2+} 内流的mEq量(例如,根据ECF表-上表29-生理性1mM或甚至低至6 μM)],随着时间的推移保持,相反,可能会决定LTD和突触的减弱。NMDAR框架,在不同的神经元和大脑的不同区域以及根据不同的发育阶段(例如,发育转换)而变化,对于确定LTP或LTD至关重要(Sava A, Formaggio E, Carignani C, Andreetta F, Bettini E, Griffante C. NMDA-induced ERK signalling is mediated by NR2B subunit in rat cortical neurons and switches from positive to negative depending on stage of development. *Neuropharmacology*. 2012; 62 (2) :925-932)。

[0456] (8) FLIPR测定中的每个测试细胞系都过表达一种NMDAR亚型。不同的细胞系,例如ARPE-19,表达具有不同密度(NMDAR框架)的所有四种亚型(A-D)(可能还有其他亚型和不同的异构体),需要不同浓度(EC100)的L-谷氨酸来实现类似的 Ca^{2+} 动员效应和下游效应(见实施例2)。

[0457] (9) 最后,突触前NMDAR受体对于它们对响应于刺激的突触前谷氨酸释放量的调节作用也很重要。

[0458] 在每个表达四种不同NMDAR亚型A-D之一的异源细胞系中,研究了右美沙酮和四种其他测试化合物在L-谷氨酸浓度响应曲线(CRC)上的11个浓度中的6个选定浓度(50 μM 、12.5 μM 、3.1 μM 、781nM、195nM和49nM,也示出了0)下对 Ca^{2+} 内流的影响。所有测试的化合物,包括右美沙酮,都显示出不可逾越的特性,这是FLIPR钙测定中NMDAR孔阻滞剂的典型特征,对于所有测试的NMDAR亚型(A-D),右美沙酮的 K_B (M)(受体亲和力的计算估计)在低微摩尔范围内。

[0459] 在相同的FLIPR Ca^{2+} 测定中,本发明人测试了当前FDA批准的NMDAR孔阻滞剂美金刚、氯胺酮和右美沙芬和高亲和力实验性NMDAR孔阻滞剂(+)-MK-801。 K_B 表(表28)报告了在不存在细胞外 Mg^{2+} 的情况下NMDAR结合亲和力的计算估计。

[0460] 尽管所有化合物,包括右美沙酮,都显示出一些NMDAR亚型偏好,但没有一种测试化合物对含有特定GluN2亚基的NMDAR具有选择性。

[0461] 本发明人公开了所有测试的FDA批准的NMDAR阻滞剂和右美沙酮显示出对含有2C亚基的亚型的相对偏好。MK-801是一种高亲和力、耐受性差的NMDAR阻滞剂,反而显示出对含有2B亚基的亚型的偏好。本发明人首次公开了右美沙酮对含有2C亚基的亚型具有偏好(K_B 表--表28)。在同一张表中,本发明人还示出,右美沙酮在测试的亚型之间具有最小的变化性:这也可能是安全性的一个重要特征,如实施例3所示(在MDD有效剂量下的副作用与安慰剂相似)。如上面的ECF表(表29)所示,强直性激活含有2C和2D亚基的亚型所需的谷氨酸浓度非常低,并且因此表明右美沙酮作用在这些亚型中的潜在重要性。

[0462] 在用于治疗MDD的剂量下,临床上耐受性更好的NMDAR通道阻滞剂右美沙酮和右美沙芬对所有亚型显示出微摩尔范围内的 K_B ,而同样用于治疗MDD的氯胺酮对GluN2C显示出纳摩尔的 K_B (与右美沙酮和右美沙芬相比,对GluN2D的亲和力高约5倍),这表明过度阻断GluN2C和/或GluN2D可能会导致认知副作用,正如70%以上接受艾氯胺酮治疗MDD的患者所见的解离效应所表明的那样。

[0463] 考虑到100%是对含有GluN2C的NMDAR的估计%亲和力,然后右美沙酮、右美沙芬、(±)-氯胺酮、美金刚对含有GluN2A的NMDAR的估计的%亲和力分别为51%、13%、11%和8%。

[0464] 美金刚对MDD无效,对GluN2B、GluN2C和GluN2D显示出纳摩尔 K_B 。

[0465] 值得注意的是,所有批准的NMDAR阻滞剂都显示出针对GluN2A亚型的微摩尔 K_B ,但临床上耐受性差的MK-801却不是,这表明这种亚型可能对认知功能特别重要。类似的推理可以应用于MK-801对GluN2B亚型的高亲和力。与GluN2C和GluN2D亚型相比,GluN2a和GluN2B这两种亚型对生理性 Mg^{2+} 阻断高度敏感,因此它们不太可能成为用于通道孔阻滞剂的目标:如果通道已经完全被 Mg^{2+} 阻断,其他孔阻滞剂的影响可能不相关。

[0466] 对MDD有效的三种NMDAR阻滞剂对GluN2B显示微摩尔 K_B ,而对MDD无效的美金刚对GluNB显示纳摩尔 K_B ,但是临床上耐受性差的MK-801对相同亚型也显示低纳摩尔 K_B 。

[0467] 综合这些数据表明,对MDD有效的临床耐受的NMDAR阻滞剂可以优先作用于GluN2C和/或GluN2D亚型,而它们对GluN2A和GluN2B相对保留(spare)。值得注意的是,由于生理性 Mg^{2+} 阻滞,对MDD有效的临床耐受的NMDAR阻滞剂的这种保留效应在体内可能更为相关。

[0468] 正如所料,(+)-MK-801,一种高效力通道阻滞剂,显示出对所有NMDAR亚型的最高估计亲和力,在所有NMDAR亚型已经为781nM的情况下,将L-谷氨酸的%效果降低到小于50%。对于所有测试的NMDAR亚型,(+)-MK801估计的 $K_B \leq 150nM$ 。

[0469] 与其他测试的NMDAR孔阻滞剂相比,右美沙酮显示出最少的 K_B NMDAR亚型偏好。这种相对缺乏NMDAR亚型选择性,同时与2A相比,保持对GluN2C的轻微偏好(右美沙芬、氯胺酮和美金刚共有的特征)也有助于解释优异的耐受性和安全性,在MDD治疗剂量下与安慰剂无法区分(见实施例3)。这种优异的耐受性和安全性特征,在MDD治疗剂量下与安慰剂无法区分,这表明在测试的MDD患者中[实施例3,用SAFER筛选的患者(Desseilles et al., Massachusetts General Hospital SAFER Criteria for Clinical Trials and Research. Harvard Review of Psychiatry. Psychopharmacology, September-October 2013;21 (5) 1-6)],右美沙酮可能仅选择性阻断过度活跃(病理性过度活跃)的NMDAR,而不干扰生理上工作的NMDAR,因此没有副作用,包括缺乏NMDAR阻滞剂的典型的认知副作用(超过70%接受治疗剂量的艾氯胺酮治疗的MDD患者经历“解离症”认知副作用,这表明这种药物确实作用于生理上运行的NMDAR)。GluN2C和2D亚型在低谷氨酸浓度下可能强直性过度活跃(在本发明人的ECF表,表29中可见,与GluN2A和GluN2B相比)。相反,这两种亚型2A和2B更依赖于由高浓度谷氨酸的刺激依赖性突触前释放触发的阶段性刺激(去极化),并且在允许任何 Ca^{2+} 内流之前需要 Mg^{2+} 阻断的释放(Kuner T, Schoepfer R. Multiple structural elements determine subunit specificity of Mg^{2+} block in NMDA receptor channels. J Neurosci. 1996;16 (11):3549-3558)。在存在 Mg^{2+} 阻断情况下,GluN2C和GluN2D强直性 Ca^{2+} 渗透性增强若干倍(Kotermanski et al., 2009),氯胺酮、右美沙芬、美金刚(所有FDA批准的药物)和右美沙酮对这些亚型(特别是本发明人的FLIPR测定公开的特定类型GluN2C)(在不存在 Mg^{2+} 的情况下)的相对偏好,证实了本发明人公开的疾病改善效果的机制的作用。

[0470] 与在较低浓度下对GluN2C(和GluN2D)亚型施加的阻断相比,在较高谷氨酸浓度下,右美沙酮对GluN2A亚型施加的阻断相对较小,这表明相对于生理阶段活性NMDAR,对病

理强直活性NMDAR具有优先作用(见上表和实施例5)。

[0471] 右美沙酮优异的安全性和耐受性的其他可能解释可能涉及右美沙酮与NMDAR相互作用的“开启”和“关闭”以及“捕获”方面(见实施例6):与氯胺酮相比,右美沙酮显示低10倍的GluN-GluN2C NMDAR亚型效力,如本发明人在这些实验中所公开的(实施例1,表28和实施例6,第I部分:与右美沙酮相比,对于1/10氯胺酮浓度而言,实现类似“开”(实施例6,第I部分)右美沙酮在“捕获”方面与氯胺酮相匹配(实施例6,第II部分)。当将该发现与美金刚的较低“捕获”进行比较时,它表明相对较高的“捕获”和相对较低的微摩尔亲和力对于临床MDD中的有效药物和安全的NMDAR通道阻滞剂是两个期望的特征。具有相对较低“捕获”的美金刚(Mealing GA, Lanthorn TH, Small DL, et al. Structural modifications to an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist result in large differences in trapping block. J Pharmacol Exp Ther. 2001; 297 (3): 906-914)不适用于MDD,但与氯胺酮相比,它似乎耐受性相对较好,氯胺酮是一种与美金刚具有相似亲和力但更高捕获的药物。具有高效力和高“捕获”的氯胺酮具有解离作用。具有与氯胺酮类似的“捕获”功能但效力较低的右美沙酮耐受性良好,在治疗剂量下没有认知副作用。

[0472] 此外,在治疗剂量下没有认知副作用(参见实施例3),表明生理NMDAR功能,例如,阶段性Glu2A-D活性不受右美沙酮影响。在实施例6,第III部分中,本发明人示出了在 Mg^{2+} 和低谷氨酸浓度存在下,右美沙酮的作用如何与膜极性相关,类似于由 Mg^{2+} 施加的阻断。这一新颖的公开还解释了右美沙酮缺乏认知副作用:类似于生理 Mg^{2+} ,右美沙酮在静息电位附近效果最好,并从孔中排出,就像在NMDAR激活的电压门控阶段中的 Mg^{2+} 一样。

[0473] 此外,右美沙酮在极低浓度的谷氨酸下,无论有或没有PAM和/或激动剂(实施例5),都可减少 Ca^{2+} 内流,这再次表明,当在 Mg^{2+} 存在下,存在高浓度的谷氨酸时,其作用可能不涉及生理阶段NMDAR功能。因此,在体内这种 Ca^{2+} 内流减少可能与GluN2A和GluN2B亚型无关,因为极低浓度的谷氨酸不会激活AMPA,因此不会缓解 Mg^{2+} 阻断,并且这些亚型在被 Mg^{2+} 阻断时对 Ca^{2+} 不可渗透,但可能与GluN2C和GluN2D相关,因为它们相对独立于(低水平的 Ca^{2+} 渗透性) Mg^{2+} 阻断(Kuner等人,1996; Kotermanski等人,2009)。综上所述,这些发现和观察表明,右美沙酮的作用可能优先用于被低浓度谷氨酸激活的强直性和病理性激活的NMDAR,包括GluN2C和GluN2D(实施例6,第III部分)和/或其他受 Mg^{2+} 阻断影响较小或不受影响的NMDAR亚型(如包含GluN3亚基的亚型)。

[0474] 作为进一步的简化,响应于生理阶段性高谷氨酸浓度所指示的各种刺激而生理地开放和关闭的电压门控NMDAR,可能相对不受右美沙酮通道阻断的影响。此外,右美沙酮的“开启”动力学(几秒钟)对于阻断刺激诱发的 Ca^{2+} 电流而言可能不够快(右美沙酮的这种“开启”时间假设得到实施例6第I部分的支持,以及右美沙酮对不同NMDAR亚型的阻断 Ca^{2+} 内流的排序的支持,其遵循NMDAR的已知动力学 $GluN2D > GluN2C > GluN2B > GluN2A$:在刺激后保持开放更长时间的亚型可能会被更有效地阻断,因此右美沙酮更有效地减少通过这些通道的 Ca^{2+} 内流)(实施例1),右美沙酮阻断活性的罪魁祸首更可能在静息膜电位。因此,右美沙酮对强直性和病理性过度活跃的NMDAR具有潜在的选择性,即,在PAM和其他激动剂存在或不存在的条件下,长期低浓度谷氨酸强直性激活NMDAR,如实施例5中所见,0.04和0.2微摩尔L-谷氨酸,存在或不存在庆大霉素和/或喹啉酸以及不存在 Mg^{2+} 阻断的情况下。

[0475] L-谷氨酸在短时间内的生理浓度(例如,阶段性谷氨酸1mM)(谷氨酸的生理衰减时

间常数为1ms)将相反不受右美沙酮的影响,如右美沙酮缺乏认知副作用所表明的那样以有效治疗MDD(实施例3)的剂量和右美沙酮作用所需的长“起效”(实施例6)。氯胺酮对GluN2C亚型的偏好在纳摩尔范围内,与微摩尔的右美沙酮和右美沙芬相比,这种差异可以解释氯胺酮在MDD治疗剂量下的解离作用。当加入PAM和/或激动剂时,右美沙酮的作用也很明显(参见实施例5)。右美沙酮对 Ca^{2+} 内流下调的影响可能很明显,不仅原因是谷氨酸的突触前重复释放,无论是在PAM存在或不存在的条件下(例如,庆大霉素,实施例5),还是在激动剂物质(如喹啉酸)存在或不存在的条件下,而且当长期谷氨酸细胞外低浓度是由于多种原因导致清除缺陷(例如,通过缺陷性EAAT活性)时,包括星形胶质细胞功能障碍或死亡,包括也可能由兴奋性毒性介导的细胞凋亡,并且因此可以用右美沙酮预防。本文显示的右美沙酮的作用包括以下内容:

[0476] (1) 与FDA批准的NMDA通道阻滞剂氯胺酮、右美沙芬和美金刚类似,右美沙酮发挥不可逾越的NMDAR阻滞作用(实施例1)。

[0477] (2) 右美沙酮在MDD患者中以具有与安慰剂相当的副作用的剂量发挥快速和稳健的治疗效果(参见实施例3),表明对病理性过度活跃的NMDAR的选择性。

[0478] (3) 右美沙酮对MDD的治疗效果在停止治疗后持续存在,超过受体占据(参见实施例3),表明神经可塑性效应持续超过受体占据(包括超过除NMDAR之外的任何受体占据)。

[0479] 从以上几点,本发明人得出结论,至少对于被诊断患有MDD的患者的子集,该障碍可能是由过度活跃的NMDAR引起的过量 Ca^{2+} 内流导致的。这种过多的 Ca^{2+} 内流会损害神经元功能,包括参与情绪状态记忆的选定回路的选定的神经元部分中的突触可塑性(突触蛋白的稳态产生和组装以及BDNF的释放受到损害)(这种在形成新的情绪状态记忆中的损害可能是情绪障碍的决定因素)。非竞争性通道阻滞剂(右美沙酮、氯胺酮、右美沙芬)对过量的 Ca^{2+} 内流的阻断,下调了过量的 Ca^{2+} 内流并恢复了神经元可塑性,包括NMDAR蛋白的合成(实施例2)。当环境刺激到达内啡肽通路内的神经元并恢复突触能力(突触蛋白准备作为功能受体组装和表达,和BDNF准备释放)时,就会产生新的情绪记忆,MDD表型就会消退。NMDAR过度开放可能是由过度刺激引起的突触前谷氨酸释放(例如,心理压力源)和/或谷氨酸清除率降低(EAAT缺陷,星形胶质细胞病理学)或NMDAR过度活跃可能由PAM或激动剂引起的,如实施例5中的庆大霉素,或过量谷氨酸与PAM或诸如喹啉酸的激动剂的组合所示。因此,“过量”谷氨酸的概念可能更多地与生理和阶段性操作期间暴露时间(病理性和强直性激活)有关,而不是与短时间内(例如,1ms)达到的浓度(例如1mM)有关。右美沙酮有效地减少了由PAM庆大霉素(实施例5)(一种已知的耳毒性和肾毒性药物)引起的 Ca^{2+} 内流,因此可以潜在地防止PAM对不同细胞(包括CNS细胞)施加的这些毒性和类似毒性。因此,类似地,在患有MDD(或其他障碍和疾病)的患者的子集中,一种或多种已知(例如,吗啡)或未知的NMDAR的PAM(或激动剂),其可能对与情绪记忆的可塑性有关的神经元具有选择性(例如,阿片类药物),可能与触发或维持障碍或疾病有关。右美沙酮有效地抵消了由PAM和NMDAR激动剂确定的过量 Ca^{2+} 进入(实施例5)。

[0480] 此外,右美沙芬被FDA批准(与奎尼丁联合)用于治疗PBA,这表明至少对于患有假性延髓综合征的患者的子集而言,通过过度活跃的NMDAR引起的过量 Ca^{2+} 内流会损害调节情绪(情感)表达的回路选定神经元部分中的神经功能(包括神经可塑性)中,调节情绪(情感)表达的回路选定神经元部分是情绪“记忆”回路的组成部分。

[0481] 最后,美金刚,也在本发明人的FLIPR Ca^{2+} 测定中测试,发挥与右美沙酮类似的非竞争性(不可克服性)NMDAR通道阻滞剂作用(如本实施例1所示)。美金刚被FDA批准用于治疗中度至重度痴呆,并被认为是可以选择性地调节这些患者的过度活跃的谷氨酸能通路[Cacabelos R, Takeda M, Winblad B. The glutamatergic system and neurodegeneration in dementia: preventive strategies in Alzheimer's disease. Int J Geriatr Psychiatry. 1999 Jan; 14(1): 3-47]。本发明人可以假设至少对于患有阿尔茨海默病的患者的子集,通过过度活跃的NMDAR引起的过量 Ca^{2+} 内流会损害涉及认知记忆方面的选定回路的选定神经元部分中的神经功能(包括神经可塑性)。阿尔茨海默病中的高谷氨酸能状态也与在这些患者中观察到的 β -淀粉样蛋白增加相符(Zott B, Simon MM, Hong W, et al. A vicious cycle of β amyloid-dependent neuronal hyperactivation. Science. 2019; 365(6453): 559-565)。

[0482] 所有上述证据表明,临床上耐受的NMDAR非竞争性通道阻滞剂可能潜在地治疗由NMDAR功能障碍引发或维持的多种疾病和障碍。在所有已知的药物中,右美沙酮可能非常有用,因为其有利的PK和PD曲线,如治疗剂量下实施例3中所示的。发明人首次公开了右美沙酮的疾病改善效果,并提供了解释这些新作用的新机制(实施例1-11)。如发明人所公开的,所有NMDAR通道阻滞剂发挥的共同治疗作用是下调由过度活跃的NMDAR引起的 Ca^{2+} 的过度内流。过量的 Ca^{2+} 内流会损害选定回路的选定神经元部分的神经可塑性机制。虽然NMDAR通道的开放和随后的 Ca^{2+} 内流取决于谷氨酸浓度(如本实施例1所示),但在生理情况下,短时间内(例如,1ms)的高浓度谷氨酸不会导致过量的(病理) Ca^{2+} 内流。另一方面,长期(强直性)低浓度谷氨酸可能相反会随着时间的推移导致过量(病理性) Ca^{2+} 内流,特别是通过未完全电压门控的NMDAR,例如,不是100%由 Mg^{2+} 阻断门控(在通道孔内存在 Mg^{2+} 时的低水平 Ca^{2+} 渗透性)。右美沙酮可能对强直性过度活跃的NMDAR,尤其是NR1-GluN2C和NR1-GluN2D或NR1-GluN3亚型选择性地作用(实施例3,在治疗剂量下没有副作用),包括在一种或多种PAM或激动剂存在或不存在的条件下(实施例5)。

[0483] 此外,在右美沙酮的情况下,本发明人首次表明,拯救神经元可塑性的机制之一是调节选定的NMDAR亚基(增强NR1和NR2A亚基的转录和合成,实施例2)。这一发现不仅有助于解释右美沙酮在治疗、预防和诊断多种疾病和障碍方面的潜在治疗效果,而且还阐明了神经可塑性的基本机制: Ca^{2+} 内流模式不仅受NMDAR调节,而且在反过来调节NMDAR的合成和表达,为由环境(表观遗传)刺激(G+E范式)导向的持续(从受孕到死亡)进化可塑性(包括神经可塑性)的概念赋予分子基础。

[0484] 基于上述证据,本发明人假设神经可塑性(LTP/LTD、记忆、连接组、个体性、自我意识)的共同密码由 Ca^{2+} 的不同模式表示, Ca^{2+} 的不同模式不仅受NMDAR调节,反过来还调节NMDAR。每个随后的刺激(突触前神经元释放谷氨酸)将被突触后神经元以不同方式接收(这将导致不同的 Ca^{2+} 进入模式),因此它将对神经可塑性产生独特的影响。这些 Ca^{2+} 模式的差异(独特)效应在个体的生命周期中不断发生(在任何给定时刻,一系列不同的刺激到达神经元)(每种 Ca^{2+} 内流模式都不同于前一种模式和后一种模式,因为它们对NMDAR框架的影响)并决定了个体不断重塑的连接组(记忆),从而决定了个体性和意识。

[0485] J. 结论

[0486] (1) FLIPR钙测定显示右美沙酮、美金刚、(±)-氯胺酮、(+)-MK801、右美沙芬对含

有GluN1加上GluN2A、GluN2B、GluN2C或GluN2D亚基之一的二异聚人重组NMDAR的不可逾越的特性。还显示了对特定GluN2亚基的不同偏好。

[0487] (2) 右美沙酮充当低亲和力(由计算的 K_B 指示的低微摩尔)非竞争性阻滞剂(不可克服),如实施例1中所见。该发现与实施例2-11中的结果一起表明右美沙酮的选择性用于过度刺激、病理性过度活跃的NMDAR。

[0488] (3) 右美沙酮对由NMDAR引起的 Ca^{2+} 内流的差异调节取决于谷氨酸的浓度(实施例1),这表明对于可能激活NMDAR的其他刺激,包括PAM,包括毒素,包括其他激动剂的类似机制,如实施例5中概述的发现:过度刺激的NMDAR(病理性过度活跃,具有过量的 Ca^{2+} 内流)比生理活性NMDAR更有效地被阻断。右美沙酮(以及可能由发明人公开的其他NAM)可能仅在长时间(强直性)开放的情况下阻断孔,此时来自不同刺激(谷氨酸和PAM和毒素)的总和对 Ca^{2+} 内流的净效应是过度的。

[0489] (4) 与其他测试的NMDAR孔阻滞剂相比,右美沙酮显示出较低的效力和最小的 K_B NMDAR亚型变化性(在本实施例1中)。通过推定仅选择性地阻断过度活跃(强直性和病理性过度活跃)的NMDAR的子集,右美沙酮孔通道阻滞的NMDAR选择性的这种相对缺乏可能有助于(连同上文第1-2点)解释其在有效治疗MDD(实施例3,MDD)的剂量下的优异的耐受性和安全性(与安慰剂无法区分)。

[0490] (5) 尽管有第3点,但存在相对的2C偏好。亚型2C偏好可能表明右美沙酮的活性优先用于病理性和强直性过度活跃的2C亚型[右美沙酮的开启/关闭动力学(实施例6)可能将分子限制于强直性过度活跃的通道,因为生理功能受体的开启/关闭,由去极化和 Mg^{2+} 阻断调节,与秒(例如,NR1-NR2D亚型)相比,以毫秒(例如,NR1-NR2A亚型)测量的速度要快得多(Hansen等人,2018年)]。通过这些亚型中存在相对较低的 Mg^{2+} 阻断,在体内增强了对含有2C和2D亚基的亚型的偏好(Kotermanski和Johnson 2009;实施例6)。此外,右美沙酮的“开启”/“关闭”动力学(实施例6)表明它可能无法影响阶段性运行的NMDAR的更快激活/失活。GluN1-GluN2A、GluN1-GluN2B、GluN1-GluN2C、GluN1-GluN2D亚型的阶段性开放分别为50毫秒、400毫秒、290毫秒和超过2秒(Hansen等人,2018年)。右美沙酮的“起效”在几十秒内测量(实施例6),使得该分子不太可能在刺激触发的阶段性开放期间进入开放通道。然而,在NMDAR通道内存在 Mg^{2+} 的情况下,当GluN1-GluN2C和GluN1-GluN2D亚型(或含有N3亚基的亚型),在静息膜电位下允许过量的 Ca^{2+} 内流时,右美沙酮可能会阻止这种过量的 Ca^{2+} 内流(实施例6)。

[0491] 实施例2

[0492] A. 概述

[0493] 在本实施例的实验研究中,本发明人试图确定(1)人视网膜色素上皮细胞(细胞系ARPE-19)的膜是否表达NMDAR受体亚型(GluN1GluN2A、GluN2B、GluN2C和GluN2D);(2)右美沙酮减轻L-谷氨酸诱导的细胞毒性;(3)右美沙酮调节选定的NMDAR蛋白亚基的转录和合成;以及(4)右美沙酮增加NMDAR的表达。下文中详述的实验表明,右美沙酮上调了NR1亚基,这对NMDAR的膜表达和因此神经可塑性至关重要。

[0494] B. 方法和结果

[0495] 1. NMDAR亚型在ARPE-19细胞中的表达

[0496] 首先,本发明人通过与共聚焦显微镜偶联的免疫荧光评估了五个NMDAR亚基

(GluN1、GluN2A、GluN2B、GluN2C、GluN2D)的表达。

[0497] 将7,500个细胞/孔置于无菌玻璃盖玻片上的24孔板中。第二天,进行免疫荧光分析。使用了以下一抗:抗-NMDAR1A (Abcam,ab68144),抗-NMDAR2A (Bioss,bs-3507R-TR),抗-NMDAR2B (Bioss,bs-0222R-TR),抗-NMDAR2C (Invitrogen,PA577423)和抗-NMDAR2D (Invitrogen,PA5-77425)和山羊抗兔IgG二抗 (GeneTex,GTX 213110-04)。免疫染色细胞的图像(参见图13A-C)通过共聚焦显微镜Zeiss LSM 800使用63X放大倍率获得。Image J软件用于量化荧光信号的强度。

[0498] 2.右美沙酮对谷氨酸诱导的细胞毒性的影响

[0499] 为了确定右美沙酮对L-谷氨酸诱导的ARPE-19细胞的细胞毒性的影响,本发明人进行了细胞活力测定。对于该实验,将ARPE-19细胞接种在96孔板中(7000个细胞/孔)。将它们在37℃的5%CO₂培养箱中放置过夜。第二天,用右美沙酮溶液预处理细胞。六小时后,将所有孔(对照细胞除外)替换为溶解在Tris缓冲对照盐溶液(CSS)中的10mM浓度的L-谷氨酸。5分钟后,彻底冲洗暴露溶液并用标准培养基代替。静置24小时后,通过结晶紫测定实验评估细胞活力。本发明人观察到,在30μM下测试的右美沙酮抵消了观察到的由L-谷氨酸处理诱导的细胞活力降低,如图14所示[它显示了用NMDAR激动剂L-谷氨酸单独(10mM L-Glu)或与右美沙酮联合处理后ARPE-19细胞的细胞活力。与用载体处理的对照细胞相比,***P<0.001(单向方差分析,然后是Tukey的事后检验)]。

[0500] 3.右美沙酮对NMDAR亚基的蛋白质表达的影响

[0501] 本发明人进行了额外的免疫细胞化学研究以确定右美沙酮是否诱导形成NMDAR的选定蛋白质的合成。

[0502] 在这些额外的研究中,7,500个细胞/孔被置于无菌玻璃盖玻片上的24孔板中。第二天,用10μM右美沙酮处理细胞24小时,然后在标准培养基中拯救5天,或连续6天用0.05μM右美沙酮处理细胞。6天后,用上述一抗和二抗进行与共聚焦显微镜联用的免疫荧光分析。

[0503] 结果显示在图15A-C中。暴露于0.05μM右美沙酮6天的ARPE-19细胞显示NMDAR1和NMDAR2A亚基显著增加,而本发明人观察到NMDAR2B表达显著下降。暴露于10μM右美沙酮24小时的ARPE-19细胞也显示出NMDAR1和NMDAR2A的显著增加,尽管与长期孵育观察到的增加相比,这种增加不太显著。NMDAR2B亚基没有随着急性治疗而改变。

[0504] C. 讨论和结论

[0505] 基于本研究的实验工作,表明ARPE-19细胞表达所有测试的NMDAR亚基(NMDAR1、NMDAR2A、NMDAR2B、NMDAR2C和NMDAR2D);右美沙酮可防止ARPE-19细胞中的谷氨酸兴奋性毒性;以及右美沙酮在测试浓度(10μM和0.05μM)下显著上调NR1和NR2A亚基,但没有影响(10μM)或下调(0.05μM)NR2B亚基。

[0506] 观察到的对NMDAR亚基的调节作用可能由右美沙酮非竞争性NMDAR阻断和过量Ca²⁺内流的下调所确定(参见实施例1)。在没有谷氨酸刺激的情况下,本发明人假设由右美沙酮抵消的过量Ca²⁺内流是由光对在ARPE-19细胞膜上表达的NMDAR的激动作用介导的。

[0507] 此外,通过高浓度谷氨酸(10mM)过度刺激的病理性过度活跃的NMDAR引起的过量Ca²⁺进入导致兴奋性毒性,表现为ARPE-19细胞活力降低(如图14所示)。

[0508] 现在在本申请中首次公开,发现右美沙酮在诊断为MDD的患者中发挥快速、持续和稳健的抗抑郁作用(参见下文实施例3)。在突然停止右美沙酮后,MDD的治疗效果似乎比血浆

水平的急剧下降更持久(如实施例3所示),这表明基于神经可塑性的作用机制。

[0509] 并且现在首次在本申请中公开,右美沙酮已显示出差异性地调节ARPE-19细胞中的亚基,包括GluN2C和GluN2D亚基。

[0510] NMDAR亚基的转录和合成的调节,可能导致NMDAR表达的调节(NR1亚基是NMDAR在细胞膜上表达所必需的),可能不仅有助于解释右美沙酮和其他非竞争性NMDAR通道阻滞剂在MDD中治疗作用的作用机制,也可能对NMDAR的生理和病理作用提供重要的见解。本发明人提出, Ca^{2+} 内流的差异模式受谷氨酸(有或没有PAM或其他谷氨酸激动剂)或其他刺激物(例如光)激活的NMDAR调节,并且 Ca^{2+} 内流的这些模式反过来调节NMDAR在细胞膜(NMDAR框架)上的表达。神经可塑性通过NMDAR(神经可塑性的共享表观遗传密码)调节 Ca^{2+} 内流的不同模式和受调节 Ca^{2+} 内流的不同模式。

[0511] 基于他们在ARPE-19中的实验结果,本发明人假设不同的谷氨酸浓度可以如图16所示起作用。

[0512] 选择NR1作为神经可塑性的量度是因为该亚基对于所有NMDAR亚型NR1-NR2A、NR1-NR2B、NR1-NR2C和NR1-NR2D的表达都是必需的。

[0513] 图16的Y轴表示假设值,其中在最低环境刺激(假设)下, $8000 = \text{NR1}$,“例如,暗室,不暴露于光”和0或非常低的nM谷氨酸浓度;在 $0.37\mu\text{M}$ 谷氨酸浓度下, $10000 = \text{NR1}$,在 $1.1\mu\text{M}$ 谷氨酸浓度下, $12000 = \text{NR1}$,直到 $1-10\text{mM}$:在这个谷氨酸浓度附近,特别是当延长时,NR1(作为神经可塑性的量度)开始下降到基线水平(无谷氨酸)并更低。

[0514] 图16的X轴显示不同浓度的谷氨酸(M) $0.001; 0.37\mu\text{M}; 1.1\mu\text{M}; 3.3\mu\text{M}; 10\mu\text{M}; 50\mu\text{M}; 100\mu\text{M}; 300\mu\text{M}; 1\text{mM}; 5\text{mM}; 10\text{mM}; 50\text{mM}; 100\text{mM}$ 。

[0515] 在图16的图例中显示了不同谷氨酸浓度下的X值(谷氨酸 μM)和Y值(假设的)NR1亚基。

[0516] 应该考虑到即使当突触间隙中细胞外谷氨酸的浓度相对较低时,体内 Ca^{2+} 内流量可能是“过量的”(导致兴奋性毒性和神经可塑性机制的停止),例如,通过GluN2C强直性和病理性激活的NMDAR引起的低nM对 Mg^{2+} 阻断相对不敏感。

[0517] 因此,总而言之,(1)右美沙酮差异性地防止谷氨酸诱导的兴奋性毒性;(2)右美沙酮差异性地调节mRNA和NMDAR受体亚基的合成;以及(3)右美沙酮对mRNA的诱导和NMDAR受体亚基的合成因亚型和刺激程度而异。

[0518] 实施例3

[0519] A. 概述

[0520] 本实施例描述了在通过SAFER筛选的MDD患者中两个剂量右美沙酮的2期研究。通过该研究,本发明人证明右美沙酮作为MDD的疾病改善治疗是有效的。特别是,发明人已经确定:(1)右美沙酮在MDD患者中是安全且耐受性良好的,其副作用特征在疾病改善剂量下与安慰剂无法区分,这表明对过度刺激的NMDAR(病理性过度活跃,具有过量的 Ca^{2+} 内流)的选择性作用,同时保留生理活性的NMDAR;以及(2)右美沙酮在停止治疗后至少7天表现出持续(持久)的治疗效果,表明其治疗效果是由于神经可塑性,这种可塑性持续超过右美沙酮占据NMDAR或其他受体的孔通道位点。

[0521] 因此,鉴于(1)NMDAR在LTP、LTD和记忆形成(Baez等人,2018)中的已知作用,包括情绪记忆(根据本实施例3的感兴趣记忆的子集);(2)右美沙酮,特别是NMDAR GluN1-

GluN2C亚型(实施例1)对用于产生突触蛋白(包括GluN2C亚基)的基因激活的影响(实施例2)(通过NMDAR减少过多的 Ca^{2+} 内流来介导);(3)右美沙酮在人类和实验中诱导的神经营养因子增加,包括BDNF;(4)实验性抑郁表型改善;以及(5)本实施例3的2a期研究结果,本发明人首次确定右美沙酮对MDD具有疾病改善效果,因此具有潜在的治愈作用。

[0522] 并且,由于右美沙酮通过NMDAR下调 Ca^{2+} 内流(参见实施例1),进而调节NMDAR(参见实施例2),因此本发明人看到了 Ca^{2+} 内流的不同模式作为神经可塑性、健康和疾病的表观遗传密码的深远影响。

[0523] 此外,鉴于这些新的确定,本发明人还公开这可以通过逆转过量 Ca^{2+} 内流对细胞生理活动损害的影响应用于由在细胞膜上表达NMDAR的选定细胞(包括额外的CNS细胞)中的NMDAR过度刺激/过度活跃和过量 Ca^{2+} 内流引发、维持或恶化的多种疾病和障碍。在神经元的情况下,本发明人表明与神经可塑性(LTP+LTD)相关的细胞功能在体外在分子水平上恢复。这在实验模型(参见实施例2)和患者(参见本实施例3)中都显示出来,而不影响正常(生理)功能的神经元,正如在MDD患者中观察到的治疗有效剂量与安慰剂相当的副作用特征所表明的那样(如本例3所示)。

[0524] B. 右美沙酮在健康和疾病中的启示

[0525] 以上概述的右美沙酮的分子作用可以帮助解释大脑活动,不仅在病理条件下,而且在健康期间,并支持健康和疾病之间连续的概念,过度激活的NMDAR可能触发、维持或恶化不平衡状态。

[0526] 本公开揭示了右美沙酮可以通过优先阻断GluN1-GluN2C病理性过度活跃的NMDAR亚型来保护“正常”健康受试者免受由强烈心理压力引起的潜在CNS损伤(实施例1)。当足够数量的NMDAR在作为离散CNS回路的一部分的足够数量的神经元中病理性过度活跃时,在足够长的时间内(例如,在特定GluN2C亚型的病理性强直性激活期间,例如,可能由压力状况引起),这些神经元和该回路将受损,并特定于受损回路的一系列症状(疾病或障碍)将出现。

[0527] 在“心理健康”(一种不因过度或异常刺激(包括变构调节剂)而改变的平衡心理状态)期间,由刺激的强度和频率(突触前谷氨酸释放)触发的 Ca^{2+} 内流的差异模式由“正常”突触后谷氨酸框架调节。该框架取决于受孕时存在的遗传决定因素[7个基因:GRIN1(具有8个剪接变体)Grin2A、2B、2C2D、3A和3B],同时取决于表观遗传决定因素,从受孕开始不断塑造该框架。由7个基因编码的不同亚基组装成具有强制性NR1亚基(NMDAR膜表达所必需)和2A-D和/或3A-B亚基的四聚体。3A和3B亚基,没有谷氨酸激动剂位点,也可以潜在地替代四聚体结构中的NR1亚基。

[0528] 通过 Ca^{2+} 通道(包括NMDAR)的不同的 Ca^{2+} 内流量是指导细胞翻译和合成活动的表观遗传决定因素,包括在自学习范式中形成突触框架本身(参见实施例2)。环境刺激,通过谷氨酸介导的兴奋性刺激,转化为不同的 Ca^{2+} 内流量。环境刺激从受孕开始(NMDAR通道存在于配子体和受精卵上),然后持续到个体的生命周期并指导NMDAR突触框架(在指导发育的其他表观遗传方向中,它们还指导七个NMDAR基因的转录,如实施例2所示)。从受孕开始,包括子宫内胚胎暴露在内,这种持续暴露于环境刺激(不断转化为细胞中,NMDAR调节的精确的 Ca^{2+} 内流量),不断调节细胞功能并随之自动调节NMDAR框架。由于差异性 Ca^{2+} 模式对突触框架(包括NMDAR表达)的调节作用,即使是相同(同一)的刺激也会产生不同的影响。(差异

效应通常属于生理参数,表现为物种内个体性的巨大差异:NMDAR亚型及其组合的可能变化越多,共享给定的相似NMDAR框架的物种内可能的个体变化性就越大。)这种离子通道(NMDAR)调节的密码(Ca^{2+} 内流的模式)从受孕开始就控制基因的激活,根据与环境的持续相互作用来塑造个体(通过选择哪些基因被激活)。这支持了长期以来的假设,即人类(和其他物种)不仅受到环境的影响,而且我们与环境是一个单元(尽管每个人对该单元的贡献很小)。

[0529] 以下因素之间的相互作用调节 Ca^{2+} 内流的差异模式:(1)环境刺激(转化为突触前神经元上的脉冲,导致突触前轴突谷氨酸释放)和(2)接受突触谷氨酸的突触后(和突触前,Baretta和Jones 1996)框架(在甘氨酸存在下由谷氨酸介导,并由多种PAM和NAM以及可能的其他激动剂调节)。同时(反过来,也就是)相同的NMDAR框架受到 Ca^{2+} 内流的这些差异模式的调节,因此 Ca^{2+} 模式不仅基于当前的刺激[谷氨酸+介质(激动剂)+调节剂(PAM和NAM)],而且还基于过去的环境刺激,包括之前的刺激,精确调节细胞活动。学习/记忆,包括情绪记忆和预测(一种根据过去的经验来制造未来的学习/记忆形式,与回忆相反,一种过去的制造,也基于过去的经验),是结构(突触)神经可塑性的形式,其由环境刺激精确凿刻,转化为 Ca^{2+} 内流模式。这些相同的 Ca^{2+} 内流模式通过不断塑造NMDAR框架来调节环境输入的影响(每种刺激的影响)。右美沙酮,通过下调病理性过度激活的NMDAR中的 Ca^{2+} 内流模式(实施例1,3)决定了神经可塑性(实施例2),包括NMDAR框架的长期修改,例如,神经可塑性效应(突触蛋白和神经营养因子的诱导),其表现出对MDD的治疗作用(如本例3所示)。

[0530] 基于本发明人在体外(实施例1、2、5、6)以及在用右美沙酮治疗的MDD患者(实施例3)中的实验发现,本发明人现在可以假设 Ca^{2+} 内流的差异模式是不仅受NMDAR框架的调节,而且反过来,这些相同的模式随着时间的推移调节和决定NMDAR框架[在个体的生命周期中发生的神经可塑性(LTP和LTD),从受孕到死亡]。右美沙酮通过选定的NMDAR(实施例1)和下游神经可塑性(实施例2)对 Ca^{2+} 内流的调节作用可能对MDD(实施例3)有治疗作用,通过允许细胞恢复神经可塑性机制(突触蛋白的合成和组装,神经营养因子的合成和释放)并通过允许形成新的情绪记忆层,中和或逆转先前的病态情绪记忆及其影响。

[0531] 在睡眠的某些阶段发生的生理LTD(修剪)也可以通过相同的机制来解释:在睡眠的某些阶段发生的 Ca^{2+} 的差异模式受NMDAR表达调节并调节NMDAR表达。右美沙酮的作用在睡眠期间也可能具有治疗作用。

[0532] 记忆形成,包括认知、运动、情感、社交记忆,包括制造的记忆[为预测/期望和在回忆期间构建的记忆(学习,LTP)],由NMDAR依赖性LTP和LTD解释,始于NMDAR调节的 Ca^{2+} 内流的不同模式。在生理环境下, Ca^{2+} 流入的这些差异模式是由刺激诱导的(环境)谷氨酸突触前释放决定的,并导致突触蛋白和神经营养因子转录-合成和组装-表达(例如,AMPA和NMDAR)和释放(神经营养因子)。这种生理记忆形成(LTP和LTD)塑造了连接组(神经元通过突触而连接和解除连接),并且是个体性和意识的基础(见下文)。

[0533] 情绪记忆可能是有意识的:当前情绪,即任何给定时刻的情绪,由现有记忆(连接组)+到达大脑的当前环境刺激(外部和内部)决定,包括身体感觉,通常由物种保持需求主导(危险-压力意识;关于食物和性的想法)。情绪记忆也可能是潜意识的(通过提示可恢复情绪)或无意识的[突触没有结构化(不成熟),无法在给定时间达到意识,但可能在不同时间出现,具体取决于正在进行的(添加-LTP或减去-LTD)神经可塑性和突触的成熟]。

Pontius, A.A (Overwhelming Remembrance of Things Past: Proust Portrays Limbic Kindling by External Stimulus—Literary Genius Can Presage Neurobiological Patterns of Puzzling Behavior. *Psychological Reports*, 73 (2), 1993, pp. 615-621) 很好地描述了对这些情绪记忆结构的预期及其在决定情绪和行为方面的重要性。现在可以根据发明人提供的公开内容重新审视这项工作, 包括右美沙酮和某些开放通道阻滞剂对病理性和强直性过度活跃通道亚型的选择性 (实施例1、3、5) 和/或选定的孔阻滞剂对内啡肽系统的NMDAR通道部分的选择性 (实施例10)。可能表现为选择性神经精神障碍 (包括MDD和相关障碍) 的功能失调的情绪记忆是本公开感兴趣的。

[0534] NMDAR在LTP、LTD中以及因此在记忆形成中的已知作用通过实施例1-11中公开的右美沙酮对NMDAR的作用得到证实: 右美沙酮作用相对于刺激的强度和频率具有选择性和差异性, 并且接受NMDAR框架 (包括激动剂+调节剂的影响), 包括选择性阻断强直性和病理性过度活跃的NMDAR孔通道以及 Ca^{2+} 内流的不同模式对神经可塑性的下游后果。特别地, 所公开的右美沙酮在本文公开的MDD患者中没有认知副作用的治疗效果证实了发明人的假设, 即右美沙酮对由过量 Ca^{2+} 内流导致功能障碍 (无法产生新的情绪记忆: 突触蛋白转录-合成和组装-膜表达和神经营养因子转录-合成和释放) 的细胞表达的过度活跃的NMDAR施加的选择性再平衡作用 (对过量 Ca^{2+} 进入细胞的下调)。通过过度活跃的NMDAR引起的过量 Ca^{2+} 内流导致功能障碍的这些CNS细胞是神经元回路 [在同一患者随时间生理上持续进化 (持续刺激诱导的LTP-LTD) 的回路] 的一部分, 并且是右美沙酮的目标, 并解释了其对MDD的有效性和及其对多种神经精神障碍的潜在有效性, 尤其包括其对MDD相关障碍的有效性。

[0535] 在不受任何理论束缚的情况下, 本发明人相信在MDD患者中的快速治疗效果的原因之一可能是mPFC中的神经元的活化, 例如, 通过诸如BDNF的神经营养因子。在MDD患者中快速作用的另一个可能解释是抑制性中间神经元投射到mPFC的强直刺激中断 (NMDAR阻断)。虽然过度活跃的NMDAR会导致突触后神经元的树突处的神经可塑性机制停止, 但是它们还可以允许沿突触后神经元的轴突到达投射到mPFC神经元的抑制性中间神经元的去极化和电学传输。右美沙酮通过下调 Ca^{2+} 内流, 不仅可以恢复这些过度刺激的神经元中的神经可塑性机制, 还可以降低电学传输, 从而潜在地镇静投射到mPFC神经元的抑制性中间神经元。此外, NMDAR的过度激活可能导致, 具有过度抑制活性的GABA_AR聚集到达选定的神经元, 例如mPFC中的神经元。通常认为, 在长期压力条件下, 抑制mPFC的中间神经元的激活通过减少长期压力期间的主动决策来达到进化 (物种保护) 的目的。在MDD中, 抑制性中间神经元的这种长期过度激活可能反而是右美沙酮潜在地纠正的病理过程的一部分。

[0536] C. 右旋美沙酮调节NMDAR和神经可塑性

[0537] 鉴于上述观察和实验结果, 本发明人假设, 在健康和疾病中, 情绪 (例如满足感、快乐、悲伤、焦虑等) 起源于有意识或潜意识, 甚至无意识的情绪记忆 (情绪回路的神经元部分的LTP和LTD)。这些情绪记忆是谷氨酸通过NMDAR触发的 Ca^{2+} 内流模式进入细胞并确定结构LTP和LTD (这些细胞包括神经回路的神经元部分) 而“习得”的。这些电路在生命周期中通过持续的神经可塑性进行进化, 这种可塑性由通过NMDAR的 Ca^{2+} 内流的不同模式调节。习得的情绪 (情绪是习得的回路, 因为其他习得的神经元回路, 例如认知、运动和社交记忆回路) 是通过刺激驱动的, NMDAR调节的, Ca^{2+} 内流的差异模式编码的 (如上所述, 这些 Ca^{2+} 内流的差异模式也调节调节剂, 即, 通过诱导NMDAR亚基和神经生长因子的产生来调节NMDAR框架, 如

实施例2所示)。几乎所有来自外部环境的刺激,包括通过感觉器官进入的刺激,例如光、声音和其他刺激,都会转化为谷氨酸释放,谷氨酸释放将激活NMDAR,从而触发 Ca^{2+} 内流的不同模式;其他外部环境刺激可能会进入个体的血流,包括pH值,或者可能是由代谢途径形成的分子,并且可能作为NMDAR激动剂或PAM和/或作为NAM。控制情绪及其表现的习得的(神经可塑性)回路(情感状态)可能会受到过度刺激的NMDAR的损害,过度刺激的NMDAR导致过量的 Ca^{2+} 内流模式,其改变细胞及其回路的功能和结构(例如,过量的 Ca^{2+} 内流导致神经可塑性降低-诸如包括NMDAR亚基和BDNF的突触蛋白的转录和产生的降低)。

[0538] 现在,本发明人已经表明,当选定神经元的病理性过度活跃的(过量 Ca^{2+} 内流)NMDAR通道被右美沙酮阻断,并且 Ca^{2+} 内流(内向 Ca^{2+} 电流)被下调时(如实施例1所示),神经可塑性机制[突触蛋白的合成,包括NMDAR亚基(实施例2)和神经营养因子,如BDNF],恢复,并且MDD表型被纠正(实施例3)。

[0539] NMDAR的过度刺激的中断可以在没有药理学NMDAR阻断的情况下发生。例如,在轻度抑郁或焦虑的情况下,触发压力的心理刺激的消除本身会导致突触前谷氨酸释放的突然减少,而这种“过量”谷氨酸释放的减少将下调先前过量的 Ca^{2+} 内流,其对神经可塑性的影响类似于右美沙酮的NMDAR通道阻断引起的 Ca^{2+} 内流减少。结果,细胞恢复神经可塑性活动,形成新的通道,产生和释放BDNF,形成新的“健康”情绪记忆,中和先前的“病态”情绪记忆。这解释了患有MDD和相关神经精神障碍(例如,GAD)的患者的自发恢复,以及在本实施例3中呈现的试验(和其他临床试验)中普遍看到的高安慰剂反应,其中15%和5%接受安慰剂治疗的患者达到分别在第7天和第14天缓解。虽然在本发明人的2a期试验中使用SAFER(以排除可能混淆临床试验结果的患者的子集)能够排除一些更有可能对安慰剂有反应的患者,但并没有排除所有这些患者。

[0540] 神经可塑性(记忆形成)的持续表现遗传重塑由经验决定[环境刺激通过多种方式(不限于感觉器官)到达个体(从受孕开始)],由突触前谷氨酸释放介导,并且由此产生的调节神经元可塑性的 Ca^{2+} 内流差异模式(Ca^{2+} 内流进入突触后神经元的差异动力学)通过在整个生命周期中不断变化的差异NMDAR框架由神经元可塑性调节。NMDAR框架的膜表达中的这种多年变化包括NMDAR的发育转换(Hansen等人,2018年),并且是所有形式的学习(认知、运动、情感和社交记忆/学习)的基础。认知(例如,语言学习)、运动(例如,走路)、情感(例如,满足感)、社交(例如,从作为交流工具的非语言“模仿”开始)记忆在结构和功能上表现为在更多(更强)或更少(更弱)连接的神经元回路中的更强或更弱的突触。这些回路可以更强或更弱,并且可以或多或少地相互连接(连接组的个体性)。因此,记忆(个体性的基础),包括但不限于情感记忆(尽管在本发明人的实验发现中更密切地考虑了情感回路),不断地从有意识到潜意识再到无意识改变(整个生命周期内的个体性和意识变化受持续的LTP和LTD调节)。

[0541] 暴露于特定刺激,通过谷氨酸和/或PAM或NAM,确定由NMDAR调节的 Ca^{2+} 内流的特定差异模式,进而调节NMDAR框架,这将在框架和功能上不断重塑突触(例如,通过突触蛋白的合成和膜表达,以及NGF的合成和释放,包括BDNF)。

[0542] 通过NMDAR的 Ca^{2+} 内流的差异模式是最终确定同一物种的个体之间的差异和相似性的共享密码(同一物种中的个体具有相似的NMDAR框架,并且同一社交中的个体暴露于相似的环境刺激,包括文化刺激,包括类似行为的模仿)。 Ca^{2+} 内流的差异模式代表了用于确定

和解释个体性、意识、习得记忆、情绪等以及物种内部和跨物种的优先交流的表现遗传密码,如下文进一步讨论:

[0543] (1) 个体性:即使对于具有相同NMDAR基因、亚型和异构体的同卵双胞胎,当受精卵分裂成两个独立的胚胎时,差异体验(暴露于环境影响,即暴露于表观遗传影响)开始不同。对环境影响的不同暴露(受精卵和胚胎之外的任何事物)将决定通过NMDAR的 Ca^{2+} 内流的差异模式,差异性地调节发育,包括神经可塑性,并确定同卵双胞胎的CNS个体性(而结构性CNS差异可能难以在人类中证明,众所周知的事实是,同卵双胞胎在出生时具有不同的指纹,这表明差异性环境暴露(及其表观遗传影响)在受精卵分裂后很快就开始了)。突变还可以对胚胎发育产生不同的影响,并解释同卵双胞胎之间的一些差异。

[0544] (2) 意识:学习和回忆习得的记忆,以及不仅回忆的能力,而且基于习得记忆的能力,“推理”、制造、投射和预测的能力;

[0545] (3) 习得记忆:这些记忆包括认知、运动、情感(个人)和社交(集体)回路;

[0546] (4) 个人和社交情感,以及行为、信仰、宗教、政治和文化运动;

[0547] (5) 物种内的优先交流:在细胞膜上表达的类似NMDAR框架(遗传和表观遗传)转化为由类似环境刺激(表观遗传)产生的类似 Ca^{2+} 内流模式,这些刺激产生在生活彼此接触的同一物种的个体中变得可识别和可预测的习得记忆(例如,部落、地方和区域群落以及国家);

[0548] (6) 不同物种之间的优先交流:由亲密关系(例如,人和狗)促进的类似环境刺激(表观遗传)转化为跨NMDAR(遗传和表观遗传)的 Ca^{2+} 内流模式,其产生变得在不同物种的个体之间可识别和可预测的学习记忆。

[0549] 以上所有都是在分子水平上由调节基因表达和神经可塑性的 Ca^{2+} 内流的差异模式确定的学习和记忆形成的示例。结构(突触/连接组)和功能(NMDAR框架起作用)神经可塑性(记忆形成)是外部环境对个体神经系统的持续实时影响,并且由跨NMDAR的 Ca^{2+} 内流的差异模式编码。 Ca^{2+} 内流的相同模式通过调节NMDAR框架来调节自身。 Ca^{2+} 内流的模式作为表观遗传密码。而且,在CNS中,表观遗传密码由通过NMDAR的孔的 Ca^{2+} 内流的差异模式表示。

[0550] 最后,在任何个体的生命周期中,复杂的(但只是表面上混乱的)恒定大脑活动可以最好地理解为环境刺激(表观遗传刺激)通过谷氨酸/甘氨酸(激动剂,介质)和PAM-NAM(变构调节剂)(其门控NMDAR)引起的差异模式的 Ca^{2+} 内流的下游效应的回响(通过多种神经递质)。虽然 Na^{+} 内流通过AMPA受体对NMDAR进行电压门控对于从NMDAR通道的孔中释放 Mg^{2+} 阻断至关重要,但细胞活性(包括基因调控)受 Ca^{2+} 内流的不同模式控制。NMDAR框架是这些 Ca^{2+} 内流的差异模式的调节器(并受其调节)。这些 Ca^{2+} 内流的差异模式作为将环境刺激转化为微调神经可塑性(突触前和突触后)的共享密码,因此负责不断重塑人类和其他物种的连接组(结构记忆)。

[0551] 转化为谷氨酸释放的环境刺激可能首先影响未被 Mg^{2+} (例如,在C和D中)完全关闭的强直活性NMDAR通道和通过低浓度谷氨酸(不能通过AMPA活化释放 Mg^{2+} 阻断,但足够高以产生/增强强直 Ca^{2+} 内流,例如40-200nM)的强直性NMDAR激活的这种生理增强(见于本发明人的实施例1在非常低的谷氨酸浓度下)可以调节神经可塑性机制和产生LTP(突触的成熟:突触蛋白和神经营养因子的产生,树突棘的产生/增强)。然而,如果 Ca^{2+} 内流量,神经可塑性的生理机制可能会被中断。发明人公开的来自实施例1-10的新数据表明右美沙酮对通过

过度活化的NMDAR引起的过量 Ca^{2+} 内流引发、维持和恶化的多种疾病和障碍的疾病改善效果和右美沙酮和发明人公开的相关化合物的潜在治疗、预防和诊断用途。

[0552] 因此,右美沙酮,在以选择性地靶向强直性和病理性过度活跃的NMDAR通道的剂量下是一种耐受性非常好的药物,现在本发明人正在公开它作为一种强大的研究和临床工具,用于了解健康和疾病中的脑功能以及用于预防、治疗和诊断由病理性过度活跃的NMDAR和人类和其他物种的组织、器官和回路的组成部分的特定细胞中过量 Ca^{2+} 内流引起的多种疾病和障碍(以下将在“右美沙酮的启示”部分中讨论)。

[0553] D. 右美沙酮在“疾病”中的启示:MDD患者2a期研究

[0554] 2a期研究着眼于每天向住院的MDD患者口服25mg和50mg的右美沙酮(通过SAFER确认诊断)。

[0555] 1. 方法

[0556] 2a期,多中心,RDBPC 3-组研究评估了右美沙酮的安全性、耐受性和PK,并探索了右美沙酮的两种口服剂量(在本实施例中也称为REL-1017)作为MDD患者的治疗的疗效。患者是18-65岁的成年人,对1(87.1%)、2(11.3%)或3(1.6%)种足够的抗抑郁药物治疗没有反应。纳入试验的患者包括符合TRD标准的患者。筛选期后,62名患者($\bar{x}$ 年龄=49.2岁, $\bar{x}$ HAMD 评分=25.3, $\bar{x}$ MADRS 评分=34.0)以1:1:1的比例随机分配至安慰剂或右美沙酮)以25mg QDay或右美沙酮50mg QDay,除了他们正在进行的SSRI、SNRI或安非他酮治疗(具体而言,62名患者正在服用氟西汀、帕罗西汀、舍曲林、依他普仑、西酞普兰、安非他酮、沃替西汀、文拉法辛和度洛西汀中的一种或多种)。右美沙酮组的患者接受一次75mg (25mg组)或100mg (50mg组)的负荷剂量。所有患者均完成了为期7天的住院治疗,并在2天后出院,并在第14天和第21天返回进行随访。在第2、4、7和14天使用MADRS、SDQ和CGI量表评估潜在疗效。安全量表包括用于拟精神病症状的4-PSRS、用于解离症状的CADSS、用于戒断体征和症状的COWS以及用于自杀的CSSRS。所有62名随机患者都是ITT人群分析的一部分。

[0557] 本研究中患者的筛查和给药示意图如图17所示。如下表30所示,患者的性格、人口统计学特征和MDD严重程度均匀分布在各组中。如下表30所示。

[0558] 表30

[0559]

	安慰剂	REL-1017 25 mg	REL-1017 50 mg	所有受试者
随机受试者	22	19	21	62
完成所有访问 (第 21 天)	20	18	19	57
接受所有剂量	21	19	21	61
年龄: 平均岁数 (SD)	49.7 (11.1)	49.4 (12.4)	48.6 (10.9)	49.2 (11.3)
女性	11 (50%)	8 (42.1%)	9 (42.9%)	28 (45.2%)
受试者 ITT	22	19	21	62
受试者 PPP	21	19	21	61
筛选 HAMD-平均 (SD)	25.6 (3.5)	25.1 (3.5)	25.0 (3.8)	25.3 (3.6)
基线 MADRS-平均 (SD)	33.8 (4.0)	32.9 (6.0)	35.2 (3.9)	34.0 (4.7)

[0560] 此外,2期研究中的患者在之前的抗抑郁治疗中经历了失败。每组失败的先前抗抑郁治疗的次数显示在下表31中。

[0561] 表31

[0562]

	安慰剂 (N=22)	REL-1017 25mg (N=19)	REL-1017 50mg (N=21)	所有受试者 (N=62)
% 关于 ATRQ 的%受试者	22 (100%)	19 (100%)	21 (100%)	62 (100%)
先前治疗失败的总数量				
1	21 (95.5%)	17 (89.5%)	16 (76.2%)	54 (87.1%)
2	1 (4.5%)	2 (10.5%)	4 (19.0%)	7 (11.3%)
3	0	0	1 (4.8%)	1 (1.6%)

[0563] 图18显示了治疗出现的不良事件表(总体概述性安全人群)。图19A和19B显示了按系统器官类别和首选项安全人群划分的治疗出现的不良事件表。图20显示了按系统器官类别和首选项安全人群划分的特殊关注不良事件(AESI)表。

[0564] 2.结果

[0565] 来自该2a期研究的数据显示出非常积极的疗效结果,对于所有施用的抑郁量表具有高度统计学意义的p值,具有大的效应值,快速的疗效(疗效的第一个信号出乎意料地开始于25mg剂量的第2天,并且第4天25mg和50mg两种剂量均具有统计学意义)和持续疗效(持久/持久且具有统计学意义和临床意义的治疗效果和大效应值)持续在为期1周的疗程突然停止后的至少1周。

[0566] 该研究还证实了在1期研究中观察到的右美沙酮良好的安全性、耐受性和PK特征。与安慰剂组相比,REL-1017(右美沙酮)组患者出现轻度和中度AEs,没有SAEs,相关器官组AE的发生率没有更高。没有证据表明治疗诱导的拟精神病和解离性AEs或麻醉作用或戒断体征和症状。没有证据表明有临床意义的QTc延长,延长定义为 ≥ 500 毫秒或比基线增加60毫秒。与安慰剂组的患者相比,右美沙酮25mg和50mg组的患者在所有疗效量度(包括MADRS、CGI-S量表、CGI-I量表和SDQ)都经历了快速(从第2天开始)、持续(直至第14天,最后一次疗效评估)和具有统计学意义的具有大效应值的显著改善。25mg组第2天出现MADRS改善,第4天右美沙酮两个剂量组均具有统计学意义,并持续至第7天和第14天(治疗停止后7天), P 值 <0.03 ,效应值为从0.7至1.0。CGI和SDQ量表也出现了类似的发现。

[0567] 在该研究期间,临床医生给予的解离状态量表评分显示在图21中。并且图22和23显示了第1天时按剂量水平(25mg或50mg)的右美沙酮的血浆浓度(图22),以及两种剂量水平下右美沙酮的谷血浆浓度水平(图23)。这两个图中显示的结果与第一阶段的研究结果一致。

[0568] 此外,与50mg剂量相比,25mg剂量具有更好的功效。该药物在有效剂量下具有良好的耐受性,其副作用与25mg剂量的安慰剂治疗的患者相当,并且表明与安慰剂和25mg剂量相比,50mg剂量的副作用发生率更高。诊断为MDD并通过SAFER筛查的患者的安慰剂反应(MADRS上为-7.4分)低于典型可见的安慰剂反应(MADRS上通常为-9-12分)。此外,独立于安慰剂效应,反应幅度(-17.8)大于典型可见值(通常为-12-14)。图24显示从第4天到第14天,治疗组中的MADRS评分与安慰剂相比具有统计学上的显著差异。图25显示了症状缓解者的百分比--MADRS<从基线的50%降低。

[0569] E. 安全性和耐受性发现

[0570] 研究结果证实了在1期SAD和MAD研究中观察到的良好耐受性和安全性。这些包括:(1)仅轻度和中度AE-无SAE;(2)与安慰剂相比,治疗组中特定相关器官组AEs的发生率没有增加;(3)与安慰剂相比,没有证据表明治疗组中治疗引起解离症状;(4)与安慰剂相比,没有证据表明治疗组中治疗引起了拟精神病症状;(5)与安慰剂相比,没有证据表明治疗组中有阿片类药物戒断症状。

[0571] F. 疗效发现

[0572] 右美沙酮25和50mg在MDD患者中显示出快速起效和持续的抗抑郁疗效,与安慰剂相比,在所有疗效量度上具有统计学上的显著差异。这些包括:(1)MADRS上的可靠疗效结果, P 值 <0.03 ,第4天至第14天的效应值较大(0.7-1.0);(2)CGI-S和CGI-I的可靠结果与MADRS结果一致, P 值和效应值大小相似;(3)SDQ评分从第4天到第7天具有中等效应值差异($d=0.4$ 和 0.5),并且对于25mg($P=0.0066$; $d=0.9$)和50mg($P=0.0014$; $d=1.1$)组在第14天具有统计学显著差异和大效应值;(4)起效快,抗抑郁疗效持久;(5)支持右美沙酮作为MDD单一疗法的持续临床开发和强烈预示功效的发现。

[0573] G. 讨论和结论

[0574] REL-1017 (右美沙酮) 25和50mg证实了非常有利的安全性、耐受性和PK曲线。出乎意料的是,由REL-1017 (右美沙酮) 25和50mg诱导的MDD患者的反应和缓解是快速的、具有统计学意义的、具有大效应值的、具有临床意义的并且在停止治疗后持续存在。右美沙酮在第14天(最后一次治疗剂量后1周)观察到MDRS、CGI-S量表、CGI-I量表和SDQ的多个维度的持续改善,其血浆水平不会导致有效的NMDAR占用,表明以前从未显示过的疾病改善效果和作用机制。因此,这项研究的发现首次表明,右美沙酮代表了对于MDD和相关障碍(例如,由选定细胞中过量 Ca^{2+} 内流引起的其他障碍)的疾病改善治疗,而不仅仅是一种仅限于受体接合的对症治疗。除了右旋美沙酮作为MDD的辅助治疗的疾病改善效果外,结果强烈表明,右美沙酮作为MDD和相关障碍的单一疗法的相似作用。

[0575] 该2a期研究的出乎意料的疗效结果得到了作用机制及其下游效应的发现的证实(如本发明人在本文实施例1-11中所公开的),连同在整个本申请中呈现的其他证据表明:

[0576] (1) 在至少患者的子集中(诊断为MDD并使用SAFER标准进一步筛选),该障碍是由参与情绪处理的选定回路的选定神经元部分中过量 Ca^{2+} 内流引起和/或维持的。

[0577] (2) 右美沙酮的临床效果比受体占据长久,因此可能是由于神经元功能的恢复,包括突触蛋白和神经营养因子的合成以及神经可塑性的恢复和神经元回路修复。

[0578] (3) 25mg剂量导致右美沙酮血浆水平约为50-150ng/ml或浓度约为150-500nM,与50mg剂量、150-450ng/ml或大约500-1300nM的浓度获得的血浆水平产生的治疗效果相比,治疗效果可能更强且起效更快。该信号表明,对于一般患者而言,较低浓度的右美沙酮足以阻断导致过多 Ca^{2+} 内流和MDD的病理性过度活跃的NMDAR通道,并且每日口服剂量高于25mg可能在对大多数MDD患者中对于达到治疗效果并不是必需的。

[0579] (4) 发明人对2a期研究数据进行了额外的子分析。子分析涉及BMI、剂量、反应(下表32,下文)和血浆水平。有趣的是,CDC根据BMI定义为正常或超重的患者对25mg右美沙酮的反应非常好,而那些定义为肥胖(BMI 30或以上)的患者反应不充分。然而,出乎意料的是,在25mg和50mg两个剂量组中,血浆水平都不随BMI变化。施用较高右美沙酮剂量50mg的正常和超重患者的反应不如施用25mg的相同BMI的患者充分。此外,施用50mg的肥胖患者的反应比施用25mg的肥胖患者好得多。然而,如上所述,即使使用50mg剂量,血浆水平也不随BMI变化。下面的表32-34说明了BMI对临床结果和血浆水平的影响。

[0580] 表32: CDC BMI定义: 正常(NL 18.5-24.9)、超重(OW 25-29.9)、肥胖(OB 30及以上); DM ng/ml = 右美沙酮血浆水平

[0581]

25 mg	BMI	MADRS CFB day 7	DM ng/ml days 7/14	MADRS CFB day 14
N=4	NL	21.75	77/5	15.6
N=12	OW	16.91	115/14	17.8
N=3	OB	8.6	113/14	7.6
50 mg	BMI	CFB day 7	ng ml 7/14	CFB day 14
N=6	NL	19.5	205/22	24.75
N=7	OW	15.3	120/7	12
N=8	OB	15.7	194/18	21.1

[0582] 表33:所有患者的中值BMI 28.6

[0583]

25 mg	BMI	MADRS CFB day 7	DM ng/ml days 7/14	MADRS CFB day 14
N=12	低于中值	19.6	113/15	17.6
N=7	高于中值	13.3	101/9.4	13.4
50 mg	BMI	CFB day 7	ng ml 7/14	CFB day 14
N=10	低于中值	16.6	209/17	15.4
N= 11	高于中值	16.7	200/22	20.8

[0584] 表34

[0585]

第 7 天 (25mg)
BMI 低于中值: 安慰剂 vs 25mg* (p 值=0.0464)
BMI 低于中值: 安慰剂 vs 25mg*NS (p 值=0.5234)
第 14 天 (25mg)
BMI 低于中值: 安慰剂 vs 25mg* (p 值=0.0460)
BMI 高于中值: 安慰剂 vs 25mg*NS (p 值=0.3786)
第 7 天 (50mg)
BMI 低于中值: 安慰剂 vs 50mg*NS (p 值=0.1171)
BMI 高于中值: 安慰剂 vs 50mg*NS (p 值=0.1357)
第 14 天 (50mg)
BMI 低于中值: 安慰剂 vs 50mg*NS (p 值=0.1675)
BMI 高于中值: 安慰剂 vs 50mg* (p 值=0.0143)

[0586] 发明人已经对右美沙酮及其异构体进行了几十年的研究。特别是,发明人之一,

Charles Inturrisi,先前已经定义了血浆蛋白在美沙酮及其异构体在药理学中的作用[Inturrisi CE,Colburn WA,Kaiko RF,Houde RW,Foley KM.Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methadone in patients with chronic pain.Clin Pharmacol Ther.1987;41(4):392-401]并研究了饮食对美沙酮代谢的影响,与长寿饮食相比,西方饮食患者的美沙酮清除速度更快[Wissel PS,Denke M,Inturrisi CE.A comparison of the effects of a macrobiotic diet and a Western diet on drug metabolism and plasma lipids in man.Eur J Clin Pharmacol.1987;33(4):403-407]。

[0587] 某些药物(包括美沙酮)的CNS渗透由 α -1-糖蛋白(AAG)的水平决定的[Jolliet-Riant P,Boukef MF,Duché JC,Simon N,Tillement JP.The genetic variant A of human alpha 1-acid glycoprotein limits the blood to brain transfer of drugs it binds.Life Sci.1998;62(14):PL219-PL226]。外消旋美沙酮及其异构体主要与AAG结合,特别是血清类黏蛋白2A变体[Eap CB,Cuendet C,Baumann P.Binding of d-methadone,l-methadone,and dl-methadone to proteins in plasma of healthy volunteers:role of the variants of alpha 1-acid glycoprotein.Clin Pharmacol Ther.1990 Mar;47(3):338-46;Hervé F,Duché JC,d'Athis P,Marché C,Barré J,Tillement JP,Binding of disopyramide,methadone,dipyridamole,chlorpromazine,lignocaine and progesterone to the two main genetic variants of human alpha 1-acid glycoprotein:evidence for drug-binding differences between the variants and for the presence of two separate drug-binding sites on alpha 1-acid glycoprotein.Pharmacogenetics.1996;6(5):403-415]。AAG水平影响美沙酮在临床前实验设置中的作用[Garrido MJ,Jimenez R,Gomez E,Calvo R.Influence of plasma-protein binding on analgesic effect of methadone in rats with spontaneous withdrawal.J Pharm Pharmacol.1996;48(3):281-284]。戒断患者的AAG升高,游离美沙酮降低[Garrido MJ,Aguirre C,Trocóniz IF,Marot M,Valle M,Zamacona MK,Calvo R.Alpha 1-acid glycoprotein(AAG)and serum protein binding of methadone in heroin addicts with abstinence syndrome.Int J Clin Pharmacol Ther.2000 Jan;38(1):35-40]。最后,肥胖患者的 α -1-糖蛋白水平增加,即 α -1-糖蛋白水平受饮食影响[Benedek IH,Blouin RA,McNamara PJ.Serum protein binding and the role of increased alpha 1-acid glycoprotein in moderately obese male subjects.Br J Clin Pharmacol.1984;18(6):941-946]和饮食影响美沙酮PK(Wisseletal.,1987)。此外,美沙酮的游离部分不受美沙酮升高的浓度或者也与AAG结合的其他药物的置换的显著影响[Abramson FP.Methadone plasma protein binding:alterations in cancer and displacement from alpha 1-acid glycoprotein.Clin Pharmacol Ther.1982;32(5):652-658]。

[0588] 基于以上第(3)和(4)点,以及在整个申请中公开的其他数据以及发明人关于美沙酮及其异构体特别是右美沙酮的共享知识,发明人公开了右美沙酮的治疗窗比它的安全窗更窄,这在发明人的第2a期研究和随后对第2a期数据的深入分析之前是一个未知事实。此外,该治疗窗可以通过测量游离右美沙酮水平和/或测量AAG和/或其变体来更好地定义,而不是通过测量总血浆水平(在这一预料不到的发现之前,一直这样做)。此外,右美沙酮对

MDD和相关障碍以及可能地对其他神经精神疾病的治疗游离水平(therapeutic free level)(约为总血浆水平的10%)定义在5-30ng/ml或大约15-100nM的范围内。此外,发明人公开了右美沙酮对MDD的潜在治疗效果可能是由于其代谢物,特别是EDDP。本发明人相信(基于本文的数据)进一步研究会发现游离右美沙酮水平和EDDP水平与治疗反应之间的直接相关性,并且会发现AAG水平和治疗反应之间的反相关。

[0589] 继续从上述点(1)-(4)的列表,从发明人的工作中获得的结论--第2期研究的结果,以及本文提出的其他实施例和证据也表明:

[0590] (5)可能有被诊断患有MDD的患者不太可能对阻断选定回路的选定神经元部分中过量 Ca^{2+} 内流的药物产生反应。基于本发明人的第2期试验中的低安慰剂反应和稳健的疗效结果,SAFER筛选工具可能有助于筛选出不太可能对选择性下调过量 Ca^{2+} 内流的药物(如右美沙酮)产生反应的MDD患者。这种SAFER筛查作用可以帮助研究人员和临床医生更好地定义MDD的子集,MDD具有由过量 Ca^{2+} 流入神经元触发和/或维持的障碍,该神经元是情绪处理回路(情绪记忆回路)的一部分。

[0591] (6)用右美沙酮治疗的受试者和患者的结果可以帮助研究人员和医生不仅定义神经精神障碍的子集,而且还定义代谢(例如,糖尿病、NAFLD-NASH、骨质疏松症)、心血管(例如,心绞痛、CHF、HTN)、免疫、炎症、感染、肿瘤、耳科和肾脏障碍的子集,其中上述障碍是由谷氨酸和/或PAM和/或激动剂对NMDAR的过度激活所决定的选定神经元或其他细胞群中的过量 Ca^{2+} 内流引发、维持或恶化的。

[0592] (7)除了在有效剂量下不存在副作用外,右美沙酮对病理性过度活跃的NMDAR的选择性还通过在2a期研究中观察到的不存在戒断(体征和症状)来表示。通过直接作用于受体或受体通路发挥临床作用的药物,诸如阿片类药物、苯二氮平类药物、多巴胺能药物或抗多巴胺能药物甚至SSRIs[Henssler J,Heinz A,Brandt L,Bschor T.Antidepressant Withdrawal and Rebound Phenomena.Dtsch Arztebl Int.2019;116(20):355-361]通常会在突然停药后导致临床上有意义的戒断体征和症状。NMDAR在脊椎动物之间共享的事实[Teng H,Cai W,Zhou L,Zhang J,Liu Q,Wang Y,et al.(2010)Evolutionary Mode and Functional Divergence of Vertebrate NMDA Receptor Subunit 2 Genes.PLoS ONE 5(10)]也表明了右美沙酮对于治疗由NMDAR过度激活引发、恶化或维持的多种家畜疾病和障碍的潜在治疗用途。

[0593] 此外,本发明人的工作还公开了体外结果,表明右美沙酮可以潜在地调节炎症性生物标志物,该炎症性生物标志物在包括MDD和TRD的神经精神疾病和障碍中,和在诸如痴呆的包括阿尔茨海默病的神经退行性疾病中以及在诸如自闭症谱系障碍的神经发育疾病和帕金森病,以及诸如分裂症的其他神经精神疾病和障碍中是异常的。右美沙酮的这些潜在抗炎作用可能是由于右美沙酮对NMDAR的阻断(表明由免疫细胞(包括神经胶质免疫细胞)表达的NMDAR的潜在NMDAR阻断),并且也可以有助于解释其对多种神经精神障碍、代谢障碍、心血管障碍、炎症、免疫疾病和肿瘤疾病的疗效。鉴于右美沙酮作为非竞争性NMDAR通道阻滞剂的已知作用机制,右美沙酮的这些抗炎作用可能是下调调节免疫细胞中过量 Ca^{2+} 内流的作用。

[0594] 本发明人已经通过一组患有MDD并用右美沙酮治疗的患者中的标志物的临床测量证实了实施例11中详述的抗炎体外作用(也参见下文的实施例7)。本发明人假设这些对炎

症标志物的影响是由右美沙酮调节在选定的神经元和免疫细胞(包括神经胶质细胞)的细胞膜上表达的NMDAR引起的。用右美沙酮治疗的神经精神障碍患者中的炎症标志物的调节可能是由于右美沙酮对免疫细胞效应(免疫记忆的调节)的影响,这反映了神经元对不同类型记忆(认知、情绪、运动记忆)的可见影响,并由BDNF和突触蛋白的增加介导。如果右美沙酮能够改善免疫细胞的功能(例如,免疫记忆和炎症反应),那么在适当的剂量下,它可能对受失调的免疫系统影响的疾病和障碍(包括炎症性障碍、自身免疫性障碍和肿瘤疾病)等具有治疗作用。

[0595] 除了该实施例3中呈现的关于右美沙酮作为MDD患者的辅助治疗的结果之外,本发明人还公开了MDD患者的右美沙酮单药治疗。右美沙酮的作用在患有MDD和同时进行抗抑郁治疗的患者中非常稳健,表明右美沙酮不仅对与MDD相关的CNS异常而且对可能与MDD治疗相关的CNS异常具有潜在的治疗作用(如本实施例3所示)。换言之,右美沙酮对具有病理性过度活跃的NMDAR的选定神经元中过多的 Ca^{2+} 内流所施加的下调可能在有或没有同时进行神经药理学治疗的情况下发生。

[0596] 本发明人假设右美沙酮对过量 Ca^{2+} 内流的选择性调节作用对于尚未接受可能改变CNS神经递质通路的治疗的患者可能特别有用。此外,发明人公开了可以成功地结合右美沙酮和行为心理疗法。

[0597] 如前所述,由于担心滥用倾向和担心QTc延长和心律失常,右美沙酮并未被认为是潜在的安全和有效药物。在该实施例3中,本发明人现在提供了对抗这些关注的附加数据。特别是,实施例3的数据显示认知和呼吸功能缺乏阿片类药物影响(麻醉作用),并且没有一些NMDAR通道阻滞剂(例如MK-801、PCP和氯胺酮)的典型的解离和/或迷幻作用。此外,在突然停药后,阿片类药物戒断(用COWS测量)没有临床意义的体征和症状。来自实施例3的数据也证实了右美沙酮的整体心脏安全性和缺乏临床意义的QTc延长。

[0598] 实施例6(电生理测试以确定“开启”和“关闭”速率和“捕获”)和实施例3(除了在治疗剂量下没有麻醉副作用外,没有拟精神病和迷幻副作用)表明右美沙酮在选定的过度活跃的NMDAR通道的膜内MK-801位点提供的非竞争性阻断允许细胞恢复生理性脑功能所必需的生理性LTP细胞活动(例如,突触蛋白的产生和组装以及BDNF的产生和释放)。

[0599] 本发明人的临床和实验数据的公开强烈表明对MDD、相关障碍和其他障碍的新的病理生理学理解。这种新的病理生理学理解可能治疗、预防和诊断策略--甚至对新治疗剂的开发产生深远而直接的影响。通过选择性靶向过度活跃的离子通道(例如,NMDAR),而不干扰生理活性NMDAR,在治疗剂量下,如实施例1-11中概述的没有拟精神病副作用和非常好的耐受性概况以及快速、稳健和持续的药效以及作用机制所强调的,右美沙酮潜在地恢复神经元和回路的功能,从而导致、触发、维持和/或恶化神经精神和其他障碍。

[0600] 艾氯胺酮的类似作用机制(NMDAR阻断)已被披露,最近被FDA批准用于TRD。然而,艾氯胺酮(和氯胺酮)提供的阻断虽然对治疗MDD/TRD有效,但似乎对过度活化的NMDAR没有选择性(或者如果具有选择性,则该阻断没有实质上有用的实施例6中公开的“开启”/“关闭”和/或相关“捕获”性质),因为艾氯胺酮和氯胺酮引起强烈的拟精神病症状(解离作用),这是高亲和力非竞争性通道阻滞剂的典型特征,也见于竞争性NMDAR通道阻滞剂,表明氯胺酮和艾氯胺酮对生理NMDAR的信号干扰。

[0601] 右美沙酮在NMDAR上的独特作用[例如,对不同NMDAR亚型A-D的更均匀影响,偏爱

GluN1-GluN2C亚型(实施例1)],其在通道孔处的特定“开启”-“关闭”动力学和“捕获”特性,和在存在生理量的 Mg^{2+} (实施例6)或其对其他受体的亲和力(实施例10)的情况下对GluN1-GluN2C亚型的偏好,对于选择性靶向和阻断选定CNS回路中病理性过度活跃的NMDAR和其他受体可能是“恰到好处”,重要的是,它的特性对于在生理活动(例如,阶段性谷氨酸能传递)期间解除NMDAR通道的阻断可能是“恰到好处”。

[0602] 行为心理治疗与右美沙酮的结合可能是治疗神经精神疾病和障碍的一种非常有效的策略:右美沙酮及其分级选择性阻断,允许心理治疗诱导的“健康”神经可塑性发生在细胞中,在用右美沙酮治疗之前,该细胞表现出病理性过度活跃的NMDAR通道和对刺激(包括心理治疗的积极刺激)无效的回路(在MDD的情况下是一个情绪记忆回路),否则可能会导致治疗性神经可塑性效应。换句话说,被具有病理性过度活跃通道的神经元损害的情绪记忆回路对心理治疗无效[也可能对减压(即有利的)生活经历无效,如MDD中的情况];另一方面,同样的回路,现在显示以前过度活跃的NMDAR的细胞现在被右美沙酮阻断(阻断过量的 Ca^{2+} 内流),可能为心理治疗诱导的“健康”神经可塑性(LTP)提供肥沃的地块(突触蛋白和BDNF的产生)。

[0603] NMDAR亚型2A-D在细胞膜(NMDAR框架的一部分)上的差异细胞表达解释了经验驱动的谷氨酸从突触前细胞的释放(有或没有PAM或其他激动剂的作用)如何决定特定模式 Ca^{2+} 的流入,其然后将会对转录(mRNA的诱导)和蛋白质合成及蛋白质组装产生下游效应(例如,CaMKII介导),其调节突触活性和强度(在用于学习和记忆形成的LTP和LTD的基础上),包括通过其他神经递质产生的回响效应。所有这些影响最终决定了个体生命周期中不断的连接组进化/退化(重塑)。基于本发明人的临床前体外和体内数据以及临床数据,NMDAR调节并且受 Ca^{2+} 内流的不同模式调节。

[0604] 神经元之间的通讯,对于连接组的不断重塑是必不可少的,由突触前作用(由兴奋的突触前神经元释放的经验驱动的突触前谷氨酸-包括内源性或外源性PAM(例如,多胺、庆大霉素)的NMDAR调节,或激动剂(例如喹啉酸))和突触后作用确定:差异表达的NMDAR亚型的NMDAR通道开放导致 Ca^{2+} 内流的不同模式和下游效应,包括神经可塑性效应,包括NMDAR框架的效应,包括CaMKII介导的效应。

[0605] 因此,突触前细胞的谷氨酸释放导致严格调节的 Ca^{2+} 流入持续一段时间,这取决于差异性突触后NMDAR框架(例如,NR1-2A-D、NR1-3A-B和它们的潜在三-异聚化变体)。在以下方面存在亚型依赖性差异:(1)失活动力学(GluN2D是最慢的-当2D受体被激活时允许钙内流的时间更长-而GluN2A是最快的——当这些通道被谷氨酸激活时允许钙内流的时间更短),以及(2)所有四个GluN2亚基的电压依赖性 Mg^{2+} 阻断强度[2D和2C的 Mg^{2+} 阻断强度最低,因此它们的开放可能由非常轻微的去极化触发,甚至可能在没有膜去极化的情况下自发发生和由低环境浓度的激动剂(例如,谷氨酸或喹啉酸)在突触间隙触发]。其他亚型对PAM、 Mg^{2+} 阻断和 Ca^{2+} 渗透性的抗性各不相同,包括包含NR1亚基的剪接变体(同种型)的亚型或三-异聚体的亚型(例如,NR1-NR2A-NR2B)和/或包括NR3A-B亚基的亚型。

[0606] 右美沙酮,通过以允许恢复生理细胞活性的方式相互作用和选择性地调节病理性过度活跃的NMDAR通道[右美沙酮的“开启”速率仅在通道病理性过度活跃时允许其通道阻断,而“关闭”速率(和受体相互作用“捕获”特性)允许右美沙酮的排出(类似于 Mg^{2+} 的排出)并在生理条件下(例如,环境刺激)恢复细胞离子流和相关的细胞活性]。

[0607] 右美沙酮,一种耐受性非常好的NMDAR通道阻滞剂,具有独特的差异性受体亚型阻断特性(实施例1)和恰到好处的“开启”/“关闭”和“捕获”动力学(实施例6),以及有或没有与PAM和激动剂(实施例5)作用,对突触蛋白诱导、组装和释放的影响(实施例2)和对过度活化的病理性过度活跃的NMDAR的选择性(实施例3),并且因此选择性下调过度 Ca^{2+} 内流,现在(由于本文公开的发明人的工作)表明自己是“同类中最好的”(新出现的一类非竞争性NMDAR阻滞剂),用于治疗患者、用作健康受试者的研究工具(记忆生理学)和用于预防、治疗和诊断患有与NMDAR过度活动相关的多种障碍的患者。

[0608] 右美沙酮可能会促进对严格调节(通过突触前细胞的差异刺激和突触后细胞上NMDAR 2A-D的差异细胞表达来调节)的 Ca^{2+} 内流模式作用的理解的进展。这些 Ca^{2+} 内流模式可能代表了允许连接组不断地重塑自身(突触、LTP和LTD的进化和退化)的共享(跨物种)密码。突触的加强和形成是记忆和学习的基础,包括情绪的学习和社交交往的学习,包括事件和人际关系的情感参与,或者甚至对宗教和政治运动的参与,从而导致从自我协调/社交协调(“心理健康”)的行为和活动 and 情绪到自我不协调/社交不协调(“精神不健康”)的破坏性和病态的行为和活动 and 情绪,是个人和社交痛苦的来源。因此,由谷氨酸触发的 Ca^{2+} 内流模式不仅受突触前释放的谷氨酸的量的调节[在相同物种的个体中(具有相似的NMDAR框架),对于相似的环境刺激可能是相似的],而且还受到突触后细胞上的NMDAR框架的精确调节。

[0609] 突触蛋白(NMDAR框架)的这种表达在同一物种的个体中是相似的,但根据个体的NMDAR基因和环境因素(G+E)不同。表观遗传(环境影响)通过NMDAR的 Ca^{2+} 内流模式转化为神经可塑性。即使在相同类型和构造上(topographically)彼此接近的细胞中,NMDAR(NMDAR框架的一部分)的差异表达也会导致刺激和突触前谷氨酸释放后 Ca^{2+} 内流的独特模式。虽然右美沙酮的选择性似乎针对病理性过度活跃的NMDAR,但其对不同亚型的亲和力不同,并且因此它可能差异性地阻断病理性过度活跃的不同受体亚型。

[0610] 此外,不同剂量的右美沙酮(也参见血浆水平,实施例3,以及图22和23)可能对不同的亚型具有不同的影响。当这些不同的影响被完全阐明时,可能会揭示右美沙酮和相关化合物在治疗选定障碍和疾病中的全部潜力。

[0611] 在实验模型中,NMDAR通道阻滞剂与神经元空泡形成和其他细胞毒性变化(“Onley损伤”)有关。药物产生这些神经毒性变化的效力与其作为NMDA拮抗剂的效力有关:即MK-801>PCP>替来他明>氯胺酮[Olney JW,Labruyere J,Price MT(1989)“Pathological Changes Induced in Cerebrocortical Neurons by Phencyclidine and Related Drugs”.Science.244:1360-1362]。当以75mg/kg的剂量给药时,已显示右美沙芬在大鼠大脑中引起空泡形成[Hashimoto,K;Tomitaka,S;Narita,N;Minabe,Y;Iyo,M;Fukui,S(1996)“Induction of heat shock protein Hsp70 in rat retrosplenial cortex following administration of dextromethorphan”.Environmental Toxicology and Pharmacology.1(4):235-239]。NMDAR拮抗剂引起永久性脑损伤的潜力已经缓和了NMDAR拮抗剂作为治疗剂的发展。本发明人首次在大鼠中进行了一项试验,以研究右美沙酮的慢性CNS毒性潜力。男性的右美沙酮剂量为0、31.25、62.5和110mg/kg/天,女性的剂量为0、20、40和80mg/kg/天。美沙酮外消旋体作为比较剂,男性为31.25mg/kg/天,女性为20mg/kg/天。测试了剂量为5mg/kg(男性)和2mg/kg(女性)的MK-801作为阳性对照剂。值得注意的是,右美沙酮的最小测试剂量(32.25mg/kg/天)是人体等效治疗剂量的十倍以上。每日给药的初始

剂量后8、48和96小时进行尸体剖检。大脑由具有识别Olney损伤(苏木精&伊红+Fluoro JadeB染色剂)专业知识的神经病理学家进行评估。任何测试剂量的右美沙酮都不会导致Olney损伤,而活性对照MK-801会导致所有测试动物的Olney损伤(存档的Relmada数据)。这些数据表明,右美沙酮可以安全地用于人类,而不用担心在MDD发展过程中其他NMDAR通道阻滞剂(包括右美沙芬)可能会导致CNS损伤。

[0612] 此外,个体神经元细胞膜上由遗传[编码不同亚基的7个基因和众多剪接变体(同种型)和巨大的突变可能性]和表观遗传(胚胎形成的环境影响)共同决定的NMDAR框架将决定该个体的“心理特征”(个体对环境刺激的反应)。持续的经验驱动的神经营可塑性(通过由突触前谷氨酸释放触发的突触后NMDAR,受突触后细胞中 Ca^{2+} 内流的差异模式调节)和对NMDAR的其他环境影响(例如,调节位点的PAM和NAM,例如多胺位点或位于激动剂位点的激动剂,例如,位于NMDA/谷氨酸位点的喹啉酸)有助于确定个体的“精神状态”(“特征”和“状态”包括Desseilles等人在2013年所定义的),以及根据本发明人当前和先前的公开,在学习(记忆形成,LTP,LTD)以及每个人的独特连接组的基础上反映了G+E范式。

[0613] 一类新的耐受性良好、安全和有效的NMDAR阻滞剂(例如,右美沙酮以及本发明人先前和当前公开的化合物和方法)的可用性和其在NMDAR上的作用对于不同的NMDAR亚型是不同的,和优先针对某些回路,可以潜在地治疗、预防和诊断精神障碍,也可以改善可能是不利的“精神特征”的一部分的社交功能和工作能力,不利的“心理特征”是由于功能障碍的NMDAR导致选定回路的选定细胞部分中的病理性过度活跃的NMDAR通道引起的(例如,执行需要一定程度的精神集中的任务的能力降低)。

[0614] NMDAR在学习(记忆形成、LTP、LTD)中具有核心作用。某些学习障碍可能继发于G+E确定的NMDAR功能障碍。结合解决和纠正引发和/或维持某些学习障碍(例如,ADHD)的环境因素,一种耐受性良好且安全的药物(如右美沙酮)可以有效调节神经元表达的病理性过度活跃的NMDAR,这些神经元是负责学习认知、社交和运动技能的神经元回路的一部分。例如,除了调节机能亢进的NMDAR(机能亢进的NMDAR破坏与认知和运动技能的学习和记忆形成有关的特定神经元回路)外,右美沙酮优先诱导NR1和NR2A亚基的合成(如实施例2中ARPE-19细胞所见-和当测试不同的细胞系时可能会有所不同),这可能对CNS成熟产生有利影响(例如,NMDAR发育转换)并对ADHD提供进一步的疾病调节作用。

[0615] 涵盖正常和病理性智能发育以及认知、社交、情感、感觉和运动功能和技能的范围取决于NMDAR框架及其工作条件,即取决于与失调的病理性活动相比的生理活动,例如,所述NMDAR框架的病理性过度活跃的NMDAR。当神经元(甚至星形胶质细胞或额外的CNS细胞)表达的过度活跃的NMDAR通道的某个阈值超过该细胞(或那些细胞,因为在组织、器官或回路受到影响之前,可能需要不止一个细胞发生功能障碍)的部分回路(或组织或器官)时,该回路(组织或器官)可能会失效,并且疾病或障碍可能会表现出来。在涉及学习成绩的某些认知回路的神经元的情况下,ADHD可能会表现出来。在内耳中的毛细胞的情况下,听力损失可能会表现出来(实施例5)等等。

[0616] 在某些神经发育和神经退行性疾病以及老化的大脑中描述的异常背景电CNS活动和异常连接可能继发于功能异常的NMDAR,并且至少在最初(在神经元损失发生之前)可以通过如右美沙酮的药物来纠正。

[0617] 本发明人的2a期研究结果(快速起效、稳健和持续的疾病缓解作用)不仅首次证实

NMDAR过度激活是大部分患者中MDD的罪魁祸首,而且还可能揭示与MDD相关的障碍的病理生理学。例如,本发明人现在可以公开,在双相障碍中,躁狂相是由病理性过度活跃的通道引起的,这些通道允许过量的钙内流,最初导致某种程度的功能(在一些较轻微的情况下-非常轻微的轻躁狂-与个人和社交福祉相关的回路功能-可能会因轻躁狂而“改善”,这可能是由于超过生理水平的非常轻微的 Ca^{2+} 内流增加所致)。

[0618] 然而,或者是因为谷氨酸的突触前释放增加(经验驱动的释放),或者星形胶质细胞的再摄取受损,或者PAM或激动剂的作用,或者甚至是因为NMDAR绝对数量或相对亚型的细胞表达中的突触后变化,“过量” Ca^{2+} 内流可能增加超过某个限度,现在导致细胞功能障碍(改变的LTP信号传导)和回路中断,表现为功能障碍的躁狂发作。随着过量的 Ca^{2+} 内流进一步发展,以及细胞功能,包括LTP机制(突触蛋白的转录、合成、组装、运输)逐渐受损,躁狂发作,在双相障碍的情况下,然后是抑郁症双相障碍(MDE)的抑郁期。由过量 Ca^{2+} 内流引起的细胞功能障碍可能进一步发展为细胞凋亡和细胞死亡,这解释了MDD患者和双相障碍患者脑萎缩的神经影像学和尸检结果。像右美沙酮这样的药物可以防止过量的 Ca^{2+} 内流、功能失调的躁狂和抑郁期以及神经元死亡,从而改变疾病的进程。

[0619] 右美沙酮可能改善的相关障碍的另一个示例是PTSD。在这种与MDD共享几个表型特征的障碍中,罪魁祸首可能是事件驱动的NMDAR激活,其导致情绪回路的选定神经元部分中过量 Ca^{2+} 内流。相关障碍的另一个示例是广泛性焦虑障碍(GAD)和社交焦虑障碍(SAD):在这些相关疾病中,与列出的所有MDD相关障碍一样,患者(具有易感性NMDAR框架的受试者)的治疗目标很可能成为事件驱动的(有或没有PAM或激动剂)情绪回路的选定神经元部分中的过量 Ca^{2+} 内流。

[0620] 相同机制已经被本发明人对MDD和其他研究的临床结果表明,通过病理性过度活跃的NMDAR的过量 Ca^{2+} 内流,可能对MDD相关的神经精神障碍有治疗作用,包括持续性抑郁症、破坏性情绪失调障碍、经前焦虑症、产后抑郁症、双相障碍、轻躁狂和狂躁症、广泛性焦虑障碍、社交焦虑障碍、躯体性症状障碍、丧亲抑郁症、调整性抑郁症、创伤后应激障碍、强迫症、慢性疼痛障碍和物质使用障碍。

[0621] 又一种潜在的病理机制由星形胶质细胞的原发性功能障碍代表。星形胶质细胞在维持非常低的细胞外谷氨酸浓度(低nM范围)方面发挥非常重要的作用,从而防止NMDAR过度开放和兴奋性毒性。

[0622] 星形胶质细胞吸收突触前神经元释放的任何细胞外谷氨酸,通过谷氨酰胺合成酶途径将谷氨酸转化为谷氨酰胺,并将谷氨酰胺释放到细胞外空间,在细胞外空间谷氨酰胺被摄入神经元转化为谷氨酸并储存以备将来使用,包括在刺激从一个细胞转导和传递到另一个细胞时将来释放。如果星形胶质细胞因任何原因(包括由于星形胶质细胞的NMDAR的过度激活和过量的 Ca^{2+} 进入星形胶质细胞,例如由喹啉酸引起)而功能障碍,则这一重要功能(谷氨酸-谷氨酰胺循环的一部分)可能会受损并且过量的谷氨酸可在细胞外空间积聚,导致兴奋性毒性和神经元功能障碍,并进一步导致星形胶质细胞功能障碍,形成自我维持的恶性循环。当星形胶质细胞膜表达的NMDAR过度活跃(病理性过度活跃,例如来自PAM或激动剂)时,过量的 Ca^{2+} 进入星形胶质细胞,并且星形胶质细胞的NMDAR功能障碍可能会损害谷氨酸-谷氨酰胺循环。

[0623] 作为NMDAR通道阻滞剂的右美沙酮不仅可以保护神经元免受兴奋性毒性,而且还

可以通过阻断其过度活跃的NMDAR来恢复星形胶质细胞的功能。星形胶质细胞因此恢复其生理功能,并再次能够在谷氨酸突触前释放后的m秒内以生理低纳摩尔水平降低细胞外谷氨酸(突触前释放后突触间隙中的谷氨酸浓度达到1mM)。因此,兴奋性氨基酸转运蛋白(EAAT)和功能性星形胶质细胞在生理环境下可以防止兴奋性毒性。值得注意的是,星形胶质细胞是血脑屏障的组成部分,它们的延伸部分与CNS毛细血管接触。因此,NMDAR过度活跃导致的星形胶质细胞功能障碍可能会破坏BBB,并对CNS细胞和回路造成病理后果。这种星形胶质细胞假说为右美沙酮在没有副作用的情况下对MDD的有效性提供了额外的潜在机制。

[0624] 当在给定神经元的膜上表达的一种或多种给定亚型的特定百分比(例如>30%)的NMDAR变得过度活跃(允许过量的 Ca^{2+} 内流)时,神经元将停止有效工作,例如,神经元将减慢BDNF的产生,并减慢其不断产生新通道(例如,NMDAR、AMPA、红藻氨酸亚基的转录、合成和组装)和/或神经元将停止与其他神经元的有效通信。神经元需要不断地维持生理合成、组装运输、突触蛋白的膜表达以及调节突触强度所必需的生长因子的合成运输和释放。这些神经元功能受钙内流的NMDAR模式的调节,如果模式改变(NMDAR过度活跃),这些神经元功能就会受到损害。

[0625] 为了进一步阐明,除了突触蛋白合成和组装的调节外,神经递质的严格调节的合成和运输也受跨细胞膜的钙电流的相同模式的控制。当由选定神经元表达的特定百分比(例如,超过30%)的离子通道过度激活时,神经元变得效率低下(过量 Ca^{2+} 内流)。当属于同一回路的足够数量的神经元效率低下时,信息流和回路本身就会变得效率低下,从而破坏基本的神经元间通信路径(回路)。当某个脑回路受损到足够程度时,就会出现一系列症状(神经精神状态、障碍、疾病)。如果上述病理生理机制(病理性过度活跃的NMDAR通道)发生在某些下丘脑神经元(血压改变和代谢障碍)、肝细胞(NAFLD、NASH)、朗格汉斯细胞(葡萄糖耐量受损和糖尿病)中,泌尿生殖道(不孕症、卵巢早衰、膀胱疾病,包括膀胱过度活动症、肾功能不全)或淋巴细胞和巨噬细胞(炎症状态、免疫系统障碍、癌症)或血管和心脏细胞(CAD、心力衰竭、心律失常)中或血小板(DIC)中,然后相应将出现障碍或疾病,包括但不限于CNS疾病和障碍,并且包括但不限于上面列出的疾病和障碍。

[0626] 由神经元回路损伤引起的一系列症状和体征可代表如DSM5所定义的神经精神障碍,例如本申请中公开的MDD、MDD相关障碍和其他神经精神障碍。因此,右美沙酮不仅是一种对症治疗,而且是一种调节神经元中缺陷离子通道的替代、恢复神经元(和其他细胞)功能并恢复神经元回路(和其他回路、组织和器官)功能的药物。

[0627] 在没有临床意义的副作用的情况下,右美沙酮的治疗作用是选择性靶向过度活跃的NMDAR和调节其功能的结果,即,阻断过度活跃的NMDAR的病理性开放通道,并返回到合成、组装、运输的生理诱导和表达新的功能性NMDAR,从而恢复神经元功能和恢复神经元回路,以及纠正和预防疾病和障碍。因为它们发生在没有临床意义的副作用的情况下,强调了选择性靶向过度活跃的、病理性开放的NMDAR,所以右美沙酮的这些作用更加显著。发明人公开了右美沙酮诱导形成NMDAR的蛋白质的合成(实施例2),并且因此潜在地恢复神经元功能和功能性神经元回路所必需的连接性。虽然NMDAR功能障碍是多种疾病和障碍的罪魁祸首,该多种疾病和障碍主要发生在神经系统中,但也存在于神经系统外,但缺乏能够安全有效地调节NMDAR受体的药物。

[0628] 右美沙酮和其他具有类似假定作用机制的药物现在也可以被认为是多种疾病和障碍的潜在疾病改善治疗。右美沙酮及其衍生物和阿片类药物的其他对映异构体(不产生临床上有意义的阿片类药物效应但可能具有引导作用(见实施例10))的安全性和有效性与其选择性靶向过度活跃的、病理性过度活跃的离子通道的能力有关,同时保留生理工作通道。右美沙酮的受体结合动力学,具有有利的“开启”和“关闭”通道内结合和有利的“捕获”特性(实施例6),与例如氯胺酮的药物相比是有利的,氯胺酮可能具有太快“起效”而无法在常规门诊中安全使用,只能在医疗服务提供者的监管下进行。

[0629] 此外,当申请人公开的药物在由NMDAR功能障碍引起的疾病过程中早期给药时,在出现严重甚至不可逆的神经元损伤之前,它们将潜在地预防疾病表现和疾病进展。由于G+E之间持续而复杂的相互作用(例如,离子通道病的遗传易感性,包括NMDAR通道病和对通道的环境刺激,包括化学和物理毒素和心理创伤),细胞不断致力于维持体内环境稳定,其特点是特定比例的强直性开放离子通道,包括NMDAR,指导细胞的生理功能,包括蛋白质的合成和组装。特别是神经元根据环境刺激(例如,从身体器官或外部环境到达神经元的刺激)不断地改变它们的连接。为了能够快速表达允许可塑性的膜受体,必须随时准备好组装和表达构建模块,例如突触蛋白。精确量的强直性 Ca^{2+} 内流(由NMDAR调节,静息膜电位下不完全阻断(具有GluN2C、GluN2D和可能的GluN3亚基的NMDAR))可能指导在突触后密度中准备好的突触蛋白的合成和组装,因此,当刺激通过突触前神经元释放谷氨酸传递时,突触后神经元可以及时反应并建立记忆(膜受体的快速组装和表达以及其他突触强化作用,例如,BDNF的释放,粘附蛋白等的释放)。当强直性 Ca^{2+} 内流过量时,准备工作无效(突触蛋白产生受损),实时不断传入的刺激无法有效地转化为记忆。右美沙酮可能下调过量的强直性 Ca^{2+} 内流并恢复神经可塑性并有可能治愈MDD。

[0630] 右美沙酮和潜在的其他药物,例如阿片类药物的其他异构体和右美沙酮的衍生物,维持和恢复离子通道,包括NMDAR通道内环境稳定,并且因此,除了代表所有这些疾病和障碍的潜在疾病改善治疗外,当在NMDAR功能障碍过程中早期给药时,在NMDAR功能障碍达到导致神经元功能受损的阈值之前,可能是有效的预防性治疗。这些针对多种疾病和病症的主要和次要预防作用可以以低于预期的剂量发挥,或者甚至使用本申请中公开的间歇剂量。

[0631] 因此,发明人现在公开右美沙酮具有稳健、快速和持续且统计学上显著的功效,并且对于MDD和潜在地对于TRD具有大的效应值。实验性临床试验详述于该实施例3。这一出乎意料的结果表明25-50mg的潜在功效上限效应,类似于0.5-1mg/Kg氯胺酮的上限[Fava M, Freeman MP, Flynn M, et al. Double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial of intravenous ketamine as adjunctive therapy in treatment-resistant depression (TRD) Mol Psychiatry. 2018]。此外,与连续治疗相反,有一个“脉冲”每周治疗的信号:在25mg组的第二周结束时,有一个需要恢复治疗的信号。该PD信号(25mg组:MADRAS-17.4第7天对比MADRAS-16.8第14天),连同PK结果(实施例3MDD, PK, 25mg组:到第14天,右美沙酮的血浆水平在非常低的ng/ml范围内)并辅以NMDAR通道阻滞剂氯胺酮的文献数据,和脉冲治疗而不是连续治疗的功效的证据,表明类似的剂量学(与连续治疗相反的每周脉冲治疗)也可能适用于右美沙酮。

[0632] 此外,发明人首次公开右美沙酮不仅阻断过度活跃的NMDAR,而且潜在地诱导新的

NMDAR,特别是ARPE-19细胞中的2A亚型的表达,这可能解释了在MDD人体研究。可能解释了MDD人体研究中出现的意想不到的长期临床效果。

[0633] 发明人还公开了右美沙酮在“西方饮食”的大鼠中降低NAFLD并调节炎症标志物(如实施例11所示)。

[0634] 发明人还公开,当特定炎症生物标志物改变时,右美沙酮也是有效的,并且因此右美沙酮潜在地调节炎症状态和与神经精神障碍相关的炎症状态。

[0635] 本发明人首次表明,对于诊断为MDD和/或TRD的患者,每天口服给药右美沙酮一周具有快速、稳健、持续和统计学显著的功效,具有大的效应值。为了确保MDD的正确诊断,发明人使用了SAFER,这是一种经过验证的工具来筛选患者并提高正确诊断MDD的可能性。SAFER提高了参加临床研究的患者被正确诊断的概率,并且因此可以对试验结果进行充分评估,从而最大限度地降低与治疗无关的因素决定患者病程从而混淆研究结果的风险(Desseilles等,2013)。这项由SAFER加强的双盲、安慰剂对照、前瞻性、随机临床试验表明,右美沙酮在治疗的第一周内可诱导超过30%在SAFER帮助下诊断的MDD患者的疾病缓解(MADRS<10),而随机分配至安慰剂组的患者的缓解率为5%(见图25)。此外,尽管在停止治疗后右美沙酮的血浆水平急剧下降至预期不会发挥临床意义上的药理作用的水平(个位数的ng/ml范围),但在停止治疗后缓解持续至少一周。对于其中一些患者,右美沙酮引起的改善可能会持续到第14天之后。MADRS评分量表不仅测量抑郁情绪,还测量一系列其他症状,这些症状与其他诊断参数(包括SAFER)结合在一起,可以诊断MDD的严重程度。在本试验中使用的不同量表中测量的一系列症状也有助于诊断DMS5定义的其他神经精神障碍,并在下面的权利要求中列出。停止治疗后疾病缓解的持续存在表明了右美沙酮的疾病缓解作用机制(例如,调节神经可塑性),而不是改善孤立的精神症状。

[0636] 实施例4

[0637] A. 概述

[0638] 发明人对在实施例3中描述的2期研究的数据进行了子分析(详述如下,并在下表35和图38A-D和38E-H中)。该子分析表明,与在MDD过程中后期治疗的患者相比,右美沙酮(REL-1017)在MDD过程早期治疗的患者中更有效。这一出人意料的发现(以前从未在任何其他抗抑郁药物中得到证实)表明,右美沙酮是一种用于治疗MDD和相关障碍以及潜在的其他神经精神障碍的潜在的疾病改善治疗。虽然对症治疗在MDD的早期和晚期同样有效,但在障碍过程的早期,在永久性损害发生之前,特定的疾病缓解治疗将有更好的结果。鉴于MDD在普通人群中的流行及其对患者和社交造成的沉重打击,在当前的对症治疗领域中引入第一个耐受性良好的潜在疾病改善治疗可能会彻底改革神经药理学领域。

[0639] 并且因此,在这项研究中,本发明人检查了右美沙酮对从MDD开始的生命年百分比的影响。在这方面,抑郁症的长期性尚未被证明是对标准抗抑郁药治疗(SAT)的反应或对安慰剂的反应的可靠预测因子(Papakostas GI, Fava M. Predictors, moderators, and mediators (correlates) of treatment outcome in major depressive disorder. *Dialogues Clin Neurosci*. 2008;10(4):439-451)。

[0640] 与SAT和非典型抗精神病药相比,右美沙酮可能对自MDD开始后生命年百分比比较低的MDD患者更有效。

[0641] B. 方法

[0642] 本发明人回顾了关于右美沙酮作为辅助治疗在1-3次充分SAT失败的MDD患者中的2a期研究的随机人群的MDD的开始日期的历史数据(在上文的实施例3中描述)。从抑郁症开始所花费的生命年百分比是通过计算从MDD开始日期开始的年数除以年龄并乘以100来计算。然后将患者划分为低于和高于中值。

[0643] 通过学生t检验将治疗组患者的MADRS CFB与安慰剂组的MADRS CFB进行比较,以获得未配对数据,在图38A-D和38E-H中的每一个中显示对比结果。通过软件GraphPad Prism ver.8.0进行分析。

[0644] C. 结果

[0645] 对于62名随机患者,从MDD开始日期算起的生命年中位百分比为23%。在右美沙酮2期研究中,在两种测试剂量(25mg和50mg)下,与安慰剂组相比,MDD开始后生命年百分比低于中位百分比的患者对右美沙酮活性治疗的反应明显更高。在同一项右美沙酮2期研究中,在两种测试剂量(25mg和50mg)下,与安慰剂组相比,对于高于从MDD开始的平均生命年百分比的患者而言,对积极治疗的反应没有统计学意义。(参见表35;图38A-H)。

[0646] 参考图38A-D:与安慰剂患者相比(自MDD开始之日起,他们的生命年百分比低于中位数百分比(低于23%)),接受25mg右美沙酮治疗的患者(自MDD开始之日起,他们的生命年百分比低于中位数百分比(低于23%))在第7天($p=0.0277$) (图38A) 和第14天($p=0.0217$) (图38B) 显示MADRS平均评分显著改善。当具有对自MDD开始的生命年的中位数百分比以上的患者进行相同的分析时,治疗效果没有统计学意义(在所有记录的时间点 $p>0.5$) (图38C和38D)。

[0647] 参考图38E-H:与安慰剂患者相比(自MDD开始之日起,他们的生命年百分比低于中位数百分比(低于23%)),接受50mg右美沙酮治疗的患者(自MDD开始之日起,他们的生命年百分比低于中位数百分比(低于23%))在第7天($p=0.0075$) (图38E) 和第14天($p=0.0483$) (图38F) 显示MADRS平均评分显著改善。当具有对自MDD开始的生命年的中位数百分比以上的患者进行相同的分析时,治疗效果没有统计学意义(在所有记录的时间点 $p>0.1$) (图38G和38H)。

[0648] D. 结论

[0649] 在这项来自2期试验的数据的子分析中,对于自MDD开始之日起,生命年百分比低于中位数(低于23%)的患者,与安慰剂相比,每日剂量为25和50mg的右美沙酮在降低MADRS评分方面显著有效。当对自MDD开始之日起,生命年百分比高于中位数(23%)的患者的相同数据进行分析时,结果在任一测试剂量均未达到统计学意义。对于单胺能药物和非典型抗抑郁药,这种与MDD的长期期相关的不同治疗效果以前没有报道过,并且对于氯胺酮或艾氯胺酮,也没有描述过。疾病改善治疗通常在疾病过程早期施用时可达到最佳效果,例如,抗生素用于细菌感染,甲状腺激素用于甲状腺功能减退症。对症治疗,例如用于抑郁症的SSRI和用于焦虑症的苯二氮平类药物,将在疾病过程中的任何时间产生对症效果。与MDD过程中晚期给药相比,右美沙酮在早期给药时的统计学显著的治疗效果证实了实施例3所预期的其疾病改善效果。此外,该发现可能有助于选择对右美沙酮治疗和其他治疗(包括心理治疗)有更高反应可能性的患者。

[0650] 最后,当临床变量对治疗反应有很大影响时,分层法可以防止I型错误并提高小型试验(<400名患者)的功效,特别是当计划进行中期分析时[Kerman et al.,1999;Broglia

K.Randomization in Clinical Trials:Permuted Blocks and Stratification.JAMA.2018;319 (21):2223-2224;Saint-Mont U.Randomization Does Not Help Much,Comparability Does.PLoS One.2015;10 (7):e0132102.Published 2015 Jul 20]。在计划的临床试验的背景下,从MDD开始,将患者的生命年数高于或低于中位数的分层,不仅可以提高组间的可比性,而且还可能表明治疗具有潜在的疾病改善效果。此外,在MDD临床试验的背景下,从MDD开始的生命年数高于或低于中位数的患者分层可以表明治疗具有潜在的疾病改善效果。由于本发明人的这些发现,右美沙酮和潜在的其他安全且耐受性良好的口服NMDAR通道阻滞剂可迅速成为MDD和相关障碍的一线治疗。

[0651] 表35:CFB=从基线的变化

[0652]

治疗	从MDD开始的生命年%: 23%=中位数	MADRS 平均 CFB 第 7 天	MADR 平 均 CFB 第 14 天
25 mg			
N=12	23%及以下 平均: 12.93%	-18.91	-18.54
N=7	高于 23% 平均: 42%	-13.14	-11.4
50mg			

[0653]

N=8	23%及以下 平均: 12.89%	-20	-21.5
N=13	高于 23% 平均: 47%	-14.46	-15.9
25+50 mg			
N=20	23%及以下 平均: 12.91	-19.35	-19.78
N=20	高于 23% 平均: 46%	-14	-14.4
安慰剂			
N=11	23%及以下 平均: 8.25%	-8	-6.8
N=11	高于 23% 平均: 49%	-9.5	-7.5

[0654] 实施例5

[0655] 概述: 本实施例5证明庆大霉素喹啉酸对于调节由内源性物质(例如, 炎症中间体)和外源性物质(例如, 药物和其他毒素)病理激活的NMDAR通道是有效的。

[0656] 第I部分: NMDAR处的正变构调节剂(PAMs)

[0657] A. 背景

[0658] 耳毒性和肾毒性药物庆大霉素在表达二异聚重组人NMDAR(包含GluN1以及GluN2A、GluN2B、GluN2C或GluN2D亚基中的一个)的稳定细胞系中充当NMDAR的正变构调节剂(PAM)。

[0659] 右美沙酮通过减少过度活化的NMDAR引起的 Ca^{2+} 内流, 从而抵消庆大霉素(和NMDAR的其他PAM)的毒性作用。特别是右美沙酮抵消被PAM肾毒性和耳毒性药物庆大霉素过度激活的NMDAR引起的过量 Ca^{2+} 内流。

[0660] 选定的障碍和疾病可以由PAM和/或NMDAR的激动剂引起, 例如, 障碍和疾病可以由毒素诱导的选定的组织或回路的选定的细胞部分中的选定的NMDAR的过度激活(通过变构调节和/或通过激动剂作用对抗NMDAR的NMDA位点)引起。

[0661] 感觉神经听力损伤可能是由螺旋神经节神经元(SGN)的损伤引起的。SGN是双极神经元, 可将听觉信息从耳朵传输到大脑。生理功能的SGN对于保持正常听力是必不可少的,

它们的功能和生存取决于遗传和环境的相互作用。

[0662] NMDA对MK-801的拮抗作用改善了在实验条件下暴露于短期庆大霉素后的肾损伤 (Leung JC, Marphis T, Craver RD, Silverstein DM. Altered NMDA receptor expression in renal toxicity: Protection with a receptor antagonist. *Kidney Int.* 2004; 66 (1): 167-176)。

[0663] 而且, NMDAR不仅在CNS中表达, 而且在外周表达 (Du等人, 2016)。

[0664] 诸如庆大霉素的肾毒性和/或耳毒性药物可通过充当由SGN和肾细胞表达的NMDAR的PAM而导致感觉神经性听力损伤和肾毒性。PAM可能导致细胞中过量 Ca^{2+} 内流和兴奋性毒性 (Cam-CaMKII、RAS和PI3K信号传导的表观遗传功能障碍)。右美沙酮, 一种新的潜在有效药物, 显示具有NMDAR非竞争性通道阻滞剂作用 (实施例1), 显示在MDD患者中产生快速、稳健和持续的临床效果 (实施例3), 并显示发挥神经可塑性作用 (实施例2), 当与庆大霉素或影响相同细胞或其他细胞的其他PAMs共同给药时, 可以潜在地预防耳毒性和肾毒性作用。

[0665] 此外, 通过相同的机制, 右美沙酮在选定组织或回路的选定细胞部分中对过量 Ca^{2+} 内流的下调, 其中过量 Ca^{2+} 内流通过用NMDAR激动剂 (例如, 谷氨酸或甘氨酸或谷氨酸激动剂喹啉酸) 的过度刺激和/或通过多种PAM而过度激活, 右美沙酮可以预防、治疗或诊断由过量 Ca^{2+} 内流触发、维持或恶化的疾病, 包括由PAM和/或NMDA激动剂引起的选定MDD病例。喹啉酸作为谷氨酸激动剂在触发、恶化或维持MDD以及通过其他机制作为神经毒剂的作用是众所周知的 [Guillemin et al., 2012; Schwarcz R, Bruno JP, Muchowski PJ, Wu HQ. Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. *Nat Rev Neurosci.* 2012; 13 (7): 465-477; Lovelace MD, Varney B, Sundaram G, et al. Recent evidence for an expanded role of the kynurenine pathway of tryptophan metabolism in neurological diseases. *Neuropharmacology.* 2017; 112 (Pt B): 373-388]。

[0666] B. 研究框架

[0667] FLIPR钙测定用于使用表达二异聚重组人NMDAR的稳定细胞系来分析庆大霉素, 该二异聚重组人NMDAR包含GluN1加上GluN2A、GluN2B、GluN2C或GluN2D亚基中的一个。使用4个NMDAR细胞系评估了10 μM 庆大霉素对三种不同L-谷氨酸浓度0.04、0.2和10 μM 的影响。并且在添加和不添加10 μM 庆大霉素的三种L-谷氨酸浓度下评估了添加10 μM 右美沙酮。

[0668] C. 结果

[0669] 对于不同的细胞系, 10 μM 庆大霉素对0.04 μM L-谷氨酸的影响 (数据是平均值 $\pm$ SEM, 每组 $n=30$) 显示在图27A-D中。从图中可以看出, 极低浓度的谷氨酸 (0.04 μM) 在所有细胞系中诱导钙进入 [GluN2D>GluN2C>GluN2B>GluN2A]。此外, 10 μM 庆大霉素显著增加了0.04 μM L-谷氨酸诱导的钙进入, GluN2A和GluN2B细胞系的 $P<0.0001$, 但GluN2C和GluN2D细胞系的 $P<0.05$ 。而且, 在存在和不存在10 μM 庆大霉素的情况下, 10 μM 右美沙酮显著降低了0.04 μM L-谷氨酸引起的钙进入, 所有细胞系的 $P<0.0001$ 。

[0670] 接下来, 对于不同的细胞系, 10 μM 庆大霉素对0.2 μM L-谷氨酸的影响 (数据是平均值 $\pm$ SEM, 每组 $n=30$) 显示在图28A-D中: 在图中可以看出, 低浓度谷氨酸0.2 μM 诱导钙进入所有细胞系 [GluN2D>GluN2C>GluN2B>GluN2A]。此外, 10 μM 庆大霉素仅对GluN2A ($P<0.0001$) 和GluN2B ($P<0.05$) 细胞系显著增加由0.2 μM L-谷氨酸诱导的钙进入, 但减少GluN2D细胞系

中的钙进入 ($P < X, X$), 因此作为该系列的负变构调节剂 (NAM)。并且, 在存在和不存在 $10\mu\text{M}$ 庆大霉素的情况下, $10\mu\text{M}$ 右美沙酮显著降低了 $0.2\mu\text{M}$ L-谷氨酸引起的钙进入, 对于 GluN2A、GluN2B、GluN2C 细胞系, $P < 0.0001$, 但对于 GluN2D 细胞, 在存在庆大霉素的情况下, $P < 0.005$ 。

[0671] 最后, 对于不同的细胞系, $10\mu\text{M}$ 庆大霉素对 $10\mu\text{M}$ L-谷氨酸的影响 (数据是平均值 $\pm$ SEM, 对于没有右美沙酮的组 $n=30$, 对于其余组 $n=20$) 显示在图 29A-D 中: 从图中可以看出, 谷氨酸 $10\mu\text{M}$ 在除 GluN2D 之外的所有细胞系中最大程度地诱导 Ca^{2+} 内流。此外, 对于 GluN2B 和 GluN2D 细胞系, $10\mu\text{M}$ 庆大霉素不会改变 $10\mu\text{M}$ L-谷氨酸诱导的钙进入, 而显著降低 GluN2A ($P < 0.0001$) 和 GluN2C ($P < 0.05$) 细胞系中的钙进入。因此, 与其在谷氨酸浓度非常低的情况下的作用相反, 当谷氨酸发挥其最大的 Ca^{2+} 内流诱导作用时, 庆大霉素充当 NAM, 尽管仅存在于 4 个测试品系中的两个 (GluN2A 和 GluN2C) 中。而且, 在存在和不存在 $10\mu\text{M}$ 庆大霉素的情况下, $10\mu\text{M}$ 右美沙酮再次显著降低了 $10\mu\text{M}$ L-谷氨酸引起的钙进入, 所有细胞系的 $P < 0.0001$ 。

[0672] D. 讨论

[0673] 如上所述, 低浓度的谷氨酸盐 ($0.04\mu\text{M}$ 和 $0.02\mu\text{M}$) 在所有细胞系 GluN2D > GluN2C > GluN2B > GluN2A 中诱导钙进入。 $10\mu\text{M}$ 谷氨酸在所有细胞系中最大程度地诱导 Ca^{2+} 进入。 $10\mu\text{M}$ 庆大霉素显著增加了 $0.04\mu\text{M}$ L-谷氨酸诱导的钙进入, GluN2A 和 GluN2B 细胞系的 $P < 0.0001$, GluN2C 和 GluN2D 细胞系的 $P < 0.05$ 。而且, 在存在和不存在 $10\mu\text{M}$ 庆大霉素的情况下, $10\mu\text{M}$ 右美沙酮显著降低了 $0.04\mu\text{M}$ L-谷氨酸引起的钙进入, 所有细胞系的 $P < 0.0001$ 。

[0674] $10\mu\text{g/ml}$ 庆大霉素对 NMDAR 的作用似乎取决于 L-谷氨酸浓度: 在 $0.04\mu\text{M}$ L-谷氨酸下, 在所有测试的细胞系中检测到正调节, 对于 GluN2A 和 GluN2B 细胞系, $P < 0.0001$, 并且 GluN2C 和 GluN2D 细胞系的 $P < 0.05$; 在 $0.2\mu\text{M}$ L-谷氨酸下, 仅在 GluN2A ($P < 0.0001$) 和 GluN2B ($P < 0.05$) 细胞系中检测到正调节, 而在 GluN2D 系中检测到负调节。在 $10\mu\text{M}$ L-谷氨酸浓度下, 所有测试细胞系均不存在正调节, 但检测到 GluN2A 和 GluN2C 的负调节。

[0675] 在所有测试的细胞系中, 在存在或不存在 $10\mu\text{M}$ 庆大霉素下, $10\mu\text{M}$ 右美沙酮能够降低由 0.04 、 0.2 或 $10\mu\text{M}$ L-谷氨酸诱导的细胞内钙水平。

[0676] 右美沙酮治疗由过量 Ca^{2+} 内流引起的疾病和障碍的有效性可以通过其选择性阻断保持过度开放的 NMDAR 的能力来确定, 与谷氨酸浓度或 PAM 或 NAM 的存在无关, 如由上述结果和实施例 1 所示。对于具有 NMDAR 介导的耳毒性和肾毒性作用的药物如庆大霉素的这些结果表明, 由过量 Ca^{2+} 内流触发或维持的疾病和障碍的主要原因可能是由长期 (强直和病理性) NMDAR 的激活引起的。可能引起兴奋性毒性的强直激活可能是由突触前谷氨酸释放引起的, 即使在非常低的浓度或突触后 NMDAR 处存在 PAM, 也可能是由突触间隙中 EAAT 的谷氨酸清除缺陷引起的。

[0677] E. 结论

[0678] 庆大霉素对 NMDAR 活性的正向调节 (Ca^{2+} 内流) 似乎取决于 L-谷氨酸浓度和 NMDAR 亚型 (不同谷氨酸浓度的差异调节和不同 NMDAR 亚型的差异调节)。

[0679] 庆大霉素作为 NMDAR 调节剂的作用似乎取决于不同浓度的谷氨酸对 NMDAR 的不同激活。

[0680] 有趣的是, 非常低和低浓度的谷氨酸 (0.04 和 $0.2\mu\text{M}$) 诱导 Ca^{2+} 进入遵循已知的 NMDAR 通道亚型动力学 [GluN2D > GluN2C > GluN2B > GluN2A]。 $10\mu\text{M}$ 谷氨酸在除 GluN2D 之外的所有细胞系中最大程度地诱导 Ca^{2+} 内流。

[0681] 10 μ g/ml庆大霉素在非常低的L-谷氨酸浓度(例如0.04)下显示出对细胞内钙水平的正向调节作用。这种非常低的谷氨酸浓度可能强直地存在于毛细胞和形成听觉通路的神经细胞的突触中,并且谷氨酸的病理性增加或变构NMDAR增强可能导致毛细胞丢失(Moser T,Starr A.Auditory neuropathy--neural and synaptic mechanisms.Nat Rev Neurol.2016;12(3):135-149;Sheets L.Excessive activation of ionotropic glutamate receptors induces apoptotic hair-cell death independent of afferent and efferent innervation.Sci Rep.2017;7:41102.Published 2017 Jan 23)。

[0682] 10 μ M右美沙酮能够降低所有测试过的含有或不含有庆大霉素的细胞系中由0.04、0.2、10 μ M L-谷氨酸诱导的细胞内钙水平。

[0683] 庆大霉素通过NMDAR在极低和低L-谷氨酸浓度下增加Ca²⁺的论证支持NMDAR的PAM在SGN(肾细胞)中作为庆大霉素耳毒性(肾毒性)的机制。因此,对特定细胞具有选择性的毒素(PAM)对NMDAR的过度激活是导致触发和/或维持多种障碍和疾病的过量Ca²⁺内流的可能原因。例如,在实施例3中呈现的一些患者中,MDD可能是由NMDAR的NMDA位点或甘氨酸位点处的PAMs和/或激动剂引起的。在实施例3中呈现的患有MDD的患者中,选定神经元中Ca²⁺内流的下调导致障碍的消退。虽然这些患者的Ca²⁺过量的确切个体原因尚不清楚,但可能的原因是:突触前谷氨酸释放过量、突触后域的PAM、NMDAR的激动剂、EAAT从突触间隙清除谷氨酸的缺陷或上述任何组合原因。

[0684] 障碍和疾病的子集,尤其是神经精神疾病和障碍,以及眼科、耳科、代谢、心血管、呼吸、肾、肝、胰腺、肺、骨、凝血障碍,可由PAM(例如庆大霉素或其他毒素)和/或激动剂(例如喹啉酸或其他毒素)激活的NMDAR引起Ca²⁺内流的异常模式引发,导致过量的Ca²⁺内流,具有不同程度的兴奋性毒性、细胞损伤和甚至细胞死亡。特别地,本发明人在实施例3中的发现有力地表明,至少对于MDD患者的子集,障碍的原因是在选定细胞(选定回路的一部分)中过量的Ca²⁺内流。反过来,作为MDD原因的过量Ca²⁺内流的这种强烈信号,以及实施例1-11中的发现表明,多种CNS和CNS外障碍可能是由选定组织和/或回路的选定细胞部分中的过量Ca²⁺内流引起的并且这种通过过度激活的(通过谷氨酸、其他内源性或外源性激动剂和/或内源性或外源性PAM)离子通道引起的过量Ca²⁺内流可以被NMDAR阻滞剂(如右美沙酮)选择性下调。NMDAR通道阻滞剂对病理性过度激活的通道的选择性作用,诸如由右美沙酮发挥的作用,对于最大限度地减少副作用至关重要。

[0685] 以下发现是值得注意的:耳毒性药物庆大霉素对Ca²⁺内流的正调节在谷氨酸浓度非常低时是明显的。这表明对于特定细胞来说,存在一种生理性强直低水平的Ca²⁺内流状态,这可能容易受到有毒PAM和/或激动剂的影响。

[0686] 在所有测试的细胞系中,右美沙酮对由谷氨酸0.04、0.2和10 μ M L-谷氨酸诱导的细胞内钙水平的下调作用表明,在存在或不存在PAMs和/或激动剂下,对选定细胞中过量Ca²⁺内流引起的多种疾病和障碍具有潜在的预防或治疗作用。

[0687] 实施例1-11(包括本实施例5)中呈现的结果表明右美沙酮,在特定于由过量Ca²⁺内流引发或维持的选定疾病的选定细胞中,对由谷氨酸(即使在非常低的浓度)和/或PAM和/或激动剂过度激活NMDAR引起的疾病和障碍的疾病改善效果。具有良好耐受性的药物(如右美沙酮)对过度活化的NMDAR具有选择活性的可用性将有助于识别、分类、诊断、预防和治疗由过量Ca²⁺进入引起的疾病。

[0688] 此外,右美沙酮总是能够克服庆大霉素的潜在毒性作用,表明右美沙酮不仅对于由庆大霉素和其他PAM引起的听力损伤和肾损伤,而且对于由有毒PAM引起的多种疾病和障碍具有潜在地非常有效的预防和疾病改善效果,并可能有助于识别特定于选定疾病的PAM。

[0689] 第II部分:NMDAR中的激动剂和PAMS

[0690] 实施例5的这一部分通过使用GluN1-GluN2A、-2B、-2C和-2D细胞系的FLIPR钙测定的作用模式观察右美沙酮、喹啉酸和庆大霉素。

[0691] 以下是实施例5的该部分II中使用的缩写列表。

[0692]

缩写	定义或扩展术语
AUC	曲线下面积
CHO	中国仓鼠卵巢
CRC	浓度依赖性曲线
DMSO	二甲基亚砷
EC ₅₀	产生半数最大反应的药物浓度
FLIPR	荧光成像读板仪
Gly	甘氨酸
GLP	良好实验室规范
IC ₅₀	药物的最大半数抑制浓度
Log	以10为底的对数
L-glu	L-谷氨酸
MW	分子质量
NA	不可用的
NMDA	N-甲基-D-天门冬氨酸
NMDAR	N-甲基-D-天门冬氨酸受体
MOR	μ-阿片受体
pEC ₅₀	摩尔EC ₅₀ 值的负对数
LTP LTD	长时程增强效应长时程抑制
SEM	标准平均误差

[0693] A. 介绍

[0694] FLIPR-钙测定用于评估右美沙酮或喹啉酸在10μM甘氨酸存在下、有或没有40或200nM谷氨酸或10μM庆大霉素的情况下,对四种人类重组NMDA受体类型的影响:GluN1-GluN2A、GluN1-GluN2、GluN1-GluN2C、GluN1-GluN2D。在10μM甘氨酸存在下,还产生了喹啉酸或庆大霉素CRC。

[0695] B. 测试项目

[0696] 2.1测试项目显示在表36(下面)中。

[0697] 表36

[0698]

名称	MW	供应商	编码	CAS
盐酸右美沙酮	345.91	Padova University		5653-80-5 (base)
喹啉酸	167.12	Merck Sigma-Aldrick	P63204-100G	89-00-9
硫酸庆大霉素	~681.58	Merck Sigma-Aldrick	G1264-250MG	1405-41-0
谷氨酸	187.1	Merck Sigma-Aldrick	G1626	142-47-2 (无水的)
甘氨酸	75.07	Merck Sigma-Aldrick	G7403	56-40-6

[0699] 将测试项目以合适的浓度溶解于H₂O(庆大霉素、L-谷氨酸、甘氨酸)或复合缓冲液(喹啉酸)中,然后立即使用或-20℃保存备用。

[0700] 储备浓度为:对于喹啉酸50x=50mM;对于庆大霉素400x=40或4mg/ml;对于L-谷氨酸和甘氨酸,400x=4mM;对于右美沙酮为2.000x=20mM。

[0701] C. 测试系统

[0702] 在FLIPR中评估测试项目在10M甘氨酸存在下单独或组合调节钙进入的能力,使用表达二异聚人NMDA受体(NMDAR)的四种CHO细胞系:GluN- /GluN2A-CHO、GluN1-GluN2B-CHO、GluN1-GluN2C-CHO、GluN1-GluN2D-CHO。

[0703] D. 实验设计

[0704] 本研究的第一个目的是评估在10μM甘氨酸存在下的喹啉酸或庆大霉素CRC效应。评估了11种喹啉酸浓度:1000μM、333μM、111μM、37μM、12μM、4.1μM、1.4μM、457nM、152nM、51nM和17nm。并且评估了11种庆大霉素浓度:100μM、33μM、11μM、3.7μM、1.2μM、412nM、137nM、46nM、15nM、5.1nM和1.7nM。

[0705] 还设计了一项探索性测试以评估在10μM甘氨酸存在下,有或没有10μM右美沙酮的情况下,喹啉酸(0.1、1、10、100、1000μM)的效果。

[0706] 除了喹啉酸(0.1-1-10-100-1000μM)和10μM甘氨酸,在有或没有10μM右美沙酮的情况下,还评估了40或200nM谷氨酸或10μM庆大霉素的联合作用。

[0707] 细胞内钙水平的FLIPR测定用作NMDAR激活的读数。

[0708] E. 方法和程序

[0709] 400x化合物板通过Echo Labcyte系统制备,每孔包含:300nL/孔的400 x L-谷氨酸/甘氨酸水溶液和300nL/孔的400 x DMSO中的测试项目溶液。400x化合物板在-20℃下储存至FLIPR实验日。

[0710] 在FLIPR实验日,通过添加高达30μL/孔的化合物缓冲液从400x化合物板产生4x化合物板。

[0711] FLIPR系统用于监测NMDAR细胞系中的细胞内钙水平,用Fluo-4预加载1小时,然后用测定缓冲液洗涤。在存在L-谷氨酸和甘氨酸的情况下,在添加测试项目之前10秒和之后5分钟监测细胞内钙水平。

[0712] F. 数据处理和分析

[0713] 通过ScreenWorks4.1 (Molecular Devices) FLIPR软件测量荧光的AUC值,以监测

添加测试项目后5分钟内的钙水平 (AUC 10-310s)。然后,通过Excel 2013 (Microsoft Omce) 软件对数据进行标准化,使用添加了10 μ M L-谷氨酸加10 μ M甘氨酸的孔 (第23列) 作为高对照,仅添加分析缓冲液的孔 (第24列) 作为低对照。

[0714] 为了评估板质量,在Excel中进行Z'计算。Z'的计算公式如下:

$$[0715] \quad Z' = 1 - 3(\sigma_h + \sigma_l) / |\mu_h - \mu_l|$$

[0716] 其中 μ 和 σ 分别是高 (h) 和低 (l) 对照的均值和均值的标准差。

[0717] 测试项目IC₅₀值通过XLfit使用四参数逻辑方程计算,对于每种NMDA受体类型,当最小反应的结果小于50%,从而最大抑制结构大于50%时:

$$[0718] \quad Y = \text{底部} + (\text{顶部} - \text{底部}) / (1 + 10^{-(\text{LogEC}_{50} - X) * \text{Hill斜率}})$$

[0719] 其中Y是相对于10 μ M L-谷氨酸加10 μ M甘氨酸的%效果,X是测试项目的摩尔浓度。

[0720] 在不同的实验条件下,通过Prism8 Graph Pad软件绘制测试项目CRC数据。并且由Prism8 Graph Pad软件执行的列分析是一种方单向方差分析,然后是Tukey的多项比较检验,具有单一合并方差。

[0721] G. 方案偏差

[0722] 右美沙酮的2000x浓缩溶液 (20mM) 的制备发生在H₂O中,而不是在DMSO中。这种方案偏差既不影响整体解释,也不损害研究的完整性。

[0723] H. 结果

[0724] 1. 板Z'值

[0725] 用相同的化合物板测试每个细胞系 (GluN1-GluN2A、GluN1-GluN2B、GluN1-GluN2C、GluN1-GluN2D) 的6个细胞板,包含所有测试项目。所有细胞板具有Z'值>0.5的结果,并被接受。

[0726] GluN1-GluN2A板的Z'值结果如下:0.78-0.81-0.78-0.82-0.87-0.80。

[0727] GluN1-GluN2B板的Z'值结果如下:0.72-0.63-0.68-0.71-0.75-0.69。

[0728] GluN1-GluN2C板的Z'值结果如下:0.57-0.62-0.57-0.61-0.70-0.63。

[0729] GluN1-GluN2D板的Z'值结果如下:0.74-0.81-0.83-0.80-0.80-0.81。

[0730] 2. 喹啉酸

[0731] 通过Graph Pad Prism获得的4种NMDA受体类型中的喹啉酸CRC图如图30所示。在10 μ M甘氨酸存在下获得喹啉酸CRC。并且数据报告为平均值 $\pm$ SEM,n=6。

[0732] 通过GraphPad Prism计算4种NMDA受体类型中的喹啉酸最佳拟合值,结果如下表37中所示:

[0733] 表37

[0734]

	2A	2B	2C	2D
pEC ₅₀	3.1	3.8	<3	3.3
EC ₅₀ (μ M)	850 *	170	>1000	520
最小反应 (%)	-1.9	-2.1	-4.0	-1.3
最大浓度下的反应 (%)	40	25	-4.0	50

[0735] *通过将最大反应限制在75%来获得GluN1-GluN2A拟合。

[0736] 3. 庆大霉素

[0737] 通过GraphPadPrism获得的4种NMDA受体类型中的庆大霉素CRC图如图31所示。在

存在10 μ M甘氨酸的情况下获得庆大霉素CRC。数据报告为平均值 $\pm$ SEM, n=6。

[0738] 通过GraphPadPrism计算4种NMDA受体类型中的庆大霉素最佳拟合值,结果如下表38:

[0739] 表38

	2A	2B	2C	2D
pEC ₅₀	<4	<4	<4	<4
EC ₅₀ (μ g/ml)	>100	>100	>100	>100
最小反应. (%)	-3.3	-3.7	-8.2	-3.2
最大浓度下的反应 (%)	0.1	0.7	0.03	1.0

[0741] 4. 10 μ M甘氨酸存在下以及与右美沙酮的相互作用下的喹啉酸效应

[0742] 100-1000 μ M喹啉酸(QA)效果在10 μ M甘氨酸存在下评估,使用4种NMDAR细胞系,结果如图32A-32D所示。还对添加10 μ M右美沙酮(DXT)进行了评估。显示的数据是平均值 $\pm$ SEM,每组n=42。

[0743] 图32A-32D中所示的相同数据列于下表39中,包括右美沙酮统计结果。

[0744] 表39

	100 QA	100 QA + 10 DXT	1000 QA	1000 QA + 10 DXT
[0745] GluN2A	2.5 $\pm$ 0.3	-0.2 $\pm$ 0.2 (*)	41 $\pm$ 1.2	34 $\pm$ 0.6 (****)
GluN2B	0.9 $\pm$ 0.7	-1.0 $\pm$ 0.8 (ns)	37 $\pm$ 1.3	12 $\pm$ 0.7 (****)
GluN2C	-2.8 $\pm$ 0.6	-3.3 $\pm$ 0.5 (ns)	-5.5 $\pm$ 0.4	-8.0 $\pm$ 0.4 (*)
GluN2D	-0.1 $\pm$ 0.4	-2.4 $\pm$ 0.2 (ns)	55 $\pm$ 1.1	32 $\pm$ 0.9 (****)

[0746] 列表数据是平均值 $\pm$ SEM(P值),每组n=42。标题浓度以微摩尔为单位。文字说明:ns,不显著;*为P<0.05;****为P<0.0001。QA是喹啉酸。DXT是盐酸右美沙酮。

[0747] 5. 40nM L-谷氨酸和10 μ M甘氨酸:100 μ M喹啉酸和/或10 μ M右美沙酮的效果

[0748] 评估了40nM L-谷氨酸在10 μ M甘氨酸存在下的效果。还使用4种NMDAR细胞系对添加100 μ M喹啉酸(QA)和/或10 μ M右美沙酮(DXT)进行了评估,结果显示在图33A-33D中。

[0749] 图33A-33D中所示的相同数据列于下表40中,包括右美沙酮统计结果。

[0750] 表40

	0.04 L-Glu	0.04 L-Glu + 10 DXT	0.04 L-Glu + 100 QA	0.04 L-Glu + 100 QA + 10 DXT
[0751] GluN2A	1.7 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.2 (ns)	7.5 $\pm$ 0.4	3.4 $\pm$ 0.2 (****)
GluN2B	-0.9 $\pm$ 0.6	0.2 $\pm$ 0.4 (ns)	3.7 $\pm$ 1.3	1.6 $\pm$ 0.3 (ns)
GluN2C	-1.2 $\pm$ 0.6	1.6 $\pm$ 0.4 (ns)	-2.0 $\pm$ 1.1	-2.5 $\pm$ 0.7 (ns)
GluN2D	18 $\pm$ 1.2	3.5 $\pm$ 0.2 (****)	26 $\pm$ 1.2	7.1 $\pm$ 0.4 (****)

[0752] 数据是平均值 $\pm$ SEM(P值),每组n=42。标题浓度以微摩尔为单位。文字说明:ns,不显著;****为P<0.0001。L-Glu是L-谷氨酸。QA是喹啉酸。DXT是盐酸右美沙酮。

[0753] 6. 40nM L-谷氨酸和10 μ M甘氨酸:1000 μ M喹啉酸和/或10 μ M右美沙酮的效果

[0754] 评估了40nM L-谷氨酸在10 μ M甘氨酸存在下的效果。还使用4种NMDAR细胞系对添加1000 μ M喹啉酸(QA)和/或10 μ M右美沙酮(DXT)进行了评估,结果显示在图34A-34D中。

[0755] 图34A-34D中所示的相同数据列于下表41中,包括右美沙酮统计结果。

[0756] 表41

	0.04 L-Glu	0.04 L-Glu + 10 DXT	0.04 L-Glu + 1000 QA	0.04 L-Glu + 1000 QA + 10 DXT
[0757] GluN2A	1.7±0.3	0.5±0.2 (ns)	41±1.0	32±0.7 (****)
GluN2B	0.9±0.6	0.2 ±0.4 (ns)	27±2.2	13±1.0 (****)
GluN2C	-1.2±0.6	1.6±0.4 (ns)	-4.1±0.9	-8.6±1.5 (**)
GluN2D	18±1.2	3.5±0.2 (****)	53±2.3	33±1.6 (****)

[0758] 数据是平均值±SEM(P值),每组n=42。标题浓度以微摩尔为单位。文字说明:ns,不显著;**是P<0.01;****是P<0.0001。QA是喹啉酸。DXT是盐酸右美沙酮。

[0759] 7. 200nM L-谷氨酸和10μM甘氨酸:100μM喹啉酸和/或10μM右美沙酮的效果

[0760] 评估了200nM L-谷氨酸在10μM甘氨酸存在下的效果。还使用4种NMDAR细胞系对添加100μM喹啉酸(QA)和/或10μM右美沙酮(DXT)进行了评估,结果显示在图35A-35D中。

[0761] 图35A-35D中所示的相同数据列于下表42中,包括右美沙酮统计结果。

[0762] 表42

	0.2 L-Glu	0.2 L-Glu + 10 DXT	0.2 L-Glu + 100 QA	0.2 L-Glu + 100 QA + 10 DXT
[0763] GluN2A	22±0.7	14±0.4 (****)	26±0.6	15±0.5 (****)
GluN2B	18±1.2	8.0±0.5 (****)	27±0.8	9.9±0.8 (****)
GluN2C	30±1.7	13±0.7 (****)	27±1.1	7.7±0.6 (****)
GluN2D	92±2.0	71±2.3 (****)	93±1.0	69±1.4 (****)

[0764] 数据是平均值±SEM(P值),每组n=42。标题浓度以微摩尔为单位。文字说明:****为P<0.0001。QA是喹啉酸。DXT是盐酸右美沙酮。

[0765] 8. 200nM L-谷氨酸和10μM甘氨酸:1000μM喹啉酸和/或10μM右美沙酮的效果

[0766] 评估了200nM L-谷氨酸在10μM甘氨酸存在下的作用。还使用4种NMDAR细胞系对添加1000μM喹啉酸(QA)和/或10μM右美沙酮(DXT)进行了评估,结果显示在图36A-36D中。

[0767] 图36A-36D中所示的相同数据列于下表43中,包括右美沙酮统计结果。

[0768] 表43

	0.2 L-Glu	0.2 L-Glu + 10 DXT	0.2 L-Glu + 1000 QA	0.2 L-Glu + 1000 QA + 10 DXT
[0769] GluN2A	22±0.7	14±0.4 (****)	46±0.9	35±1.0 (****)
GluN2B	18±1.2	8.0±0.5 (****)	27±1.5	13±1.0 (****)
GluN2C	30±1.7	13±0.7 (****)	6.6±0.8	-3.8±0.9 (****)
GluN2D	92±2.0	71±2.3 (****)	58±1.6	43±1.1 (****)

[0770] 数据是平均值±SEM(P值),对于每组,n=42。标题浓度以微摩尔为单位。文字说明:****为P<0.0001。QA是喹啉酸。DXT是盐酸右美沙酮。

[0771] 9. 1000μM喹啉酸和10μM甘氨酸:10μg/ml庆大霉素和/或10μM右美沙酮的效果

[0772] 评估了1000μM喹啉酸(QA)在10μM甘氨酸存在下的效果。还使用4种NMDAR细胞系对

添加10g/ml庆大霉素和/或10μM右美沙酮(DXT)进行了评估,结果显示在图37A-37D中。

[0773] 图37A-37D中所示的相同数据列于下表44中,包括DXT统计。

[0774] 表44

	1000 QA	1000 QA + 10 DXT	1000 QA + 10 GENT	1000 QA + 10 GENT + 10 DXT
[0775] GluN2A	41±1.2	34±0.6 (****)	47±1.1	34±0.6 (****)
GluN2B	37±1.3	12±0.7 (****)	37±1.4	21±0.9 (****)
GluN2C	-5.5±0.4	-8.0±0.4 (*)	5.6±0.4	-11±0.9 (****)
GluN2D	55±1.1	32±0.9 (****)	53±1.7	36±0.8 (****)

[0776] 数据是平均值±SEM(P值),每组n=42。标题浓度以μM(QA和DXT)或μg/ml(GENT)为单位。文字说明:*为P<0.05;****为P<0.0001。QA是喹啉酸。DXT是盐酸右美沙酮,GENT是硫酸庆大霉素。

[0777] I. 讨论

[0778] 使用表达二异聚重组人NMDAR的稳定细胞系,使用FLIPR钙测定来分析测试项目,该二异聚重组人NMDAR包含GluN1加上GluN2A、GluN2B、GluN2C或GluN2D亚基中的一个

[0779] 10μM右美沙酮抑制由谷氨酸、喹啉酸或其组合以及喹啉酸+庆大霉素诱导的NMDAR介导的钙进入。

[0780] 在FLIPR钙测定中,喹啉酸对含有GluN2A、GluN2B、GluN2D的二异聚NMDAR显示部分激动剂模式作用。喹啉酸EC₅₀在GluN2A、GluN2B和GluN2D细胞系中的结果分别为850、170和520μM。1000μM喹啉酸反而降低了GluN2C细胞系中0.2μM L-谷氨酸引起的细胞内钙增加。

[0781] 喹啉酸,在10μM甘氨酸的存在下,在开始时,在大约100μM和高达1000μM时诱导GluN2A、GluN2B和GluN2D细胞系中钙进入的增加。在GluN2A、GluN2B和GluN2D细胞系中,较低的喹啉酸浓度导致无效。喹啉酸在测试浓度下不会增加GluN2C细胞系中的细胞内钙,但似乎在该细胞系上充当NAM。

[0782] 1000μM喹啉酸对钙进入的最大%效果(平均值±SEM)在存在10μM甘氨酸下的结果:与10μM L-谷氨酸加10μM甘氨酸引起的100%效果相比,对GluN2A、GluN2B和GluN2D细胞系分别为41±1.1%、37±1.3%和55±1.1%。

[0783] GluN2B细胞系中的喹啉酸CRC表明部分激动剂行为,因为333μM和1000μM喹啉酸引起类似的次最大钙进入(分别为23±3.0和25±2.1%)。

[0784] 取决于激动剂浓度和NMDAR亚基,喹啉酸与L-谷氨酸的复合物相互作用也支持部分激动行为。在GluN2A、GluN2B和GluN2D亚基处,100μM喹啉酸与0.04μM L-谷氨酸显示正相互作用,但1000μM喹啉酸在GluN2D亚基上与0.2μM L-谷氨酸有负相互作用,其中单独使用0.2μM L-谷氨酸几乎达到最大功效(92±2.0%)。

[0785] 此外,令人惊讶的是,1000μM喹啉酸降低了GluN2C细胞系中由0.2μM L-谷氨酸引起的细胞内钙增加(从30±1.7%下降到6.6±0.8%,P<0.0001),从而用作拮抗剂,见下文。较低浓度的喹啉酸(例如0.1、1、10μM)不会在任何细胞系中引发任何反应,也不会改变细胞系对0.04μM或0.2μM L-谷氨酸或10μM庆大霉素的反应。

[0786] 在FLIPR中观察到的喹啉酸作用与对GluN2A、GluN2B、GluN2D二异聚NMDA受体的部分激动剂作用相容,这与先前关于使用电生理技术的含有GluN2A或GluN2B的二异聚NMDA受

体的文献论文一致 (Banke TG, Traynelis SF. Activation of NR1/NR2B NMDA receptors. *Nat Neurosci*. 2003; 6 (2) :144-152; Blanke ML, VanDongen AM. Constitutive activation of the N-methyl-D-aspartate receptor via cleft-spanning disulfide bonds. *J Biol Chem*. 2008; 283 (31) :21519-21529; Kussius and Popescu, 2009)。Banke和Traynelis, 2003年报道了通过外部电生理测量喹啉酸对大鼠GluN1-GluN2B受体的效力为 $518 \pm 35 \mu\text{M}$, 与本发明人报告的值非常一致。喹啉酸在FLIPR中不能激活GluN1-GluN2C受体与DeCarvalho等人的数据一致 (De Carvalho LP, Bochet P, Rossier J. The endogenous agonist quinolinic acid and the non endogenous homoquinolinic acid discriminate between NMDAR2 receptor subunit. *Neurochem. Int*. 1996; 28:445-452), 表明在注射大鼠GluN1和GluN2C亚基的卵母细胞中, 对100或1000 μM 喹啉酸没有电生理反应。在GluN2C细胞系中通过FLIPR测量的1000 μM 喹啉酸降低由0.2 μM L-谷氨酸引起的细胞内钙增加的能力表明喹啉酸保留了一些结合GluN2C亚基得谷氨酸结合位点的能力, 但功效为零, 因此表现为拮抗剂而不仅仅是GluN2C亚基的低效力激动剂。

[0787] 在所有测试的细胞系中, 在存在10 μM 甘氨酸但不存在谷氨酸的情况下测试的庆大霉素在任何测试浓度 (从1.7nM到100 μM) 下都不会引起钙进入。因此, 庆大霉素, 一种PAM (实施例5, 第I部分) 似乎在NMDAR谷氨酸结合位点缺乏激动剂活性。

[0788] 10 $\mu\text{g/ml}$ 庆大霉素仅在GluN2A细胞系中略微增强1000 μM 喹啉酸 (从 $41 \pm 1.2\%$ 到 $47 \pm 1.1\%$, $P < 0.0001$)。这证实了激动剂+PAM组合的同时应用可能会增强作用, 并且右美沙酮可以有效地阻断由激动剂和PAM组合引起的增强的 Ca^{2+} 电流, 至少在GluN2A亚型中是这样。

[0789] 庆大霉素对NMDAR的正向调节作用依赖于激动剂并不奇怪, 因为对于变构调节剂, 亲和力可能是有条件的, 因为有效 K_b 的大小取决于共结合激动剂的类型及其浓度 (如Kenakin T所报道的, Strachan RT. PAM-Antagonists: A Better Way to Block Pathological Receptor Signaling? *Trends Pharmacol Sci*. 2018; 39 (8) :748-765)。

[0790] 10 μM 右美沙酮证实了其显著降低所有四种细胞系中200nM L-谷氨酸和GluN2D细胞系中40nM L-谷氨酸诱导的细胞内 Ca^{2+} 内流的能力 (也参见本实施例5的第I部分)。

[0791] 10 μM 右美沙酮也确实减少了GluN2A、GluN2B和GluN2D细胞系中细胞内 Ca^{2+} 内流, 该细胞内 Ca^{2+} 内流通过333和1000 μM 喹啉酸以及引起足够高的细胞内钙水平的喹啉酸和谷氨酸或庆大霉素的组合而增加。右美沙酮的这种活性模式证实了其作为非竞争性通道阻滞剂的活性, 当引发足够量的 Ca^{2+} 内流时, 它可有效降低由L-谷氨酸、谷氨酸位点的其他激动剂和PAM及其组合引起的 Ca^{2+} 内流。

[0792] Braidy等人 (Braidy N, Grant R, Adams S, Brew BJ, Guillemin GJ. Mechanism for quinolinic acid cytotoxicity in human astrocytes and neurons. *Neurotox Res*. 2009; 16 (1) :77-86), 描述了喹啉酸 [受到MK-801的抑制, 一种开放通道阻滞剂, 与右美沙酮相比具有相似但更有效的非竞争性活性 (参见实施例1)] 对星形胶质细胞和神经元的各种参数的亚微摩尔效应: 细胞内烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD^+) 和聚 (ADP-核糖) 聚合酶 (PARP) 水平; 细胞外乳酸脱氢酶 (LDH) 水平; 分别在星形胶质细胞和神经元中的iNOS和nNOS表达水平。

[0793] 本发明人的结果, 测试GluN2A、GluN2B、GluN2D和GluN2C细胞系, 未显示浓度低于100 μM 的喹啉酸的效果。本发明人假设Braidy等人在2009年研究的对亚微摩尔浓度的喹啉

酸敏感的培养的人类星形胶质细胞和神经元表达具有可能对喹啉酸更敏感的具有亚基组合的NMDAR亚型,诸如含有GluN3A和GluN3B亚基的亚型(例如,三异聚体NR1-NR2A或B或C或D-NR2A或B)。含有GluN3A和GluN3B亚基的NMDAR已被证明存在于星形胶质细胞中(Skowronska K, Obara-Michlewska M, Zielińska M, Albrecht J. NMDA Receptors in Astrocytes: In Search for Roles in Neurotransmission and Astrocytic Homeostasis. *Int J Mol Sci*. 2019;20(2):309)。

[0794] 有趣的是,GluN3A亚基被认为是亨廷顿病(HD)病理生理学的关键,这也被喹啉酸脑注射所模拟。众所周知,喹啉酸神经毒性复制HD的神经化学特征(Beal MF, Kowall NW, Ellison DW, Mazurek MF, Swartz KJ, Martin JB. Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature*. 1986;321(6066):168-171)。GluN3A受体表达在亨廷顿病(HD)动物模型(由于突变的亨廷顿蛋白螯合PACSIN衔接蛋白)以及人类HD患者纹状体组织(Mackay JP, Nassrallah WB, Raymond LA. Cause or compensation? - Altered neuronal Ca^{2+} handling in Huntington's disease. *CNS Neurosci Ther*. 2018;24(4):301-310)中均增强,并且抑制异常GluN3A表达挽救了HD模型中的突触和行为障碍(Marco S, Giralt A, Petrovic MM, et al. Suppressing aberrant GluN3A expression rescues synaptic and behavioral impairments in Huntington's disease models. *Nat Med*. 2013;19(8):1030-1038)。因此,根据本发明人的结果,喹啉酸可以优先靶向含有GluN3A的NMDARs。

[0795] Koch等人2019年报道了7.2mM喹啉酸能够激活卵母细胞中的GluN1-GluN3B亚型(Koch A, Bonus M, Gohlke H, Klöcker N. Isoform-specific Inhibition of N-methyl-D-aspartate Receptors by Bile Salts. *Sci Rep*. 2019 Jul 11;9(1):10068)。正如我们的FLIPR研究和Koch等人的结果所证实的,喹啉酸被认为是谷氨酸结合位点的NMDAR部分激动剂。似乎与GluN1-GluN3B亚型中存在的两个亚基仅包含甘氨酸结合位点的假设形成对比。

[0796] 含有GluN3的NMDAR的药理学尚处于起步阶段,如最近的一篇论文(Grand T, Abi Gerges S, David M, Diana MA, Paoletti P. Unmasking GluN1/GluN3A excitatory glycine NMDA receptors. *Nat Commun*. 2018;9(1):4769)表明经典甘氨酸位点拮抗剂(如7-CKA或CGP-78608)可以相反揭示甘氨酸对GluN1-GluN3A受体的兴奋作用。

[0797] 关于实施例10(下文),有趣的是注意到选择的星形胶质细胞群(例如,CA1海马区中的那些)高度表达MOR(Nam等人,2018)。这些MOR被认为在星形胶质细胞谷氨酸释放和记忆形成中发挥核心作用(Nam等,2019)。星形胶质细胞在细胞外谷氨酸内环境稳定中的作用是公认的,星形胶质细胞衍生的谷氨酸是NMDAR介导的抑制性突触传递增强的关键(Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M. Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci*. 1998;1(8):683-692),以及是NMDAR介导的神经元慢内向电流(SIC)和LTD的关键(Fellin T, Pascual O, Gobbo S, Pozzan T, Haydon PG, Carmignoto G. Neuronal synchrony mediated by astrocytic glutamate through activation of extrasynaptic NMDA receptors[published correction appears in *Neuron*. 2005 Jan 6;45(1):177]. *Neuron*. 2004;43(5):729-743;Navarrete et al., 2019)。

[0798] 证实实施例10的公开内容,右美沙酮优先靶向(Shepherd Affinity)在选定星形

胶质细胞群的膜上表达的结构相关、物理偶联的NMDAR-MOR,可能通过介导细胞外谷氨酸水平的平衡控制而有助于右美沙酮的抗抑郁机制。

[0799] J. 基于实施例5的第I部分和第II部分的结论

[0800] 基于本实施例5中本发明人的研究的结论如下:首先,大量(mM浓度)的突触前谷氨酸释放(生理刺激诱导的释放),当被功能性EAAT系统快速清除时,没有兴奋性毒性(生理性神经传递),而少量(低nM范围)会导致NMDAR的强直性过度激活(强直性和病理性),可以导致选定细胞中过量的 Ca^{2+} 内流和慢性低级别兴奋性毒性,并伴有LTP停止和细胞损伤和细胞消亡。

[0801] 其次,在有毒PAM(在这种情况下为庆大霉素)存在和不存在的条件下,右美沙酮能够在所有水平的谷氨酸浓度下,下调 Ca^{2+} 内流,即使在低至40nM的浓度下。

[0802] 第三,测试的极低浓度的谷氨酸可以代表选定细胞中的强直和病理浓度,并且当随着时间延长时,可以导致选定细胞过量中的 Ca^{2+} 内流。

[0803] 第四,测试的极低浓度的谷氨酸可以代表强直浓度,其可以确定中间神经元的强直刺激,例如,投射到mPFC的抑制性中间神经元(参与MDD的发病机制),或其他中间神经元(参与其他神经精神障碍的发病机制)。

[0804] 第五,强直性低浓度谷氨酸对 Ca^{2+} 内流的影响可以通过PAM增强,如用庆大霉素所见。

[0805] 第六,在低浓度(低nM范围)下过度(病理性)暴露于突触前谷氨酸可能是由一系列突触前去极化事件(例如,eEPSC)引起的或甚至可能是自发的(例如,mEPSC)和/或从突触间隙清除缺陷引起的,例如,EAAT的缺陷。

[0806] 第七,右美沙酮的疾病改善效果可以独立于过度 Ca^{2+} 内流的原因而发挥作用:1)过量突触前释放(持续过量“低浓度”谷氨酸),2)突触后增强(有毒PAM或NMDAR的激动剂可增强极低浓度环境突触谷氨酸的作用),3)突触间隙谷氨酸清除缺陷(EAAT缺陷)。

[0807] 第八,实施例1、2、3、6、7、9和10,连同第一至第七结论(上文),表明当其动力学异常时,右美沙酮可选择性靶向选定的NMDAR通道:右美沙酮只有在选定细胞上的NMDAR开放时间过长或过宽(过度活跃)并导致过多 Ca^{2+} 内流时才能阻断(见实施例6,右美沙酮作用“开启”动力学)通道。

[0808] 第九,美沙酮的NMDAR通道阻断的基本上是有“开启”、“关闭”动力学:与用于MDD的有效剂量的安慰剂相比,右美沙酮的副作用概况(实施例3,MDD)表明,不仅右美沙酮的“开启”动力学(以上第8点),选择性地仅阻断病理性过度活跃(过度活跃时间过长)的NMDAR是有用的,但它的“关闭”动力学使得它允许恢复NMDAR活性而不会导致长时间的完全阻断,该长时间的完全阻断会阻碍生理性NMDAR活动并引起副作用(例如,人格解体/解离效应,如氯胺酮所见,一种更有效的NMDAR通道阻滞剂)。

[0809] 右美沙酮的“开启”、“关闭”和“捕获”的特征在实施例6,第I部分和第II部分中详细描述。

[0810] 电生理学开启/关闭速率测定被设计为相对于GluN1/GluN2C NMDAR细胞系中10/10 μM L-谷氨酸/甘氨酸诱导的全细胞电流的阻断,建立测试项目的起效和偏移动力学。10 μM 右美沙酮的起效和偏移动力学参数 τ_{on} 和 τ_{off} 结果分别为46.4和174s。1 μM ($\pm$)-氯胺酮(右美沙酮浓度的十分之一)的 τ_{on} 和 τ_{off} 结果分别为47.1和151s,表明与右美

沙酮相比的效力 $\times 10$,实施例1结果证实了这一点。

[0811] 电生理学测定被设计为相对于GluN1-GluN2CNMDAR细胞系中10/10 μ M L-谷氨酸/甘氨酸诱导的全细胞电流的阻断,建立测试项目的“捕获”。选择右美沙酮和(±)-氯胺酮作为测试项目。右美沙酮“捕获”结果为85.9%。(±)-氯胺酮“捕获”结果为86.7%。

[0812] 基于上述新的和意想不到的发现及其与实施例1结果的相关性,特别是 K_b 表(表28)中所示的结果,更具体地,表28的GluN1-GluN2C列中所示的结果,以及文献中可获得的对于与测定中测试的不同药物的MDD功效和安全性以及PK参数相关性,本发明人公开了临床耐受和MDD有效的NMDAR通道阻滞剂,其即使在生理性 Mg^{2+} 浓度存在的情况下也能够降低静息膜电位状态下 Ca^{2+} 渗透性,其应具有以下特征:1)对GluN1-GluN2C亚型的低效力(低微摩尔)[与氯胺酮(纳摩尔)相比,右美沙酮的效力是1/10;实施例1(K_b 表,表28)和实施例6A(“开启”和“关闭”)];2)相对高的“捕获”:低于MK-801,低于PCP,但与氯胺酮相当,高于美金刚(美金刚对MDD无效)。

[0813] 总之,用于MDD适应症的基本有用的NMDAR通道阻断剂的特征是:对GluN1-GluN2C和GluN2D亚型具有低微摩尔(1-12微摩尔)优先亲和力的小分子;和80-90%的“捕获”;以及以下“起始”和“偏移”动力学参数: τ_{on} 和 τ_{off} :分别为40-50s和145-180s;以及对 μ 阿片受体的低亲和力(实施例10)(例如,与吗啡相比,1/10或更少)。

[0814] 实施例6

[0815] 概述:该实施例6证实了MDD-有效的NMDAR通道阻断剂的特征:(1)慢起效(低效力):因此不干扰非常快的阶段性生理NMDAR激活,因此不受缓慢起效的影响;(2)较高的捕获:因此,药物会粘在通道中,并发挥稳定地阻断强直性和病理性开放的通道。

[0816] 第I部分:GluN1/Glu2C NMDAR的电生理开启/关闭速率测定

[0817] A.概述

[0818] 在实施例6的第I部分中,在手动膜片钳中评估右美沙酮和(±)-氯胺酮,以评估它们对含有GluN2C亚基的重组二异聚人NMDAR的起效和偏移动力学。

[0819] 1.方法

[0820] 手动膜片钳记录发生在-70mV。在没有 Mg^{2+} 的情况下,将细胞暴露于10/10 μ M L-谷氨酸/甘氨酸中5s,然后联合应用L-谷氨酸/甘氨酸加测试项目30s,再暴露于L-谷氨酸/甘氨酸50s。通过曲线拟合到一阶指数方程估算 τ_{on} 和 τ_{off} 。

[0821] 2.结果

[0822] 10 μ M右美沙酮和1 μ M(±)-氯胺酮产生类似的 $74.6\% \pm 1.9\%$ ($n=12$)和 $74.6\% \pm 2.2\%$ ($n=3$) NMDAR电流阻断,而10 μ M(±)-氯胺酮导致 $97.2\% \pm 0.3\%$ ($n=3$)的阻断。

[0823] 对于10 μ M右美沙酮和1 μ M(±)-氯胺酮, τ_{on} 结果分别为46.4s ($n=11$)和47.1s ($n=10$)。10 μ M(±)-氯胺酮 τ_{on} 下降到9.9s ($n=4$)。

[0824] 10 μ M右美沙酮的偏移动力学结果(173.5s, $n=11$)类似于1和10 μ M(±)-氯胺酮(分别为151.0, $n=10$ 和163.2s, $n=4$)。

[0825] 2.结论

[0826] 右美沙酮相对于(±)-氯胺酮的低效力是由于右美沙酮起效动力学较慢,这表明右美沙酮对NMDAR的作用是由环境L-谷氨酸激活的,并且可能保留阶段地激活的NMDAR。

[0827] B.总结

[0828] 电生理学开启/关闭速率测定被设计为相对于GluN1/GluN2C NMDAR细胞系中10/10μM L-谷氨酸/甘氨酸诱导的全细胞电流的阻断,建立测试项目起效和偏移动力学。

[0829] 选择右美沙酮和(±)-氯胺酮作为测试项目。10μM右美沙酮产生75%的GluN1/GluN2C介导的电流抑制,而10、3、1和0.3μM(±)-氯胺酮分别产生97%、90%、75%和44%的抑制。并且因此,使用引起相似效果的浓度的测试项目评估这两个项目的动力学参数,即右美沙酮和(±)-氯胺酮的浓度分别为10和1μM。

[0830] 10μM右美沙酮的起效和偏移动力学参数tau-on和tau-off分别为46.4和174s。1μM(±)-氯胺酮的tau-on和tau-off分别为47.1和151s。

[0831] 最后,添加到细胞内而不是添加到细胞外溶液中的10μM右美沙酮不能抑制10/10μM L-谷氨酸/甘氨酸诱导的电流。

[0832] 在该实施例中使用以下数据的缩写列表。

[0833]

缩写	定义或扩展术语
CHO	中国仓鼠卵巢
Gly	甘氨酸
GLP	良好实验室规范
L-glu	L-谷氨酸
MW	分子质量
NA	不可用的
NMDA	N-甲基-D-天门冬氨酸
NMDAR	N-甲基-D-天门冬氨酸受体

[0834]

缩写	定义或扩展术语
CHO	中国仓鼠卵巢
Gly	甘氨酸
OECD	经济合作与发展组织
QC	质量控制
s	秒
SEM	平均数标准误差
SOP	标准操作规程

[0835] 使用电生理学手动膜片钳方法来建立右美沙酮和(±)-氯胺酮的开启/关闭速率测定。相对于GluN1/GluN2C NMDAR细胞系中10/10μM L-谷氨酸/甘氨酸诱导的全细胞电流的阻断,研究了测试项目的起效和偏移动力学。

[0836] 还评估了右美沙酮细胞内应用效果。

[0837] 测试项目如下表45所示。

[0838] 表45

	名称	MW	供应商	编码	CAS
	盐酸右美沙酮	345.91	Padova University	NA	5653-80-5 (base)
[0839]	盐酸(±)氯胺酮	274.19	Merck Sigma-Aldrich	K2753	1867-66-9
	L-谷氨酸	187.1	Merck Sigma-Aldrich	G1626	142-47-2 (无水的)
	甘氨酸	75.07	Merck Sigma-Aldrich	G7403	56-40-6

[0840] 将测试项目以合适的浓度溶解在H₂O中,然后在-20℃下储存直至使用。

[0841] 储备浓度为:对于右美沙酮,100mM=10mg/289μl;对于(±)-氯胺酮,100mM=10mg/365μl;对于L-谷氨酸,1M=100mg/534μl;对于甘氨酸,1M=100mg/1332μl。

[0842] C. 测试系统

[0843] 使用手动膜片钳全细胞记录方法评估测试项目,使用HEKA Elektronik Patchmaster系统,耦合到BioLogicRSC-160灌注装置(BioLogic,Seyssinet-Pariset, France)。本研究使用表达二异聚人GluN1/GluN2CNMDA受体的CHO细胞系。

[0844] D. 实验设计

[0845] 使用表达hGluN1/hGluN2C二异聚受体的NMDAR细胞系,通过如Mealing GA等人,在2001年中所描述的电生理学手动膜片钳程序测量右美沙酮和(±)-氯胺酮的开启/关闭速率。

[0846] 右美沙酮阻断hGluN1/hGluN2C受体的能力也在细胞内添加时进行了评估。

[0847] E. 方法和程序

[0848] 通过手动膜片钳全细胞记录研究在聚-D-赖氨酸涂覆的玻璃盖玻片上生长的hGluN1/hGluN2C-CHO细胞。用于膜片钳记录的细胞外和细胞内溶液具有以下组成:

[0849] (1) 细胞内溶液(以mM计):80 CsF、50 CsCl、0.5 CaCl₂、10 HEPES、11 EGTA,用CsOH调节至pH 7.25;以及

[0850] (2) 细胞外溶液(以mM计):155 NaCl、3 KCl、1.5 CaCl₂、10 HEPES、10 D-葡萄糖,用NaOH调节至pH7.4。

[0851] 记录在等于保持电位的-70mV固定电压下发生。

[0852] hGluN1/hGluN2C-CHO细胞暴露于10/10μM L-谷氨酸/甘氨酸5秒,然后联合应用L-谷氨酸/甘氨酸加测试项目30秒以及再暴露到L-谷氨酸/甘氨酸50秒,如图39所示。

[0853] 测试项目开启/关闭速率通过曲线拟合它们诱导的电流阻断的发展或从它的缓解来测量。

[0854] F. 数据处理和分析

[0855] 分析了至少n=10个独立细胞。对于每个细胞,仅在10μM甘氨酸存在下的电流设置为0%,而在5秒应用后,由10μM L-谷氨酸和10μM甘氨酸诱导的稳态电流设置为100%。测试项目抑制谷氨酸诱导的电流的起效时间常数(tau-on,秒)和偏移时间常数(tau-off,秒)使用如下所示的一阶指数方程计算:

[0856] 测试项目起效的一阶方程:

[0857] $I(t) = I_1 + (I_0 - I_1) \times e^{-t/\tau_{on}}$

[0858] 测试项目偏移的一阶方程:

[0859] $I(t) = I_1 + (I_2 - I_1) \times (1 - e^{-t/\tau_{off}})$

[0860] 其中 $I(t)$ 是时间 t 处的电流; t 是测试项目分别在起始或偏移方程中施加或移除后的时间(秒); I_0 是施加10 μ M L-谷氨酸和10 μ M甘氨酸5秒后和施加测试项目之前的电流; I_1 是在10 μ M L-谷氨酸和10 μ M甘氨酸存在下,施加测试项目30秒后的电流; I_2 是在连续存在10 μ M L-谷氨酸和10 μ M甘氨酸的情况下,移除测试项目50秒后的电流; τ_{on} (又名tau-on)是起效的时间常数(秒);并且, τ_{off} (又名tau-off)是偏移的时间常数(秒)。

[0861] G. 结果

[0862] 1. 测试项目电流阻断%

[0863] 首先测定由10 μ M右美沙酮产生的阻断。10 μ M右美沙酮在hGluN1/hGluN2C-CHO细胞中产生的10/10 μ M L-谷氨酸/甘氨酸诱导的电流的阻断为74.6% $\pm$ 1.9% (n=12)。然后,研究了(±)-氯胺酮效果并且阻断结果为:在10、3、1和0.3 μ M时,分别为97.2% $\pm$ 0.3% (n=3)、89.7% $\pm$ 0.6% (n=3)、74.6% $\pm$ 2.2% (n=3)和44.2% $\pm$ 3.0% (n=7)。图40报告了存在10 μ M右美沙酮或各种浓度的(±)-氯胺酮时的剩余电流%的图,以及相关数据表。图40中报告的相同数据列于表46,如下:

[0864] 表46

	测试项目	电流%(平均值 $\pm$ SEM)	N
	对照	100	28
	10 μ M 右美沙酮	74.6 $\pm$ 1.9	12
[0865]	10 μ M (±)- 氯胺酮	97.2 $\pm$ 0.3	3
	3 μ M (±)-氯胺酮	89.7 $\pm$ 0.6	3
	1 μ M (±)-氯胺酮	74.6 $\pm$ 2.2	3
	0.3 μ M (±)- 氯胺酮	44.2 $\pm$ 3.0	7

[0866] 对照电流(100%)由10/10 μ M L-谷氨酸/甘氨酸诱导的,结果为-594.2 $\pm$ 103.7 pA (平均值 $\pm$ SEM, n=28)。

[0867] 图41报告了单独添加10/10 μ M L-谷氨酸/甘氨酸或添加10/10 μ M L-谷氨酸/甘氨酸与10 μ M右美沙酮或1 μ M(±)-氯胺酮组合的hGluN1/hGluN2C-CHO细胞的样品迹线。

[0868] 2. 测试项目起效和偏移动力学

[0869] 由于将使用引起相似阻断%的测试项目浓度来产生可比较的动力学数据(Mealing等人, 2001), 因此在tau-on和tau-off实验中测试了10 μ M右美沙酮和1 μ M(±)-氯胺酮。

[0870] 图42报告了在动力学实验中使用测试项目获得的典型迹线。10 μ M右美沙酮分别产生46.4和173.5s的tau-on和tau-off。1 μ M(±)-氯胺酮分别产生47.1和151.0s的tau-on和tau-off。

[0871] 图43报告了在持续存在10/10 μ M L-谷氨酸/甘氨酸的情况下,添加测试项目后平均电流%的时间过程,用于起效参数估计,以及10 μ M右美沙酮和1 μ M(±)-氯胺酮效果的比较和统计分析,其实施于来自单迹线拟合的平均tau值(10 μ M右美沙酮和1 μ M(±)-氯胺酮分别为46.7 $\pm$ 2.1s和47.3 $\pm$ 1.4s)。

[0872] 在图43中,迹线代表记录的10 μ M右美沙酮(中线;灰色阴影)、10 μ M(±)-氯胺酮(底线;黑色阴影)和1 μ M(±)-氯胺酮(顶部线;浅灰色阴影)的电流%,而内部黑色线是相对拟合线。

[0873] 以下等式用于拟合:

$$[0874] \quad I(t) = I_1 + (I_0 - I_1) \times e^{-t/\tau_{on}}$$

[0875] 拟合数据结果报告在下表47中:

[0876] 表47

-测试项目	Tau-on (s)	I ₀ ((电流%))	I ₁ ((电流%))	N
10 μ M(右美沙酮)	6.4	100 ((限制的))	20.4	11
1 μ M(±)-k氯胺酮	47.1	100 ((限制的))	28.7	10
10 μ M(±)-k氯胺酮	9.9	100 ((限制的))	3.6	4

[0878] 图44然后显示了10 μ M右美沙酮(左栏)和1 μ M(±)-氯胺酮(右栏)实验的tau-on比较:在10/10 μ M L-谷氨酸/甘氨酸的连续存在下,测试项目移除后平均电流%的时间过程,用于偏移参数估计,在图45中进行了报告,以及10 μ M右美沙酮和1 μ M(±)-氯胺酮效果的比较和统计分析,其实施于来自单迹线拟合的平均tau值(10 μ M右美沙酮和1 μ M(±)-氯胺酮分别为176.5 $\pm$ 10.5s和151.7 $\pm$ 6.3s)也图45中进行了报告。在图45中,迹线代表记录的10 μ M右美沙酮(灰色阴影)、1 μ M(±)-氯胺酮(黑色阴影)和10 μ M(±)-氯胺酮(浅灰色阴影)的电流%,而内部黑色线是相对拟合线。

[0879] 以下等式用于拟合:

$$[0880] \quad I(t) = I_1 + (I_2 - I_1) \times (1 - e^{-t/\tau_{off}})$$

[0881] 并且拟合数据结果报告在下表48中。

[0882] 表48

测试项目	Tau-off (s)	I ₁ ((电流%))	I ₂ ((电流%))	N
[0883] 10 μ M 右美沙酮	173.5	21.7	98.5	11
1 μ M (±)-k氯胺酮	151.0	28.5	95.5	10
10 μ M (±)-k氯胺酮	163.2	4.9	102.9	4

[0884] 图46显示了10 μ M右美沙酮(图46的左柱)和1 μ M(±)-氯胺酮(图46的右柱)实验的Tau-off比较。

[0885] 为了验证记录的慢测试项目动力学效应不是由于实验限制,然后还测试了10 μ M(±)-氯胺酮对起效动力学的影响。10 μ M(±)-氯胺酮的tau-on为9.9s,表明实验装置可以记录快动力学,而tau-off为163.2s。

[0886] 3. 右美沙酮细胞内应用

[0887] 为了评估右美沙酮可能的细胞内作用,将10 μ M测试项目添加到细胞内溶液中,并将10/10 μ M L-谷氨酸/甘氨酸在这种条件下诱导的电流与对照比较。存在细胞内10 μ M右美

沙酮时的电流裕度为 -752.1 ± 240.5 ($n=7$) pA, 而对照条件下为 -647.5 ± 215.5 ($n=12$) pA。这两个值的差异不显著 ($P>0.05$, 非配对t检验)。作为进一步的证据, 在细胞内10 μ M测试项目存在的情况下, 10 μ M右美沙酮对10/10 μ M L-谷氨酸/甘氨酸诱导的电流的抑制量没有增加。图47和48中报告了两个实验, 其中图47显示细胞内右美沙酮没有改变10/10 μ M L-谷氨酸/甘氨酸诱导的电流, 图48显示细胞内右美沙酮没有增加细胞外右美沙酮的电流阻断。更具体地说, 图47是在对照条件(左柱, $n=12$) 和存在10 μ M细胞内右美沙酮(右柱, $n=7$) 下的10/10 μ M L-谷氨酸/甘氨酸诱导的电流图。并且图48是在存在(中心柱, $n=12$) 和不存在(右柱, $n=7$) 10 μ M细胞内右美沙酮的情况下, 相对于10/10 μ M L-谷氨酸/甘氨酸诱导的电流标准化的10 μ M右美沙酮的效果图。

[0888] H. 讨论

[0889] 10 μ M右美沙酮和1 μ M(±)-氯胺酮在hGluN1/hGluN2C-CHO细胞中引起了10/10 μ M L-谷氨酸/甘氨酸引起的电流的相似抑制%。该结果与先前的FLIPR研究(实施例1)一致, 显示(±)-氯胺酮对hGluN1/hGluN2CNMDAR的效力比右美沙酮高近10倍。

[0890] 当比较诱导相似阻断%的测试项目浓度时, 两个测试项目的起效动力学产生了非常相似的结果, 即, 右美沙酮和(±)-氯胺酮分别为10和1 μ M。事实上, 10 μ M右美沙酮和1 μ M(±)-氯胺酮的tau-on分别为46.4和47.1s。10 μ M(±)-氯胺酮tau-on为9.9s, 正如预期的那样, 因为tau-on是浓度依赖性的, 不像tau-off。

[0891] 10 μ M右美沙酮(173.5s)的偏移动力学也产生了与1和10 μ M(±)-氯胺酮相似的结果(分别为151.0和163.2s)。

[0892] 记录的数据表明, (±)-氯胺酮相对于右美沙酮的效力高10倍是由于(±)-氯胺酮在相同的右美沙酮浓度下测试时具有更快的起效动力学, 而偏移动力学没有显著差异。

[0893] I. 结论

[0894] 10 μ M右美沙酮和10 μ M(±)-氯胺酮分别诱导74.6%和97.2%的hGluN1/hGluN2C受体阻断。3、1和0.3 μ M(±)-氯胺酮分别阻断89.7, 74.6和44.2%。

[0895] 10 μ M右美沙酮阻断和解除阻断的tau-on和tau-off参数分别为46.4s和173.5s。同样, 1 μ M(±)-氯胺酮阻断和解除阻断的tau-on和tau-off参数分别为47.1s和151.0s。

[0896] 10 μ M(±)-氯胺酮的tau-on和tau-off参数分别为9.9和163.2s。

[0897] 细胞内10 μ M右美沙酮未显示对10/10 μ M L-谷氨酸/甘氨酸诱导的电流的阻断。

[0898] 第II部分: 对GluN1-Glu-2C NMDAR的电生理学捕获测定

[0899] A. 概述

[0900] 在实施例6的该第II部分, 在手动膜片钳中评估右美沙酮和(±)氯胺酮, 以评估它们的捕获含有GluN2C亚基的重组二异聚人NMDAR的水平。

[0901] 1. 方法

[0902] 手动膜片钳记录发生在-70mV。通过将hGluN1/hGluN2C-CHO细胞暴露于10/10 μ M L-谷氨酸/甘氨酸5秒, 然后联合应用L-谷氨酸/甘氨酸加测试项目30秒, 然后仅应用甘氨酸85秒, 最后再暴露于L-谷氨酸/甘氨酸50秒来确定测试项目捕获。

[0903] 2. 结果

[0904] 右美沙酮和(±)-氯胺酮对GluN1/GluN2C受体分别显示 $85.9\% \pm 1.9\%$ ($n=13$) 和 $86.7\% \pm 1.8\%$ ($n=11$) 的捕获。

[0905] 3. 结论

[0906] 右美沙酮和氯胺酮在本发明人的实验条件下显示出类似的捕获,这可能与它们作为抗抑郁药物的报道功效有关(与抑郁症的孤立症状有关)。有趣的是,美金刚,另一种NMDAR拮抗剂,比氯胺酮和右美沙酮更有效,但据报道低捕获,被FDA批准用于治疗晚期痴呆,但据报道没有抗抑郁作用。本发明人的结果表明,对于MDD中NMDAR通道阻断剂的治疗效果,可能需要高捕获。

[0907] B. 总结

[0908] 设计电生理学测定以相对于GluN1-GluN2C NMDAR细胞系中10/10 μ M L-谷氨酸/甘氨酸诱导的全细胞电流的阻断,建立测试项目捕获。

[0909] 选择右美沙酮和(±)-氯胺酮作为测试项目。

[0910] 右美沙酮捕获结果为85.9%。

[0911] (±)-氯胺酮捕获结果为86.7%。

[0912] 电生理学手动膜片钳方法用于建立右美沙酮和(±)-氯胺酮的捕获测定。相对于GluN1-GluN2C NMDAR细胞系中10/10 μ M L-谷氨酸/甘氨酸诱导的全细胞电流的阻滞,研究了测试项目捕获。

[0913] 测试项目如下表49所示。

[0914] 表49

名称	MW	供应商	编码	CAS
盐酸右美沙酮	345.91	Padova University		5653-80-5 (盐基)
(±) 盐酸氯胺酮	274.19	Merck Sigma-Aldrich	K2753	1867-66-9
L-谷氨酸	187.1	Merck Sigma-Aldrich	G1626	142-47-2 (无水的)
甘氨酸	75.07	Merck Sigma-Aldrich	G7403	56-40-6

[0916] 将测试项目以合适的浓度溶解在H₂O中,然后在-20℃下储存直至使用。

[0917] 储备浓度为:对于右美沙酮,100mM=10mg/289 μ l;对于(±)-氯胺酮,100mM=10mg/365 μ l;对于L-谷氨酸,1M=100mg/534 μ l;对于甘氨酸,1M=100mg/1332 μ l。

[0918] C. 测试系统

[0919] 使用手动膜片钳全细胞记录方法评估测试项目,使用与BioLogic RSC-160灌注装置(BioLogic,Seyssinet-Pariset,France)耦合的HEKA Elektronik Patchmaster系统,如在本实施例1的第I部分的方案中所描述的。在本研究中使用表达二异聚人GluN1-GluN2C NMDA受体的CHO细胞系。

[0920] D. 实验设计

[0921] 本实施例6的第II部分的目的是评估右美沙酮和(±)-氯胺酮在引起对GluN1-GluN2C受体的相似电流%阻断的浓度下的捕获。

[0922] 基于在本实施例6的第I部分中报告的结果,10 μ M右美沙酮和1 μ M(±)-氯胺酮被选择作为测试项目浓度。

[0923] E. 方法和程序

[0924] 通过手动膜片钳全细胞记录研究在聚-D-赖氨酸涂覆的玻璃盖玻片上生长的hGluN1/hGluN2C-CHO细胞。用于膜片钳记录的细胞外和细胞内溶液具有以下组成:

[0925] (1) 细胞内溶液(以mM计): 80 CsF、50 CsCl、0.5 CaCl₂、10 HEPES、11 EGTA, 用CsOH调节至pH7.25;

[0926] (2) 细胞外溶液(以mM计): 155 NaCl、3 KCl、1.5 CaCl₂、10 HEPES、10 D-葡萄糖, 用NaOH调节至pH7.4。

[0927] 记录发生在等于保持电位的-70mV固定电压下。

[0928] 如Mealing等人在2001年中所述, 使用适当浓度的测试项目测量初始阻断的捕获。测试项目捕获是通过将hGluN1/hGluN2C-CHO细胞暴露于10/10μM L-谷氨酸/甘氨酸5秒, 然后同时应用L-谷氨酸/甘氨酸加测试项目30秒, 然后仅应用甘氨酸85秒, 最后再暴露于L-谷氨酸/甘氨酸50秒来确定。测试项目应用方案的示意图如图49所示。

[0929] F. 数据处理和分析

[0930] 10/10μM L-谷氨酸/甘氨酸诱发的电流的阻断根据以下公式计算:

$$[0931] \quad B = [(I - I_B) / I] \times 100 \quad (1)$$

[0932] 其中I被确定为从线性外推到L-谷氨酸拮抗剂联合应用结束时的电流值, I_B是在L-谷氨酸/阻断剂联合应用结束时测量的电流。

[0933] L-谷氨酸诱发的电流的残余阻断根据下式计算:

$$[0934] \quad B_R = [(I_{1st} - I_{2nd}) / I_{1st}] \times 100 \quad (2)$$

[0935] 其中I_{1st}是在第一次L-谷氨酸暴露开始后1秒内测量的最大电流, I_{2nd}是从溶液中清洗掉阻滞剂后延迟的第二次L-谷氨酸暴露开始后1秒内测量的最大电流。

[0936] 捕获的阻断(BT), 或在第二次L-谷氨酸应用开始时剩余的阻断量占在前一次L-谷氨酸/拮抗剂联合应用结束时产生的初始阻断的百分比, 其根据以下公式计算:

$$[0937] \quad B_T = B_R / B \times 100 \quad (3)$$

[0938] 其中B和B_R定义如上。

[0939] 数据表示为平均值±S.E.M。(n≥10个细胞)。

[0940] G. 方案偏差

[0941] 等式(1)中的I值是从线性外推(而不是一阶指数曲线)到L-谷氨酸拮抗剂联合应用结束而确定的。

[0942] 如在实施例6的方案中报告的, 等式(2)中的I_{1st}和I_{2nd}在第一次或第二次L-谷氨酸暴露开始后1000±100ms测量, 而不是200±25ms, 因为本发明人的hGluN1-hGluN2C对L-谷氨酸的反应开始明显慢于Mealing等人在2001年报道的在培养的大鼠皮层神经元中的反应。

[0943] H. 结果

[0944] 图50显示了响应于测试项目的指定应用在捕获测定实验中获得的代表性迹线。

[0945] 如图51A-51C(左)所示, 外推至L-谷氨酸与拮抗剂联合应用结束, 相对于控制电流[等式(1)], 由10μM右美沙酮产生的对10/10μM L-谷氨酸/甘氨酸引起的电流的阻断为83.8%±1.2%。在1μM(±)-氯胺酮存在下, 观察到的阻断为74.0%±1.2%。这两个数字在统计学上是不同的。

[0946] 使用等式(2)计算的残留阻断也获得了统计学上显著的差异, 对于10μM右美沙酮和1μM(±)-氯胺酮结果分别为71.8%±1.1%和64.1%±1.3%, 如图51B所示。

[0947] 对于10μM右美沙酮和1μM(±)-氯胺酮, 从等式(3)获得的捕获的阻断分别为

85.9%±1.9%和86.7%±1.8%(右)。对于两个测试项目,这种影响的量必须被认为是相等的。

[0948] I. 讨论

[0949] 在本发明人对GluN1/GluN2C受体的实验条件下,(±)-氯胺酮显示86.7%的捕获,与Mealing GA、Lanthorn TH、Murray CL、Small DL、Morley P报告的86.0%值最佳一致。具有相似阻断动力学的低亲和力非竞争性N-甲基-D-天冬氨酸受体拮抗剂在捕获程度存在差异。J Pharmacol Exp Ther.1999;288(1):204-210,使用培养的大鼠皮层神经元。

[0950] 本发明人还获得了右美沙酮对GluN1/GluN2C受体的类似的85.9%的捕获阻断值。

[0951] 捕获的拮抗剂已表明产生NMDAR强直阻断(Mealing等人,2001)。NMDAR强直阻断可能对环境谷氨酸抑制起作用,这反过来可能与NMDAR阻滞剂的抗抑郁作用有关。

[0952] 相对于氯胺酮而言,更安全的右美沙酮曲线不能用对GluN1/GluN2C受体的差异捕获来解释。相反,考虑到两种阻滞剂都以相似的水平被捕获在NMDAR中,在不同的亚型(包括GluN2C和GluN2D)和相似的游离脑浓度下,较低的右美沙酮效力可能决定NMDAR强直阻断水平低于氯胺酮。

[0953] J. 结论

[0954] 10μM右美沙酮和1μM(±)-氯胺酮分别诱导83.8%和74.0%的hGluN1/hGluN2C受体的阻断。

[0955] 对于10μM右美沙酮和1μM(±)-氯胺酮,残留阻断分别为71.8%和64.1%。

[0956] 因此,对于10μM右美沙酮和1μM(±)-氯胺酮,捕获的阻断分别为85.9%和86.7%。

[0957] 第III部分:在镁存在下的右美沙酮自动电生理学研究

[0958] A. 背景

[0959] 在生理条件下,NMDAR孔被细胞外镁阻断。因此,本发明人试图表征在细胞外镁存在下和在不同膜电位下右美沙酮对二异聚人NMDAR的阻断。

[0960] B. 方法

[0961] 使用稳定表达重组二异聚人NMDAR的CHO细胞在QPatch HTX(Sophion Bioscience A/S,Ballerup,Denmark)中进行自动化膜片钳实验。在存在1mM细胞外镁的情况下,将细胞夹在-80mV保持电位。电压方案包括去极化2秒,步进脉冲至+60mV,以检查密封质量和细胞NMDAR表达水平,然后是2秒斜坡回到保持电位。在方案期间,在不存在或存在10μM右美沙酮的情况下,在不同电压下测量L-谷氨酸诱导的电流。

[0962] C. 结果

[0963] 研究了10μM右美沙酮对10μM或1μM L-谷氨酸诱导的电流的影响。GluN1/GluN2D受体导致人二异聚NMDAR对右美沙酮阻断更敏感:在-30mV至-80mV范围内的所有测量负电压下,右美沙酮显著降低了10μM或1μM L-谷氨酸引发的电流。具体而言,在应用右美沙酮后,在-80mV和存在1μM L-谷氨酸下,残余电流是应用前水平的62.5±4.1%(n=4),而在对照细胞中该值为102.5±3.9%(n=4)。右美沙酮表现的阻断作用是电压依赖性的,类似于镁表现的阻断作用。

[0964] D. 结论

[0965] 右美沙酮在1mM胞外镁存在下,优先降低GluN1/GluN2D受体处的L-谷氨酸电流,这表明右美沙酮对由环境L-谷氨酸激活的NMDAR有作用,并可能保留阶段性激活的NMDAR。

[0966] 实施例7--生物标志物

[0967] A.背景

[0968] 如上所述,右美沙酮增加健康受试者中的BDNF。在该实施例7中,本发明人假设BDNF和另外的生物标志物的分析可以增加至本申请公开的右美沙酮作为疾病改善治疗的概述的结果。值得注意的是,在本文讨论的MDD患者中,右美沙酮并未增强BDNF,因此,BDNF血浆水平不太可能是MDD中右美沙酮效果的可靠标志物。然而,右美沙酮,通过对炎症生物标志物水平较高的患者表现出更高的效力,可以对这些患者发挥疾病改善效果,而不仅仅是对症效果(对症效果对于具有特定疾病生物标志物的患者通常不是特异性的,而是在具有相同症状但不一定是相同疾病且所述疾病具有相同病理生理学的不同患者群体中观察到)。

[0969] B.BMI、生物标志物及右美沙酮的治疗效果

[0970] 1.方法

[0971] 在本实验中,将患者根据其BMI分为以下人群(30以下=非肥胖;等于或大于30=肥胖):人群1:非肥胖(39名患者)和人群2:肥胖(21名患者)。

[0972] 2.治疗前第1天基线水平的结果总结:

[0973] 相对于非肥胖患者,在肥胖患者中可以观察到测量的生物标志物的总体下降趋势(即,在诊断为MDD的患者中,与肥胖患者相比,在非肥胖患者中观察到更高水平的炎症标志物)。非肥胖和肥胖患者之间可能存在统计学上的显著差异:(1)GM-CSF*p值0.024(非肥胖和肥胖患者分别为 $57,129 \pm 75,891$ 和 $4,673 \pm 12,943$);(2)IL-2**p值0.004(非肥胖和肥胖患者分别为 $6,882 \pm 9,602$ 和 $2,086 \pm 1,932$);(3)IL-7**p值0.004(非肥胖和肥胖患者分别为 $1,359 \pm 1,382$ 和 $0,628 \pm 0,481$)。

[0974] 其他炎性细胞因子(IL-13、IL-4、IL-6、MIP-1a、TNF-a)在两组中接近统计学显著性,在非肥胖患者中同样具有更高水平。

[0975] 当与肥胖患者表现出的缺乏反应相关时(参见表32-34),上述结果表明,右美沙酮通过在具有更高水平炎症生物标志物的患者中显示出更高的功效,可以表现出对这些患者具有疾病改善效果,并且不仅是对症效果(对症效果对于具有特定疾病生物标志物的患者通常不是特异性的,而是在具有相同症状但不一定是相同疾病的不同患者群体中观察到)。

[0976] 本领域技术人员普遍接受的是,用于治疗慢性疾病的纯对症药物的效果趋于在量级上迅速降低或在停止用药后突然停止(尤其是在突然停药后,就像在发明人在本申请中公开的右美沙酮的2期临床试验中的情况,实施例3)。对症药物的突然停药甚至可以确定症状增强或反弹的现象(与治疗前基线相比症状恶化)。对症治疗的一个示例是用于治疗疼痛的咖啡,例如,用于治疗术后疼痛的咖啡。如果在术后炎症状态仍然活跃时停用咖啡,疼痛将在几个小时内恢复。

[0977] 另一方面,疾病改善治疗引起的改善,包括症状的改善,往往在治疗周期完成后持续存在,例如,针对癌症、多发性硬化症或类风湿性关节炎的免疫疗法,甚至在停止治疗后。如果免疫治疗周期足够,患者的症状,例如疾病部位的疼痛和炎症、全身不适等,一般不会在突然停止治疗后复发,如实施例3中描述的患者情况。

[0978] 右美沙酮在MDD患者中诱导的缓解在停止治疗后出乎意料地持续的事实,表明右美沙酮的作用不是纯粹的对症性的,即右美沙酮不会通过与特定受体结合而简单地在症状

上提升患者的情绪,这种作用会在停止用药和受体解除结合后停止,例如,在情绪低落的受试者中使用阿片类药物或者甚至酒精时可能会发生这种情况。右美沙酮在MDD患者中诱导的持续缓解(由MADRS和其他量表的多个维度的改善确定,因此不限于作为孤立症状的抑郁症的改善)表明右美沙酮的效果可能仅次于疾病改善效果,包括在实施例3中讨论的2a期试验中首次临床证实的神经可塑性机制(例如,可能与新NMDAR通道的合成有关的神经可塑性机制),例如另见实施例2。

[0979] 新的体内(大鼠)和体外实验(在下面的实施例11中)也表明右美沙酮可以调节可能在MDD中增加的炎症生物标志物的作用。用右美沙酮治疗的MDD患者的血浆分析进一步证实了其在包括MDD在内的神经精神疾病中的疾病改善效果。最后,对于通过与受体结合来缓解症状的对症治疗,本领域技术人员期望更高的剂量发挥更强大的作用,因为随着药物的血浆水平更高,将发生更多的受体结合。

[0980] 出乎意料的是,在本发明人的2a期试验中情况并非如此,其中较低剂量(25mg),相比于与50mg的较高(双倍)剂量,似乎效果同样好或更好。较高的剂量导致大约两倍的血浆水平和更多副作用的趋势,但与25mg相比并没有提高功效。出人意料地观察到25mg右美沙酮在MDD中的“治疗上限效应”再次表明了疾病改善效果,例如,在用于癌症、多发性硬化症或类风湿性关节炎的免疫疗法中所见的情况--疾病改善治疗的剂量加倍不一定会在个体患者中提高功效或增加治愈患者的百分比的疾病状态。然而,高于“上限效应”的更高剂量可能会增加副作用,取决于药物的安全性和耐受性曲线。在右美沙酮的情况下,这种副作用的增加是存在的,但其临床意义很低(如果有的话),因为右美沙酮的安全窗口很大。另一方面,在对症治疗的情况下,例如阿片类药物治疗急性疼痛,吗啡剂量加倍通常会导致更好的疼痛控制,尽管通常以更严重的副作用为代价。本发明人在本文中公开了每天或甚至间歇施用的甚至更低剂量的右美沙酮(例如,每天少于25mg,例如0.1-24mg)可以有效治疗对更高剂量没有反应的患者子集中的MDD。此外,较高剂量的右美沙酮(例如,每天滴定至1000mg的剂量)可能会使25或50mg组中未改善的患者的子集(例如,肥胖患者)受益。

[0981] 此外,直接作用于神经递质受体的药物,例如苯二氮平类、阿片类药物和多巴胺拮抗剂,或作用于它们的通路,包括转运通路,例如SSRI,似乎通过影响特定的神经递质通路来发挥它们的作用,并且当停药后,它们的作用突然停止或甚至会反弹。如2a期研究中使用右美沙酮治疗的患者所见,治疗停止后整周的治疗效果持续存在,特别是在没有戒断效应的情况下,强烈表明通过神经可塑性机制的疾病改善效果。此外,效果的持续性也表明间歇性长期治疗(例如,每周)相对于连续(例如,每天)长期治疗的潜在功效。

[0982] 在本发明人的2a期研究中看到的意想不到的疾病缓解效果被本发明人假定是由于多种作用机制,包括所述效果和作用机制的相互作用和协同作用(包括变构相互作用),这些效果可能由右美沙酮对多种受体和通路的多重作用决定,该受体和通路包括NMDAR及其亚型、烟碱受体(Talka等,2015)、sigma-1(Maneckjee R, Minna JD. Characterization of methadone receptor subtypes present in human brain and lung tissues. Life Sci. 1997; 61 (22))、SET、NET、MOP、DOP、KOP(Codd等人,1995)5-羟色胺受体及其亚型,尤其包括5-HT_{2A}和5-HT_{2C}受体(Rickli A, Liakoni E, Hoener MC, Liechti ME. Opioid-induced inhibition of the human 5-HT and noradrenaline transporters in vitro: link to clinical reports of serotonin syndrome. Br J Pharmacol. 2018; 175 (3) : 532-543)以

及组织胺受体 (Codd et al., 1995; Kristensen K, Christensen CB, Christrup LL. The $\mu_1, \mu_2, \delta, \kappa$ opioid receptor binding profiles of methadone stereoisomers and morphine. *Life Sci.* 1995; 56 (2) : PL45-PL50)。最后, 右美沙酮的作用可能是直接的, 也可能是通过其代谢物EDDP和EMDP及其异构体产生。Forcelli等人, 于2016年 (Forcelli PA, Turner JR, Lee BG, et al. Anxiolytic- and antidepressant-like effects of the methadone metabolite 2-ethyl-5-methyl-3,3-diphenyl-1-pyrrolidine (EMDP). *Neuropharmacology.* 2016; 2015.09.012) 公开美沙酮代谢物, 特别是EMDP, 基于临床前模型和nAChR通道的受体结合数据, 并基于烟草制品中发现的尼古丁对缓解焦虑和抑郁症状的对症作用, 用于治疗焦虑和抑郁症状。

[0983] 基于以上公开的本发明人的数据, 以及他们在下文实施例8中呈现的NMDAR锚定结果的数据, 本发明人公开了美沙酮的代谢物, 包括实施例8中呈现的那些, 不仅可以有效地用于治疗症状, 但可以有效地作为对神经精神疾病和障碍以及本申请中公开的并且由过量 Ca^{2+} 内流触发、维持或恶化的其他疾病和障碍的疾病改善治疗。这些疾病缓解作用反映了右美沙酮诱导的神经可塑性。

[0984] 目前的理解是, 右美沙酮主要用作具有有利PD曲线的NMDAR开放通道非竞争性阻断剂 (如本文的实施例中所示), 并且NMDAR处的通道阻断作用导致过度活跃的通道的调节 (NMDAR在多种疾病和障碍中可能具有病理性过度活跃)。通过阻断过度活跃的NMDA受体并由此调节钙内流, 右美沙酮治疗确定下游神经可塑性, 正如关于右美沙酮诱导NMDAR蛋白亚基合成的新体外实验结果所证明的那样 (实施例2)。NMDAR调节的这些下游作用导致潜在的疾病改善治疗益处, 包括快速和持续的, 如本发明人在MDD中的2a期研究结果所示。

[0985] 5-HT_{2A} 5-羟色胺受体亚型5-HT_{2A} (和在较小程度上, 5-HT_{2C}) 与5-羟色胺受体激动剂的迷幻/拟精神病作用和潜在治疗作用相关 [Halberstadt AL, Geyer MA. Multiple receptors contribute to the behavioral effects of indoleamine hallucinogens. *Neuropharmacology.* 2011; 61 (3) : 364-381]。迷幻药物现在与神经可塑性效应有关 (Ly等人, 2018年)。Rickli等人于2018年报道了右美沙酮是一种5-HT_{2A}激动剂 (K_i 520nM) 和5-HT_{2C}激动剂 (K_i 1900nM)。因此, 右美沙酮有一种新的机制可以诱导神经可塑性, 或者两种机制 (NMDAR拮抗作用和5-HT_{2A}激动作用) 之间可能存在协同作用或甚至重叠 (变构相互作用)。除了右美沙酮定位在NMDAR的孔内之外, 如发明人公开的结合研究所示, 在PCP位点, 本发明人假设激活的5-HT受体2A和2C与 Ca^{2+} 可渗透的NMDAR之间的变构相互作用: 当5-HT_{2A}-C激动剂 (例如, 右美沙酮) 与这些受体结合时, 它们导致结构相关的NMDAR病理性过度活跃的通道关闭。

[0986] NMDAR通道阻断所需的外消旋1, d-美沙酮和1-美沙酮的浓度高于激活阿片受体所需的浓度 [Matsui A, Williams JT. Activation of μ -opioid receptors and block of Kir3 potassium channels and NMDA receptor conductance by L- and D-methadone in rat locus coeruleus. *Br J Pharmacol.* 2010; 161 (6) : 1403-1413]: 外消旋美沙酮和左旋美沙酮都在临床上用于治疗疼痛, 其临床效果以强大的 μ 阿片类药物效应为主。与左美沙酮相比, 右美沙酮对阿片受体的亲和力低20倍以上 (Codd等人, 1995)。对MDD患者有治疗作用的右美沙酮的浓度足以发挥NMDAR阻断作用 (低微摩尔范围, Gorman等人, 1997), 还可以介导由5-HT_{2A}和5-HT_{2C}激动剂作用诱导的神经可塑性效应 (分别对于5-HT_{2A}和5-HT_{2C}受体的

高纳摩尔和低微摩尔范围,Rickli等人,2019),没有来自阿片类药物的激动剂作用或5-羟色胺受体激动剂作用的临床上有意义的副作用,即没有阿片类药物具有的典型的镇静和呼吸抑制作用,并且没有某些NMDAR通道阻滞剂(例如,PCP和氯胺酮)和某些迷幻5-HT_{2A}激动剂药物(例如,裸盖菇素、DOI和LSD)典型的拟精神病/迷幻作用(实施例3证明了右美沙酮用于治疗MDD的剂量没有认知副作用)。

[0987] 在导致对MDD的持续治疗益处的剂量下缺乏临床上有意义的阿片类药物相关副作用和迷幻/拟精神病作用现在由本文呈现的2a期结果显示(参见实施例3)。来自2a期研究的上述结果和观察表明,右美沙酮的快速和持续抗抑郁作用可能取决于其作为NMDAR通道阻滞剂的伴随作用(Gorman等人,1997),也可能取决于其作为5-HT_{2A}和5-HT_{2C}激动剂的作用(Rickli等人,2018)。这两种作用都可能在患有MDD的患者中诱导神经可塑性和调节过度活跃的NMDAR通道的活性,同时通过NMDAR通道阻断和可能的5-羟色胺激动作用(5-HT_{2A}和5-HT_{2C}受体激动剂作用)以及可能的其他5-羟色胺受体和通路(更好地确定5-HT_{2A}和5-HT_{2C}受体在ARPE-19细胞中的神经可塑性调节中的作用的实验正在进行中,包括验证5-羟色胺与NMDA受体之间的结构关联)来促进神经可塑性和神经连接。

[0988] 因此,本发明人不仅为右美沙酮在MDD患者中的快速和持续治疗作用提供了强烈信号,而且还提供了解释右美沙酮的高效神经可塑性作用的新作用机制,这可能是其治疗功效的基础。具体而言,本发明人的临床和实验结果表明右美沙酮在MDD和相关障碍(例如本文列出的障碍)中的持续的疾病改善效果,并证实了在本申请中讨论的其他MDD相关障碍中的潜在治疗性疾病改善效果。

[0989] 本发明人现在还公开了右美沙酮用于治疗躯体性症状障碍(SSD)、用于治疗适应障碍(AD)和用于治疗物质使用障碍(SUD)的用途。当发明人探索右美沙酮对具有源自刺激CNS和/或PNS神经元(神经性疼痛)、躯体伤害感受器(躯体疼痛)和内脏伤害感受器(内脏疼痛)的癌症疼痛(Morley等人,2016)的患者的影响时,对疼痛强度没有可测量的效果。

[0990] 本文公开的本发明人的新的临床和实验结果表明,右美沙酮虽然可能对降低疼痛强度无效,但对SSD和AD具有潜在的疾病改善效果,包括当这些疾病的最突出症状是疼痛时。为了进一步阐明,右美沙酮对带有疼痛成分的SSD和AD的功效并不是对持续刺激CNS或PNS神经元(神经性疼痛)、躯体伤害感受器(躯体疼痛)和内脏伤害感受器(内脏疼痛)引起的疼痛的直接作用,对于持续刺激CNS或PNS神经元(神经性疼痛)、躯体伤害感受器(躯体疼痛)和内脏伤害感受器(内脏疼痛)引起的疼痛而言,经典的镇痛药效果最好(例如,外消旋美沙酮)。然而,当CNS或PNS神经元(神经性疼痛)、躯体伤害感受器(躯体疼痛)和内脏(疼痛)伤害感受器的持续刺激不是主要的罪魁祸首时,正如带有疼痛成分的SSD和AD的情况一样(相比之下,例如,手术后疼痛或甚至慢性癌症疼痛),右美沙酮,其潜在的疾病/障碍改善效果和作用机制,在整个本申请中定义并在实施例1-11中公开,可能是潜在的治愈性的,如在患有MDD的患者中所见(如本文实施例3所示)。

[0991] 沿着相同的推理思路,本发明人现在公开右美沙酮可能是一种用于SUD的疾病改善治疗方法,尤其是在没有“对麻醉性镇痛剂的耐受性和身体依赖,和/或身体渴望”的情况下。基于新的临床和实验证据,“当受试者对麻醉性镇痛剂和/或成瘾物质有耐受性和身体依赖,和/或身体渴望时”,阿片类药物替代疗法可能效果最好,例如,外消旋美沙酮或左美沙酮,如Isbell H、Eisenman AJ所证实:The addiction liability of some drugs of

the methadone series. *J Pharmacol Exp Ther.* 1948;93:305-313; Fraser and Isbell, 1962. 基于上述内容, 本发明人现在公开, “当受试者对麻醉性镇痛剂和/或成瘾物质有耐受性和身体依赖, 和/或身体渴望时”, 未指明右美沙酮。本发明人现在公开, 当受试者不再对成瘾物质具有耐受性并且不再对成瘾物质具有身体依赖, 并且不再对成瘾物质具有身体渴望, 但仍然患有SUD时, 如在MDD患者中所见, 具有潜在的疾病/障碍改善效果的右美沙酮可能对SUD具有治愈作用。

[0992] 25和50mg剂量之间出乎意料的相似效果表明较低剂量的更好功效(上限效应), 促使在实施例2中详述的新体外研究和对右美沙酮的先前PD 和 PK发现的审视, 包括Bernstein等人在2019年对1期PD和PK结果的新审视。实施例2中新体外研究的结果和对PK/PD模型的审视也指出了低剂量的潜在功效。此外, 当本发明人在用右美沙酮治疗的正常志愿者中测量BDNF血浆水平时, 他们发现在用25mg治疗的受试者中BDNF的显著统计学增加, 但在用50和75mg治疗的受试者中没有发现这种显著统计学增加。最后, 只有极低的5mg单剂量右美沙酮与促智作用的信号有关。总之, 这些发现表明即使非常低剂量的右美沙酮也可能产生治疗效果, 例如, 导致血浆水平甚至低于实施例3中25mg剂量在第7天的血浆水平和更接近同一患者在第14天可见的血浆水平(当治疗效果仍然存在时), 以及5mg剂量的血浆水平附近。基于发明人进行的研究和本申请中公开的结果(参见实施例1-7), 用于MDD的右美沙酮的治疗浓度可以保留生理功能NMDAR (NR1-GluN2A和NR1-GluN2B通道的快速生理性开放和关闭不允许右美沙酮进入并阻断阶段性开放通道, 但相同的治疗浓度足以和有效地作用于选择的病理性和强直性过度活跃的通道, 例如NR1-GluN2C和可能的NR1-GluN2D)。

[0993] 外消旋美沙酮、d-美沙酮、l-美沙酮、外消旋氯胺酮和[S]-氯胺酮的NMDAR通道阻断作用已在体外通过测量HEK293细胞中表达的人克隆NMDAR NR1/NR2A和NR1/NR2B受体的电生理反应得到证实。这些化合物中的每一个的大约等效半数最大抑制浓度(IC₅₀) 在低微摩尔范围内(参见Bernstein等人的表1, 2019)。与左美沙酮相比, 右美沙酮对 μ 阿片受体的纳摩尔亲和力是左美沙酮的1/10到1/30 (Gorman等人, 1997; Kristensen等人, 1994), 并且消旋美沙酮在常用处方剂量下的 μ 阿片类药物相关的镇痛作用是归因于左美沙酮(其对阿片受体的效力被列为外消旋美沙酮效力的两倍, 因此右美沙酮对阿片类药物效果的贡献被认为可以忽略不计)。由于微摩尔(NMDAR) 和纳摩尔(μ 阿片受体) 的亲和力, 本发明人临床研究中使用的右美沙酮的剂量(25和50毫克)(其不具有临床意义上的阿片类药物效应) 不太可能阻断正常功能阶段性激活的NMDAR通道。对于用于治疗特定疾病和障碍的特定药物, 可能需要高受体占有率。在右美沙酮和其他NMDAR调节剂的情况下, 治疗目标仅限于病理性和强直性过度活跃的NMDAR(例如, GluN2C或2D), 而不是阶段性过度活跃的NMDAR(例如, GluN2A、2B)。因此, 在没有阿片类药物副作用或其他临床上有意义的副作用的剂量下, 正常功能的阶段性NMDAR的受体占有率应该非常低, 甚至没有更好, 并且对治疗MDD有效(如实施例3所示) 和调节病理性和强直性过度活跃的NMDAR(包含2c和2d亚基的病理性和强直性过度活跃的NMDAR允许结合右美沙酮, “开启”动力学, 如实施例6所示)。如本发明人在患者中的临床结果中所见, 这种有希望的作用模式, 即选择性靶向过度活化的受体同时保留正常功能的受体, 也得到从较低剂量获得比较高剂量更好的结果(实施例3) 的信号的支持。

[0994] 此外, NMDAR的离子通道区域在不同的受体亚基中高度保守, 这可能是测试的临床有效(MDD) 的NMDAR阻滞剂的亚型选择性低(小于10倍) 的原因--如实施例1所示。然而, 已经

表明生理水平的 Mg^{2+} 降低美金刚对含GluN2A或GluN2B的受体的抑制接近20倍,因此对含有GluN2C和GluN2D亚基的NMDA受体的选择性增加高达10倍 (Kotermanski and Johnson, 2009)。 Mg^{2+} 与右美沙酮联合使用可增加右美沙酮对相同受体的选择性,从而提高其疗效。

[0995] 本发明人还确定,右美沙酮的NMDAR阻断是细胞外的,并且在右美沙酮穿透细胞膜后,细胞内阻断不太可能是主要贡献者(实施例6)。

[0996] 总之,右美沙酮通过作用于病理性开放和强直性过度活跃的受体[在兴奋性和抑制性神经元以及可能在星形胶质细胞和其他细胞]并下调过量 Ca^{2+} 内流,导致神经可塑性的恢复,允许在功能障碍的记忆(在MDD的情况下为情绪抑郁记忆)和在其他疾病和障碍的情况下的其他功能障碍的记忆微回路之上形成新的记忆。长期过量的 Ca^{2+} 内流,如过度活跃的强直和病理性开放的NMDAR所见,决定了过量的 Ca^{2+} 内流,这对生理神经可塑性有抑制作用(类似于没有突触前谷氨酸释放和突触后 Ca^{2+} 内流的完全缺乏刺激,导致神经可塑性降低)。 Ca^{2+} 内流过多和过少都会干扰神经可塑性,包括阶段性(刺激过多或过少,刺激诱发LTP-eEPSC)和强直性(过多或过少 Ca^{2+} 内流,刺激独立“维持”LTP-mEPSC)。此外,右美沙酮对过量 Ca^{2+} 下调的作用可预防更严重的细胞功能障碍,包括细胞凋亡,并预防与细胞消亡相关的疾病和障碍,包括神经发育和神经退行性疾病以及与衰老相关的细胞凋亡。值得注意的是,有证据表明MDD也与神经元和星形胶质细胞消亡有关,如上所述。

[0997] 实施例8-分子建模

[0998] 在本研究中,基于源自实施例3(以上)和本申请中公开的其他实施例的右美沙酮的疾病改善效果,本发明人公开了美沙酮代谢物,例如EDDP,也可以是疾病改善。为了证实本公开的作用机制,发明人通过使用分子模型研究在关闭状态与NMDA受体GluN1-GluN2B四聚体亚型跨膜位点的结合,经由电脑模拟,验证了右美沙酮代谢物可能与NMDAR通道孔相互作用的假设。为此电脑模拟验证中构建的计算机的NMDAR亚型是由2个GluN1亚基和2个GluN2B亚基组成的GluN1-GluN2B四聚体。值得注意的是,N2B亚基对于形成包括NMDAR在内的超复合物至关重要。为了提高计算的效率,只对受体的跨膜区域进行了建模。这样做是因为受体的跨膜区域是(1)假定的PCP结合位点所在的位置,(2)经测试的FDA批准和临床耐受的NMDA通道阻滞剂(右美沙芬、氯胺酮、美金刚)也可能在其中作用,以及(3)在本发明人假设美沙酮及其异构体和代谢物也可以作用的情况下。

[0999] 发明人使用由蛋白质数据库(PDB)编码4TLM识别的结构作为计算机研究的起点,以研究下表50中所示的药物,所有这些药物都是已知的NMDAR开放通道阻滞剂,推测其作用在具有已知的亲和力和已知的临床效果的跨膜结构域的PCP位点。PCP是一种附表I药物,而MK-801是一种高亲和力NMDAR通道阻滞剂,具有严重的副作用,阻碍了其临床应用。如在整个申请中所指出的,其他四种药物在临床上用于各种适应症。如在该实施例8中所见,如表50所示,测试的右美沙酮代谢物的锚定分数(docking scores)与已建立的NMDAR通道阻滞剂的锚定分数在相似范围内。

[1000] 表50

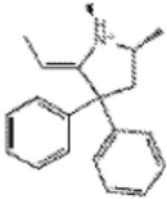
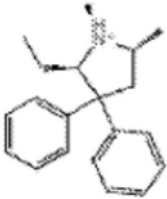
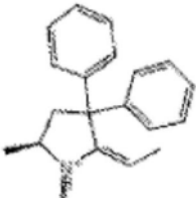
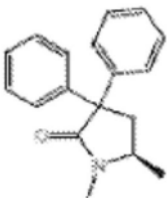
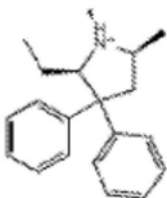
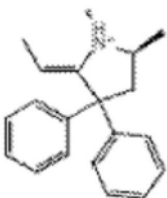
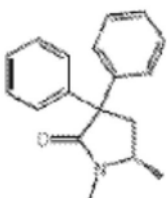
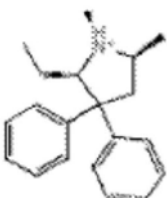
[1001]

分子	预测的亲合力 (锚定) (Delta G, kcal/mol)
MK-801	-6.8
PCP	-6
氯胺酮	-5.8
美金刚	-5.8
金刚烷胺	-5.23
右美沙芬	-6.3
右美沙酮	-6.5

[1002] 此外,所有测试的代谢物在与具有已知NMDAR阻断作用的化合物相似的范围内显示出预测的亲合力结果(如下表51所示)(大约-5到-7的预测亲合力,如上表50所示)。这些电脑拟结果表明了右美沙酮代谢物在孔通道处潜在的NMDAR阻断作用。

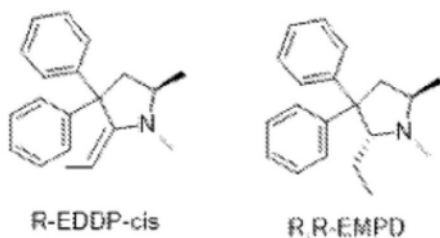
[1003] 表51

[1004]

 title: R-EDDP-trans glide gscore: -7.085	 title: R,S-EMPD glide gscore: -6.969
 title: S-EDDP-cis glide gscore: -6.967	 title: R-DDPP glide gscore: -6.853
 title: S,R-EMPD glide gscore: -6.793	 title: S-EDDP-trans glide gscore: -6.74
 title: S-DDPP glide gscore: -6.56	 title: S,S-EMPD glide gscore: -6.445

[1005] 鉴于表51(以上)中所示的结果,与表50中其他NMDAR通道阻滞剂所示的分数相比,本发明人表明类似的代谢物会表现出类似的亲和力结果。此类代谢物可能包括但不限于:

[1006]



[1007] 实施例9:来自实施例3的2期研究的其他疾病改善信号

[1008] 本实施例9提供了指标的子分析,这些指标表明右美沙酮的作用不限于情绪改善,

因此证实了本发明人的表现出疾病改善效果,这更有可能导致不同症状的改善,而不仅仅是诸如情绪的一种症状。

[1009] 实施例3中呈现的来自2期研究的数据的子分析(参见下面的对于MADRS和SDQ个体和综合指标的患者数据),揭示了右美沙酮用于治疗如MDD和相关障碍和此处列出的其他障碍的疾病和障碍的潜力。该数据表明:(1) MDD患者的认知改善(表明促智作用的潜力);(2) 对睡眠障碍的治疗效果;(3) 对社交功能的潜在治疗效果;(4) 对工作能力的治疗效果,包括提高精力和动力;以及(5) 对性功能障碍的潜在治疗效果。效果(1)-(5)不太可能仅仅是对症的,并且可能是MDD或相关障碍的一部分(简明国际神经精神访谈明确排除了精神症状的医学、器质性、药物原因,并且SAFER访谈确认了MDD的诊断不继发于已知的医学原因)。对症治疗更有可能作用于一种症状,而不是一组症状。标准抗抑郁药通常会改善情绪,但不会改善动力或性功能。用于感染的阿司匹林可以改善发烧,但不能改善咳嗽或其他感染特异性症状。用于感染的抗生素是一种改善疾病的治疗方法,可以改善发烧甚至最终因细菌性肺炎引起的咳嗽。

[1010] A. 概述

[1011] 1. 背景

[1012] REL-1017(盐酸右美沙酮)是一种N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)通道阻滞剂,最近在一项双盲随机多中心安慰剂对照的三组2期研究中对重度抑郁症(MDD)患者进行了每日口服剂量25mg和50mg的测试。两种测试剂量的REL-1017每天口服给药一次,第1天的负荷剂量为75mg或100mg,然后从第2天到第7天分别为25mg或50mg(实施例3)。根据所有测试量表,发现两种测试剂量都具有快速、稳健和持续的功效。值得注意的是,两种剂量均显示出良好的耐受性和安全性曲线,没有证据表明突然停药后出现认知副作用或戒断效应。改善功能结果的重要性日益得到认可,尤其是在神经精神障碍领域。

[1013] 2. 目的

[1014] 分析REL-1017对MADRS和SDQ量表的选择功能指标部分的影响。

[1015] 3. 方法

[1016] 本发明人从MADRS和SDQ量表中选择项目,并创建了认知和动力功能的综合指数:认知综合指数:[MADRS6(难以集中注意力)、SDQ16(清醒)、SDQ22(感觉迟缓)、SDQ35(注意力集中能力)、SDQ36(记忆能力)、SDQ37(找词能力)、SDQ38(锐度)、SDQ39(决策能力)、SDQ42(工作能力)];动力-能量综合指数:[MADRS7(疲倦)、SDQ7(动力)、SDQ20(精力)];情绪综合指数:[MADRS1(报告的悲伤)、SDQ1,2,3(情绪)];睡眠综合指数:[MADRS4(减少的睡眠)、SDQ13(入睡能力)、SDQ14(在半夜保持睡眠的能力)、SDQ15(在醒来之前保持睡眠的能力)];本发明人还分别分析了SDQ的两个额外的单功能项目。1) 社交功能,单个问题(SDQ41,社交功能);2) 性功能,单个问题(SDQ40,性功能)。

[1017] 4. 统计分析

[1018] 治疗起效后分析在不同时间距离基线的变化:应用的基于可能性的方法是混合效应模型重复测量(MMRM)模型,具有治疗、访视(第2天、第4天、第7天、第14天)以及治疗和访视之间的相互作用的固定效应项。提供了LS均值和LS均值差异(LS均值中REL-1017和安慰剂之间的差异)以及用于检验无差异假设的p值和科恩效应值(根据LS均值差异和合并的标准差计算)。25mg和50mg剂量分别考虑和组合:25mg+50mg,联合治疗组(CTG)。

[1019] 5. 结果

[1020] 认知综合指数:第7天:与安慰剂组相比的最小二乘均值差异为:25mg治疗组-10,23 (p值0,1;效应值0,49);50mg治疗组:-11,41 (p值0,07;效应值0,53);CTG,25mg+50mg:-10,85 (p值0,05;效应值0,51) 第14天:与安慰剂组相比的最小二乘均值差异为:25mg治疗组:-14,71 (p值0,01;效应值0,86);50mg治疗组:-20,61 (p值0,0008;效应值1,15);CTG,25mg+50mg:-17,83 (p值0,0009;效应值1,02)。动力综合指数:第7天:与安慰剂组相比的最小二乘均值差异为:25mg治疗组-17,37 (p值0,02;效应值0,73);50mg治疗组:-17,41 (p值0,01;效应值0,74);CTG,25mg+50mg:-17,39 (p值0,006;效应值0,74);第14天:与安慰剂组相比的最小二乘均值差异为:25mg治疗组:-26,5 (p值0,0003;效应值1,33);50mg治疗组:-26,27 (p值0,0002;效应值1,34);CTG,25mg+50mg:-26,38 (p值0,000029;效应值1,35)。情绪综合指数,第7天:与安慰剂组相比的最小二乘均值差异为:25mg治疗组-12,3 (p值0,08;效应值0,51);50mg治疗组:-16,1 (p值0,02;效应值0,72);CTG,25mg+50mg:-14,3 (p值0,02;效应值0,62);第14天:与安慰剂组相比的最小二乘均值差异为:25mg治疗组:-16,5 (p值0,02;效应值0,71);50mg治疗组:-18,0 (p值0,01;效应值0,85);CTG,25mg+50mg:-17,3 (p值0,006;效应值0,79)。睡眠综合指数,第7天:与安慰剂组相比的最小二乘均值差异为:25mg治疗组-6,6 (p值0,44;效应值0,22);50mg治疗组:-9,18 (p值0,27;效应值0,38);CTG,25mg+50mg:-7,96 (p值0,27;效应值0,3);第14天:与安慰剂组相比的最小二乘均值差异为:25mg治疗组:-21,7 (p值0,001;效应值1,09);50mg治疗组:-21,7 (p值0,0009;效应值1,2);CTG,25mg+50mg:-21,74 (p值0,0001;效应值1,17)。社交功能,单个问题(SDQ41,社交功能),第7天:与安慰剂组相比的最小二乘均值差异为:25mg治疗组:-1,07 (p值0,04;效应值0,65);50mg治疗组:-1 (p值0,05;效应值0,57);CTG,25mg+50mg:-1,034 (p值0,021;效应值0,61);第14天:与安慰剂组相比的最小二乘平均差异为:25mg治疗组:-1,246 (p值0,003;效应值0,99);50mg治疗组:-1,137 (p值0,006;效应值0,98);CTG,25mg+50mg:-1,19 (p值0,0009;效应值0,99)。性功能,单个问题(SDQ40,性功能) 25mg治疗组:-0,66 (p值0,15;效应值0,48);50mg治疗组:-0,28 (p值0,52;效应值0,19);CTG,25mg+50mg:-0,46 (p值0,23;效应值0,32);第14天:与安慰剂组相比的最小二乘均值差异为:25mg治疗组:-1,32 (p值0,006;效应值0,93);50mg治疗组:-0,4 (p值0,35;效应值0,29);CTG,25mg+50mg:-0,86 (p值0,037;效应值0,59)。

[1021] 6. 结论

[1022] 在MDD患者中,除了在所有测试量表中与安慰剂相比改善整体CFB外,REL-1017(右美沙酮)在认知、动机、社交和性功能方面产生了快速、具有临床意义、持续且具有统计学意义的改善。除了证实基于疾病改善机制的作用机制,REL-1017对MDD的快速、稳健和持续疗效不仅限于改善情绪,还可能扩展到具有社交经济意义的认知、动力、社交和性功能。这些令人鼓舞的结果表明右美沙酮具有潜在的疾病改善效果,并表明其优于标准抗抑郁治疗的潜在优势。

[1023] B.MDD:使用数字应用程序定制NMDAR通道阻断剂的剂量学

[1024] 来自2期试验(实施例3)的数据,包括来自PK/PD关系的数据,以及单个患者反应的子分析,提示治疗功效可能从第2天或更早开始,并且受试者间在影响大小和/或响应的可持续性/持续时间方面存在广泛的差异。

[1025] 为了定制治疗以最好地满足个体需求,本发明人公开了将右美沙酮治疗与监测患

者症状和体征并实时通知看护人,并且甚至通知患者或其亲属(告知针对个体患者的适当剂量学和治疗持续时间)的数字应用程序相结合。在其他问题和说明中,数字应用程序可以利用一个或多个问题及其修改,这些问题源自在第2阶段研究(实施例3)和其他右美沙酮试验期间(Bernstein等人,2019;Moryl等人,2016)对MDD患者进行的问卷调查,特别是发现受右美沙酮治疗影响的那些问题(实施例3和本实施例9):ATRQ,抗抑郁治疗反应问卷;CADSS,临床医生管理的解离状态量表;CGI-I,改善的临床总体印象;CGI-S,严重度的临床总体印象;COWS,临床阿片类戒断量表;C-SSRS,哥伦比亚自杀严重程度评定量表;HAM-D-17,汉密顿抑郁量表-17;IWRS,交互式网络应答系统;MADRS,蒙哥马利抑郁量表;MGH,马萨诸塞州总医院MINI,简明国际神经精神病学访谈;SDQ,抑郁症状问卷;BPI,简短的精神病学访谈;ESAS,埃德蒙顿症状评估量表;VAS,视觉模拟量表;MGH-CPFQ=马萨诸塞州总医院-认知和身体功能问卷;数字符号替换测试(DSST);希恩残疾量表(SDS);和Bond-Lader量表。

[1026] C.放射性标记的NMDAR通道阻滞剂作为诊断工具和药物选择工具

[1027] 病理性NMDAR受体激活(NMDAR过度活跃)可能对特定神经元或神经元外群体具有选择性,并且可能触发、恶化或维持多种疾病和病症。NMDAR过度活跃可能是由高于正常水平的谷氨酸和/或PAM和/或激动剂物质引起的,并且可以通过NMDAR通道阻滞剂来纠正,例如右美沙酮(参见实施例1和5)。

[1028] 放射性同位素标记的右美沙酮和/或对阿片受体具有低亲和力的其他NMDAR通道阻滞剂的分布模式可以诊断MDD或其他神经精神障碍或甚至额外的CNS疾病。

[1029] 单独给药或甚至与阿片受体激动剂或拮抗剂一起给药的放射性同位素标记的右美沙酮和/或其他对阿片受体具有低亲和力的NMDAR通道阻滞剂的分布模式可用于诊断由选定的神经元(或其他细胞)过度激活引起的选定疾病,包括内啡肽系统的非神经元细胞部分。在右美沙酮的情况下,纳洛酮的给药可能允许检测放射性同位素标记的右美沙酮在内啡肽通路之外的特定分布,以及涉及特定疾病的不同系统或通路或回路的一部分,对于这些特定疾病而言,其中NMDAR和除阿片受体以外的受体是关键的。因此,放射性同位素标记的右美沙酮和/或其他NMDAR通道阻滞剂的分布模式可用作诊断患者疾病和障碍的诊断工具。放射性同位素标记的右美沙酮和/或对阿片受体具有低亲和力的其他放射性标记的NMDAR通道阻滞剂和/或放射性标记的研究药物的分布模式也可用作选择有效的疾病改善药物的药物选择工具。

[1030] D.将磁共振光谱和其他放射技术与NMDAR通道阻断剂相结合作为诊断工具和药物选择工具

[1031] 磁共振光谱(MRS)已被用于了解可能与增加的谷氨酸和病理性NMDAR受体激活相关的疾病的机制。NMDAR过度活跃可能对特定神经元(或甚至神经元外)群体具有选择性,并可能触发、恶化或维持多种疾病和障碍。NMDAR过度活跃可能由高于正常水平的谷氨酸和/或PAM和/或激动剂物质引起,并且可以通过NMDAR通道阻滞剂,例如右美沙酮(例如,实施例1和5)来纠正。

[1032] 通过右美沙酮和/或其他NMDAR通道阻滞剂对MRS结果的修改可用作诊断工具,用于诊断患者的疾病和障碍并用于跟踪治疗效果。右美沙酮和/或其他NMDAR通道阻滞剂,特别是研究药物对MRS结果的修改可用作选择有效疾病改善药物的药物选择工具。

[1033] E.NMDAR和额外的CNS疾病和障碍

[1034] 除了CNS、PNS和特定的特化受体外,外周NMDAR也已在大多数细胞的膜上得到证实,包括为呼吸、心血管、和泌尿生殖系统的一部分的细胞,以及在肝细胞、朗格汉斯细胞和免疫系统细胞上[Du et al.,2016;Dickens et al.,2004;McGee MA,Abdel-Rahman AA.N-Methyl-D-Aspartate Receptor Signaling and Function in Cardiovascular Tissues.J Cardiovasc Pharmacol.2016;68(2):97-105;Miglio G,Varsaldi F,Lombardi G.Human T lymphocytes express N-methyl-D-aspartate receptors functionally active in controlling T cell activation.Biochem Biophys Res Commun.2005;338(4):1875-1883]以及血小板上[Kalev-Zylinska ML,Green TN,Morel-Kopp MC,et al.N-methyl-D-aspartate receptors amplify activation and aggregation of human platelets.Thromb Res.2014;133(5):837-847]。疾病和障碍可能是由外周NMDAR的过度激活引起的[Du et al.,2016;Ma et al.,Excessive activation of NMDA receptors in the pathogenesis of multiple peripheral organs via mitochondrial dysfunction, oxidative stress,and inflammation.SN Comprehensive Clinical Medicine(2020)2:551-569]。

[1035] 基于本发明人的公开内容(包括实施例1-11;),右美沙酮是一种耐受性非常好且安全的药物,通过NMDAR阻断作用对诸如MDD的疾病具有临床意义的治疗效果,没有认知副作用和滥用倾向,可能对预防、治疗和诊断由NMDAR(包括外周、额外的CNS、NMDAR)过度激活引起的疾病和障碍具有潜在的益处,包括Du等人于2016年和Ma等人于2020年列出的疾病和障碍(那些通过参考并入本文的疾病和病症)。特别是,感染(包括病毒感染)引起的身体疼痛(包括头痛)和胃肠道症状可以通过右美沙酮缓解,感染(包括病毒感染)由外周NMDAR过度激活引起。

[1036] 在实验性鼠模型中,右美沙酮虽然不是镇痛剂(热板潜伏期),但抑制脾细胞增殖(显著超过左美沙酮),该抑制脾细胞增殖不受纳洛酮给药影响,表明免疫调节作用的非阿片类介导机制[Hutchinson MR,Somogyi AA.(S)-(+) -methadone is more immunosuppressive than the potent analgesic(R)-(-)-methadone.Int Immunopharmacol.2004;4(12):1525-1530]。此外,左美沙酮的活性降低了右美沙酮的这种作用。基于实施例1和本申请中概述的其他观察结果,本发明人假设这种免疫调节作用是由于右美沙酮的NMDAR阻断,而没有对于NMDAR的有意义的PAM作用。

[1037] 在另一项研究中[Toskulkao T,Pornchai R,Akkarapatumwong V,Vatanatunyakum S,Govitrapong P.Alteration of lymphocyte opioid receptors in methadone maintenance subjects.Neurochem Int.2010;56(2):285-290],慢性阿片类药物暴露与人淋巴细胞中G蛋白偶联的阿片受体基因表达的下调有关。根据Taskulkao等人2010年的研究,阿片类药物诱导淋巴细胞上阿片受体数量变化的机制可能类似于阿片类药物诱导靶神经元耐受和依赖的机制之一。基于当前公开内容,本发明人提出免疫细胞受体调节的机制也可能与NMDAR阻断有关。

[1038] 最后,基于[He L,Kim J,Ou C,McFadden W,van Rijn RM,Whistler JL.Methadone antinociception is dependent on peripheral opioid receptors.J Pain.2009;10(4):369-379],与主要作用于中枢神经系统的吗啡(左吗啡)相反,美沙酮的镇痛作用主要是外周的(不被中枢给药的naloxone methiodide阻断)。与主要作用于CNS的

吗啡(左吗啡)相反。美沙酮的这些外周作用可能与阿片受体偶联的外周受体的NMDAR阻断有关[Narita M, Hashimoto K, Amano T, et al. Post-synaptic action of morphine on glutamatergic neuronal transmission related to the descending antinociceptive pathway in the rat thalamus. *J Neurochem*. 2008;104(2):469-478; Rodríguez-Muñoz M, Sánchez-Blázquez P, Vicente-Sánchez A, Berrocoso E, Garzón J. The mu-opioid receptor and the NMDA receptor associate in PAG neurons: implications in pain control. *Neuropsychopharmacology*. 2012;37(2):338-349], 包括由炎症细胞表达的NMDAR, 左吗啡不具有这种作用, 在NMDAR中没有活性(Gorman等, 1997)。因此, 上文介绍并在实施例10中详细描述的她pherd亲和力也可以引导右美沙酮靶向具有阿片受体的外周细胞, 包括免疫细胞。

[1039] 此外, 谷氨酸储存在血小板致密颗粒中, 并且在血栓形成期间大量释放(>400μM)。NMDAR激动剂促进NMDAR通道阻滞剂抑制血小板活化和聚集。血小板中存在NMDAR转录物(Kalev-Zylinska et al., 2014)意味着血小板具有调节NMDAR表达的能力。流式细胞术和电子显微镜表明, 在未激活的血小板中, NMDAR亚基包含在血小板内部, 但在血小板激活后重新定位到血小板泡、丝状伪足和微粒上(Kalev-Zylinska等, 2014)。

[1040] 弥散性血管内凝血(DIC)是一种疾病, 其中血液凝块在全身形成, 阻塞小血管, 从而影响诸如心脏、肺、肝、肾、脑等的器官和系统。症状可能包括胸痛、呼吸急促、腿痛、说话困难或身体运动部位出现问题。随着凝血因子和血小板用完, 可能会发生出血。这可能包括尿液出血、便血或皮肤出血。并发症包括多器官衰竭。相对常见的原因包括感染、手术、重大创伤、烧伤、癌症和妊娠并发症。有两种主要类型: 急性(快速发作)和慢性(缓慢发作)。诊断通常基于血液检查。发现可能包括低血小板、低纤维蛋白原、高INR或高D-二聚体。治疗主要针对潜在疾病。其他措施可能包括给予血小板、冷沉淀或新鲜冷冻血浆。然而, 支持这些治疗的证据很少。肝素在缓慢发展的形式中可能是有用的。大约1%入院的人受到这种疾病的影响。在那些患有败血症的人中, 发病率在20%到50%之间, 死亡率很高。根据Kalev-Zylinska等人, 2014, DIC可以通过血小板表达的NMDAR的过度激活来触发、维持或恶化。右美沙酮和其他NMDAR通道阻滞剂及其代谢物, 通过阻断过度激活的血小板NMDAR, 可能对预防和治疗DIC有用(实施例1-11)。

[1041] F.COVID 19

[1042] DIC与大多数COVID-19死亡事故有关(Wang J, Hajizadeh N, Moore EE, et al. Tissue Plasminogen Activator(tPA) Treatment for COVID-19 Associated Acute Respiratory Distress Syndrome(ARDS): A Case Series[published online ahead of print, 2020 Apr 8]. *J Thromb Haemost*. 2020;10.1111/jth.14828.doi:10.1111/jth.14828)。

[1043] COVID-19患者的子集将出现危及生命的并发症。老年患者、男性患者和患有呼吸系统、心血管和代谢副发病变的患者风险较高。虽然副发病变和高龄与COVID-19并发症和死亡的风险增加有关, 但决定个体间结果高度可变的病理生理机制尚不清楚。

[1044] NMDAR在所有系统的细胞膜上表达, 包括免疫系统、呼吸系统、心血管系统、肾系统、神经元以及血小板。NMDAR过度活跃与肺、心血管、肾脏、代谢、CNS和凝血病理学有关。NMDAR通道阻滞剂可显著减轻由各种因素引起的急性肺损伤(Du et al., 2016; Dickman

KG,Youssef JG,Mathew SM,Said SI.Ionotropic glutamate receptors in lungs and airways:molecular basis for glutamate toxicity.Am J Respir Cell Mol Biol.2004;30 (2):139-144)。DIC可能与大多数COVID-19死亡事故有关(Wang等人,2020年)。谷氨酸储存在血小板中并在血栓形成期间释放。NMDAR激动剂促进血小板活化和聚集而NMDAR通道阻滞剂抑制血小板活化和聚集(Kalev-Zylinska等人,2014)。

[1045] 异常的免疫反应与感染患者的并发症风险有关,包括COVID-19。右美沙酮具有免疫系统调节作用(He等人,2004;Hutchinson等人,2009;Toskulkao等人,2009),可能与免疫系统细胞部分表达的NMDAR受体阻断有关。

[1046] NMDAR的过度活跃可以通过正变构调节剂和激动剂、外源性(例如药物和/或毒素)和/或炎症(包括由感染引起的炎症)中增加的代谢通路的中间体(例如喹啉酸)来增强。多种炎症物质,包括在病毒感染(包括COVID-19)期间产生和/或释放的物质,或包括抗病毒药物在内的药物,可能充当NMDAR的正变构调节剂和激动剂,并引发、维持或恶化并发症。

[1047] 在患者的子集中,来自COVID-19的并发症可能会因NMDAR在多种细胞群和血小板中的过度活化而被触发、维持或恶化。右美沙酮和其他NMDAR非竞争性通道阻滞剂可通过过度活跃的N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)下调Ca²⁺内流,从而减轻COVID-19患者的炎症、呼吸、心血管、胃肠道、CNS、代谢和凝血(例如DIC)并发症,该N-甲基-D-天冬氨酸受体(NMDAR)在免疫系统、呼吸系统、心血管系统、肾脏系统以及胃肠道和代谢系统的细胞膜上表达,包括肝脏、胰腺和CNS(Du et al.,2016;Dickens et al.,2004;Mcgee et al.,2016;Welters A,Lammert E,Mayatepek E,Meissner T.Need for Better Diabetes Treatment:The Therapeutic Potential of NMDA Receptor Antagonists.Bessere Diabetesmedikamente sind erforderlich:therapeutisches Potenzial von NMDAR Antagonisten.Klin Padiatr.2017;229 (1):1420;Miglio et al.,2005)和血小板(Kalev-Zylinska等人,2014年)。

[1048] 最近的在线出版物表明,在意大利罗马马莱尼别墅的阿片类药物维护设施中,阿片类药物成瘾人群中缺乏COVID-19并发症(“Coronavirus,i tossicodipendenti sembrano immuni:l’ipotesi degli esperti di Villa Maraini-Cri”Il Messaggero, May 4,2020,Caltagirone Editore)。虽然作者将此发现归因于这些患者的异常免疫系统,但根据本发明人的发现和公开,本发明人公开了外消旋美沙酮对COVID-19并发症的保护可能是由于其NMDAR通道阻断活性。如实施例7中所公开的,右美沙酮可以提供比美沙酮增强的免疫调节作用,更重要的是,它具有没有外消旋美沙酮的阿片类药物效应的优点。

[1049] 由于受影响的系统、器官和组织的细胞部分中的NMDAR过度活跃,具有预先存在的副发病变的患者可能更容易受到伤害(Du等人,2016)。

[1050] 在症状的发作和并发症的发展之间可能存在有利的时间治疗窗,可以使用可以防止并发症发展的药物,例如,NMDAR通道阻滞剂来获得该治疗窗。

[1051] 在年轻患者中观察到的对COVID-19并发症的相对保护的一种可能解释可能在于与成人相比,在年轻受试者中观察到的发育年龄差异性NMDAR框架(Hansen et al.,2017;Swanger SA and Traynelis SF.Synaptic Receptor Diversity Revealed Across Space and Time.Trends in Neurosciences, August 2018, Vol.41, No.8:763-765)。因此,年轻患者可能不太容易受到炎症介质、PAM和/或激动剂和/或COVID-19诱导的过量谷氨酸细胞外

浓度引起的NMDAR过度激活的影响。值得注意的是,谷氨酸和谷氨酸激动剂(在NMDAR的谷氨酸位点充当激动剂的物质)不是幼年GluN3A亚基(这些亚基确实缺乏谷氨酸激动剂位点)的激动剂,并且因此具有这些亚基的NMDAR亚型对谷氨酸不敏感(例如,二异聚体GluN1-GluN3)或对谷氨酸(例如,三异聚体GluN1-GluN2-GluN3)和NMDA位点的其他激动剂相对不敏感。NMDAR亚型钙渗透性较低和/或对谷氨酸不敏感或不太敏感可能会使细胞不易受到兴奋性毒性的影响,包括由谷氨酸位点的PAMs和激动剂引起的兴奋性毒性。含有GluN3A亚基的NMDAR亚型的对 Ca^{2+} 的渗透性较低(三异聚体,例如,GluN1-GluN2-GluN3)或对 Ca^{2+} 不渗透(Roberts, A.C. et al. Downregulation of NR3A-containing NMDARs is required for synapse maturation and memory consolidation. *Neuron* 63, 342-356 (2009))。因此,含有GluN3亚基的NMDAR表达较高的患者,例如儿科患者,可以相对保护免受通过NMDAR引起的增加的 Ca^{2+} 内流引发的并发症(例如,DIC、呼吸、心脏、肾脏、代谢并发症),因为它们的NMDAR框架与成人的NMDAR框架相比,受 Ca^{2+} 电流的影响较小。与性别相关的差异性NMDAR框架也可以解释与男性相比,女性患者的COVID-19并发症负担较轻。

[1052] 开放通道NMDAR通道阻滞剂(右美沙酮和阿片类药物的其他选择异构体、它们的代谢物和它们的衍生物、氯胺酮和美金刚和金刚烷胺),尤其是右美沙酮,其具有良好的安全性、耐受性、有效剂量下的PK曲线[通过过度活跃的NMDAR的内流(实施例1-11)]通过选择性阻断 Ca^{2+} ,可减轻、治疗和/或预防因COVID-19和上述DIC的其他原因导致的DIC,以及其他COVID-19并发症,包括免疫学(炎症反应)、呼吸系统(咳嗽、肺部炎症、ARDS、呼吸衰竭)、心血管(HTN、缺血性心脏病和心力衰竭)、代谢(葡萄糖耐量受损和糖尿病)、肾脏(肾功能不全)和神经系统并发症(味觉和嗅觉缺陷、头痛、神经精神疾病缺陷、CVA)。

[1053] 此外,右美沙酮和其他NMDAR非竞争性通道阻滞剂可以预防因抗病毒药物或其他对NMDAR具有正向变构调节或激动作用的分子的疗法引起的NMDAR介导的并发症(Hama R, Bennett CL. The mechanisms of sudden-onset type adverse reactions to oseltamivir. *Acta Neurol Scand.* 2017; 135 (2): 148-160)。

[1054] 与可能由PAM庆大霉素引起的NMDAR介导的内耳毛细胞毒性类似(实施例5),与COVID-19相关的嗅觉和味觉丧失可能表明在存在或不存在对NMDAR的PAM和/或激动剂的情况下,由病毒或其治疗引起的特殊感觉嗅觉细胞中NMDAR介导的毒性。

[1055] 右美沙酮及其衍生物可以对症治疗咳嗽(Winter CA, Flataker L. Antitussive action of d-isomethadone and d-methadone in dogs. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1952; 81 (2): 463-465; Noel, Peter R et General Practitioner Research Panel. 《The sulphone analogue of d-methadone: Assessment of antitussive activity in general practice》, *British Journal of Diseases of the Chest.* 1963, vol. 57 no 1, p. 48-52)。根据本发明人的公开,咳嗽的有效性可能不仅是对症的,而且可能表明对病原体进入口附近的细胞上的NMDARs的疾病改善治疗作用。值得注意的是,在COVID-19患者的子集中,主要症状不是呼吸道症状而是胃肠道症状,并且对于这些患者,右美沙酮可能会提供胃肠道症状(GI)的对症治疗。然而,与咳嗽一样,胃肠道的治疗不仅是对症治疗,而且可能通过阻断过度刺激的NMDAR受体来缓解疾病,该NMDAR受体与导致疾病并发症的胃肠道中的阿片受体结合。

[1056] 右美沙酮的作用机制仍然是对通过过度刺激的NMDAR引起的过量的 Ca^{2+} 内流进行

下调,过度刺激的NMDAR由作为任何器官、组织和系统的一部分的细胞表达并且,特别是过度刺激的NMDAR表达在免疫细胞(炎症反应)、呼吸系统细胞(气道炎症)、心脏和血管细胞(HTN和心力衰竭)、朗格汉斯细胞和肝细胞(葡萄糖耐量受损、糖尿病和肝功能不全)、GI细胞、肾细胞(肾功能损害)和NS细胞(神经精神症状,包括特殊感觉的损害)的膜上、下丘脑-垂体肾上腺轴(高肾上腺素能状态)和血小板(DIC)的细胞部分。氯胺酮IV可以镇静解离剂量在机械通气患者中使用,用于镇静目的和用于NMDAR通道阻滞剂作用,以治疗和预防COVID-19并发症。右美沙酮可用于预防和治疗COVID-19并发症,此外还会发挥镇咳作用。如上所述,并在实施例7的发现中得到证实,外消旋美沙酮的免疫调节作用(Toskulkaio T, Pornchai R, Akkarapatumwong V, Vatanatunyakum S, Govitrapong P. Alteration of lymphocyte opioid receptors in methadone maintenance subjects. *Neurochem Int.* 2010;56 (2) :285-290),可能对右美沙酮更为显著(Hutchinson等人,2004),并且由于缺乏阿片类药物和拟精神病作用而可能在临床上有用,如实施例3所证实。这些免疫调节作用,除了为MDD和神经精神障碍、自身免疫性障碍、感染性疾病(包括COVID-19并发症)提供治疗作用外,还可以治疗癌症及其并发症。

[1057] 与其他NMDAR非竞争性通道阻滞剂,诸如金刚烷胺和美金刚的作用类似,右美沙酮也可具有抗病毒作用,例如通过阻断病毒孔通道。

[1058] 此外,右美沙酮对外周NMDAR的作用可能受益于其对外周阿片受体的shepherd亲和力和(参见下文实施例10)并到达靶外周受体(He等人,2009)。Du等人,2016年列出的所有的组织和系统由表达阿片受体的细胞组成,包括呼吸细胞、肾脏细胞、心脏细胞、胰腺细胞、肝脏细胞、GI细胞和免疫细胞。

[1059] G. 亚裔患者

[1060] 为了获得新药申请的批准,日本药品与医疗器械管理局要求补充药代动力学(PK)安全性和/或药效学(PD)功效研究,因为FDA (USA) 和EMA (欧洲) 新药申请通常基于来自亚洲/日本受试者的有限数据的研究。PK和PD的差异主要由遗传变异导致的不同人群之间的药物代谢差异决定,是日本机构对补充日本受试者临床研究的要求的基础。由于需要进行额外的研究,向日本人群营销新药的申请可能取决于添加支持日本开发计划的药物的新数据。本申请中提供的新数据证实了专门针对亚裔患者的疗效的假设,并确定了所需额外研究的类型、设计和范围。

[1061] 日本和白种人受试者之间的已知遗传学差异(Hiratsuka M1, Takekuma Y, Endo N, Narahara K, Hamdy SI, Kishikawa Y, Matsuura M, Agatsuma Y, Inoue T, Mizugaki M. Allele and genotype frequencies of CYP2B6 and CYP3A5 in the Japanese population. *Eur J Clin Pharmacol.* 2002 Sep;58 (6) :417-21)可能确定不同人群对外消旋美沙酮和右美沙酮的不同PK和PD反应。

[1062] 2012年9月,在美国和欧洲发现并广泛使用60多年后,外消旋美沙酮在日本被批准用于治疗疼痛。

[1063] Takagi和Aruga指出个体间药物动力学的多样性如何需要密切监测不良事件。Takagi等人在2018年描述的PK和PD外消旋美沙酮多样性可能也与右美沙酮有关。外消旋美沙酮通过细胞色素P450 (CYP) 异构体CYP3A4、CYP2B6、CYP2C19,并且在较小程度上通过CYP2C9和CYP2D6经肝脏N-去甲基化产生稳定且无阿片类药物活性的代谢物2-亚乙基-1,5-

二甲基-3,3-二苯基吡咯烷。

[1064] 使用对映体特异性美沙酮测定研究了CYP2B6、CYP2C19和CYP3A4对外消旋美沙酮的立体选择性代谢,其中CYP2B6优先代谢右美沙酮,CYP2C19优先代谢左美沙酮,而CYP3A4没有显示出偏好(Gerber JG,Rhodes RJ,Gal J.Stereoselective metabolism of methadone N-demethylation by cytochrome P4502B6 and 2C19.Chirality.2004;16:36-44)。

[1065] 衔接性试验通常用于解释在主要是白种人群中进行的研究的PK和PD结果,并将这些结果应用于亚裔患者。

[1066] 本发明人提出了右美沙酮的新数据和新数据分析,表明不同的PK和PD反应可能不会导致临床上显著的负面结果,该负面结果会阻碍右美沙酮在亚洲和/或日本患者中用于治疗用途的开发。本发明人还提出了暗示潜在功效的新数据和新数据分析,包括在亚洲患者中的功效。本申请中提供的数据,除了教导在亚洲和/或日本人群中进一步开发右美沙酮可能具有潜在的有益治疗用途外,还提供了以下途径:进一步开发右美沙酮作为一种新的化学实体,用于亚洲和/或日本患者的治疗。

[1067] 1.单剂量和多剂量递增研究

[1068] 本发明人对Bernstein等人,2019年所示的单剂量和多剂量递增研究(SAD和MAD研究)的数据进行了补充分析,并公开了在种族多样化的受试者中[SAD(42名受试者):白种人57.1%,非洲裔美国人28.6%,亚洲人11.9%,混合2.4%;MAD(24名受试者):白种人62.5%、非洲裔美国人20.8%、亚洲人12.5%、混合4.1%],右美沙酮在大多数单剂量和多剂量参数中表现出与剂量成比例的线性药代动力学。高达150毫克的单次剂量和高达75毫克的每日剂量持续10天的耐受性良好,大多数是轻微的治疗中出现的不良事件,没有严重或危急的不良事件。发生了与剂量相关的嗜睡和恶心,并且大多出现在较高剂量水平。没有证据表明突然停药后出现呼吸抑制、解离和拟精神病作用或戒断体征和症状。观察到整体剂量反应效应,较高的剂量导致QTcF(使用Fridericia公式校正的QT间期)相对于基线的变化较大,但研究人员认为这些变化均无临床意义。在这些受试者(包括亚裔患者)体内,未检测到右美沙酮向左美沙酮的转化。具体而言,对于本申请,在这些研究中包括的6名亚洲受试者中,至少接受了一剂右美沙酮,单次剂量高达150毫克和每日剂量高达75毫克并持续10天的耐受性良好,大多数是轻微的治疗中出现的不良事件并且没有严重或危急的不良事件。

[1069] 本发明人还在用右美沙酮治疗的受试者(SAD和MAD研究)中进行了药物基因组分析(下文详述),并且本发明人能够得出结论,尽管PK差异性高,但所有参数和剂量水平的积累比例均小于20%,因此证明个体间的差异性会影响PK参数,但不会影响整体药物积累。因此,这些药物基因组学分析结果表明,右美沙酮PK和PD在患者中的结果很可能在亚裔患者和/或日本患者中重现。

[1070] 2.药物基因组学分析

[1071] 从每个受试者获得用于DNA提取的血液样品。样品在-70℃或更低温度下储存,等待运送至基因组学实验室(实验室公司临床试验-基因组学实验室[西雅图,华盛顿州])。基于盲法分析,特定受试者被确定为慢速或快速代谢者。从这些受试者的血液样本中提取DNA并进行微阵列分析以确定特定代谢酶的特异性表达(见下文)。

[1072] 使用DMET微阵列(Affymetrix, Santa Clara, Calif)进行药物基因组学测试。通过为不同的代谢者确定活动评分来进行探索性分析:差代谢者=0,中间代谢者=1,强代谢者(EM)=2,超快代谢者=3,不确定性的中等评分,例如中间代谢者或EM=1.5,EM或超快速代谢者=2.5。合并了SAD和MAD研究共同的药代动力学参数。DMET分析包括多个代谢相关基因的多态性及其对相关基因的表型和活性的解释。然而,并非所有基因都可以获得基于基因多态性存在的基因活性信息。药物基因组学报告仅限于文献中报道的与右美沙酮代谢相关的代谢酶的子集(Fernandez CA, Smith C, Yang W, et al. Concordance of DMET plus genotyping results with those of orthogonal genotyping methods. Clin Pharmacol Ther. 2012; 92:360-365),特别是CYP酶CYP1A2、CYP2B6、CYP2C18、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4、CYP3A5和CYP3A7。

[1073] 选择来自SAD研究的总共9个样品和来自MAD研究的10个样品用于药物基因组学分析,并且将两个研究共同的PK参数合并用于比较(所选样品之一来自亚洲受试者)。所有测试对象的CYP3A4表型都表现出正常代谢,因此不影响右美沙酮代谢。分析表明消除半衰期与CYP2B6代谢活性和可能的CYP1A2活性之间存在初步相关性。与差和中等代谢者相比,CYP2B6广泛和超快代谢者(活性评分1.5-2.5)具有明显更短的消除半衰期。CYP1A2也观察到类似的趋势。CYP2C19与消除的关系与预期相反:活性增加与右美沙酮消除时间延长相吻合。在第一剂右美沙酮后24小时内观察到CYP1A2和暴露的初步趋势,因为活性增加与暴露减少相关。没有其他CYP酶对暴露有影响。

[1074] 右美沙酮的剂量比例以前没有在文献中得到很好的描述。尽管PK参数的高度变异性阻碍了统计显著性的确定,但PK的线性在单剂量参数中得到了初步证明,而在多剂量参数中得到了最终证明。MAD研究的剂量比例在第1天证实为单剂量C_{max}和AUC_{tau},在第10天证实为稳态C_{max}、AUC_{tau}和C_{ss}。尽管MAD研究证实了剂量比例,但50和75mg治疗组之间的浓度和暴露比较显示出非常细微的差异。基于人口统计学/药物基因组学特征,或基于剂量水平的药物从血流快速吸收到外周隔室,缓慢释放回全身循环,50mg受试者内的较高变异性可能解释了这一观察结果。外围隔室中的单独消除也可能有所贡献。在每天服用6或7次右美沙酮后达到稳态。在SAD研究中,AUC_{0-inf}与AUC₀₋₂₄的比率约为2.5倍,变异系数为25%。假设线性PK,这被认为是稳态暴露的预期累积比率。使用C_{max}、C_{min}和AUC_{tau}计算的累积比例表明,在10天的给药期间,右美沙酮有累积。AUC_{tau}在50mg剂量水平的累积比例最高,但通常在2.3至3.4倍的范围内。因此,观察到的右美沙酮累积接近或略高于50mg剂量水平的预期累积。尽管PK变异性很高,但所有参数和剂量水平的累积比例均小于20%,因此表明个体间变异会影响PK参数,但不会影响整体药物累积。

[1075] 细胞色素P450酶对外消旋体立体异构体之一具有偏好,如外消旋美沙酮的情况。CYP2B6在右美沙酮的代谢中比在L-美沙酮的代谢中发挥更大的作用,并且CYP2B6多态性被证明会影响右美沙酮的暴露。在MAD研究中,CYP2B6广泛和超快代谢者的消除半衰期明显缩短。尽管先前的数据显示CYP1A2对美沙酮维持患者的外消旋美沙酮处置没有影响,但本发明人观察到较高的活性与较短的消除半衰期和健康正常志愿者的较少暴露相关。然而,研究人群的差异可能影响了这些结果,因为本发明人将吸烟者排除在研究之外,并且烟草烟雾是已知的CYP1A2诱导剂。

[1076] 可能复杂的机制涉及右美沙酮的分布和消除,以及代谢酶和转运蛋白之间的相互

作用,例如由ABCB1基因编码的外排药物转运蛋白P-糖蛋白。有人提出,该基因的多态性会极大地影响美沙酮的PK。然而,这些影响尚无定论,部分原因是编码区中存在大量单核苷酸多态性,这些多态性具有不同的群体频率。本发明人观察到的高PK变异性与多种CYP酶对右美沙酮的复杂代谢和CYP2B6多态性的多样性一致。

[1077] 总之,结合日本人群特有的和已知会影响右美沙酮暴露的遗传变异(Hiratsuka等人,2002),本发明人的上述新数据分析表明右美沙酮治疗在亚裔和/或日本人群中的安全性(来自6名接受右美沙酮剂量高达150mg的亚洲患者的SAD和MAD数据),并鼓励在亚洲和/或日本患者人群中进一步开发右美沙酮。

[1078] 3. 在大鼠中的PK和安全性实验数据

[1079] 本发明人在大鼠中进行了新的PK研究和在大鼠中进行了新的安全性研究。这些研究(研究A、B和C,将在下面简要讨论)提供了对人类受试者(包括亚洲和/或日本血统的人类受试者)的正确研究设计必不可少的新信息。

[1080] 研究A是对大鼠口服和/或皮下给药后单个试验样品的药代动力学研究。在研究A中,共分析了美沙酮(右旋和左旋对映异构体)的255个研究样品。校准标准品和质量对照样品的结果表明该方法对所有报告的浓度都具有可接受的性能。

[1081] 研究B是通过毒代动力学评价研究d-美沙酮对大鼠胚胎胎儿发育的影响的研究。在这项对Sprague-Dawley大鼠的胚胎胎儿发育研究中,从GD6-17开始口服给予d-美沙酮,在任何评估剂量水平下,均未观察到对母体存活、临床发现、卵巢和子宫参数或母体肉眼观察结果的试验样品的相关影响。在10、20和40mg/kg/天中观察到与试验样品相关但非不利的母体体重减少和/或体重变化,并且在40mg/kg/天中观察到母体食物消耗减少。在评估的任何剂量水平下均未观察到基于胎儿存活率、性别比、体重以及外部、内脏和骨骼检查的发育毒性证据。基于这些发现,母体和发育毒性的无毒副反应水平(NOEL)被认为是40mg/kg/天(GD17 C_{max}=738ng/mL;GD17 AUC_{0-24hr}=9920hr*ng/mL),评估的最高剂量水平。

[1082] 研究C是一项为期91天的大鼠安全性研究,描述了不同剂量右美沙酮在大鼠中的长期安全性。该研究提供了新的长期安全性数据,特别是与外消旋美沙酮相比,缺乏CNS作用和呼吸抑制作用。

[1083] 具体而言,研究A显示大鼠中显著的PK差异,考虑到对人类数据的分析,包括基于性别的差异包括来自亚洲和/或日本受试者(包括女性受试者)的研究和数据。特别是,研究B和C展示了新的安全性数据,表明人类研究设计和人类数据分析,包括来自亚洲和/或日本受试者的研究和数据,包括育龄妇女的研究和数据。

[1084] 这些新的大鼠PK和安全性实验数据,连同上述人类PK、PD和药物基因组学数据,为在亚洲和/或日本人群中(包括在女性受试者,包括育龄女性受试者)开发右美沙酮提供了新的支持和新的教导。最后,研究A、B和C鼓励和教导右美沙酮在可能药理学更敏感的患者群体中的开发,包括在亚裔,特别是日裔患者中。

[1085] 4. 功效实验和临床数据

[1086] 本申请(实施例3)中提出的新实验数据进一步支持和教导了包括日本在内的亚洲国家的右美沙酮的临床开发计划的下一步。实施例1-9都支持开发用于多种疾病和病症的右美沙酮,包括在包括日本患者在内的亚裔受试者中的开发。

[1087] 具体而言,所提供的数据表明,右美沙酮产生潜在临床相关的CNS可塑性影响和行

为影响,特别是鉴于最近发现的神经精神疾病、障碍、症状和病症的神经生物学和神经病理学,包括抑郁症、焦虑症、假性延髓情绪、疲劳和强迫症;选自拔毛癖、搔抓症和咬指甲的自伤行为;人格解体障碍;对处方药、毒品或酒精上瘾;和行为成瘾;疼痛,包括神经性疼痛;戒酒;和咳嗽。与安慰剂相比,本申请中公开的神经可塑性和行为实验结果,连同通过施用右美沙酮确定的测试的100%亚洲受试者(N=2)中血浆BDNF的增加,为亚洲和/或日本患者的潜在治疗效果提供了支持。

[1088] 总之,以上公开的新数据和结果支持右美沙酮的安全性和功效,并教导右美沙酮作为治疗剂和/或作为神经可塑性调节剂的持续临床开发,包括对于诸如亚洲和/或日本人群的人群而言,与白种人群相比,PK和PD参数和特征存在差异。

[1089] 实施例10:作用机制:内啡肽系统及其与NMDAR的关系;MOR-NR1双受体异二聚体的选择性靶向;NMDAR Shepherd亲和力;配体定向信号传导

[1090] 该实施例10证明了shepherding,提供了一种新的作用机制,该作用机制解释了用于NMDAR的NMDAR通道阻滞剂右美沙酮对情绪控制脑回路的神经元部分的选择性。

[1091] A. 前提

[1092] 内啡肽系统,以其在疼痛/镇痛中的核心作用而闻名(Pasternak GW, Pan YX. Mu opioids and their receptors: evolution of a concept. Pharmacol Rev. 2013; 65 (4) : 1257-1317. Published 2013 Sep 27), 调节经历的情感成分(例如,快乐和痛苦)。内啡肽系统是稳态情绪和幸福感和主要生理调节剂,并指导选择、社交互动和认知能力/兴趣。环境(幸福感和满足感)和功能(认知和动力功能,例如,专注于任务的能力和意愿;学习、记忆形成)和神经精神障碍(例如,情绪改变、抑郁或躁狂、焦虑状态、成瘾和强迫行为),受到内啡肽系统的高度调节。内啡肽系统稳态在神经精神障碍中发生改变,例如MDD、GAD、OCD、成瘾障碍和相关疾病(Lutz PE, Kieffer BL. Opioid receptors: distinct roles in mood disorders. Trends Neurosci. 2013; 36 (3) : 195-206)。

[1093] 长期使用阿片类药物(导致内啡肽系统中受体-配体相互作用特性的药物)的临床应用受到耐受性、身体依赖性和成瘾性的限制。尽管有这些缺点,由于缺乏替代品,直到1950年代,阿片类药物被广泛用于治疗神经精神障碍,包括情绪障碍和焦虑症。

[1094] 与阿片受体(MOR、DOR和KOR等)的直接药物(或内源性配体)相互作用是阿片类药物效应的原因(Pasternak和Pan., 2013)。并非所有内啡肽系统的激动剂都是情绪增强剂:虽然MOR的激活与有益反应相关(β -内啡肽和MOR激动剂),但与之相反的是,KOR的激活(强啡肽和KOR激动剂)与焦虑相关。

[1095] 体验可以是新颖的或重复的。特别是新颖性与内啡肽的释放有关。

[1096] B. 新颖体验

[1097] 当新颖体验具有有利的进化/物种保存特征(例如,性活动、食物摄入或甚至简单的体育锻炼)时, β -内啡肽被释放并且 μ 阿片受体(MOR)被愉悦、放松甚至欣快的感觉激活(类似MOR激动剂的感觉)。

[1098] 当新颖体验具有不利的进化/物种保存特征(例如,在疼痛的情况下,该体验对物种保存具有潜在或实际的破坏性后果),强啡肽被释放并且 κ (kappa)阿片受体(KOR)被焦虑的感觉(KOR激动剂样感觉)激活。

[1099] 在重复体验(即,非新体验)后释放的内啡肽的受体结合效应通过NMDAR受体激活

(耐受性)和NMDAR介导的神经可塑性而下调,这导致第一次新体验(重复刺激后突触结构的变化和 Ca^{2+} 内流的变化)。与新体验相比,这种对重复体验的影响的耐受性对于每次重复体验都是正确的,因为每一个最后的体验都变成了相对于前一个体验的“新”体验。这同样适用于重复摄入阿片类激动剂药物,例如,出于娱乐目的或镇痛目的:与前面的“娱乐修复”或“镇痛效果”相比,重复剂量的效果将不同(例如,逐渐减弱)。”这种众所周知的现象,耐受性,是由NMDARs的激活和与之前的体验相比差异性 Ca^{2+} 内流的下游后果引起的。

[1100] 如果在体验之间允许足够的时间,则可以至少部分恢复特定体验(耐受性逆转)的突触框架“童贞”[所需时间取决于个体(基线突触结构)以及体验的类型和强度,例如食物、性或阿片类药物作为娱乐性“修复”,或阿片类药物作为镇痛剂、“止痛药”]。刺激之间的时间(即,在选定回路的特定突触间隙部分没有谷氨酸释放的时间,因此没有额外的NMDAR激活的时间)允许返回到功能基线(NMDAR通道的关闭状态)和在特定突触结构内的新结构(LTP+LTD)基线,该特定突触结构在涉及体验的特定细胞的膜上表达,即选择内啡肽系统的神经元部分。

[1101] 因此,如果已经过去了足够的时间,那么与新体验相比,可以以相同或非常相似的效果(情绪反应的强度)来重复体验(耐受性逆转)。如果体验具有强烈的进化物种保护内涵,例如食物和性体验,则允许NMDAR返回到关闭状态并因此再次 μ 受体引发对内啡肽爆发的强烈反应所必需的体验之间经过的时间是短的。对于阿片类药物成瘾者来说也是如此,其在“修复”之间留出了足够的时间,或者当阿片类药物用于术后疼痛时,当两次手术之间具有足够的时间,并且从而用阿片类药物治疗的两次疼痛事件:当两剂药物之间有足够的的时间间隔时,重复使用阿片类药物的效果将接近第一次使用后体验的效果,因为与阿片受体相关的NMDAR已恢复到其基线活性。

[1102] 在暴露于压力的小鼠中建立的抑郁实验模型基于对性的兴趣丧失(FUST,雌性尿液嗅测试)和对新颖食物的兴趣丧失(NSFT,采用新奇抑制摄食实验)。在发明人公开的数据中,已显示右美沙酮在这些模型中发挥抗抑郁样作用。这些抗抑郁样作用的假定作用机制基于实施例2并通过实施例3中公开的右美沙酮的持续治疗作用得到证实,表明潜在的神经可塑性诱导的疾病改善效果。

[1103] 阿片受体和NMDAR(但不是AMPA)共定位于大脑的相同区域(Narita等人,2008),并且在选定神经元的突触后区域具有结构相关性(MOR-NR1在体内形成受体异二聚体)。值得注意的是,AMPA的激活对于通过GluN2A和GluN2B通道触发电压依赖性钙内流是必要的,因为这些通道的开放取决于去极化和 Mg^{2+} 阻断的释放(在 Mg^{2+} 阻断的存在下,这些通道亚型被完全阻断)。另一方面,GluN2C和GluN2D在静息膜电位下允许一些 Ca^{2+} 内流(Kuner等人,1996;Kotermanski等人,2009)。因此,右美沙酮可能优先作用于GluN2C NMDAR亚型和GluN2D亚型(实施例1、5和6)。

[1104] NMDAR激活是对内啡肽耐受的分子机制(这可以看作是一种生理和进化物种保护机制,因此不会激励个体沉迷于徒劳的享乐行为),也是众所周知的对阿片类药物特定作用的耐受和成瘾现象的分子机制(Trujillo KA, Akil H. Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801. Science. 1991; 251 (4989): 85-87)。有趣的是,不同作用的耐受水平(起效和强度)不同:对呼吸抑制和欣快的耐受迅速而强烈,而对镇痛作用的耐受则稍慢且强度较低。最后,对阿片类药物的便秘作

用几乎没有或没有耐受性。后一种作用主要是阿片类药物的外周作用,这表明神经可塑性可能是对欣快感等中枢作用的耐受机制。这种对阿片类药物不同作用的不同耐受性也表明了阿片类药物对选定的MOR-NR1异二聚体的激活。鉴于本发明人的实验发现(实施例1-11)和其他观察,对这些阿片类药物效应的耐受性、身体依赖性和对阿片类药物的成瘾倾向(以及戒断的焦虑,包括解决身体依赖后成瘾者持续存在的焦虑)和强迫行为可能由与MOR相关的GluN2C和/或GluN2D NMDAR亚型的优先病理激活决定。发明人公开了相同的机制,即选定的MOR-NR1异二聚体的过度激活,是MDD的基础。

[1105] NMDAR激活通过降低(耐受性)内啡肽(或阿片类药物)的作用来调节内源性阿片类药物系统的生理机能,该作用由重复(非新的)刺激诱导的体验(或由重复施用阿片类药物诱导)引起。根据定义,对新体验不能有耐受性,对阿片受体激动剂的首剂也不能有耐受性。耐受性是一种发展为重复体验和重复剂量的阿片受体激动剂药物的学习/记忆形式(具有神经可塑性后果的NMDAR过度活跃)。耐受性(对重复体验或重复剂量的阿片类药物)的分子机制是在结构上与阿片类药物受体相关(物理耦合)的NMDAR的PAM。NMDAR通道开放的增加(PAM效应)增强了 Ca^{2+} 内流(Narita等人,2008)。因此,在其突触热点MOR-NR1异二聚体中表达突触后神经元中的过量的 Ca^{2+} 内流是耐受性的分子基础(减少用于镇痛或娱乐目的的重复体验或重复阿片类药物剂量的影响)。

[1106] 重复“积极”体验将导致结构上与其MOR(NR1-MOR的物理耦合)相关的NMDAR的激活,并将确定对 β -内啡肽激增的耐受性,对重复这种失去新颖性的“积极”体验相对甚至绝对失去兴趣。同时,重复的“积极”体验可以决定满足的状态,特别是如果允许在重复体验之间经过“适当”的时间量。这个“适当的时间量”将根据个体(及其突触结构)和体验的类型而有所不同[通常,生存所必需的食物和性体验(物种保存体验)将具有更短的“适当的时间量”即,与其他对生存不太重要的刺激相比,通过重复体验来体验快乐的经过的时间更短]。

[1107] 如果重复体验被重复,这种由内啡肽引起的生理NMDAR激活(“积极”体验)及其下游效应(LTP)将随时间而减小。如果在体验之间允许时间经过,那么在没有内啡肽的PAM效应的情况下,NMDAR的基线活动将会恢复。这个经过的时间(暴露之间的“安静”)允许通道关闭和 Ca^{2+} 内流减少,产生生理性下游后果,例如,LTP和新的记忆层)。当在一段时间后重复体验时,相关的MOR将再次能够对 β -内啡肽做出生理反应,并随着体验的重复而返回奖励,并且从而恢复对体验的兴趣。

[1108] 如发明人公开的实验模型所见,如果MOR-NR1复合物的NMDAR通道部分被病理激活(例如,由于长期压力),则存在过量的 Ca^{2+} 进入,伴随细胞功能障碍和LTP机制的停止和失去对食物和性(以及其他活动:快感缺乏)的兴趣,会随着时间的推移而持续存在,就像抑郁的孤立症状的实验模型中的情况一样。低亲和力NMDAR通道阻滞剂右美沙酮以持续的方式成功地逆转了患者的MDD(实施例3)。

[1109] 在易感的个体中[具有“易感的”突触框架的个体,特别是“易感的”NMDAR框架,例如,NMDAR在刺激后容易保持过度激活(病理性过度活跃)],一些重复的“积极”经历,甚至是一次“积极”、有益的、新颖的经历,都可能触发、恶化或维持神经精神障碍,基于持续的NR1-MOR异二聚体过度激活(例如,成瘾,尤其是阿片类药物成瘾和/或行为成瘾,以及OCD和躁狂状态,或甚至抑郁症,因为无法再次实现一生一次的“幸福状态”,例如通过阿片类药物“修复”获得)。此外,波动的NMDAR功能障碍可能是双相障碍的临床表现的分子基础。

[1110] 通过相同的机制(NR1-MOR的过度激活),重复剂量的 μ 激动剂阿片类药物将导致耐受和依赖,并且突然停药或给予拮抗剂后,导致身体(耦合到MOR的外周NMDAR的过度激活)和精神症状(耦合到MOR的外周NMDAR的过度激活)的戒断(Trujillo和Akil,1991)。同样的机制(NMDAR的持续低水平过度激活)可能会在身体戒断症状解决后触发MDD。当强 μ 激动剂阿片类药物用于止痛或娱乐目的时,一般来说,对疼痛的镇痛作用、愉快的“修复”或呼吸抑制实际上可以总是通过增加剂量来获得(镇痛和欣快作用没有上限),这意味着NMDAR过度激活及其随之而来的耐受性可以通过足够高剂量的全激动剂 μ 阿片类药物来克服。这条一般规则在极端情况下也有例外,例如,在使用非常高剂量的 μ 阿片类激动剂治疗的慢性疼痛患者中出现的痛觉过敏,其中NMDAR过度活跃通过增加 μ 激动剂(或其代谢物)的慢性剂量而变得如此严重,以至于它不能再被更高的阿片类药物剂量所克服,并且实际上,随着剂量的逐步增加,痛觉过敏会恶化。在这种情况下,痛觉过敏可以通过轮换使用不同的 μ 激动剂来解决或改善,通常在较低的等痛(equianalgesic)剂量下(Pasternak和Pan,2013)。这种由非常高剂量的长期阿片类药物引起的NMDAR强烈过度激活模型的类比可以通过非常强烈的反复创伤经历来得出,例如,退伍军人的PTSD。

[1111] 重复的“消极”体验(或沉迷于消极体验)将导致与KOR结构相关的NMDAR的过度激活,对新的强啡肽激增产生耐受性,并降低与类似消极体验相关的焦虑程度(习惯于消极体验,对困境的更高容忍度),但也可能决定持续的低水平焦虑(MDD,PTSD)或对轻微事件的敏感性。已知兴奋和敏化作用都是NMDAR介导的现象(Trujillo and Akil,1991;Trujillo KA.Are NMDA receptors involved in opiate-induced neural and behavioral plasticity?A review of preclinical studies.Psychopharmacology (Berl).2000;151(2-3):121-141)。患有严重抑郁症的患者通常不仅对积极体验(快感缺乏,抑郁症的已知标志)反应较小,而且对消极体验的反应也较小(对失去漠不关心,例如,对丧亲之痛或失去工作的漠不关心;这种漠不关心,一种不太被重视的抑郁症表现,在SDQ量表的第6个问题中被捕捉到了)。虽然有效(不是恐慌)的战争反应是必要的,但是在一些经验丰富的士兵中看到的对战争事件的相对“漠不关心”,因此可能是NMDAR过度激活(NR1-KOR)和KOR受体对强啡肽刺激的反应减少的表现。

[1112] 在易感个体中,重复的“消极”体验或甚至单一的“消极”新体验(特别是如果特别“强烈”)可能引发、恶化或维持神经精神障碍(例如,MDD相关障碍,包括PTSD和丧亲障碍)。创伤体验后这些持续的神经心理症状可以在分子水平上通过NR1-KOR过度激活来解释,过量 Ca^{2+} 内流导致LTP机制受损。

[1113] MDD可能因此由与MOR和/或KOR相关的过度活跃的NMDAR引起。

[1114] 如本申请中所公开的,当NMDAR激活过量时,例如,病理性和强直性激活的GluN1-GluN2C和2D亚型,神经精神障碍可能会因为过量 Ca^{2+} 内流和随之而来的神经可塑性机制的失调障碍而被触发、维持或恶化,该失调障碍即用于突触蛋白的转录、合成、组装和表达以及神经营养因子的转录、合成和释放的下游信号传导的失调,包括BDNF(参见实施例2)和LTP/LTD的相应改变。NMDAR的强直性过度激活的临床表现取决于受影响的大脑区域,或更准确地说,取决于受影响的神经元群体和相关受体和功能回路。在MDD和相关疾病的情况下,与阿片受体(例如,NR1-MOR和/或NR1-KOR,尤其是GluN2C亚型)物理耦合(结构相关)的NMDAR的强直性过度激活会破坏内啡肽系统的生理调节功能,引起MDD和相关障碍。

[1115] 随着使用安全且耐受性良好的NMDAR通道阻滞剂(诸如右美沙酮)所教导的知识的进步,神经精神科医生将能够了解与NMDAR过度激活(对NMDAR通道阻滞剂的反应)或NMDAR活动减退(施用NMDAR通道阻滞剂后恶化)相关的障碍。非继发于NMDAR过度激活的障碍在施用右美沙酮后不会改善或恶化。

[1116] 因此,与受体(包括阿片受体)相关的NMDAR过度激活的临床表现与受影响的神经元和神经元群体以及表达与所述NMDAR物理偶联的选定受体的回路有关。NMDAR过度激活的这些临床表现取决于个体独特的NMDAR框架,该框架由遗传决定,然后由环境刺激在表观遗传上形成,并根据发育阶段(即年龄)、社会文化变量以及甚至性别差异而变化。

[1117] NMDAR是记忆形成(学习,LTP/LTD)的中心,并且在CNS(和额外的CNS,它们是发出与这些细胞主要功能相关的精确指令所必需的,例如胰岛胰腺细胞中的胰岛素产生或淋巴细胞中免疫记忆的产生)中普遍存在。NMDAR在结构上与根据特定神经元集群和回路的功能不同的选定受体相关[例如,内啡肽系统中的阿片受体和用于其他CNS系统和回路的其他受体(或甚至其他组织中的额外CNS受体)]。当过度活跃的NMDAR在结构上与阿片受体相关时,例如在内啡肽系统中,可能会出现神经精神障碍,例如MDD和相关障碍。当过度活跃的NMDAR在结构上与其他受体(例如烟碱受体)相关时,可能会出现不同的神经精神障碍,例如认知障碍。

[1118] 氯胺酮、右美沙芬和右美沙酮对阿片受体的亲和力低(美金刚没有)。这些NMDAR通道非竞争性阻断剂(例如,氯胺酮、右美沙芬和右美沙酮,但不是美金刚),通过下调神经元中过量 Ca^{2+} 内流和结构上与阿片受体相关(物理耦合的过度活跃的NMDAR,可能恢复这些阿片受体对内啡肽的生理反应,缓解由内啡肽系统的调节障碍引起的神经精神障碍。

[1119] 内啡肽,结合阿片受体的生理神经肽,参与幸福感、奖励机制、压力减轻和对新颖刺激的反应。内啡肽通路的破坏与抑郁症的孤立症状有关(Lutz等,2015),内啡肽水平与抗抑郁药的反应有关(Kubryak OV,Umriukhin AE,Emeljanova IN,et al.Increased β -endorphin level in blood plasma as an indicator of positive response to depression treatment.Bull Exp Biol Med.2012;153(5):758-760)。

[1120] 本发明人提供了右美沙酮的NMDAR通道非竞争性阻断作用的证据(实施例1),包括对病理性和强直性过度活跃的NMDAR(例如GluN1-GluN2C亚型)的优先作用,(实施例1、5、6),以及本发明人已经提出证据表明右美沙酮对 Ca^{2+} 电流的这种下调可能通过神经可塑性机制在动物模型和人类(实施例3)中具有治疗作用。

[1121] 此外,本发明人公开了MDD和相关障碍可能由结构上与阿片受体相关的病理性和强直性活化的NMDAR的选择性过度激活引起的。NR1-MOR或KOR相互作用调节内啡肽的生理作用(内啡肽或阿片类药物对MOR和KOR的作用受结构上相关的NMDAR状态的调节)。NMDAR过度激活会破坏生理内啡肽的相互作用,并最终干扰NMDAR调节的神经可塑性(突触结构和突触功能),这表现为个体生命中任何特定时间的实时情绪状态、认知功能和社交互动。

[1122] 如上所述,潜在的治疗药物优先靶向选定的NMDAR群体(例如,病理性和强直性过度活跃的GluN1-GluN2C和/或GluN1-GluN2D亚型)的能力,同时保留NMDAR(例如,GluN1-GluN2A和GluN1-GluN2B亚型,由 Mg^{2+} 阻断强烈门控)的生理性和阶段性开放/关闭,对于避免认知副作用是至关重要的,从轻度到中等强度的解离症状(右美沙芬和氯胺酮)到昏迷,如MK-801所见(Trujillo,2000)。当电压门控受体的功能被阻断时可以看到这些副作用,或者

当任何NMDAR亚型的阻断过度时可以看到这些副作用,从而干扰其生理功能,包括过度阻断相对电压无关的NMDAR亚型(例如,NR1-NR2C生理学上和强直性地开放,而不是病理性和强直性激活)。对所有临床耐受的NMDAR通道阻滞剂(实施例1)测试的GluN1-GluN2C和/或GluN1-GluN2D亚型的优先阻断通过生理浓度(1mM)的细胞外 Mg^{2+} 的存在而被加重若干倍(Kuner and Schoepfer,1996;Kotermanski and Johnson,2009)。

[1123] NMDAR在CNS(和额外的CNS)中普遍存在,并且当靶向特定障碍(诸如MDD和可能由内啡肽系统异常调节引起的相关神经精神障碍)时,需要一种优先靶向病理性和强直性过度活跃的NMDAR的药物,这些NMDAR也是在功能和结构上与阿片受体(例如,NR1-MOR)相关(物理耦合)。这种进一步的药物选择性[对在结构上与阿片受体相关的NMDAR的选择性,在先前描述的对病理和强直活性GluN1-GluN2C和2D亚型的选择性(优选,实施例1)之上],根据发明人的新观察,在整个申请和下文中概述,似乎是用于治疗MDD和相关障碍的NMDAR非竞争性阻滞剂的有效性的基本特征。在MDD的情况下,由Rodriguez-Munoz等人于2012年描述并由Narita等人于2008年预测的MOR-NR1异二聚体的靶向,由于内啡肽系统在维持“幸福”的生理状态中的生理作用而很有用。“幸福”的生理状态在MDD和相关障碍中发生改变,其中阿片受体和NMDAR在选定脑区(内啡肽通路)中在结构上相关,以在神经元的突触后区域形成异二聚体(MOR-NR1)(Narita et al.,2008年;Rodriguez-Munoz等人,2012年)。

[1124] 因此,对于由内啡肽通路的神经元部分上的NMDAR的破坏触发、维持或恶化的疾病,选择性靶向与阿片受体(内啡肽的受体)在结构上相关(物理耦合)的NMDAR是期望的。

[1125] Shepherd亲和力和假设;配体导向的信号;双受体;偏置信号:

[1126] 为了MDD和相关障碍的有效治疗,对阿片受体和NMDAR均具有亲和力的药物可能对于选择性靶向与内啡肽系统的神经元部分的膜上表达的阿片受体结构相关(物理偶联)的NMDAR的目的是有利的。对阿片受体没有亲和力的NMDAR通道阻滞剂(例如美金刚)可能不会选择性地靶向/到达内啡肽系统(但可能选择性地到达另一个系统,并通过选择性地靶向与另一种受体(例如烟碱受体)相关的NMDAR而可能对由该系统的功能障碍触发的疾病有效,例如阿尔茨海默病)并且因此对MDD和相关障碍是无效的(Zarate et al.,2006;Kishi T, Matsunaga S,Iwata N.A Meta-Analysis of Memantine for Depression.J Alzheimers Dis.2017;57(1):113-121)。仅作用于阿片受体的药物,例如, μ 完全激动剂吗啡[左吗啡,不具有NMDAR通道阻滞剂活性(Gorman等,1997)],实际上会对MDD产生相反的作用:通过靶向“欣快的”MOR,左吗啡在NMDAR中充当PAM,选择性地靶向MOR-NR1异二聚体。即使设计阿片类药物组合,其选择性靶向(拮抗作用)“焦虑”KOR(例如,丁丙诺啡-沙米啡烷组合),也可能选择性靶向内啡肽系统,但也可能触发物理偶联受体的NMDAR激活,导致对KOR拮抗作用的耐受性,逆转丁丙诺啡/沙米啡烷组合通过KOR拮抗产生的对于MDD的治疗效果。事实上,通过KOR拮抗来逆转焦虑的设计组合药物在治疗抑郁症的孤立症状时表现出最初的有效性,随后就失去了功效(Ragguett RM,Rong C,Rosenblat JD,Ho RC,McIntyre RS.Pharmacodynamic and pharmacokinetic evaluation of buprenorphine+samidorphan for the treatment of major depressive disorder.Expert Opin Drug Metab Toxicol.2018;14(4):475-482;Zajacka JM,Stanford AD,Memisoglu A,Martin WF,Pathak S.Buprenorphine/samidorphan combination for the adjunctive treatment of major depressive disorder:results of a phase III clinical trial

(FORWARD-3). *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2019;15:795-808. Published 2019 Apr 4)。丁丙诺啡-沙米啡烷组合的功的丧失与通过结构相关的NMDAR (KOR-NR1异二聚体) 的激活 (PAM效应) 对KOR拮抗作用的耐受机制一致。

[1127] 为了对MDD和相关障碍有效, 具有阿片类药物和NMDAR作用的药物不应是高亲和力阿片类药物 (强阿片类药物), 因为强 (高亲和力) 阿片类药物的阿片类药物激动剂作用在NMDAR阻断上占优势, 例如, 对于外消旋美沙酮和左美沙酮或外消旋美沙芬和左美沙芬而言, 阿片类药物效应在NMDAR阻断效果上占优势。然而, NMDAR阻断活性能够防止耐受性 (它防止MOR激活的PAM效应), 并且与左吗啡 (没有NMDAR通道阻断活性的MOR激动剂) 相比, 使用美沙酮 (MOR激动剂+NMDAR通道阻滞剂) 对增加剂量和维持稳定剂量的趋势的需要较小。

[1128] 强阿片类药物 [例如, 完全阿片类药物激动剂1-吗啡, 缺乏NMDAR阻断活性 (Gorman等人, 1997)], 因此发挥阿片类药物效应并诱导耐受性 (即, 在NMDAR处充当PAM, 导致过度活跃和过量 Ca^{2+} 内流)。通常可以通过增加剂量来克服耐受性: 这在癌症疼痛治疗领域是众所周知的 (Pasternak和Pan, 2013年), 在该领域, 对疼痛控制的医学需求克服了一些麻醉剂副作用的不利方面, 并且通常使用高剂量的阿片类药物用于控制疼痛。兼具作为强 μ 激动剂和NMDAR阻断作用活性的药物 (例如, 外消旋美沙酮和左美沙酮或外消旋美沙芬或左美沙芬) 对镇痛作用的耐受性较低 (与吗啡相比, 剂量增加较少)。

[1129] 另一方面, 一些高亲和力强阿片类药物的某些右旋异构体, 虽然与外消旋混合物保持相似的NMDAR阻断作用, 但是为一种对阿片类药物受体具有低亲和力的药物, 如右美沙芬和右美沙酮 (Codd等人, 1995年)。右美沙酮在可以治疗由NMDAR过度活跃引发或维持的障碍的剂量下没有临床意义的阿片类药物效应, 例如 (实施例3)。这些药物的低阿片受体亲和力不会导致临床上明显的阿片类药物效应: 通过增加剂量, 右美沙酮和右美沙芬的剂量限制副作用不是阿片类药物的典型副作用 (麻醉、呼吸抑制), 即使施用非常高剂量的右美沙酮。在啮齿动物研究中也发现了高剂量下阿片类药物效应的缺乏: 仅在外消旋美沙酮和1-美沙酮治疗的动物中, 死亡之前会出现麻醉和呼吸抑制, 而在右旋美沙酮治疗的动物中则没有 (在这些动物中, 死亡是一种抽搐之前的“全有或全无”的突然现象 (Scott CC, Robbins EB, Chen KK: Pharmacologic comparison of the optical isomers of methadone. *J Pharm Exp Ther*. 1948;93:282-286))。

[1130] 此外, 不具有NMDAR通道阻断作用的阿片类药物, 例如吗啡 (1-吗啡), 通过在NMDAR处充当PAM (不具有NMDAR通道阻断活性), 实际上可能触发、恶化或维持神经精神症状和障碍, 包括抑郁症, 尤其包括成瘾性疾病领域的抑郁症。

[1131] D. 重新考虑将NMDAR作为神经精神障碍的治疗和诊断靶标: Shepherd亲和力作为一种靶向内啡肽系统的选定神经元群体部分表达的NMDAR的策略

[1132] 根据实验数据 (实施例1-11), 本发明人能够公开用于MDD的有用NMDAR通道阻滞剂的特征。这些特征包括: (1) 对具有非竞争性通道阻断的NMDAR的较低微摩尔亲和力 (实施例1); (2) 对主要受体亚型 (2A-D) 的相似亲和力 (实施例1); (3) 对受 Mg^{2+} 阻断影响较小的受体亚型 (受电压门控相位激活影响较小) 的优先亲和力, 例如GluN1-GluN2C和GluN1-GluN2D (实施例1) [在生理浓度的 Mg^{2+} 存在下, 这种优先亲和力会放大几倍 (Kuner and Schoepfer, 1996; Kotermanski and Johnson, 2009; Patch Clamp study, Example 6)]; (4) 相对较高的“捕获”和非常有用的动力学: NMDAR的“开”和“关”动力学 (实施例6); (5) 拮抗低谷氨酸浓度

影响的能力,有或没有PAMs和/或激动剂(实施例5);(6)在MDD有效剂量的患者中没有认知副作用(实施例3),表明保留参与意识所必需的持续实时“认知”功能的NMDAR;(7)对阿片受体的低亲和力:对与阿片受体结构相关(物理耦合)的NMDAR的shepherd亲和力*,从而对内啡肽系统具有趋向性;(8)NMDAR通道阻滞剂(右美沙酮)的脑浓度应足以对病理性和强直性过度活跃的NMDAR通道发挥作用,同时强直性和阶段性地保留生理工作通道。与血浆浓度相比,右美沙酮在脑中的浓度高出3-4倍。其独特的化学结构、低分子量(345,91)和分配系数($\log P=3.30$)可实现理想的CNS渗透;以及(9)已被 Mg^{2+} 阻断的阶段性和生理性工作通道,除了在去极化状态期间,由于起效缓慢而不太可能受到右美沙酮的影响。(10)带正电荷的分子:正电荷允许右美沙酮在静息膜电位(在最大负电压下)期间发挥其阻断作用,类似于 Mg^{2+} 发挥的阻断作用:当在外部刺激和突触前谷氨酸释放的情况下发生去极化时, Mg^{2+} 和右美沙酮都从通道中排出,从而允许对刺激产生生理反应,正如在MDD治疗剂量下右美沙酮没有认知效应所证实的那样(实施例3)。

[1133] NMDAR Shepherd亲和力(MDD)定义如下:阿片受体亲和力导致阿片类药物临床效应可忽略不计(例如,非常弱的部分阿片类药物激动剂),无法克服NMDAR阻断活性的治疗效果,但能够将药物导向靶细胞群,例如在突触后热点处表达在结构上偶联异二聚体的NR1-MOR的细胞,例如内啡肽通路的细胞部分。

[1134] NMDAR Shepherd亲和力定义如下:定义:对选定受体的受体亲和力(例如,在MDD的情况下是阿片受体,在阿尔茨海默病的情况下是nAChR/NMDAR复合物,在其他神经精神障碍的情况下是其他选择的异二聚体受体),将NMDAR通道阻滞剂引导至靶细胞群:表达在结构上偶联异二聚体的NMDAR受体的细胞,例如nAChR/NMDAR复合物(Elnagar MR,Walls AB, Helal GK,Hamada FM,Thomsen MS,Jensen AA.Probing the putative $\alpha 7$ nAChR/NMDAR complex in human and murine cortex and hippocampus:Different degrees of complex formation in healthy and Alzheimer brain tissue.PLoS One.2017;12(12): e0189513.Published 2017 Dec 20),在阿尔茨海默病的情况下并且例如,药物美金刚。

[1135] 具有NMDAR拮抗剂治疗活性的药物的shepherd亲和力应导致临床耐受或可忽略不计的shepherd效应(如右美沙芬和右美沙酮的阿片类药物亲和力的情况),无法克服(例如,通过PAM效应)对病理性过度活跃通道的NMDAR治疗阻断作用:通过增加剂量,剂量限制副作用(如果有)与NMDAR相关,与shepherd亲和力受体效应无关。此外,内源性配体凭借其受体亲和力和生理浓度,应该能够取代shepherd亲和力药物的治疗浓度。这种取代将允许生理配体-受体机制恢复(例如,阿片受体上的内啡肽),同时可能有利于将取代的药物分子引导至结构相关的NMDAR,通过下调过量的 Ca^{2+} 内流来确定通道关闭和其下游治疗后果。

[1136] 阿片类药物效应不能克服NMDAR临床作用是所有临床耐受性良好、FDA批准的对MDD具有作用的NMDAR通道阻滞剂的共同特征,包括右美沙芬、氯胺酮和艾氯胺酮,并且对于右美沙酮也是如此。

[1137] 在MDD和相关障碍的情况下,Shepherd亲和力将药物选择性地引导至与阿片受体结构相关的过度活跃的NMDAR,选择性地纠正内啡肽回路中的NMDAR调节障碍(例如,纠正NR1-MOR异二聚体功能关系)。Shepherd亲和力(在这种情况下对阿片受体的亲和力低)决定了与阿片受体结合的低亲和力的右美沙酮,而没有临床意义的阿片类药物效应。低亲和力允许通过循环与结构相关的NMDAR结合的shepherds和内啡肽来置换右美沙酮,阻断 Ca^{2+} 电

流和下游效应,包括恢复生理阿片受体-内啡肽关系,恢复正在进行的神经营可塑性和解决MDD表现。

[1138] NMDAR通道阻断剂选择性靶向与所选细胞群的膜上的其他受体形成复合物(结构偶联)的NMDAR的能力可以选择性地治疗(和诊断)多种疾病,除了由与阿片受体相关的功能障碍的NMDAR引起的疾病(由于内啡肽系统受损引起的疾病),如上文针对MDD和相关障碍所公开的。

[1139] E.通过对与NMDAR框架相关的特定受体的Shepherd亲和力将NMDAR通道阻断剂导向至目标选定神经元群体

[1140] “NMDAR Shepherd亲和力”因此可以是用于选择性靶向NMDAR的工具(例如,右美沙酮的情况,一种低亲和力NMDAR通道阻滞剂,偏爱NR1-NR2C亚型),NMDAR由选定细胞(例如,黑质细胞)表达,用于帕金森病,或由尾核神经元表达,用于亨廷顿病,或由运动神经元表达,用于ALS,和多种疾病和障碍等等。这种对神经元群体和/或回路的选择性靶向是通过“NMDAR shepherd亲和力”实现的:由回路的神经元部分选择性表达的受体的低亲和力靶向性涉及疾病并与NMDAR结构相关(物理耦合)(在MDD的情况下,shepherd亲和力表现为对阿片受体的选择性低亲和力,阿片受体是调节情绪的内啡肽系统的一部分)。

[1141] 过度活跃的NMDAR与多种疾病和障碍有关,例如本发明人已公开的疾病和障碍,强调了众所周知的NMDAR在几乎所有脊椎动物细胞上普遍存在。美金刚用于阿尔茨海默病可能是NMDAR shepherd亲和力的另一个示例(尽管迄今未描述):这里的shepherd亲和力可能是针对nAChR/NMDAR复合物或sigma1受体或咪唑啉I1受体,美金刚对所有受体具有低亲和力(Elnagar等人,2017)。金刚烷胺,一种低亲和力NMDAR拮抗剂,可能对黑质致密部中的神经元具有一定的受体选择性,例如,通过对sigma1受体的NMDAR shepherd亲和力(Peeters M,Romieu P,Maurice T,Su TP,Maloteaux JM,Hermans E.Involvement of the sigma 1receptor in the modulation of dopaminergic transmission by amantadine".The European Journal of Neuroscience 2004.19(8):2212-20),或对另一种受体的shepherd亲和力,该另一种受体对这种神经元群体更具有特异性。利鲁唑,另一种低亲和力NMDAR通道阻滞剂,可能受益于对运动神经元上选定受体的shepherd亲和力。对运动神经元具有shepherd亲和力的NMDAR通道阻滞剂药物,例如,通过5-羟色胺受体(如Rickli等人所示,2018年对于右美沙酮),可以改善特定病理状态下的虚弱(Nardelli P,Powers R,Cope TC,Rich MM.Increasing motor neuron excitability to treat weakness in sepsis.Ann Neurol.2017;82(6):961-971)。

[1142] 因此,在MDD和相关障碍的情况下,假定的shepherd亲和力是NMDAR与其他受体的(包括阿片受体)选择结构关联(物理偶联)的直接函数。内源性配体,例如,在MOR shepherd亲和力情况下的 β -内啡肽,或在KOR shepherd亲和力情况下的强啡肽,从阿片受体中取代低亲和力右美沙酮分子(内源性配体-受体生理相互作用,因此不受低亲和力药物干扰)并且右美沙酮可用于与结构相关的NMDAR的结构相关的过度活跃的开放通道结合。反过来,NMDAR的阻断作用,通过减少过量的 Ca^{2+} 内流,有利于内源性配体、 β -内啡肽或强啡肽的结合,从而逆转“类耐受机制”(Trujillo和Akil所述,1991年,对于阿片类药物和镇痛剂),这可能是导致MDD的内啡肽回路中断的基础。

[1143] NMDAR shepherd亲和力特征包括(1)低亲和力和(2)弱或没有激动作用。这些将在

下面讨论。

[1144] 低亲和力:NMDAR通道阻断剂药物对靶标shepherd受体(MDD情况下的阿片受体)的亲合力/浓度应低于用于相同受体的天然配体的亲合力/浓度(例如,与右美沙酮相比, β -内啡肽对 μ 阿片受体的亲合力要高几倍,因此内啡肽可以取代对阿片受体具有低亲和力的药物(如右美沙酮)的治疗(MDD)浓度)。天然配体对药物的取代可能有利于其与结构相关、物理耦合的NMDAR结合。

[1145] 弱或没有激动作用(和/或有利的副作用):对特定靶标受体的shepherd亲合力不应引起临床上显著的副作用(但可能导致一些可能具有临床意义的有利的附加作用,这可能会增加NMDAR阻断确定的有利的临床效果)。强激动剂药物引起的临床效果超过NMDAR通道阻断作用,如外消旋或左旋美沙酮和外消旋或左旋美沙芬的情况,因此NMDAR作用在临床上不太有用[它们可能仍然部分有用,例如,用于降低在治疗阿片类药物成瘾和疼痛(例如,外消旋美沙酮)中的耐受性,但在MDD和相关障碍中的用处有限]。

[1146] 虽然将NMDAR通道阻滞剂引导至表达于功能障碍的回路的选择定细胞群部分的突触后区域的NMDAR的能力对于选择性靶向特定疾病(例如,MDD和其他与内啡肽系统功能障碍相关的障碍)可能很重要,如右美沙酮的药物,耐受性非常好(例如,由于对较少受 Mg^{2+} 阻断影响的病理性和强直性过度活跃的受体亚型(例如GluN1-GluN2C和/或GluN1-GluN2D亚型)的优先亲合力,并且因此是一种耐受性良好且可能灵活的药物,不易因阶段性活性GluN1-GluN2A和GluN1-GluN2B或强直和生理活性GluN1-GluN2C和/或GluN1-GluN2D亚型的阻断而产生认知副作用),对于由结构上与其他(非阿片类)受体相关(物理耦合)的过度活跃的NMDAR引起的疾病也可能有效(例如,比对MDD有效的剂量更高)。

[1147] 右美沙酮对不同受体的作用[烟碱(Talka等人,2015);sigma-1(Maneckjee等人,1997年);SET,NET(Codd等人,1995年);5-羟色胺受体及其亚型,尤其包括5-HT_{2A}和5-HT_{2C}受体(Rickli等人,2018);和组胺受体(Codd等人,1995;Kristensen等人,1995)],可能不仅潜在地决定直接受体介导的作用,如先前假设的那样,而且潜在地可以替代或也可能通过shepherd亲合力发挥作用,即指导右美沙酮分子选择表达这些受体中的一种或多种的群体,右美沙酮以低亲和力靶向,从而选择性地阻断与这些受体相关的病理性和强直性过度活跃的NMDAR,在选定回路的选定神经元部分中具有靶向的下游神经可塑性效应。

[1148] 本发明人假设某些低亲和力NMDAR通道阻滞剂对MDD和相关障碍的功效(右美沙芬、氯胺酮、右美沙酮)取决于它们对阿片受体的低亲和力(NMDAR shepherd亲合力):这种对阿片受体的低亲和力允许选择性靶向与阿片受体相关的过度活跃的NMDAR,从而选择性靶向功能障碍的内啡肽通路的神经元部分。这解释了为什么美金刚是一种NMDAR通道非竞争性阻断剂,其活性类似于右美沙芬、氯胺酮和右美沙酮(实施例1),但对阿片受体没有亲合力,因此对表达NR1-MOR异二聚体复合物的细胞缺乏阿片类药物shepherd亲合力,并且不能选择性靶向由内啡肽通路的神经元部分表达的NMDAR,对MDD无效(Zarate等人,2006;Kishi等人,2017)。

[1149] 此外,纳洛酮消除氯胺酮的抗抑郁作用(Williams NR,Heifets BD,Blasey C,et al. Attenuation of Antidepressant Effects of Ketamine by Opioid Receptor Antagonism. *Am J Psychiatry*. 2018;175(12):1205-1215)。通过与阿片受体结合,阿片拮抗剂药物纳洛酮干扰低亲和力阿片受体与氯胺酮的结合,因此干扰其优先靶向结构上与阿

片受体相关的NMDAR的shepherd亲和力[纳洛酮与阿片受体的高亲和力(拮抗剂)结合有效地致盲了对同一受体的低亲和力shepherd亲和力](这是发明人的又一新公开)。虽然已经假设纳洛酮可能会干扰氯胺酮的弱阿片类药物效应或可能干扰内啡肽的作用,但通过纳洛酮逆转MDD中的氯胺酮有效性(如Williams等人,2018年所证明的,描述了氯胺酮单独的有效性和氯胺酮+纳洛酮缺乏有效性)可能是由于其对阿片受体的“shepherd亲和力”的致盲(氯胺酮不能再靶向与阿片受体物理耦合的NMDAR)。

[1150] 本发明人认为,在氯胺酮(以及右美沙酮和右美沙芬)的情况下,弱阿片类药物效应对抗抑郁作用的贡献是不可能的:如果是这种情况,即使有临床意义,这些弱阿片类药物效应也会在氯胺酮(以及右美沙酮和右美沙芬)给药后的几个小时内消失(随着它们的血浆水平下降),但抗抑郁作用持续数天或数周。此外,随着剂量的增加,这些药物似乎都没有具有临床意义的阿片类药物效应:随着剂量的增加,“解离”样作用,更典型的NMDAR通道阻滞剂,往往会出现而不是阿片类药物效应。此外,如果与阿片受体的结合对于MDD治疗作用很重要,则将剂量加倍会提高有效性,而治疗MDD的NMDAR通道阻滞剂则不是这种情况(实施例3)。值得注意的是,虽然这些NMDAR相关认知副作用的剂量治疗窗口对于氯胺酮和艾氯胺酮来说是狭窄的,但对于右美沙芬(一种非处方药)和右美沙酮(实施例3)来说是宽的。除了显示右旋美沙酮在治疗MDD的剂量下缺乏具有临床意义的阿片类药物效应外,也示出了较高剂量同样缺乏具有临床意义的阿片类药物效应,包括缺乏呼吸抑制作用和缺乏滥用倾向(Isbell and Eisenman,1948;Fraser and Isbell,1962;Olsen,G.D.,Wendel,H.A.,Livermore,J.D.,Leger,R.M.,Lynn,R.K.and Gerber,N.,Clinical effects and pharmacokinetics of racemic methadone and its optical isomers, Clin.Pharmacol.Ther.,21(1976)147-157;Scott et al.,1948)并在最近的出版物中得到了DEA的认可(Drug Enforcement Administration.Diversion Control Division.Drug& Chemical Evaluation Section.Methadone.July 19,2019)。

[1151] 对于MDD,具有NMDAR阻断作用的低亲和力阿片类药物的shepherd亲和力强烈依赖于对阿片类药物受体的“低亲和力”,在没有临床意义的阿片类药物效应的情况下:对阿片类药物受体具有高亲和力的分子决定阿片类药物激动剂作用,其不仅掩盖(利用阿片类药物效应)而且抵消(强阿片类药物对相关NMDAR的PAM作用)同一药物的低亲和力NMDAR阻断作用:例如,消旋美沙酮和左美沙酮是强阿片类药物及其NMDAR作用被他们的麻醉效果掩盖了。由Trujillo和Akil于1991年描述并由Narita等人于2008年展示的吗啡在NMDARs中发挥的PAM,并且是吗啡耐受性和成瘾倾向的分子基础。本发明人之一Charles Inturrisi(戈尔曼等人中,1997)的早期工作也显示了阿片类药物耐受的NMDAR机制并且本发明的另一位发明人认为是临床相关的(Manfredi等人,1997)。

[1152] 另一方面,将NMDAR通道阻滞剂与阿片受体解偶联,例如,通过添加阿片受体拮抗剂,可以使NMDAR通道阻滞剂靶向另一个细胞群(药物将不再对具有阿片受体的细胞具有选择性,例如,参与内啡肽系统的细胞)。与阿片类拮抗剂(例如,右美沙酮/纳洛酮或另一种阿片类拮抗剂,例如沙米啡烷)的组合通过致盲阿片类药物shepherd效应,可能不再对MDD有效,但可能对需要另一个细胞群(例如,具有大量的烟碱受体的细胞群)的NMDAR通道选择性(优先)阻断的另一种疾病或障碍有效,并且因此可能对不同的疾病有效,例如痴呆。本发明人已经注意到对不同疾病和障碍具有选择性的多种NMDAR通道阻断剂的未满足需求。例如,

在氯胺酮、右美沙酮、右美沙芬或任何其他对阿片受体具有低亲和力(或甚至对阿片受体具有高亲和力,例如左啡诺)的NMDAR通道阻滞剂中添加纳洛酮(或另一种阿片拮抗剂),不仅会拮抗任何阿片类药物效应,而且会使shepherd阿片类药物的亲和力致盲,从而将NMDAR作用与阿片受体分离,并可能降低这些药物对MDD的有效性,但可能“允许”NMDAR shepherd亲和力被“下一个”低亲和力取代shepherd受体接管。在右美沙酮的情况下,“下一个”低亲和力shepherd受体可能是:烟碱(Talka等人,2015);sigma-1 (Maneckjee等人,1997年);SET, NET (Codd等人,1995年);5-羟色胺受体及其亚型,尤其包括5-HT_{2A}和5-HT_{2C}受体(Rickli等人,2018);和组胺受体(Codd等人,1995;Kristensen等人,1995)。

[1153] 从本发明人的庆大霉素实验(实施例5)和关于庆大霉素毒性的文献中了解到,PAM可以靶向选定的细胞群(例如,对于PAM庆大霉素,内耳细胞或肾细胞)并引起选择性兴奋毒性。此外,某些分子,包括内源性分子,包括喹啉酸,可以用作NMDAR激动剂,并且选定的神经元群体可能更受这种激动剂作用的影响,例如,在喹啉酸的情况下,内啡肽通路的神经元部分。由于PAM和/或激动剂的作用,右美沙酮在降低通过NMDAR病理性过度活跃引起的过量Ca²⁺可能有效(实施例5)。

[1154] 根据本发明人的实验结果(实施例1-11),MDD可被视为一种内啡肽通路的疾病,其中与阿片受体结构相关的选定NMDAR已变得病理性过度刺激:低浓度谷氨酸引起的病理性和强直性过度激活,例如,有或没有PAM(例如,吗啡等)和有或没有毒性激动剂(例如喹啉酸等)的情况下,由刺激(例如压力)诱导的低水平的细胞外突触谷氨酸,甚至由有缺陷的清除机制引起的长期低水平过量谷氨酸,例如有缺陷的EAAT或星形胶质细胞病理学。

[1155] 当相关的NMDAR过度活跃时,内啡肽不再能有效地与阿片受体结合(这种相同的分子机制为其他病理状态所共有,包括阿片耐受、物质使用障碍、慢性疼痛障碍、其他成瘾障碍、冲动性障碍、OCD、以及MDD和相关障碍)。NMDAR通道阻滞剂,对结构上与阿片受体(例如,氯胺酮、右美沙芬、右美沙酮)相关的NMDAR有选择性(shepherd亲和力),选择性地阻断表达结构上相关(物理耦合)的MOR-NMDAR复合物的神经元中的Ca²⁺内流,这已由Narita等人于2008年和Rodriguez-Munoz等人于2012年描述。减少过量Ca²⁺流入细胞和与阿片受体相关的病理性过度活跃的NMDAR的下游效应应恢复内啡肽的生理结合[内啡肽将自阿片受体取代低亲和力阿片类药物(例如右美沙酮),因为它们具有更高的亲和力,并有助于将被取代的药物与MOR相关的NMDAR通道结合位点结合]。最后,NMDAR调节的神经可塑性将在内啡肽通路内恢复,伴随突触蛋白的产生和“新的健康情绪记忆”的形成和MDD的消退。

[1156] F.MDD的MOR-NMDAR shepherd假设的证据

[1157] 右美沙酮和所有三种FDA批准和测试(实施例1)的NMDAR非竞争性通道阻断剂对NMDAR具有相似的低微摩尔活性,包括对GluN1-GluN2C亚型的共同偏好(实施例1)。在这四种药物中,美金刚是唯一一种对MDD无效的药物。美金刚在MDD中的无效表明,NMDAR通道阻滞剂可能需要阿片受体亲和力才能到达由选定神经元的细胞膜表达的异二聚GluN1-MOR结构的选定NMDAR部分,例如,内啡肽系统的神经元部分。此外,当添加阿片类药物拮抗剂时,氯胺酮会降低其对MDD的疗效(Williams等人,2018年)。综上所述,这些发现和观察表明,低阿片类药物亲和力可能会引导(指导)MDD-有效的NMDAR非竞争性通道阻滞剂,因此它们选择性地靶向表达与阿片受体结构相关的NMDAR的神经元(例如,MOR-GluN1复合物)。如果NMDAR非竞争性通道阻滞剂与阿片受体无亲和力(例如,美金刚,Zarate等人,2006;Kishi等

人,2017),则NMDAR非竞争性通道阻滞剂对抑郁症无效;或者如果它们与阿片受体有亲和力,则添加阿片拮抗剂后对MDD无效(例如,氯胺酮,如Williams等人所示,2018)。

[1158] 尽管有越来越多的相反证据,直到今天,许多本领域普通技术人员仍然担心右美沙酮的滥用倾向。许多本领域普通技术人员,假设右美沙酮的情绪提升作用可能是由于与阿片受体直接相互作用的阿片效应(吗啡样效应)。氯胺酮也存在类似的担心(Sanacora等人,2015):本申请中公开的“shepherd亲和力”机制对于包括本领域普通技术人员(包括本领域的专家)来说是未知的。

[1159] 虽然阿片类药物激动剂具有欣快和其他受体介导的作用,但这些作用仅限于药物与受体结合的时间,并且已知在停药后停止和反弹。本发明人的2期结果出人意料地检测到两个强信号,表明右美沙酮的效果不是由对阿片受体的直接激动剂作用介导的对症效果,而是疾病改善效果,可能由选择性靶向的NMDAR作用介导,通过Shepherd亲和力将右美沙酮导向与阿片受体(内啡肽系统的一部分)相关的选定NMDAR,以及下游效应,包括神经可塑性(实施例1-11)。第一个信号是右美沙酮停药后至少7天的持续治疗效果(实施例3),表明超过阿片受体占据的效果:在停药约24天后,受体占据效应将停止,这可以从当外消旋美沙酮用于维持阿片类药物使用障碍时看出,或6-12小时后,这可以从外消旋美沙酮用于治疗疼痛时看出。根据本发明人的经验和观察以及从关于外消旋美沙酮及其异构体用途的文献综述以及关于消旋美沙酮及其异构体的可用科学文献,可以推断出继发于阿片受体占据的作用(缓解疼痛的作用或缓解阿片类药物耐受的症状和体征)需要高亲和力阿片类药物激动作用,而NMDAR介导的神经可塑性效应,例如对MDD的治疗作用,需要对阿片受体的低亲和力(NMDAR shepherd亲和力),而不具有临床上有意义的阿片类药物效应。

[1160] shepherd亲和力的第二个信号:对于MDD,与50mg剂量相比,25mg剂量的右美沙酮有效或更有效且起效更快(实施例3)。由阿片受体占据介导的效应几乎没有或没有上限效应(Pasternak和Pan,2013年):将剂量加倍将导致效应增强(例如,当施用外消旋美沙酮用于阿片类药物滥用障碍或疼痛时,当剂量增加时,其效应明显增加,与如吗啡的其他高亲和力阿片受体激动剂一样)。在缓解MDD的剂量下缺乏阿片类药物效应表明MDD有效性的机制与阿片受体的占有率无关,而是与NMDAR通道阻断作用有关。NMDAR对内啡肽系统的选定受体部分的作用可能是由对结构相关的阿片受体的shepherd低亲和力指导的。

[1161] 对阿片受体(右美沙芬、氯胺酮、右美沙酮)具有低亲和力的NMDAR非竞争性通道阻滞剂对MDD均有效,这支持了这些药物可通过减少选定神经元中NMDAR通道过度活跃和 Ca^{2+} 内流来恢复生理性内啡肽-阿片受体相互作用的假设,该选定神经元表达与阿片受体(内啡肽系统)结构相关的NMDAR,例如含有GluN2C亚基的亚型。这种效应需要表达阿片受体的神经元的选择性靶向(通过shepherd亲和力)。

[1162] 有趣的是注意到,选择的星形胶质细胞群体(例如,CA1海马区中的那些)高度表达MOR(Nam等人,2018)。这些MOR被认为在记忆形成中发挥核心作用(Nam et al.,2019;Zhang H,Largent-Milnes TM,Vanderah TW.Glial neuroimmune signaling in opioid reward.Brain Res Bull.2020;155:102-111)。星形胶质细胞在细胞外谷氨酸稳态中的作用是公认的,星形胶质细胞衍生的谷氨酸是NMDAR介导的抑制性突触传递增强的关键(Kang等人,1998),以及NMDAR介导的神经元缓慢内向电流和LTD的关键(Fellin et al.,2004;Navarrete M,Cuartero MI,Palenzuela R,et al.Astrocytic p38 α MAPK drives NMDA

receptor-dependent long-term depression and modulates long-term memory. *Nat Commun.* 2019;10(1):2968)。

[1163] 值得注意的是,具有抗抑郁样效应的次麻醉剂量的氯胺酮上调大鼠海马中谷氨酸转运蛋白EAAT2和EAAT3的表达(Zhu X,Ye G,Wang Z,Luo J,Hao X. Sub-anesthetic doses of ketamine exert antidepressant-like effects and upregulate the expression of glutamate transporters in the hippocampus of rats. *Neurosci Lett.* 2017;639:132-137),表明星形胶质细胞的NMDAR可能在EAAT2表达控制中发挥作用,因此在强直性谷氨酸水平控制中可能发挥作用。因此,低亲和力、非竞争性NMDAR通道阻滞剂,诸如氯胺酮、右美沙芬、右美沙酮和美金刚(实施例1),通过星形胶质细胞的NMDAR的通道孔阻断过量 Ca^{2+} 电流,可以通过另一种机制控制兴奋性毒性:上调谷氨酸转运体的表达,其进而下调谷氨酸的强制性水平。右美沙酮优先靶向(shepherd效应)结构相关、物理耦合的NMDAR-MOR(NMDAR-MOR在选定的星形胶质细胞群的膜上表达),因此可能通过不同的机制促成右美沙酮的抗抑郁机制,包括通过介导细胞外谷氨酸水平的平衡控制。

[1164] 最后,右美沙酮的抗抑郁作用也可以通过靶向表达于选定神经胶质细胞群的膜上的结构相关、物理偶联的NMDAR-MOR来发挥(Zhang等人,2020)。

[1165] 总之,在生理性 Mg^{2+} 阻断的存在下,临床耐受的NMDAR通道阻滞剂的作用可能与NR1-GluN2A和NR1-GluN2B通道无关。具体而言,在超极化状态下,存在GluN1-GluN2A和GluN1-GluN2B亚型的完全的 Mg^{2+} 阻断(参见Kuner和Schoepfer的图1,1996),表明非竞争性NMDAR通道阻滞剂对超极化状态下的这些亚型没有潜在的影响空间。生理浓度的 Mg^{2+} 对 Ca^{2+} 内流发挥100%的有效门控,并且因此非去极化神经元对LTP没有GluN1-GluN2A和GluN2B亚型贡献。如果没有去极化事件,这些亚型将保持封闭:这些亚型无法促进记忆的形成(例如,在感觉剥夺期间,在没有去极化感觉事件的情况下)。

[1166] 另一方面,这些超极化神经元,没有通过GluN1-GluN2A和GluN2B亚型的 Ca^{2+} 内流,可以反而接收 Ca^{2+} 内流,因此可以维持某种程度的神经可塑性(即,一些突触蛋白的合成),因为,即使在超极化静息状态下,也存在GluN1-GluN2C和GluN2D亚型的不完全阻断(参见Kuner和Schoepfer的图1,1996年)。因此,即使没有去极化事件,这些亚型仍然对 Ca^{2+} 内流部分开放,并能够指导与神经可塑性相关的细胞功能,例如,即使在感觉剥夺期间,在没有去极化感觉事件的情况下,这些亚型也可以指导记忆形成。

[1167] 在由非去极化谷氨酸量的过量突触前释放或清除缺陷引起的过量长期(强直性)细胞外谷氨酸浓度的情况下,有或没有PAM或激动剂(除了谷氨酸和甘氨酸),以及过量(病理性)和长期(强直性)激活的GluN1-GluN2C和GluN2D亚型,对于非竞争性NMDAR通道阻滞剂的 Ca^{2+} 阻断作用存在潜在的治疗空间,如本发明人的FLIPR所示,具有不可逾越的曲线(实施例1)。

[1168] 所有数据都支持上面提到的右美沙酮在MDD中的作用机制:右美沙酮对强直性和病理性过度活跃的GluN1-GluN2C(和可能的GluN1-GluN2D亚型)具有选择性,特别是与阿片受体(内啡肽通路的一部分)物理耦合的强直性和病理性过度活跃的GluN1-GluN2C和GluN1-GluN2D亚型。总之,公开右美沙酮作为MDD和相关障碍的疾病改善治疗的作用的证据来自实施例1-11。

[1169] 右美沙酮也对5-HT_{2A}-5-HT_{2C}通道具有亲和力(Rickli等人,2018)。虽然,与对阿

片受体的低纳摩尔亲和力相比,这种亲和力较低[Rickli等人于2018年报告称右美沙酮是一种5-HT_{2A}激动剂(K_i 520nM)和5-HT_{2C}激动剂(K_i 1900nM)](Codd等人,1995),它可以潜在地充当shepherd亲和力。这种对5-HT_{2A}和5-HT_{2C}通道的亲和力可导致5-羟色胺受体shepherd效应,类似于对阿片受体描述的引导阿片类药物亲和力效应。因此,右美沙酮可能对与5-羟色胺和阿片类药物系统相关的NMDAR具有选择性。众所周知,内啡肽和5-羟色胺系统是神经递质系统,该神经递质系统是MDD的病理生理学及其CNS回路的核心,因此优先靶向结构上与5-羟色胺和/或阿片受体相关的NMDAR可能对右美沙酮的治疗效果至关重要。此外,对烟碱受体的亲和力可能通过相同的引导机制解释右美沙酮对认知功能的选定指标的积极影响(实施例3和实施例9)。

[1170] 实施例11

[1171] A.d-美沙酮在西方饮食治疗的大鼠中的选择效果

[1172] 所有涉及动物的程序均按照尊重国家和国际法律 and 政策的机构指南进行(欧洲经济共同体的理事会指令86/609, OJL358, 1, 1987年12月12日; NIH实验动物的护理和使用指南, NIH出版物No. 85-23, 1985)。该研究设计经帕多瓦大学伦理委员会批准, 用于实验动物的护理和使用以及通过意大利卫生部批准(授权号721/2017)。

[1173] 雄性Sprague-Dawley大鼠(200 ± 50 g)每笼饲养3只, 温度为21°C, 12小时光照和12小时黑暗交替。经过一段时间的适应后, 将大鼠分为两个适当的随机组: 一个继续服用标准饮食的对照组和另一个饲喂高脂肪含量的饮食(60%千卡来自饮食, 高脂饮食, HFD)的对照组。这种饮食在饮用水中也富含果糖, 浓度为30% (w/V)。HFD和果糖的结合是所谓“西方饮食”的模式。26周后, 将HFD饮食的大鼠随机分为2个亚组。动物每天通过灌胃治疗15天, 分别用: 水性载体(西方饮食亚组); d-美沙酮(10mg/kg体重)。

[1174] B.d-美沙酮对肝脏炎症的影响

[1175] 通过qRT-PCR测量大鼠肝脏中参与炎症的三种细胞因子的基因表达。参考图52A和52B, 通过给予西方饮食, 促炎性白细胞介素IL-6和抗炎性白细胞介素IL-10的基因表达显著增加, 表明肝脏炎症增加, 可能伴随着肝脏努力再生。有趣的是, d-美沙酮治疗能够抵消这种影响, 即使它没有恢复生理性IL-6和IL-10的表达。此外, 相对于标准饮食, 西方饮食也增加了CCL2(一种参与炎症和肝脏中免疫细胞募集的趋化因子)的基因表达(参见图52C)。D-美沙酮治疗对这种增加没有显著影响, 但是与喂养西方饮食的未治疗大鼠相比, 在d-美沙酮治疗的动物中可以观察到下降趋势。

[1176] C.d-美沙酮对肝脏状态和肝脏脂质代谢的影响

[1177] 本发明人还通过石蜡包埋的肝切片的苏木素-伊红染色对肝组织进行了组织学分析。在组织学上, 用标准饮食喂养的大鼠显示出正常的肝脏结构(图53A), 而在用西方饮食喂养的大鼠中观察到脂质积累导致的具有典型的气球样变的肝脏脂肪变性(图53B, 箭头), 而在用d-美沙酮治疗的大鼠中可以观察到肝脏脂肪变性减少(图53C)。

[1178] 为了支持表明存在肝脏脂肪变性的组织学数据, 本发明人通过qRT-PCR测量了参与脂质代谢的两个基因, 即GPAT4和SREPB2的表达。正如预期的那样, GPAT4和SREPB2的基因表达均在给予西方饮食下显著增加, 并且d-美沙酮治疗能够导致它们的表达显著下降, 即使这种下降并没有恢复它们的生理水平(参见图54A和图54B)。

[1179] 除了对右美沙酮的治疗范围增加潜在适应症外 (NAFLD和NASH), 这些数据证实右

美沙酮的作用不仅是对症的,而且是潜在的疾病改善:预计情绪障碍的对症治疗不会对炎症参数产生可测量的影响。然而,疾病改善治疗可能潜在地调节生理病理学的不同方面,包括与MDD相关和/或关联的代谢和炎症状态。

[1180] 虽然通过参考本发明的优选实施例的细节公开了本发明,但是应当理解,本公开旨在作为说明性而非限制性意义,正如预期的那样,在本发明的精神和修改后的权利要求书的范围内,本领域普通技术人员很容易做出修改。

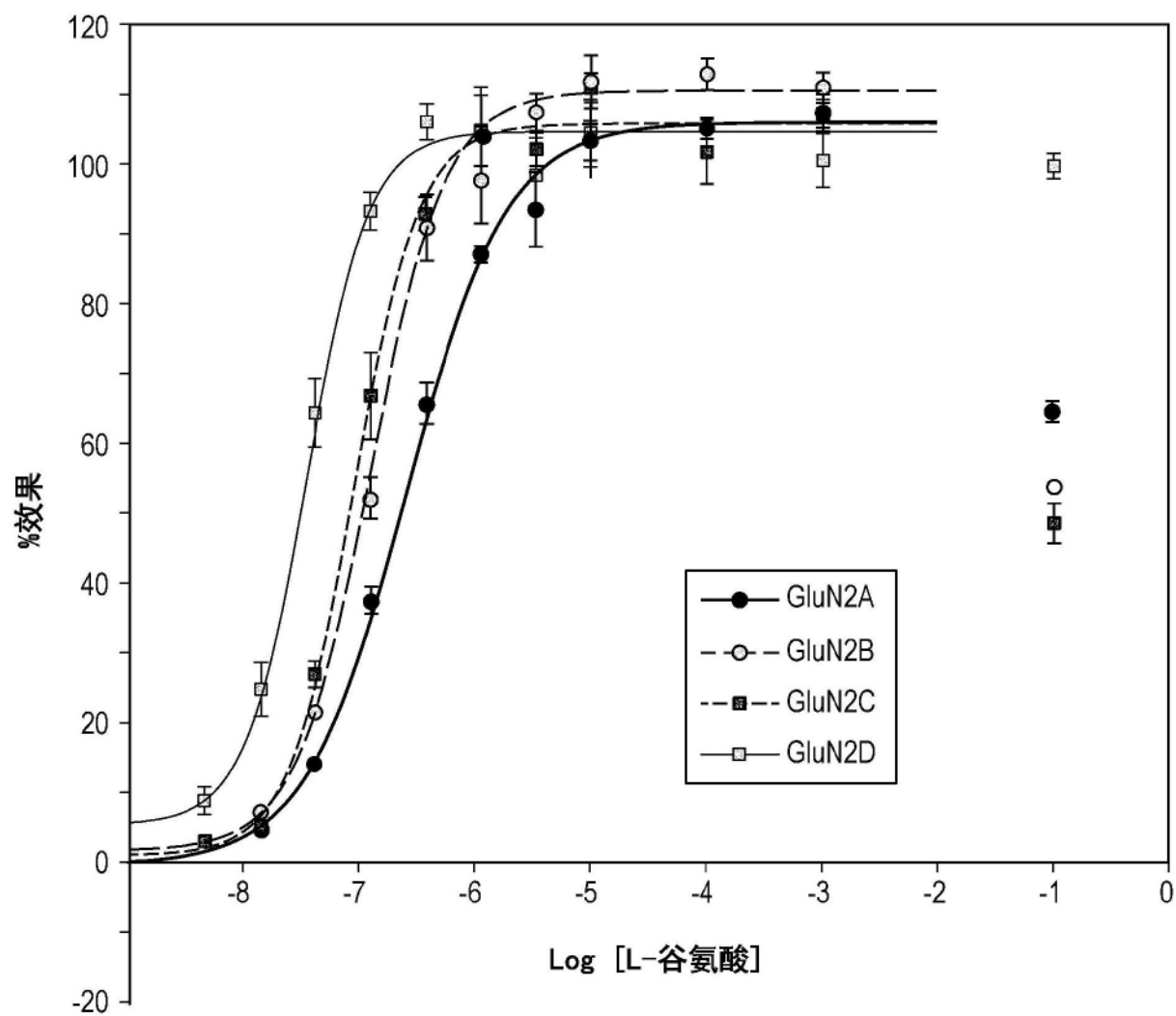


图1

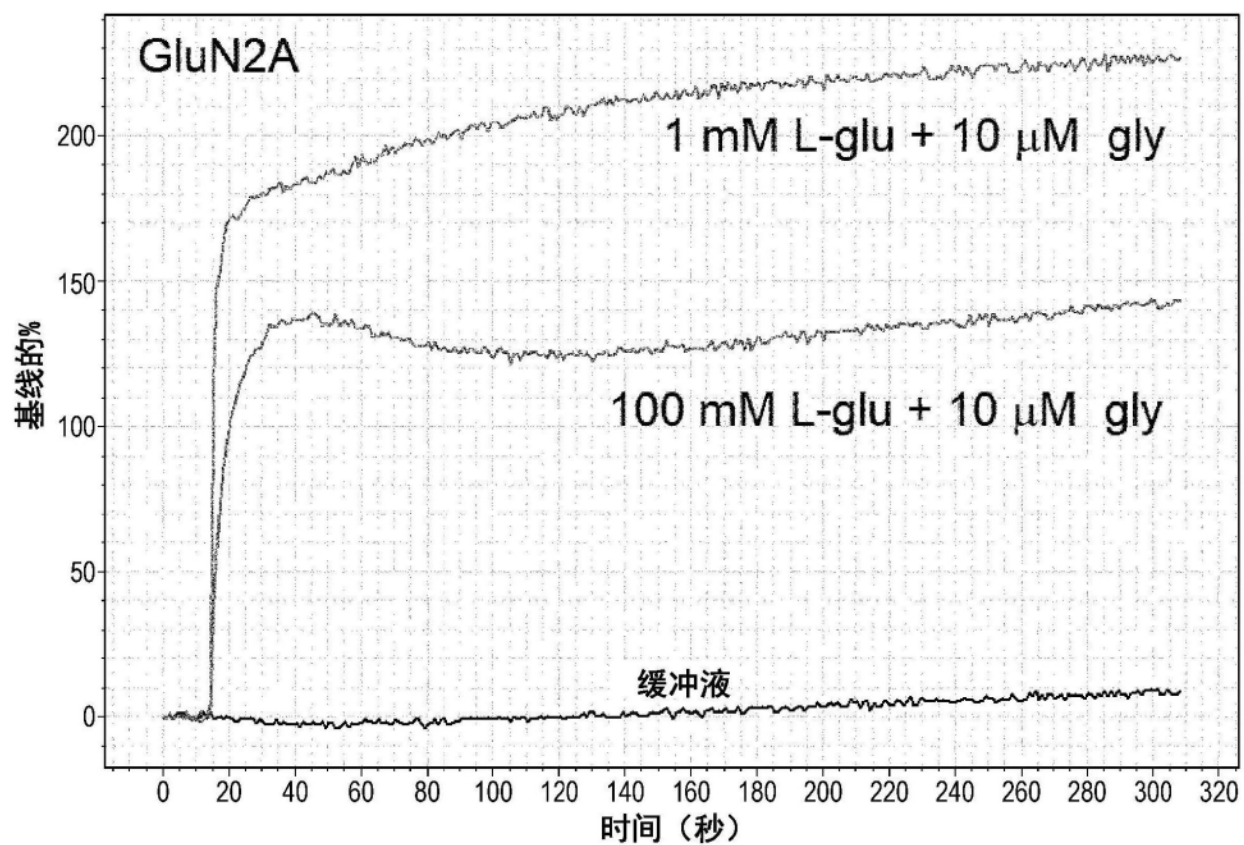


图2A

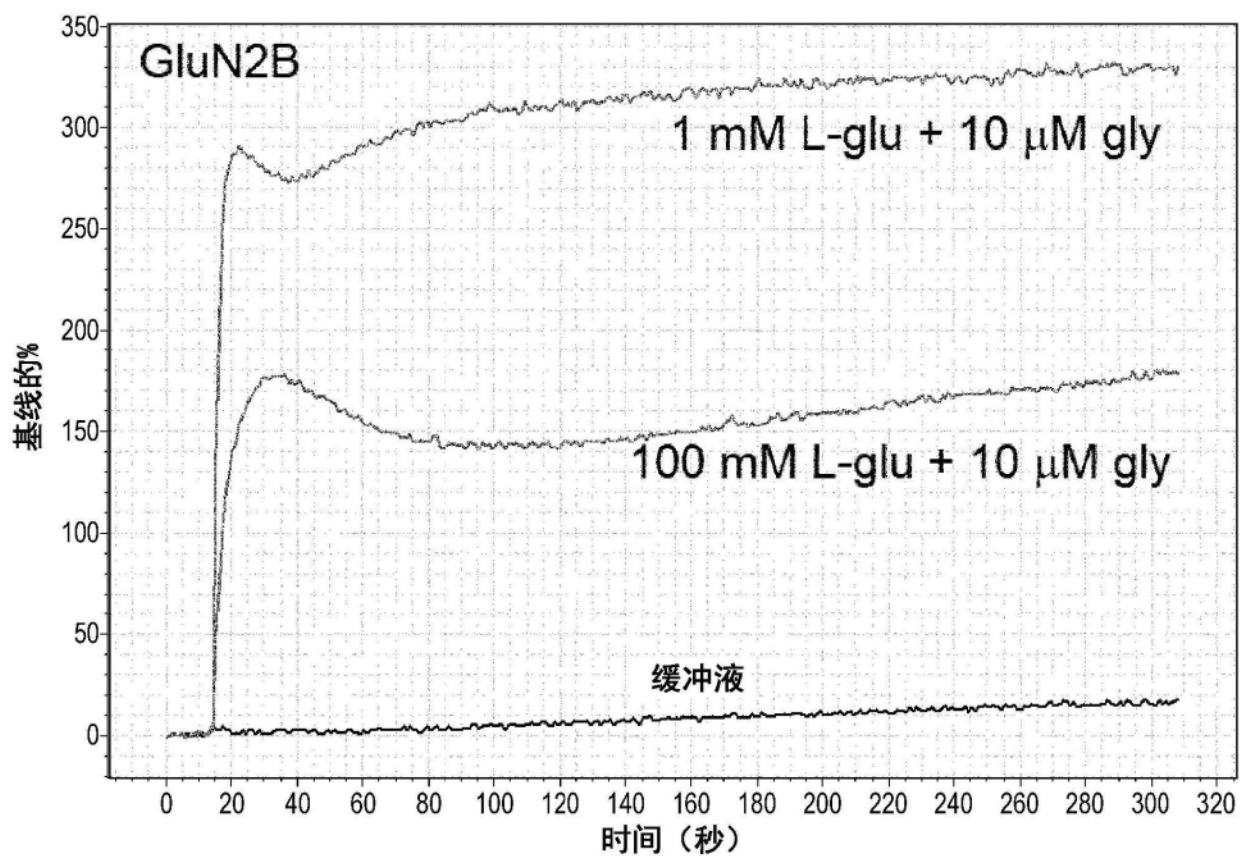


图2B

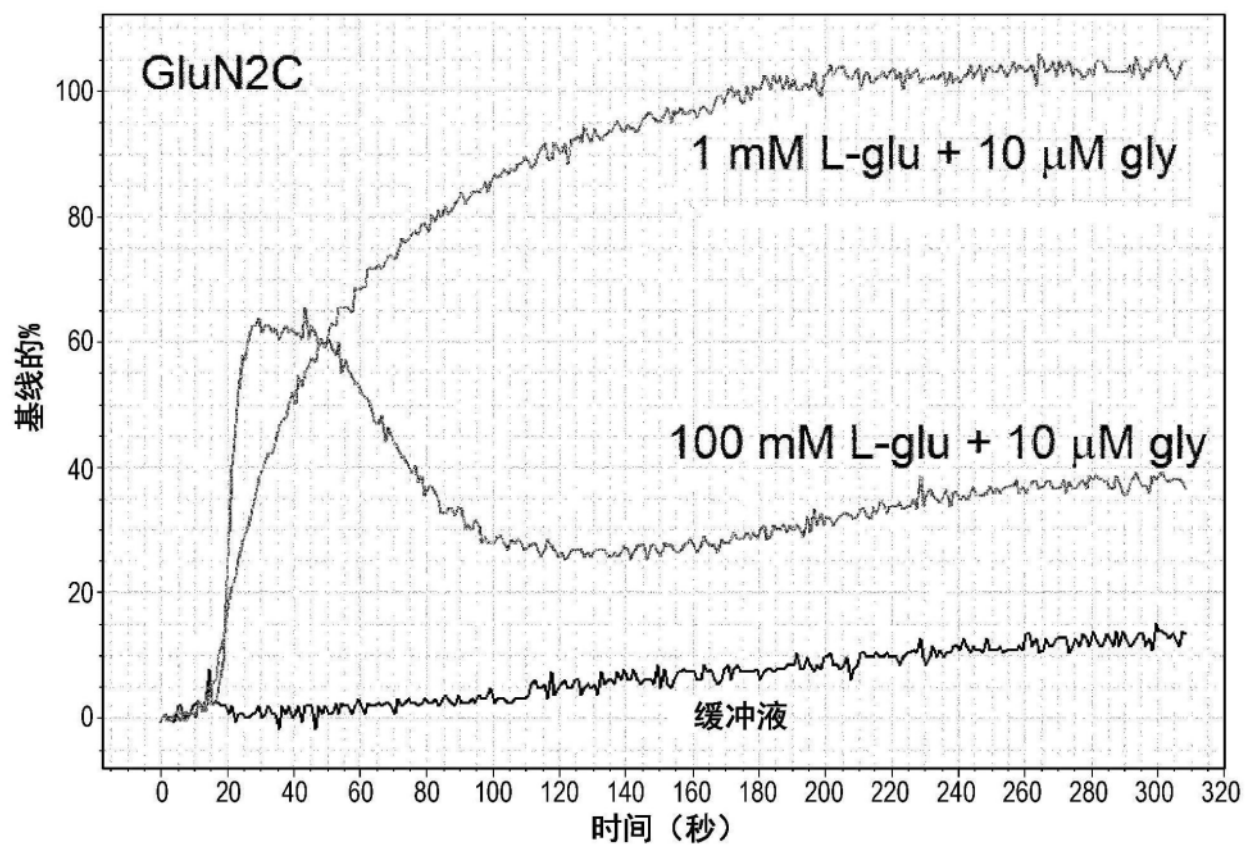


图2C

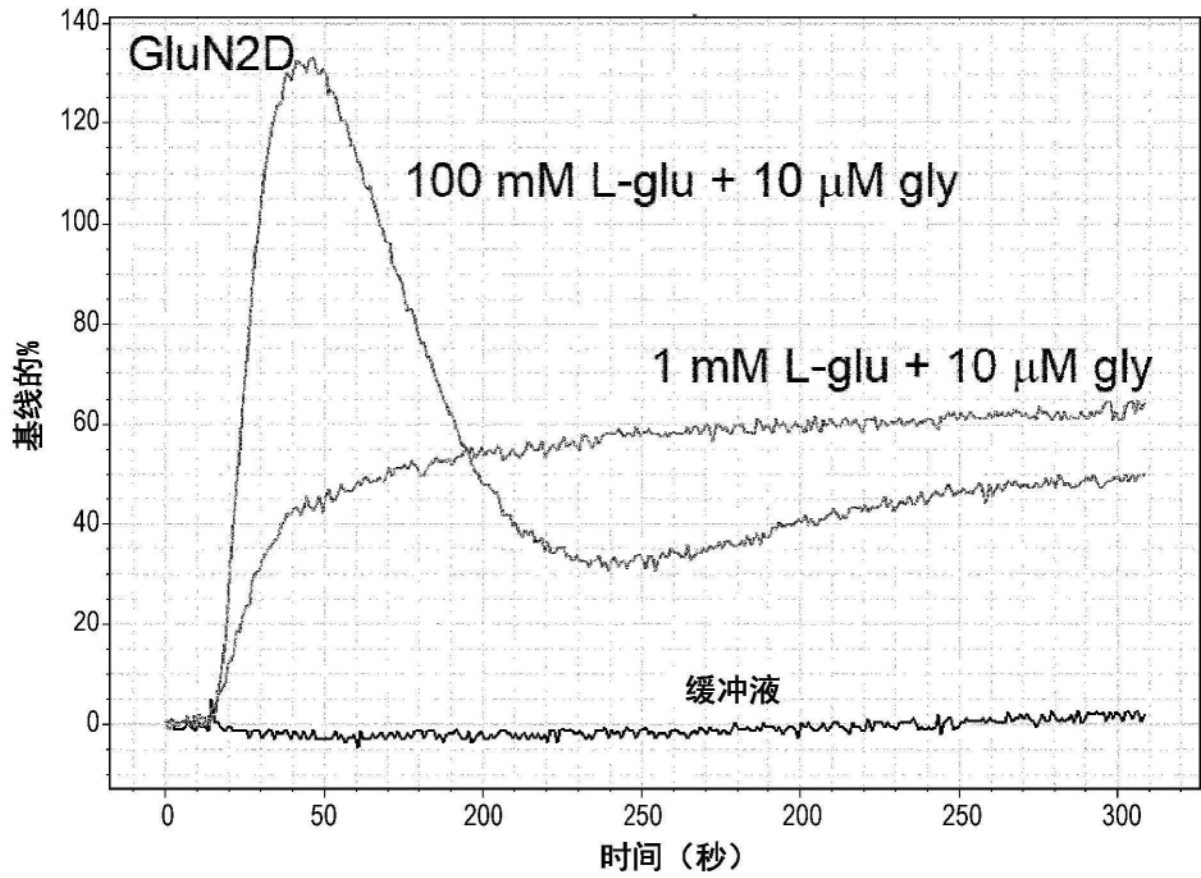


图2D

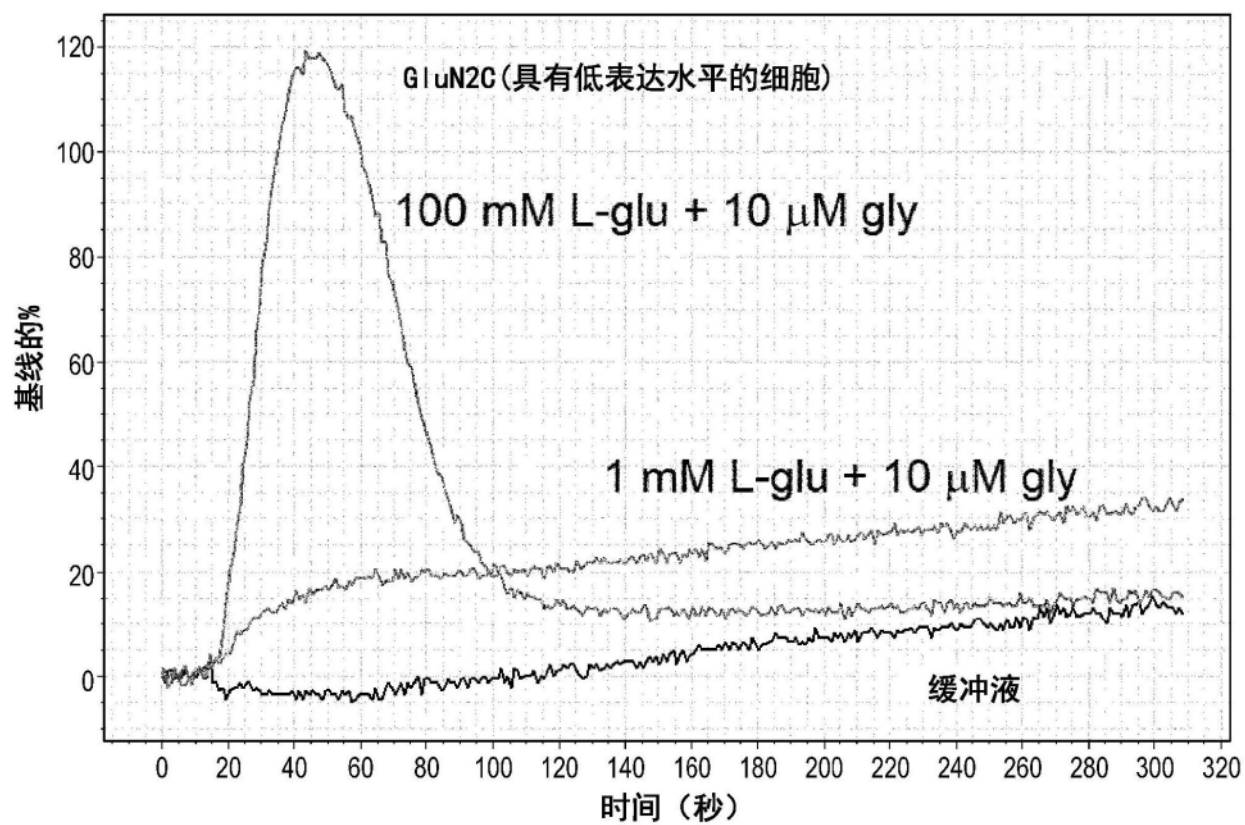


图2E

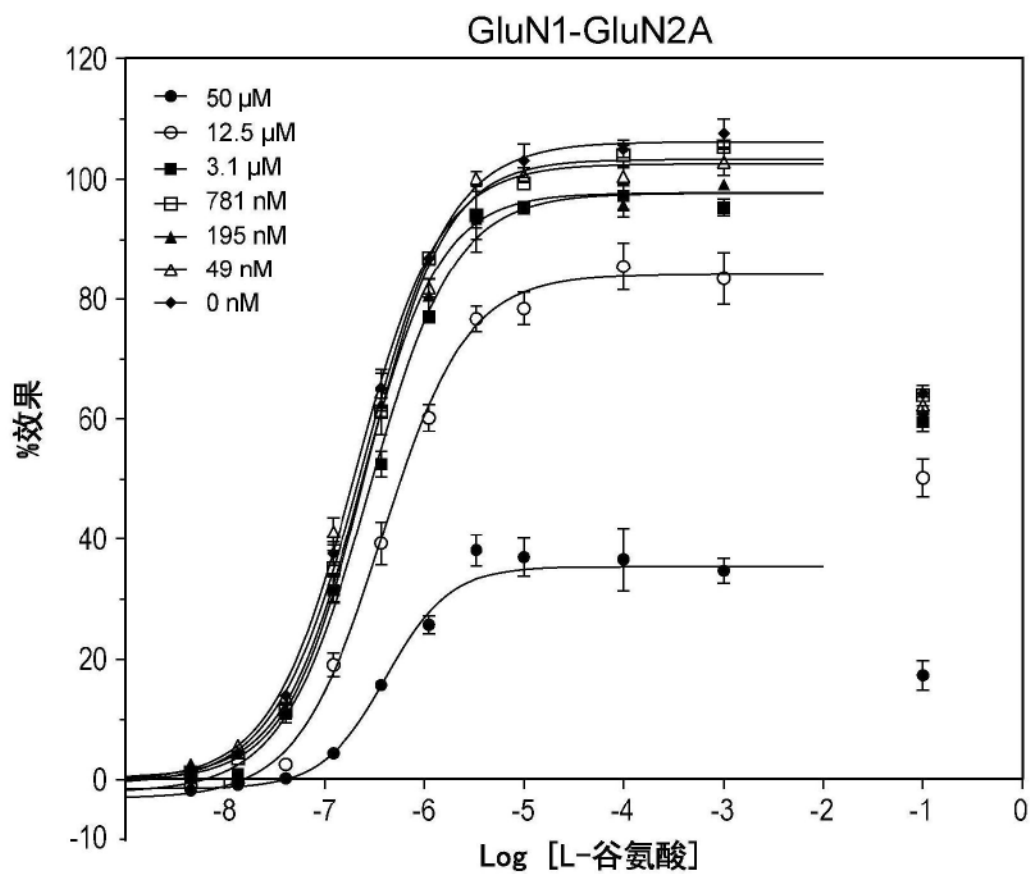


图3A

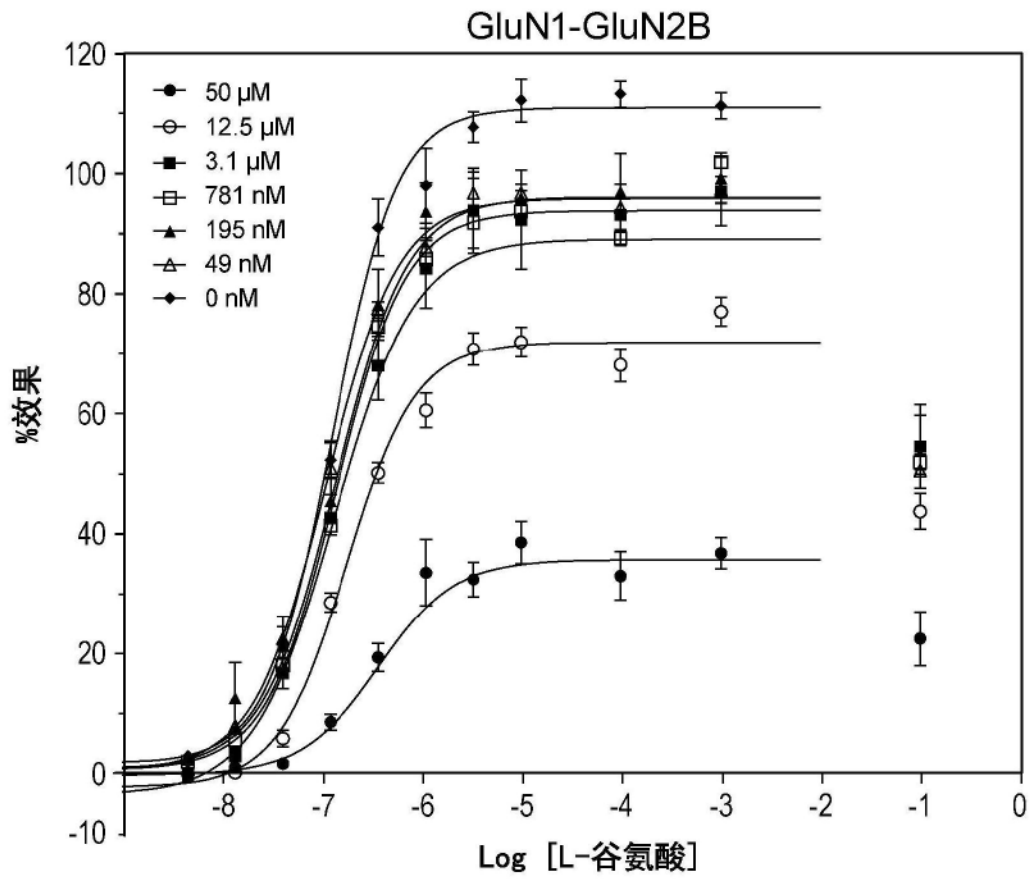


图3B

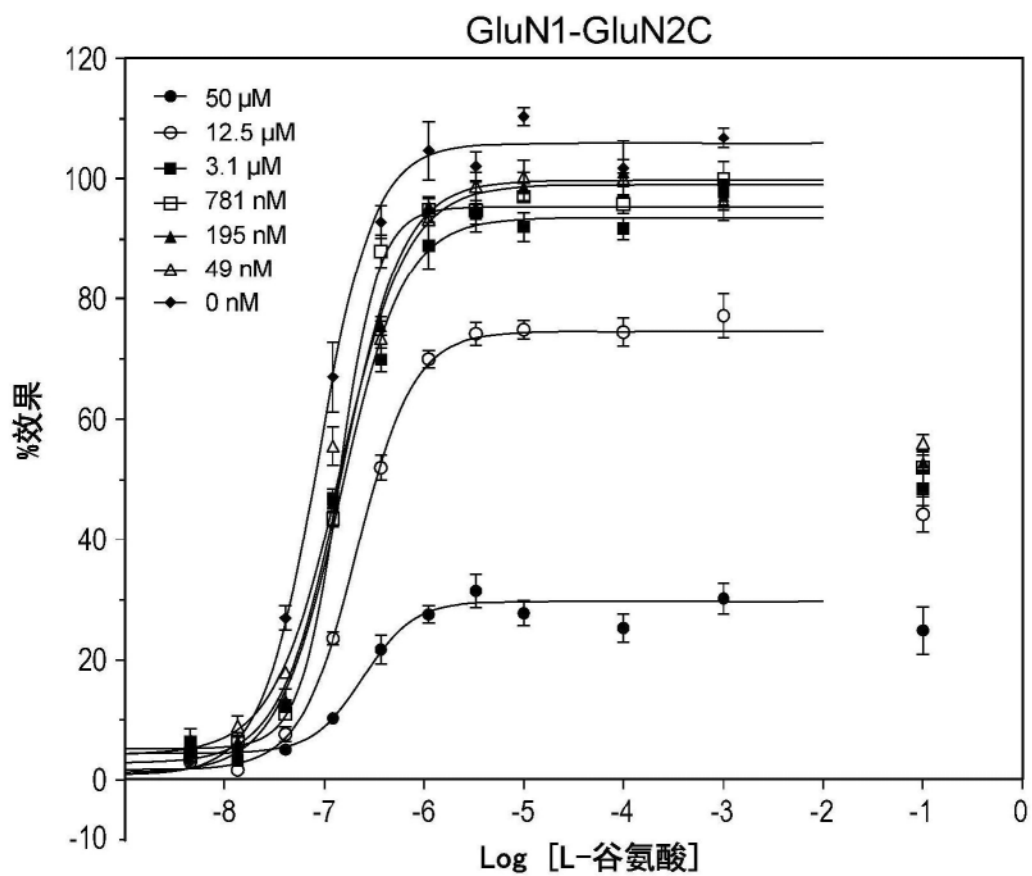


图3C

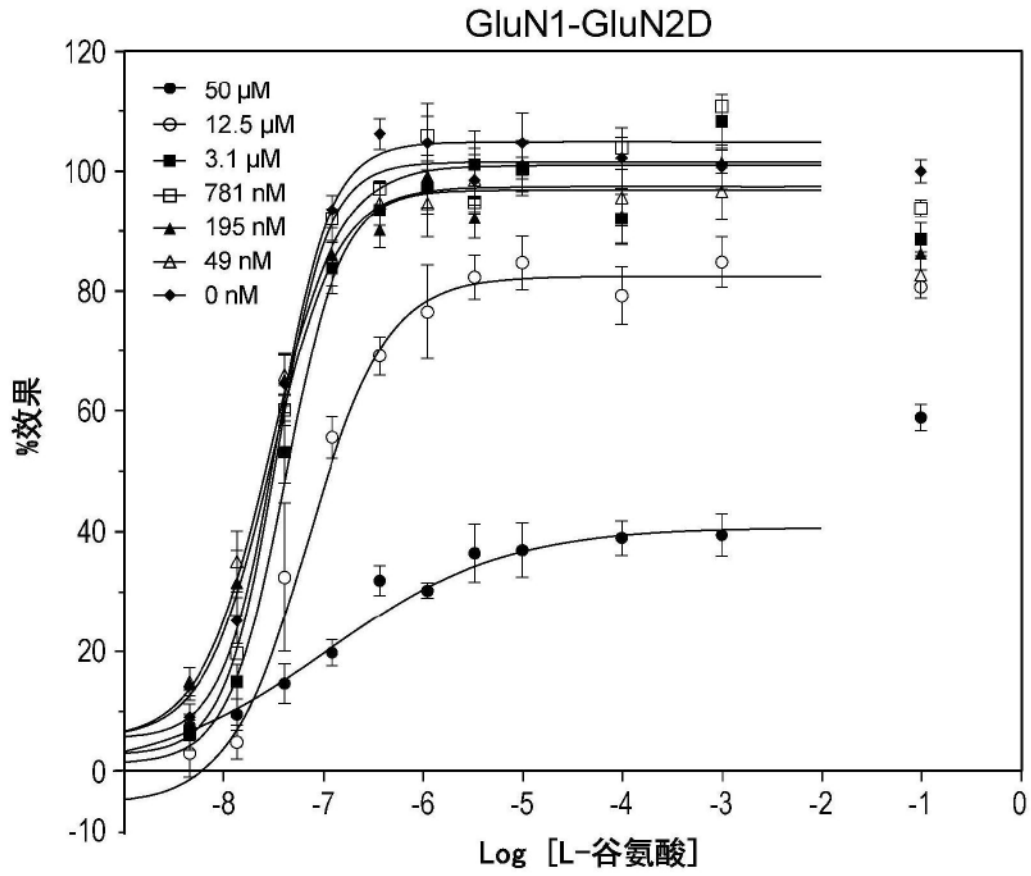


图3D

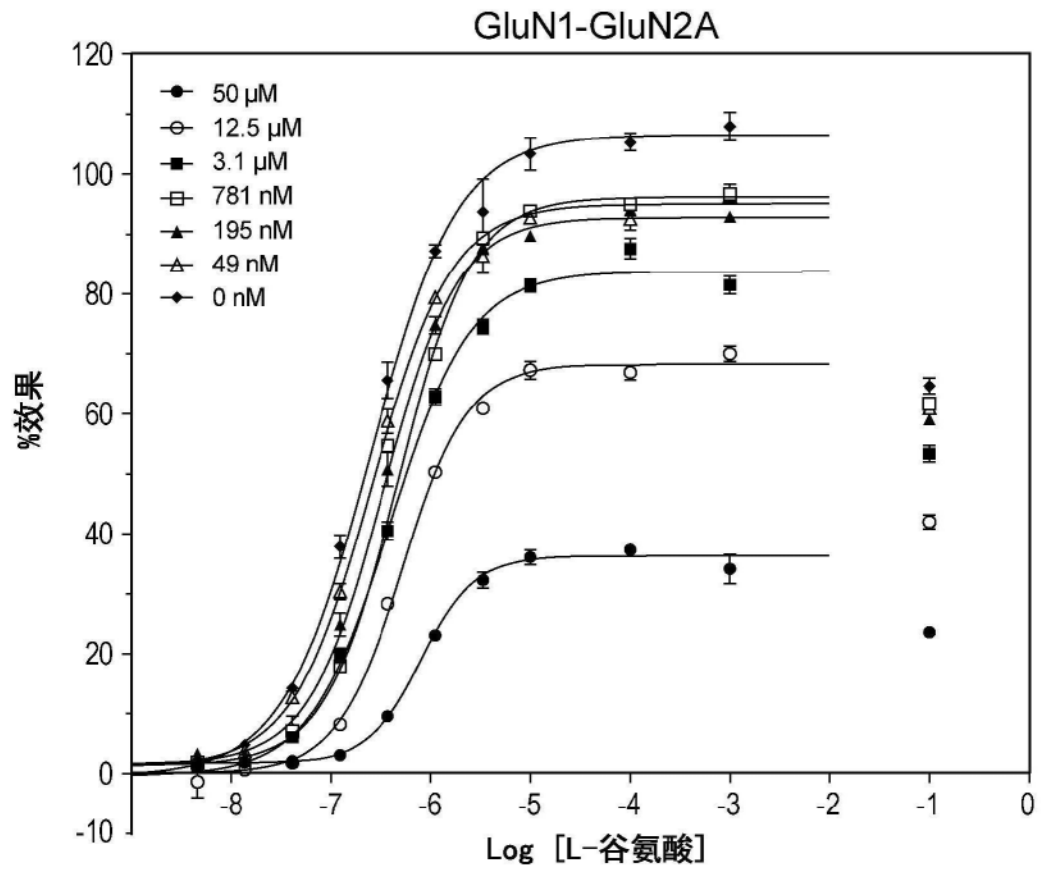


图4A

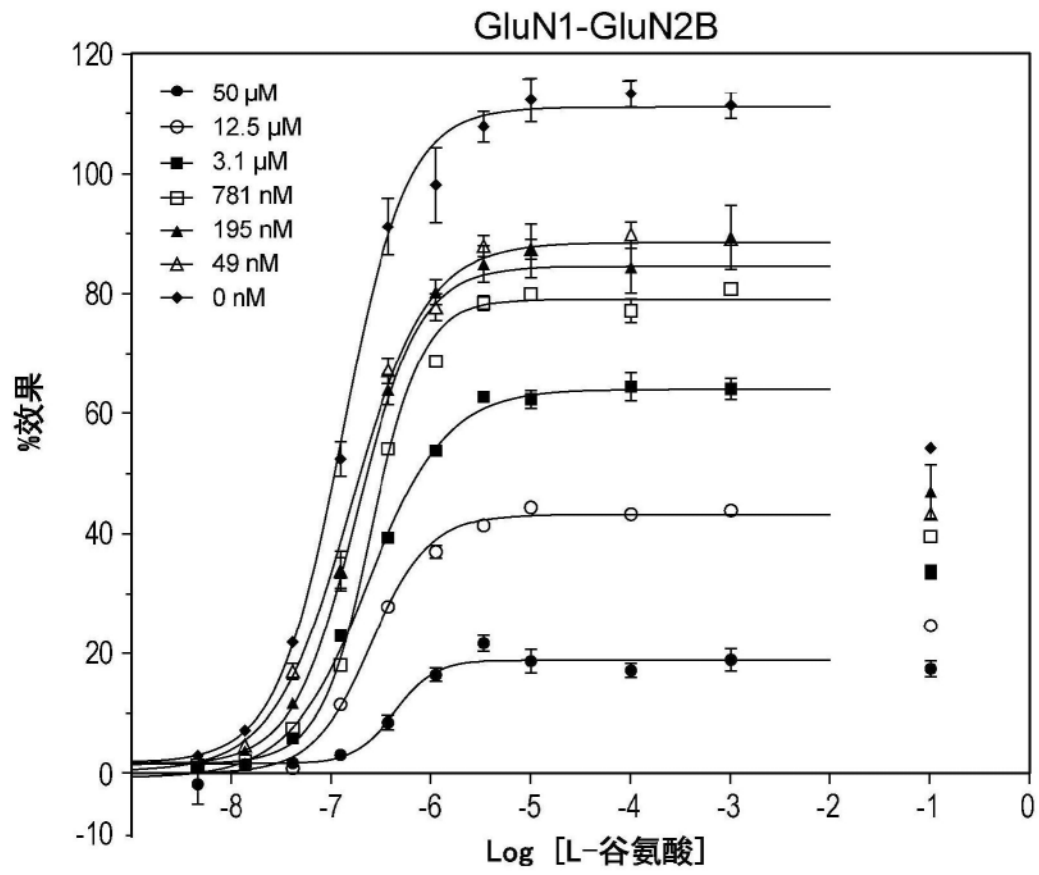


图4B

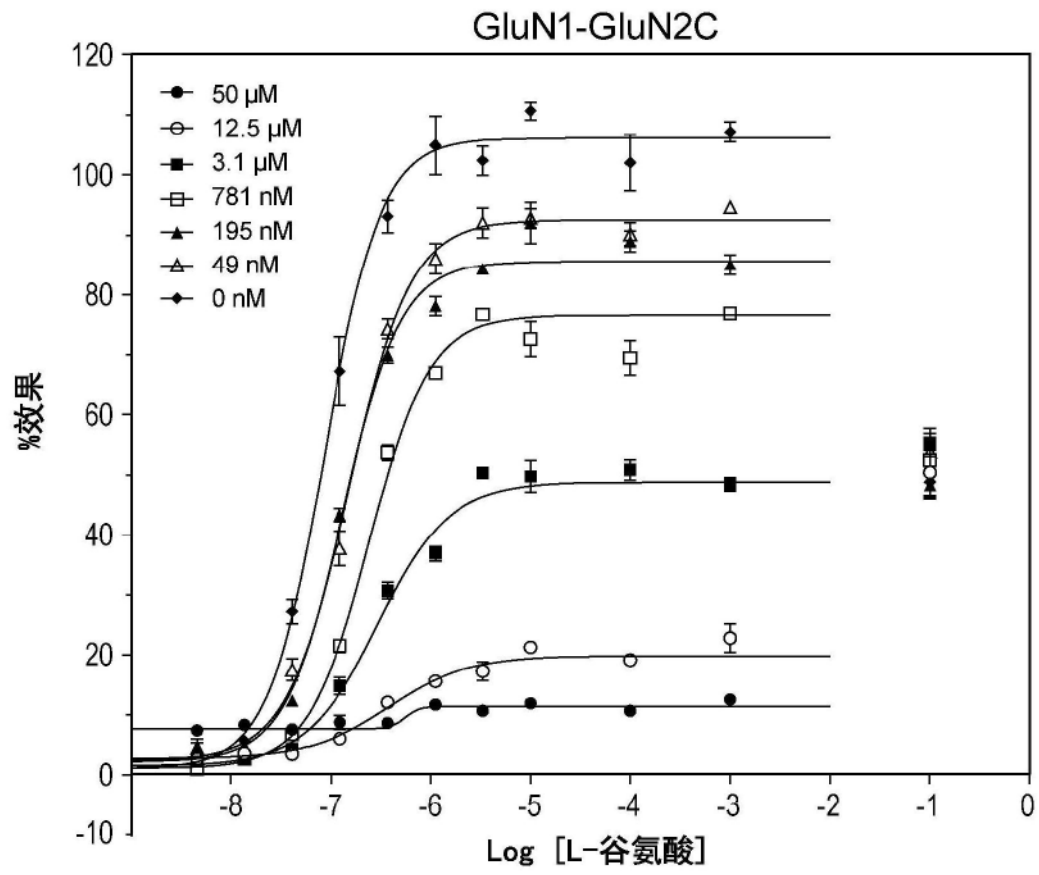


图4C

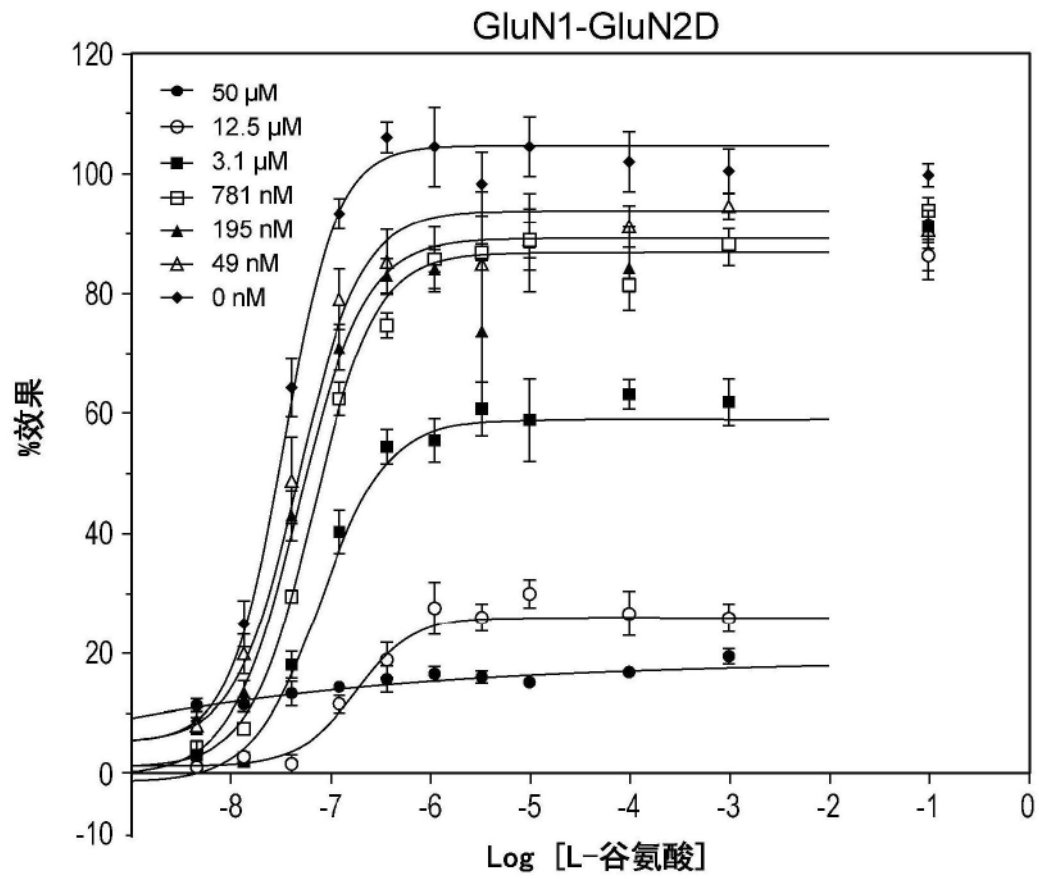


图4D

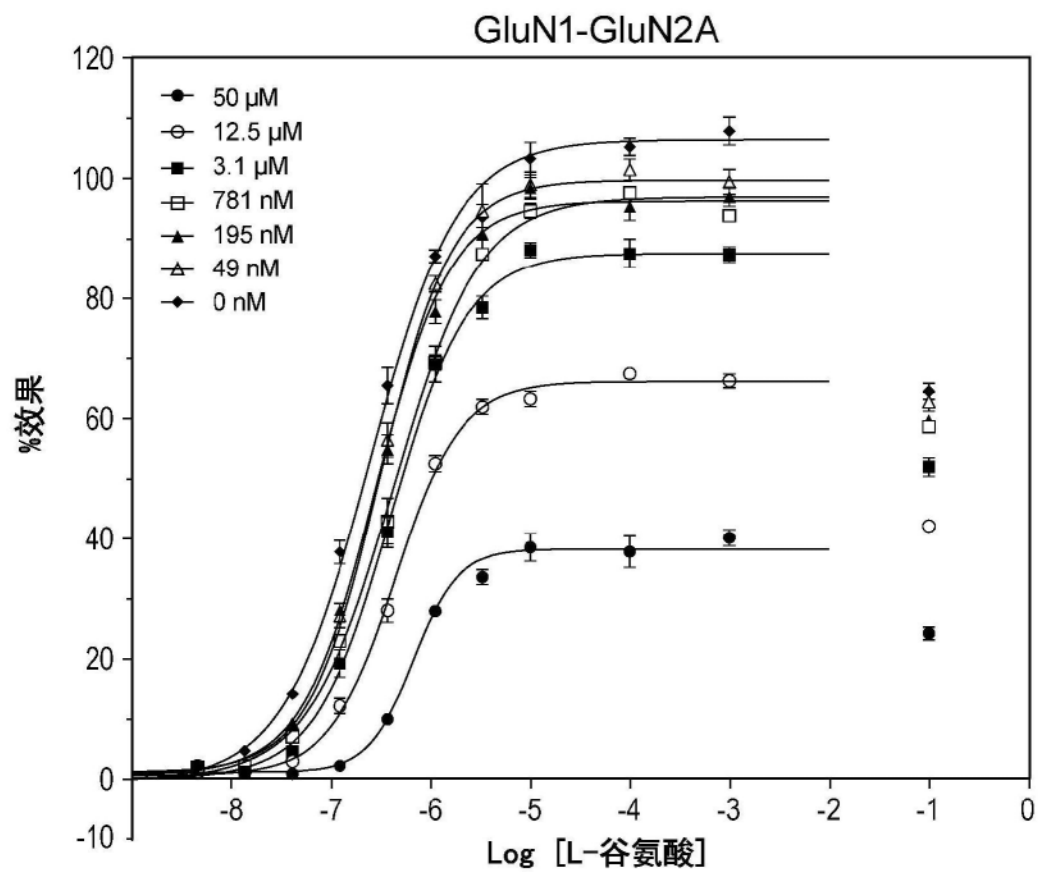


图5A

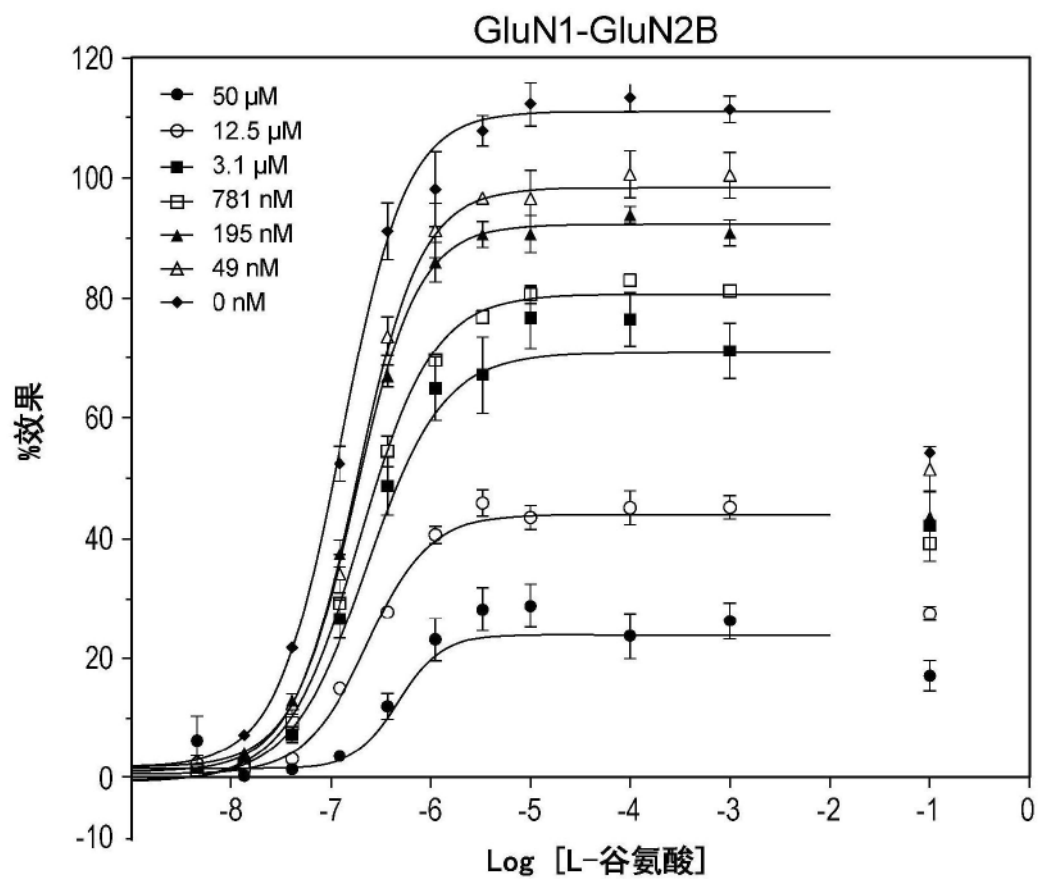


图5B

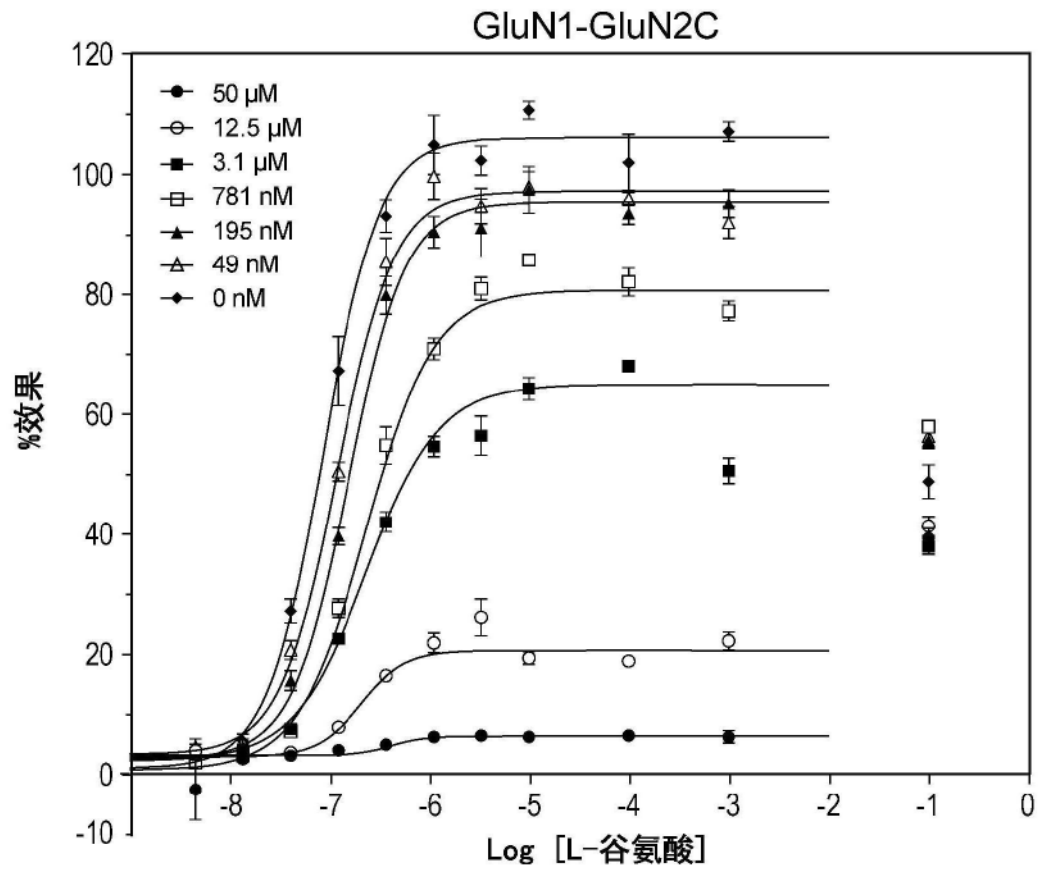


图5C

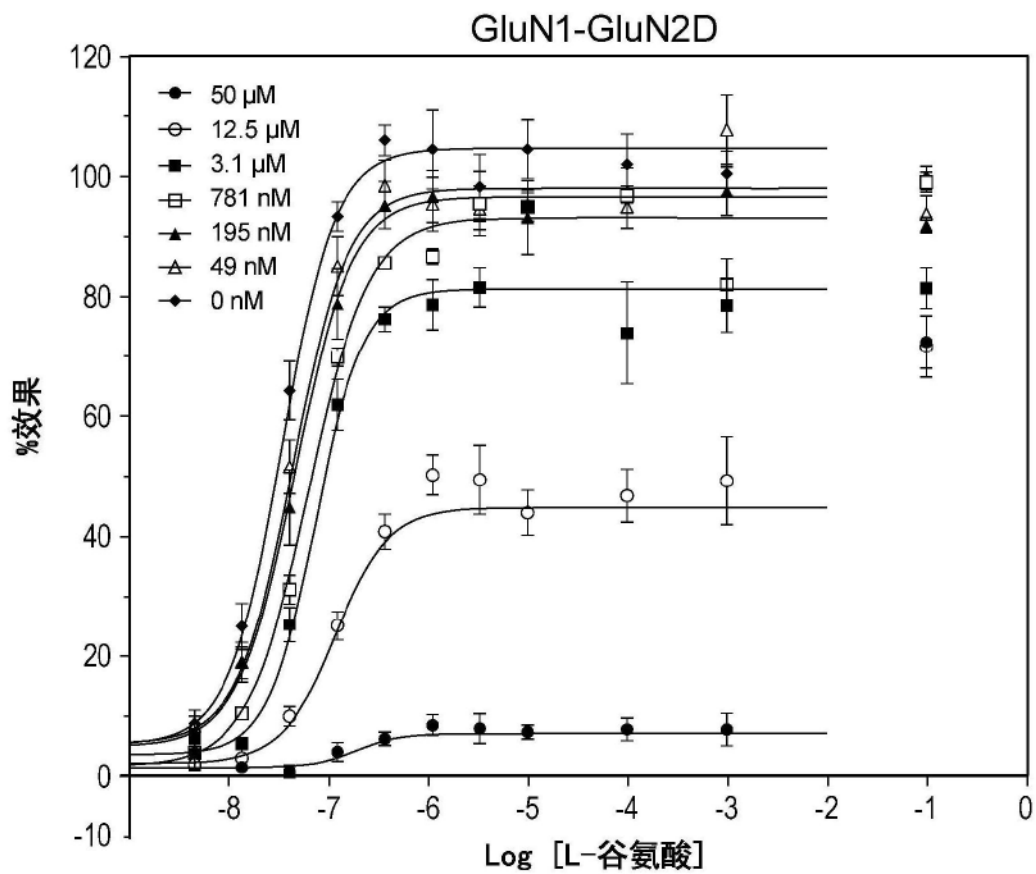


图5D

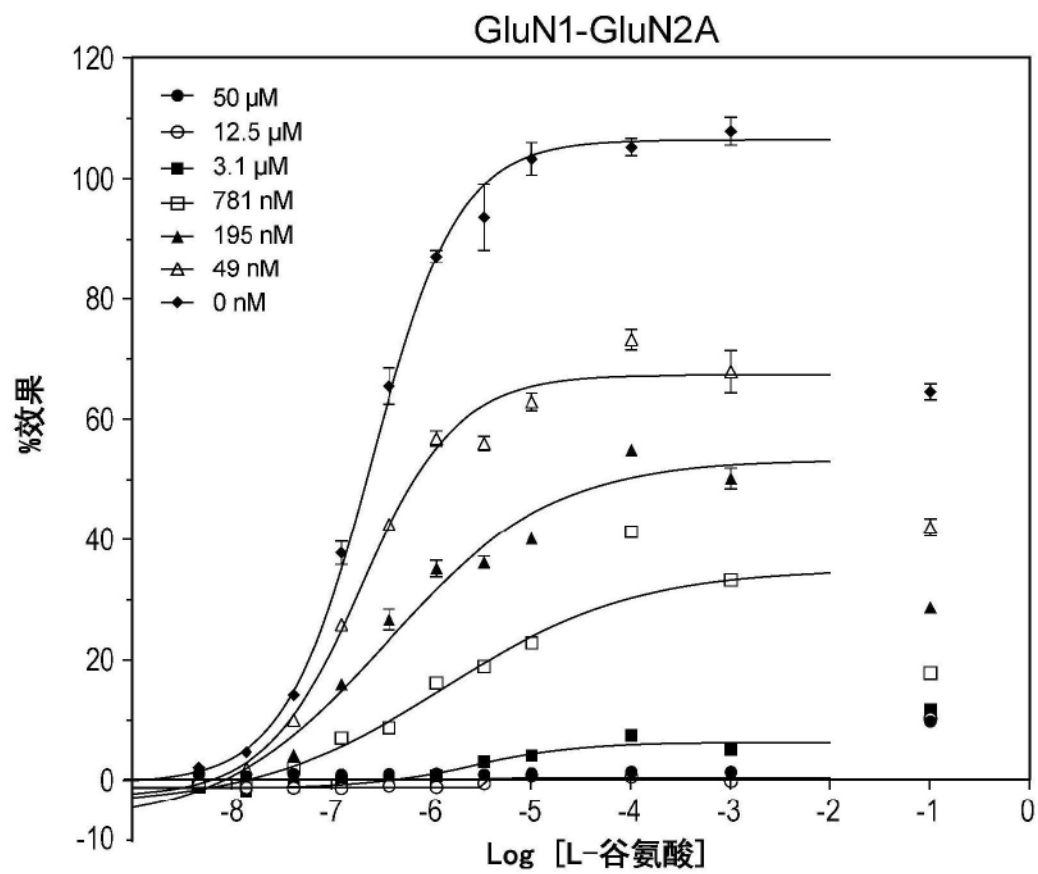


图6A

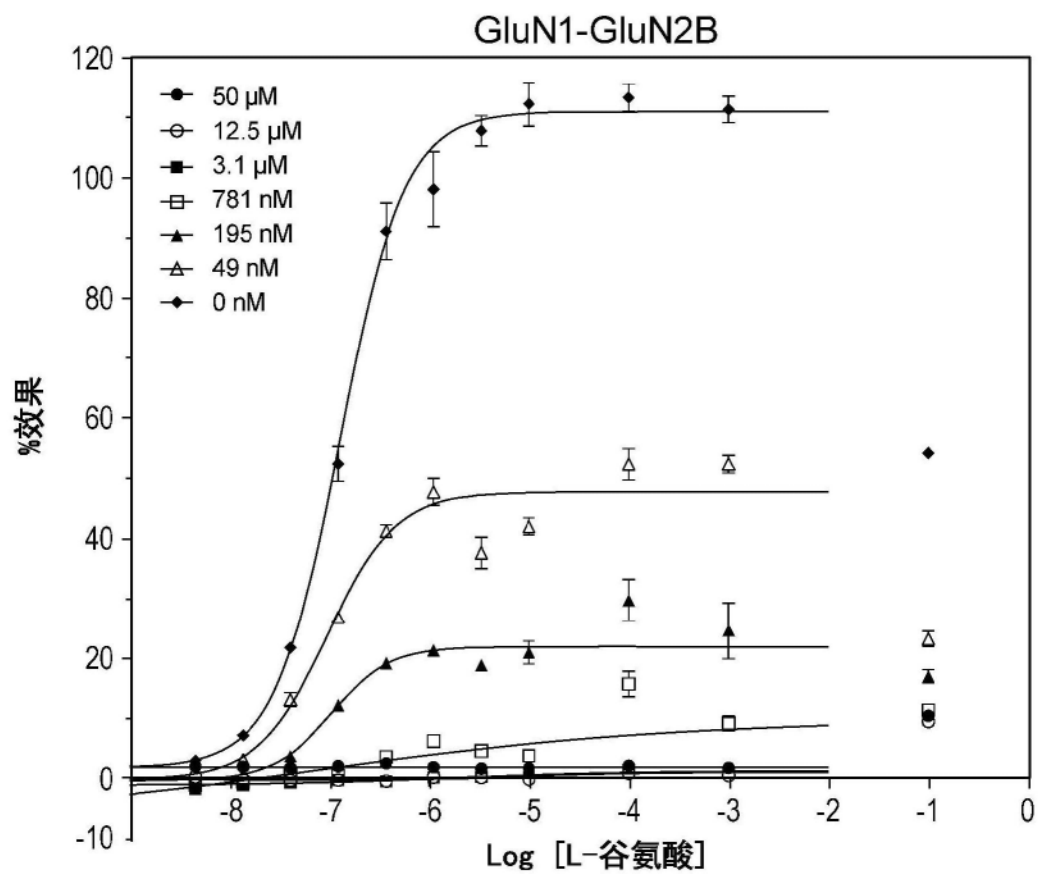


图6B

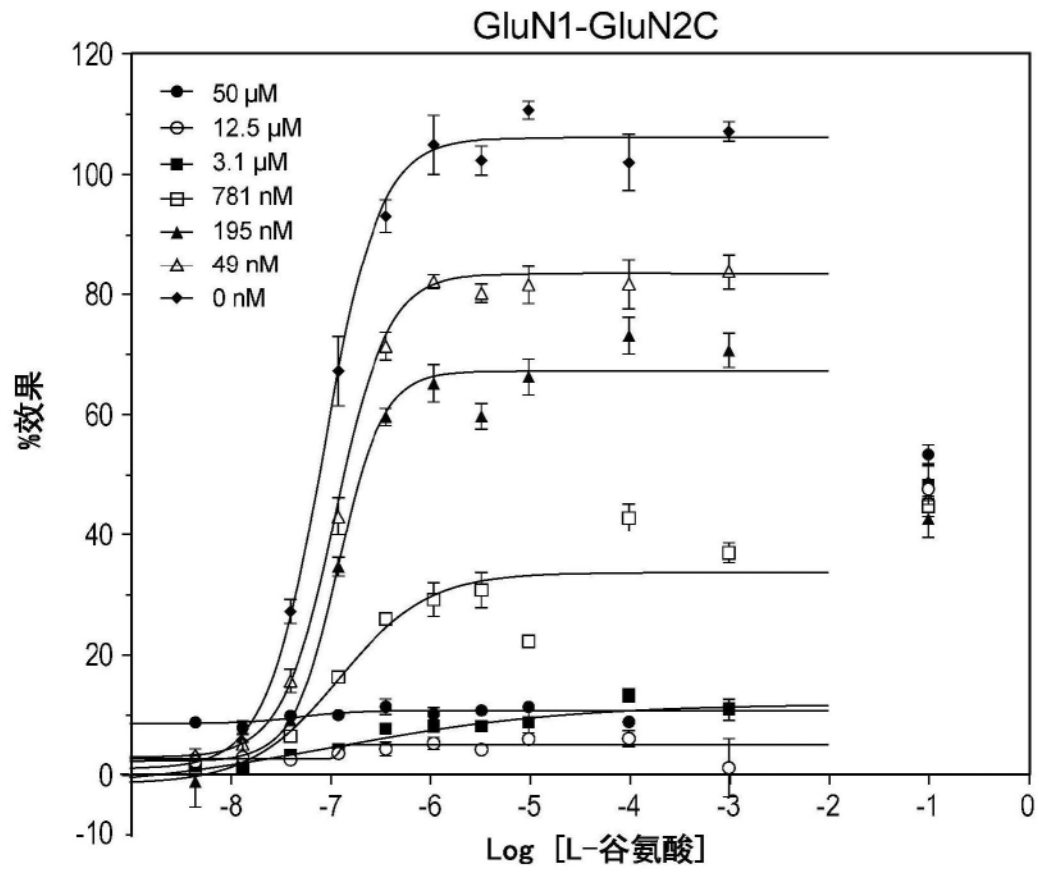


图6C

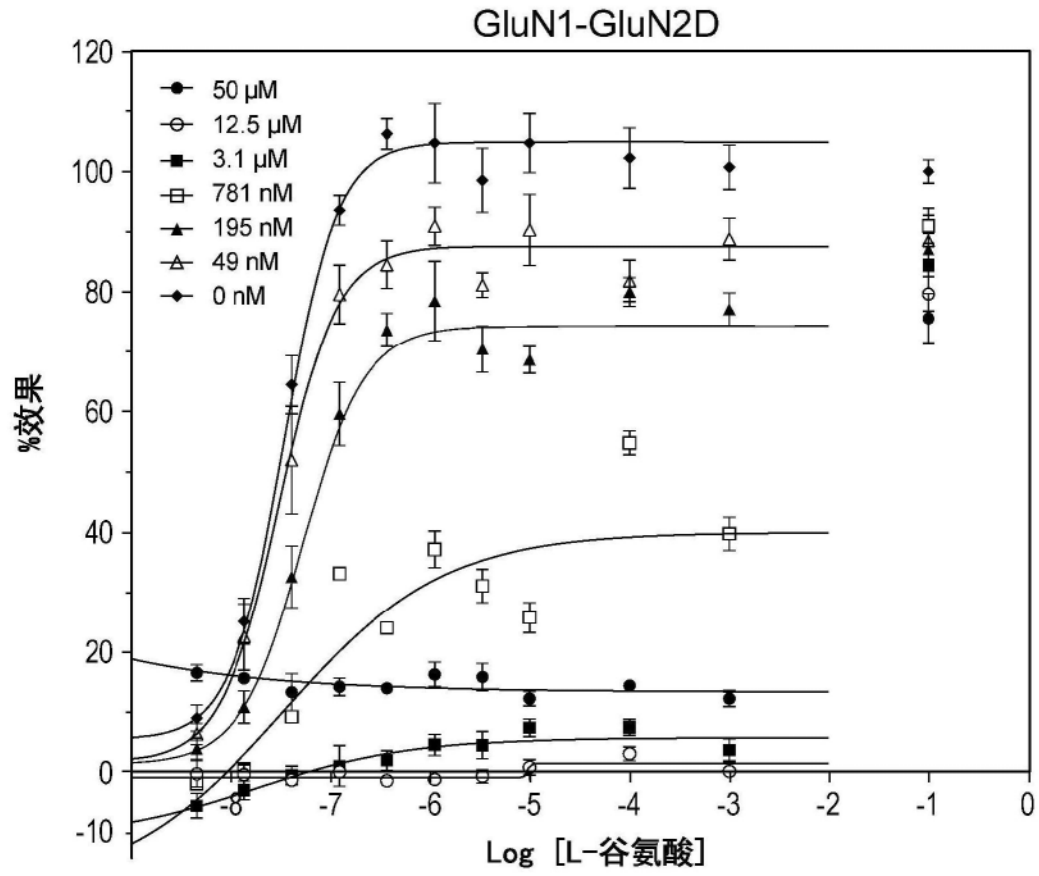


图6D

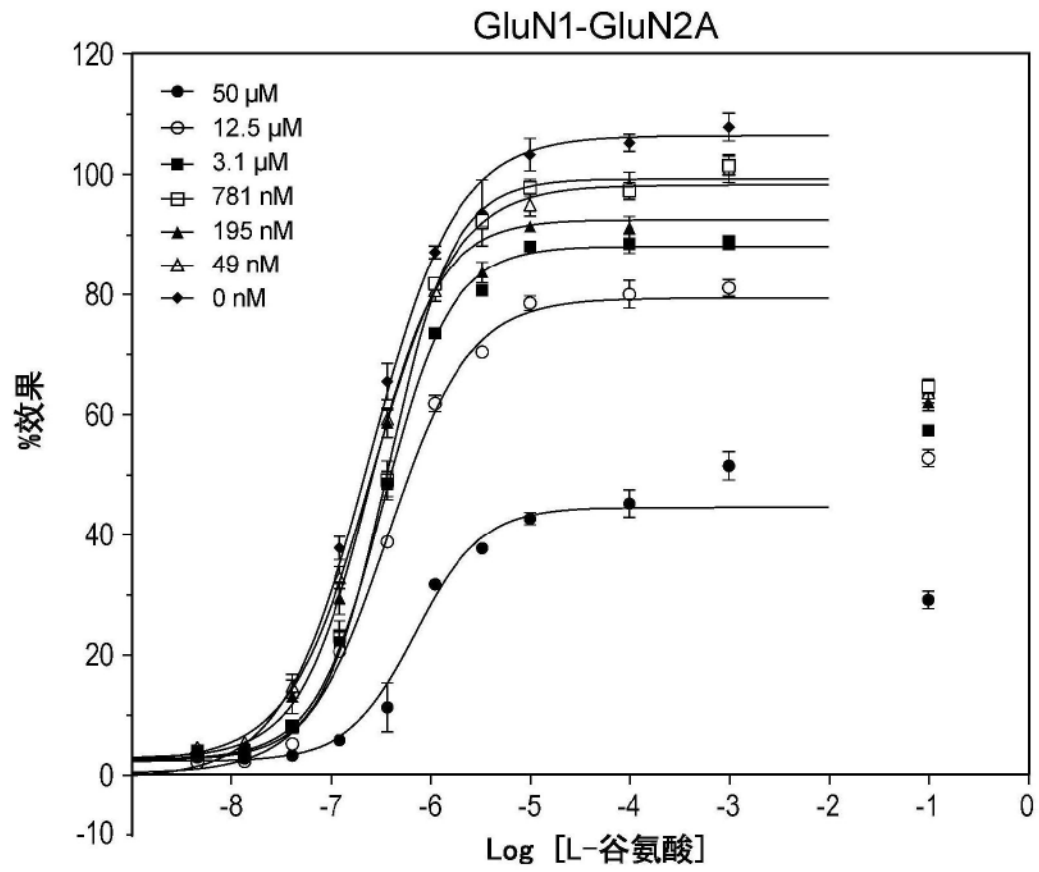


图7A

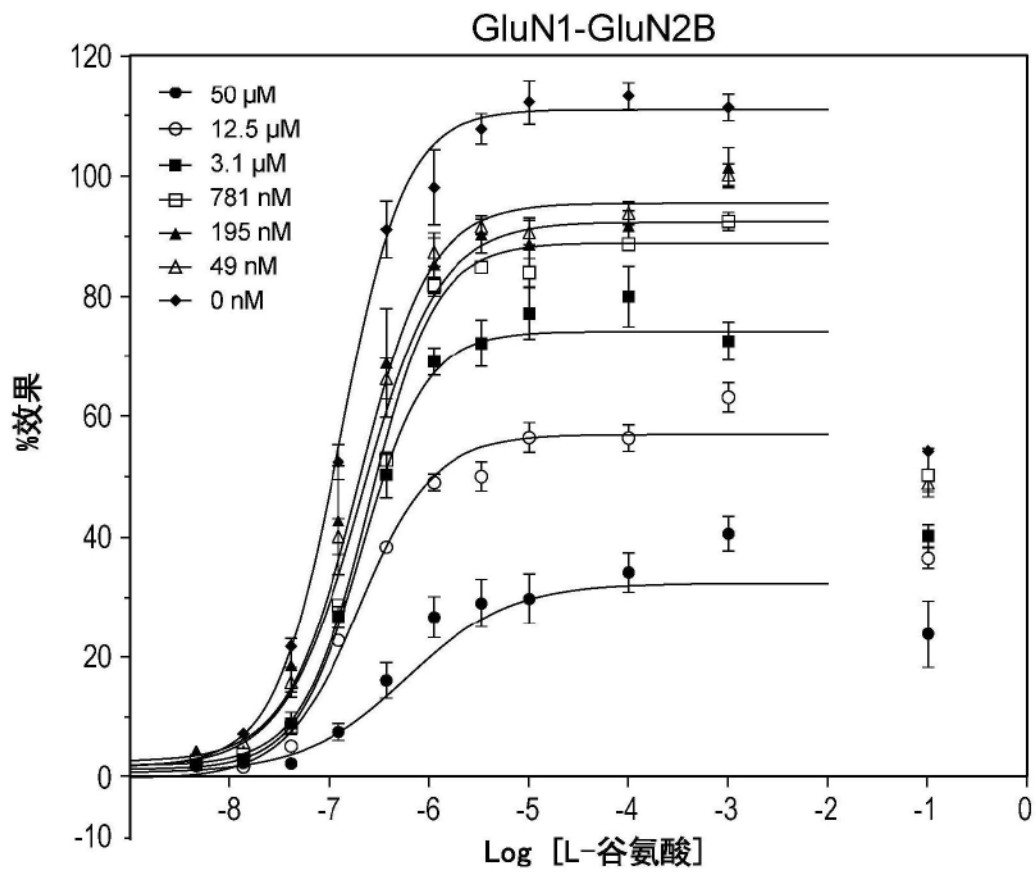


图7B

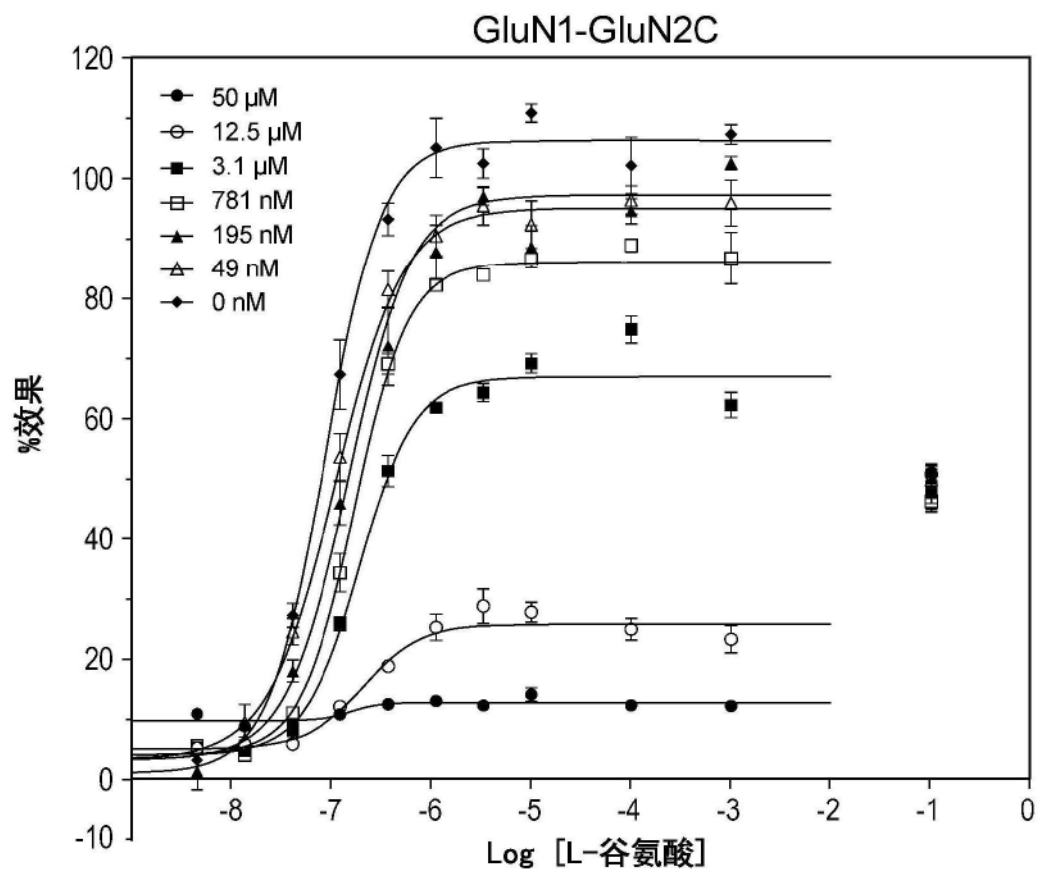


图7C

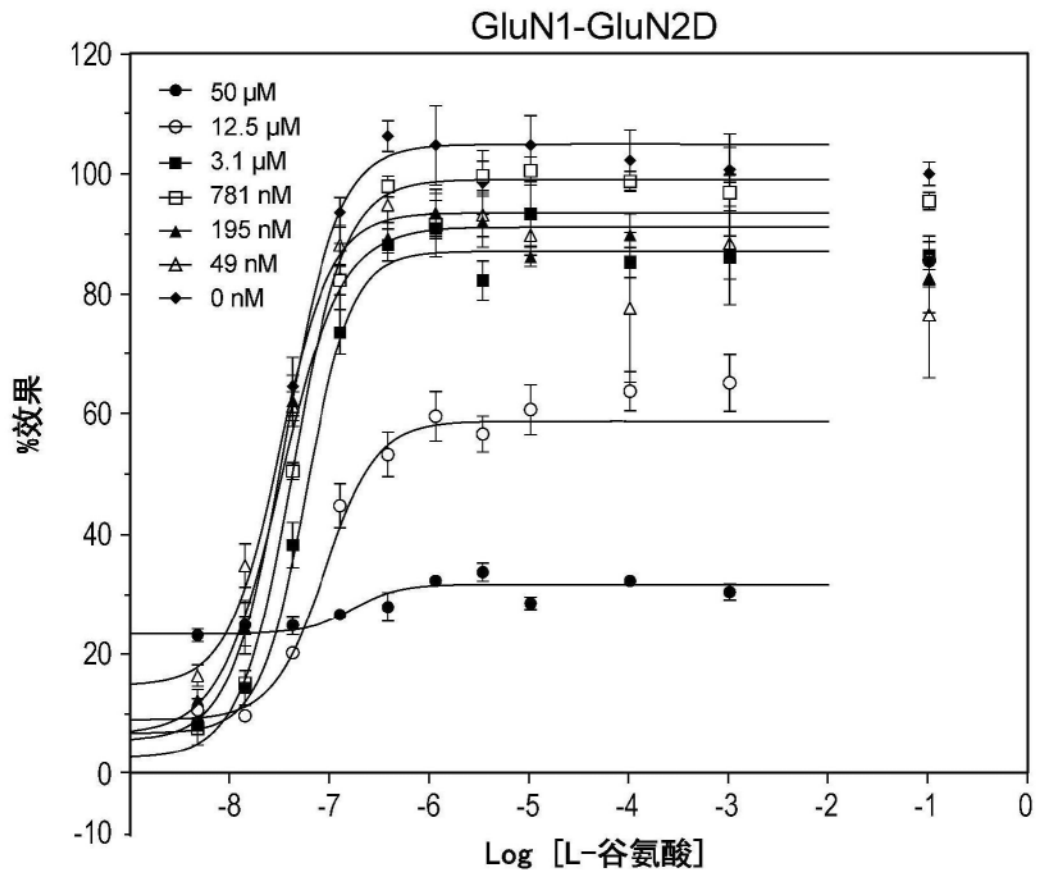


图7D

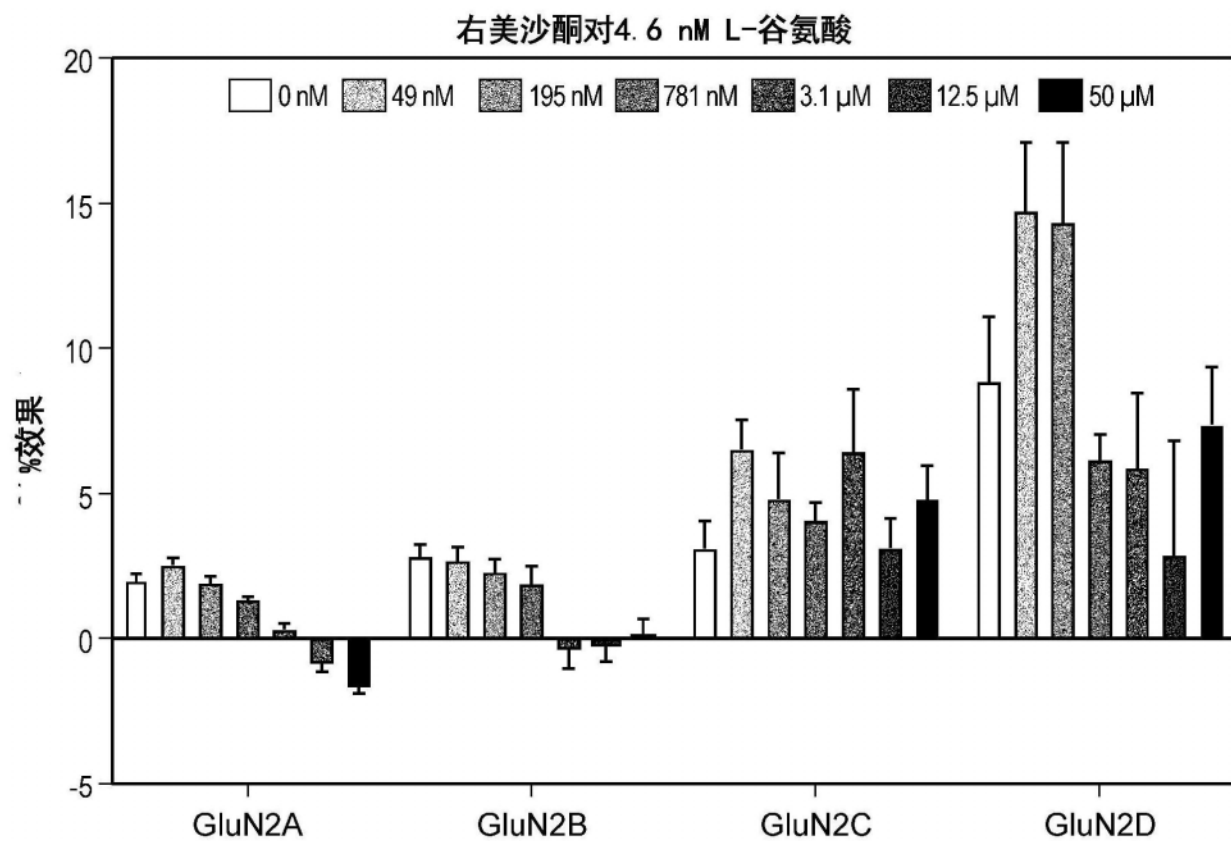


图8A

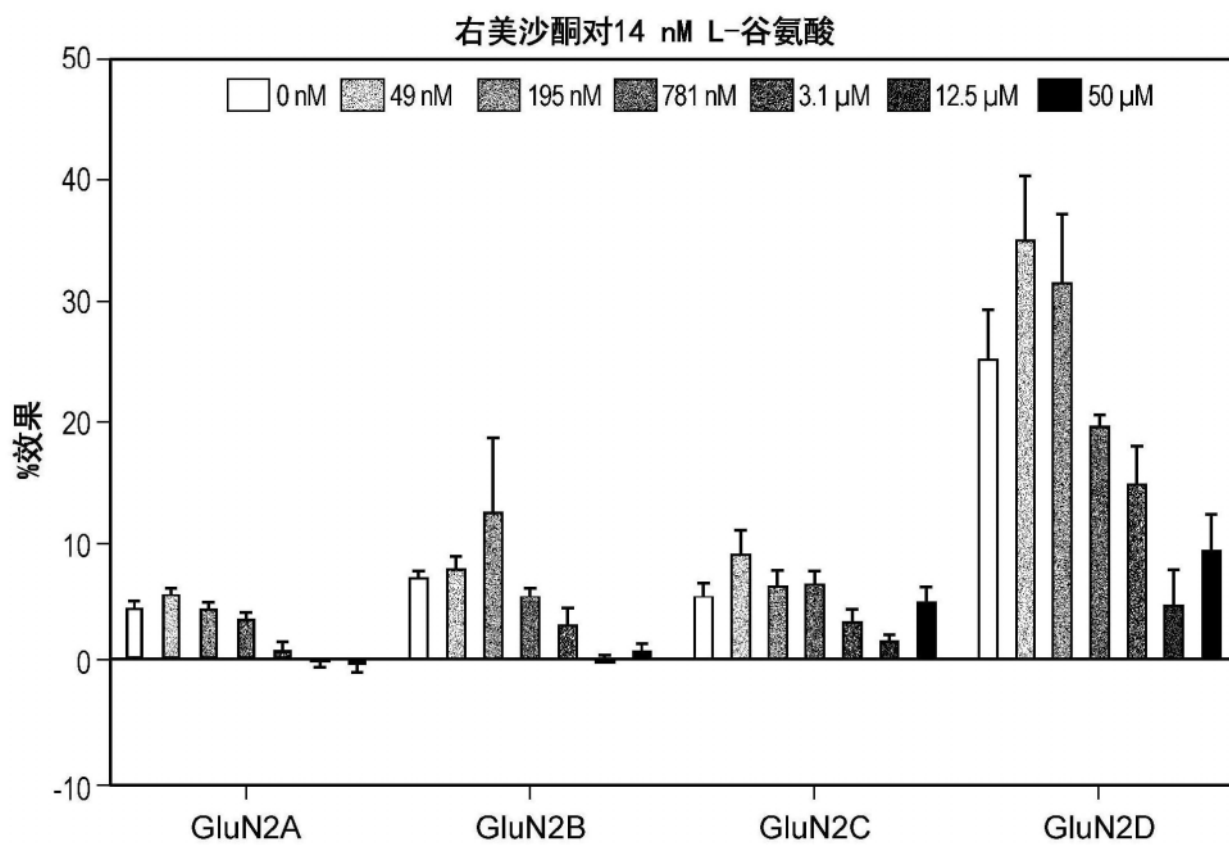


图8B

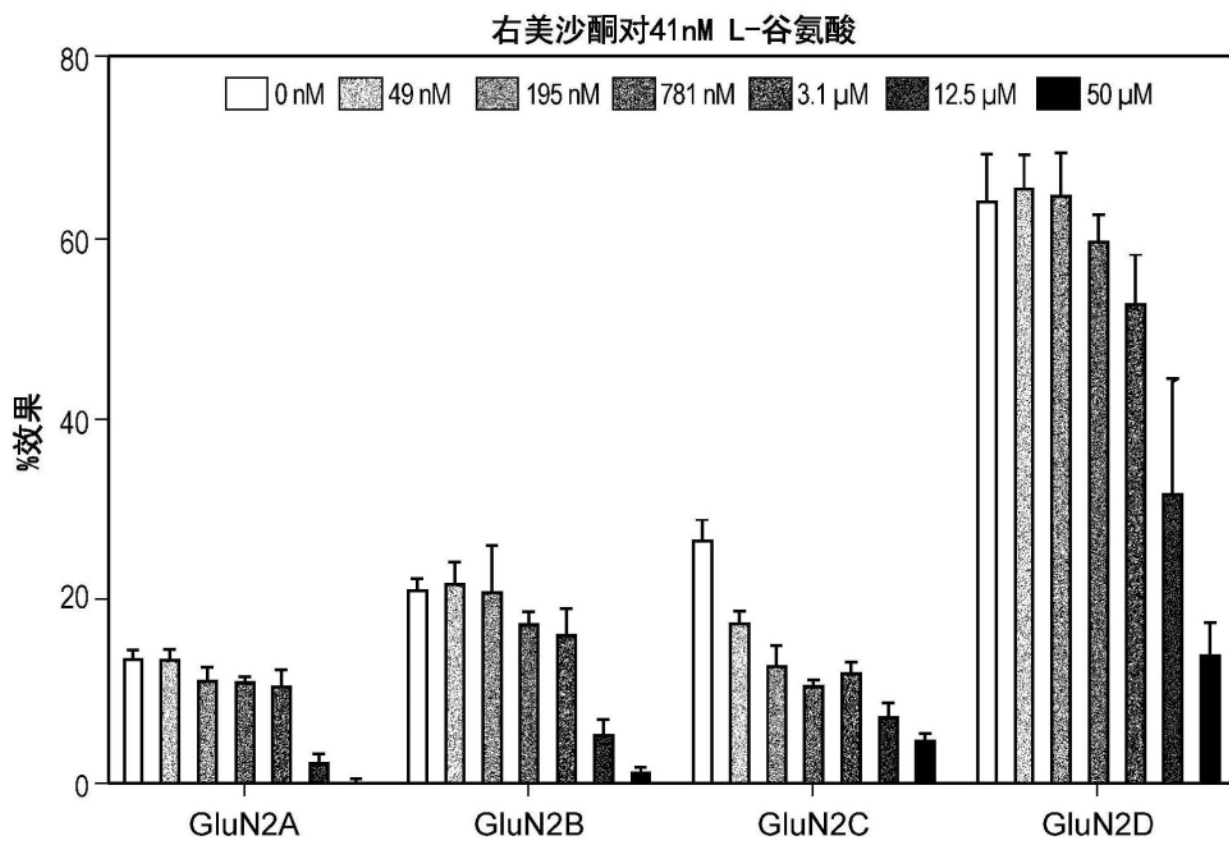


图8C

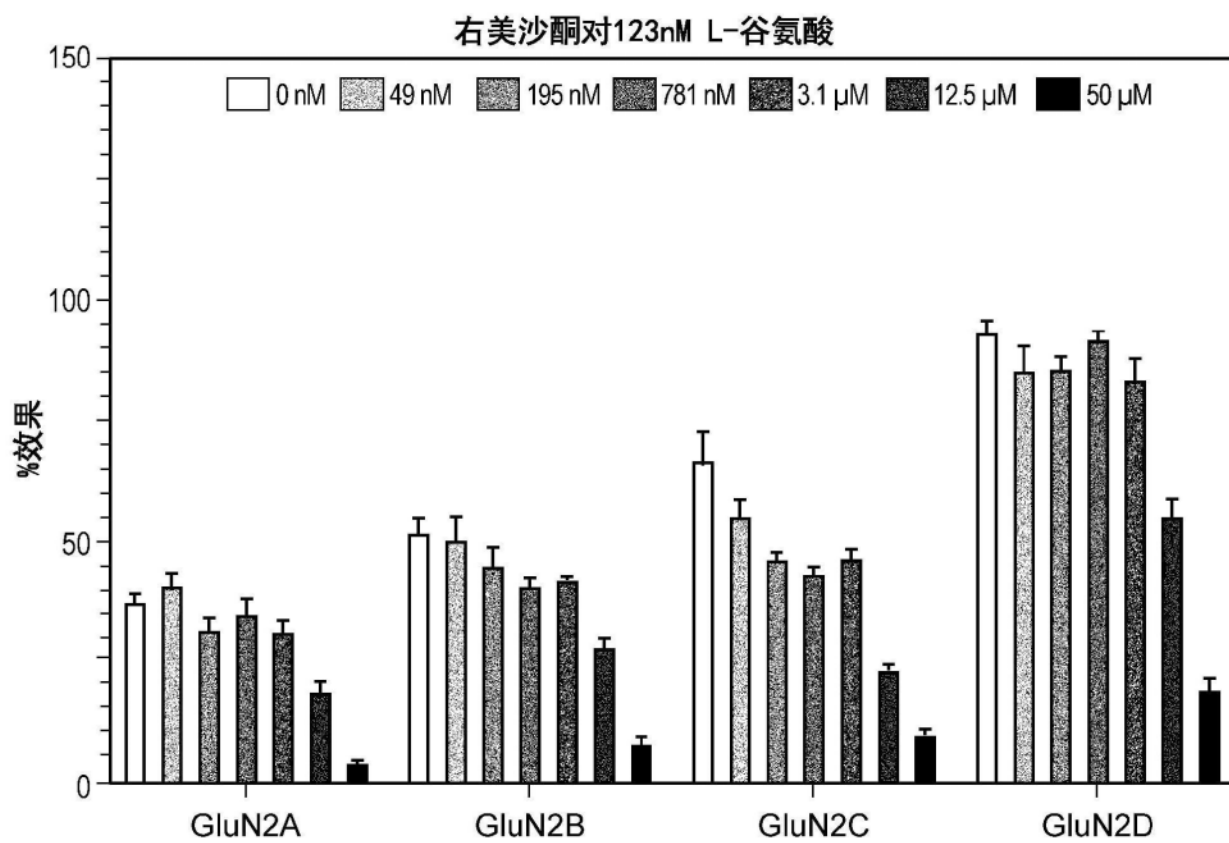


图8D

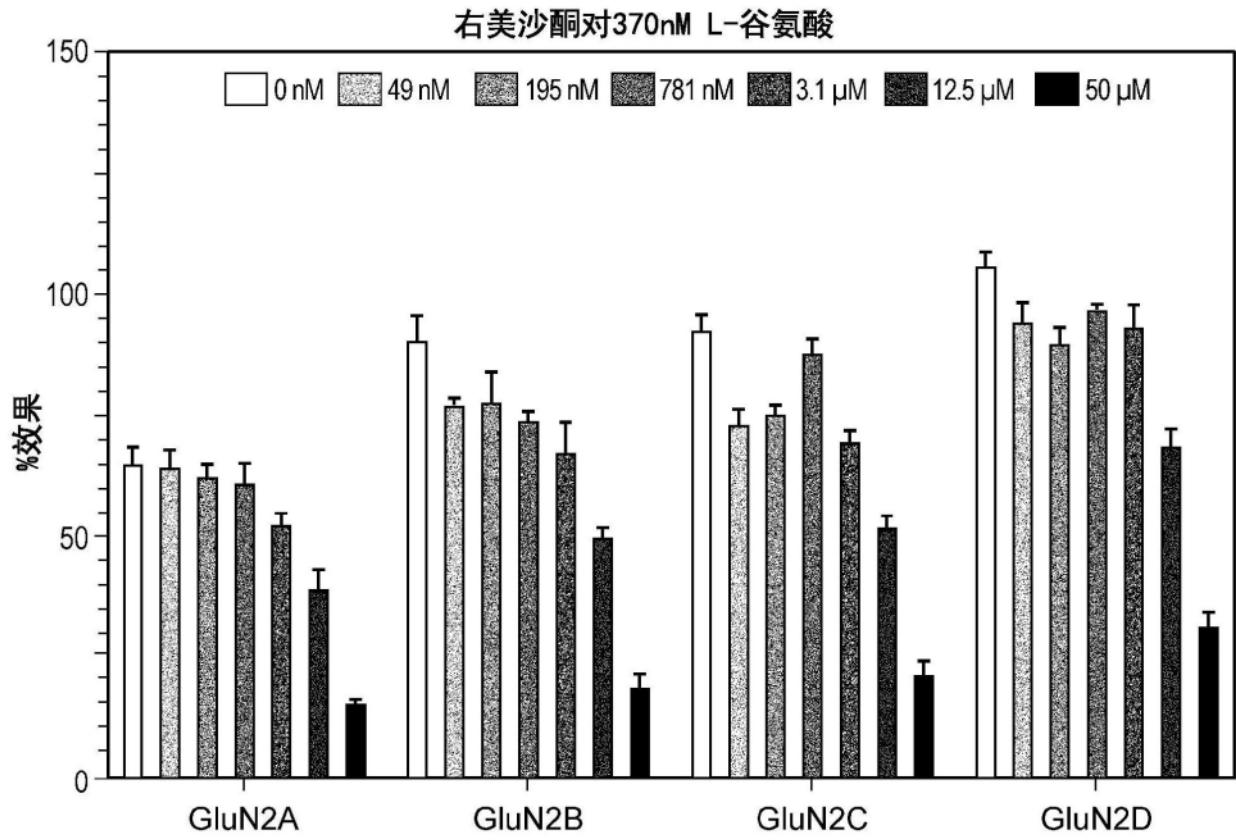


图8E

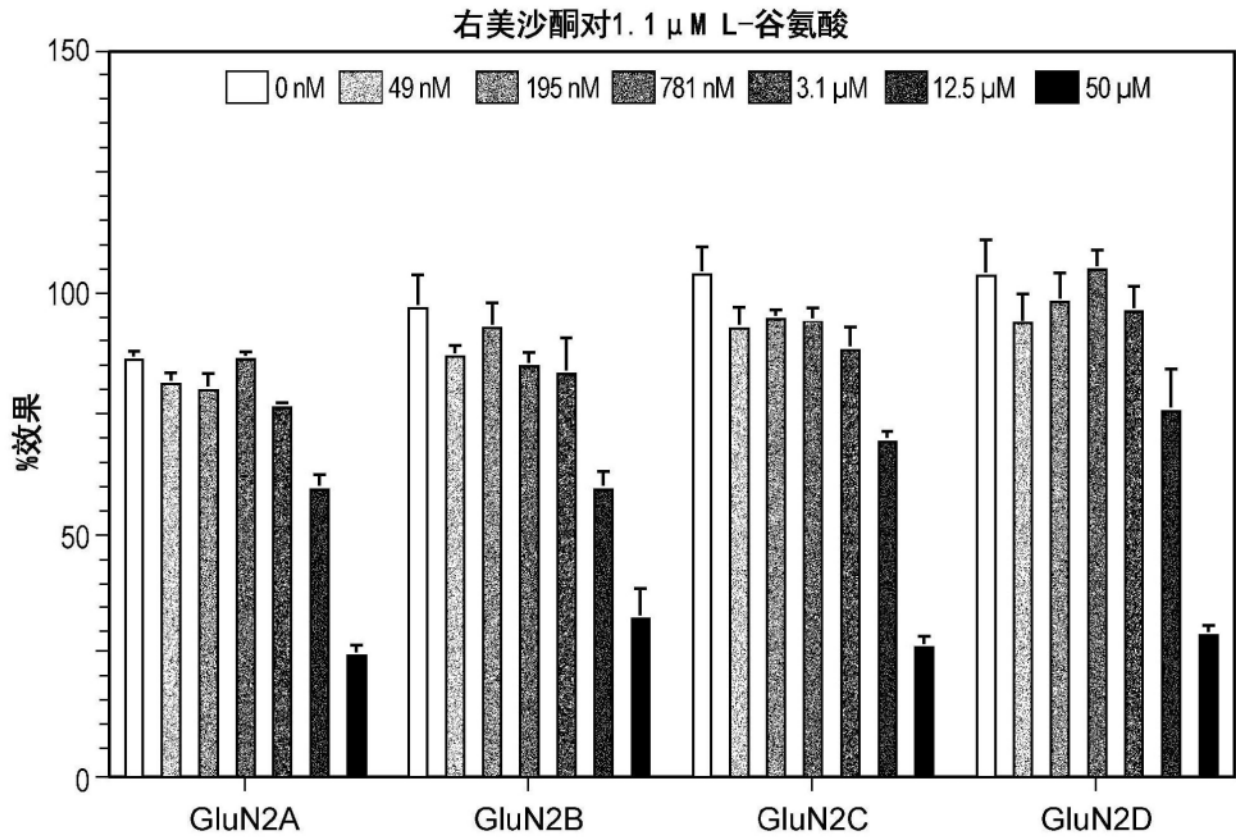


图8F

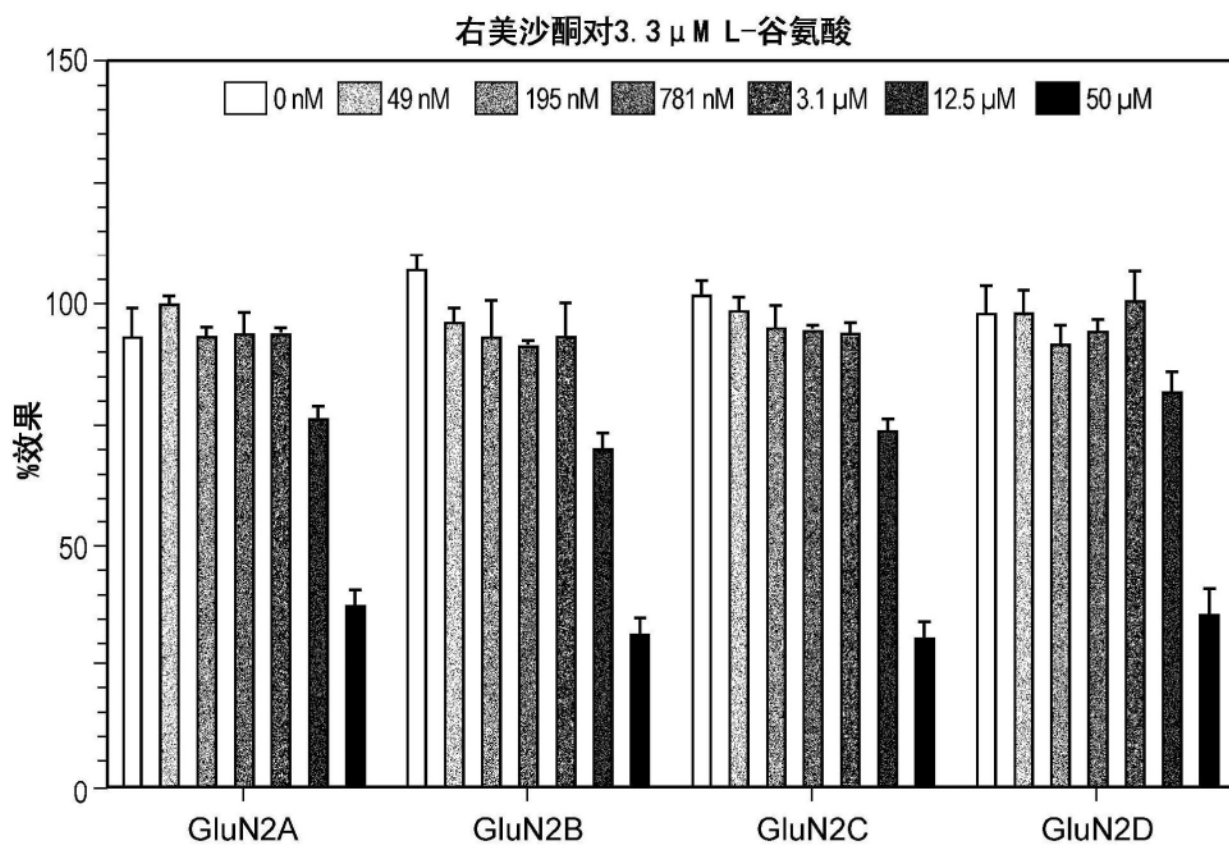


图8G

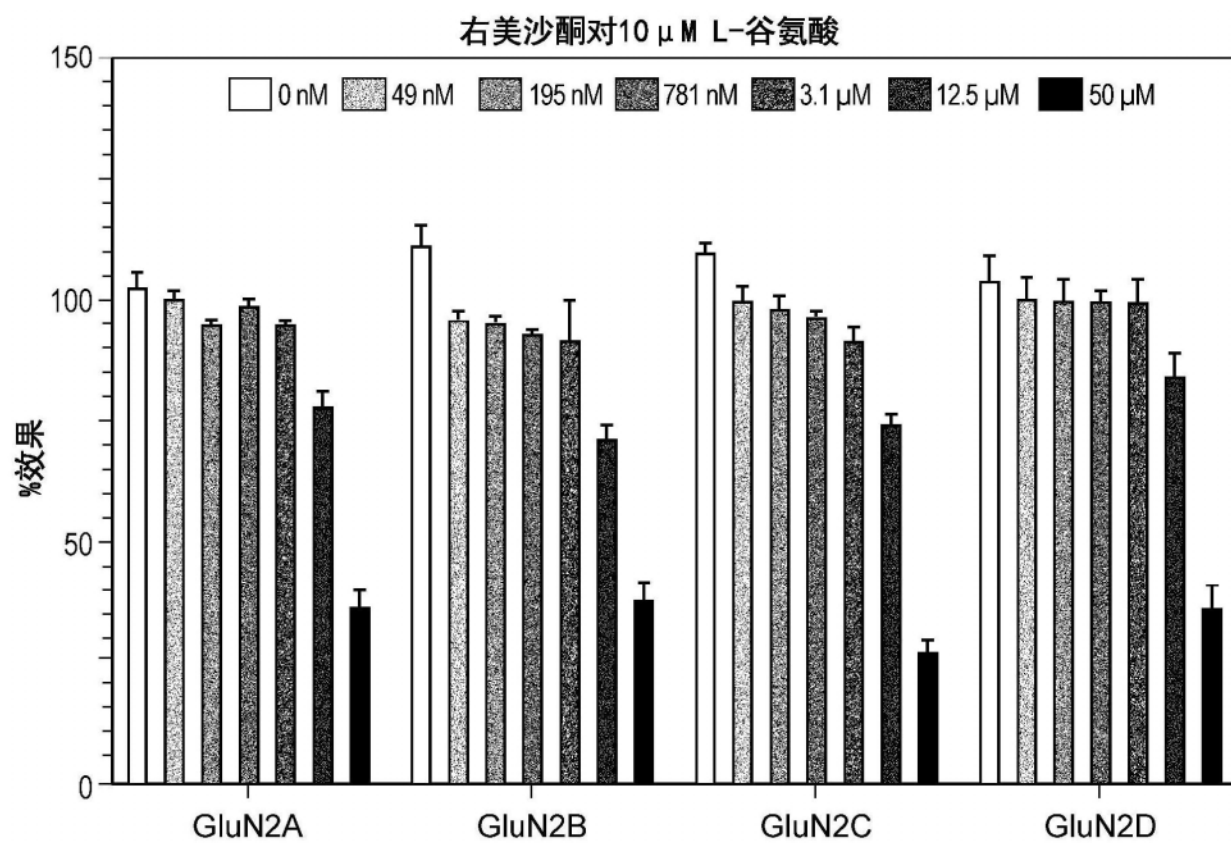


图8H

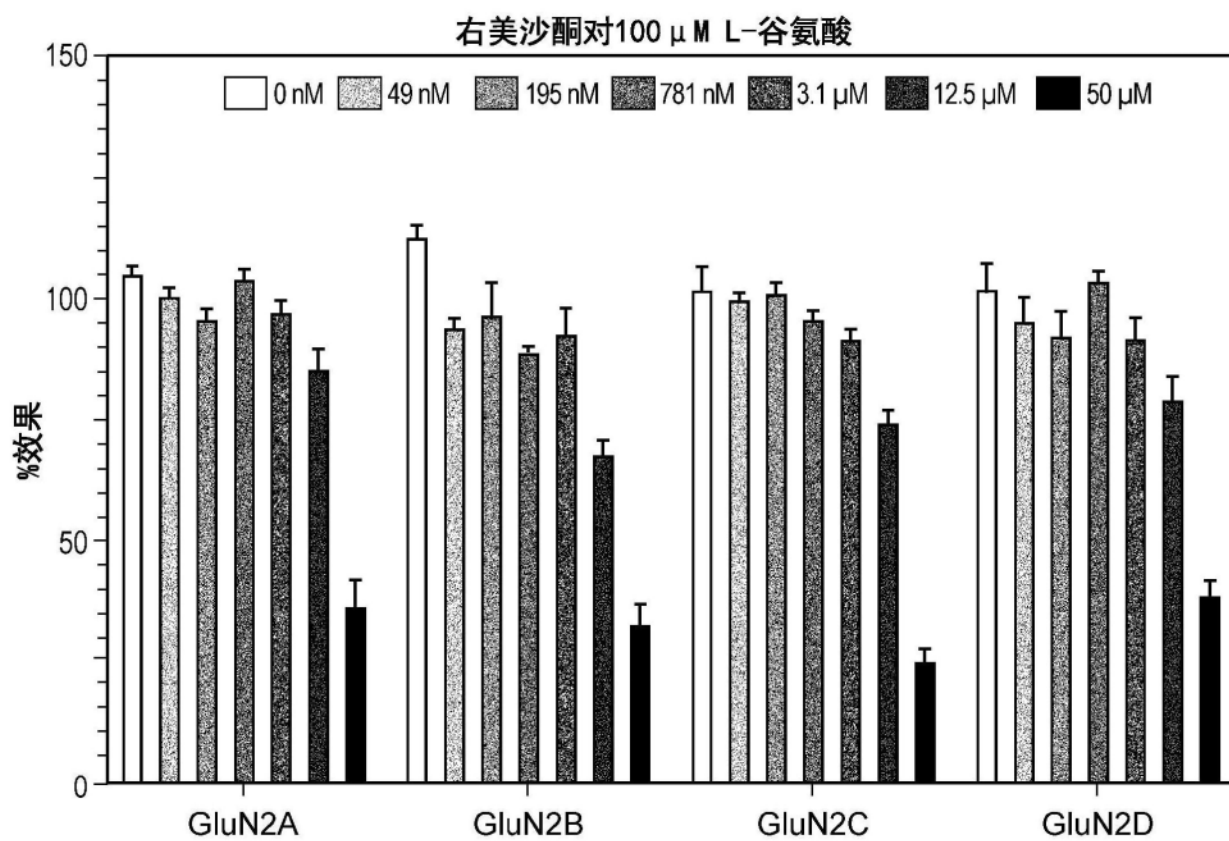


图8I

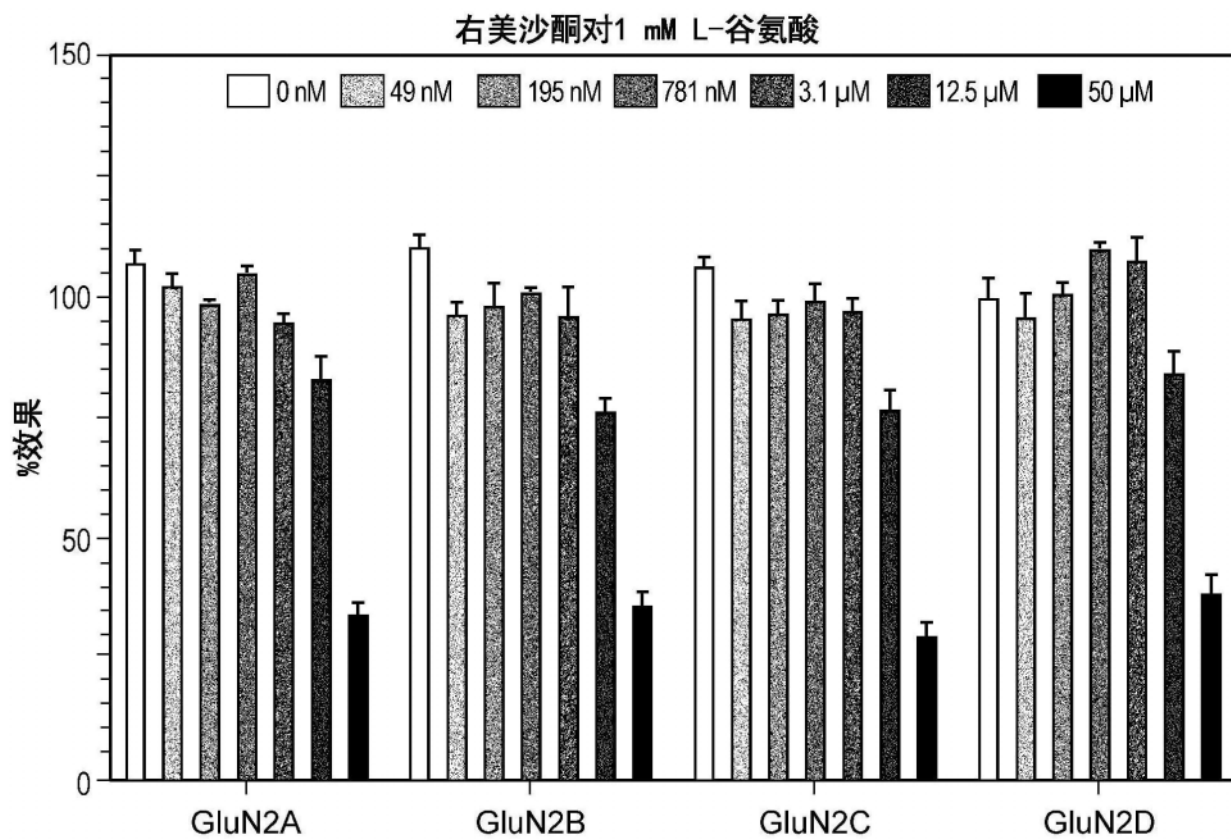


图8J

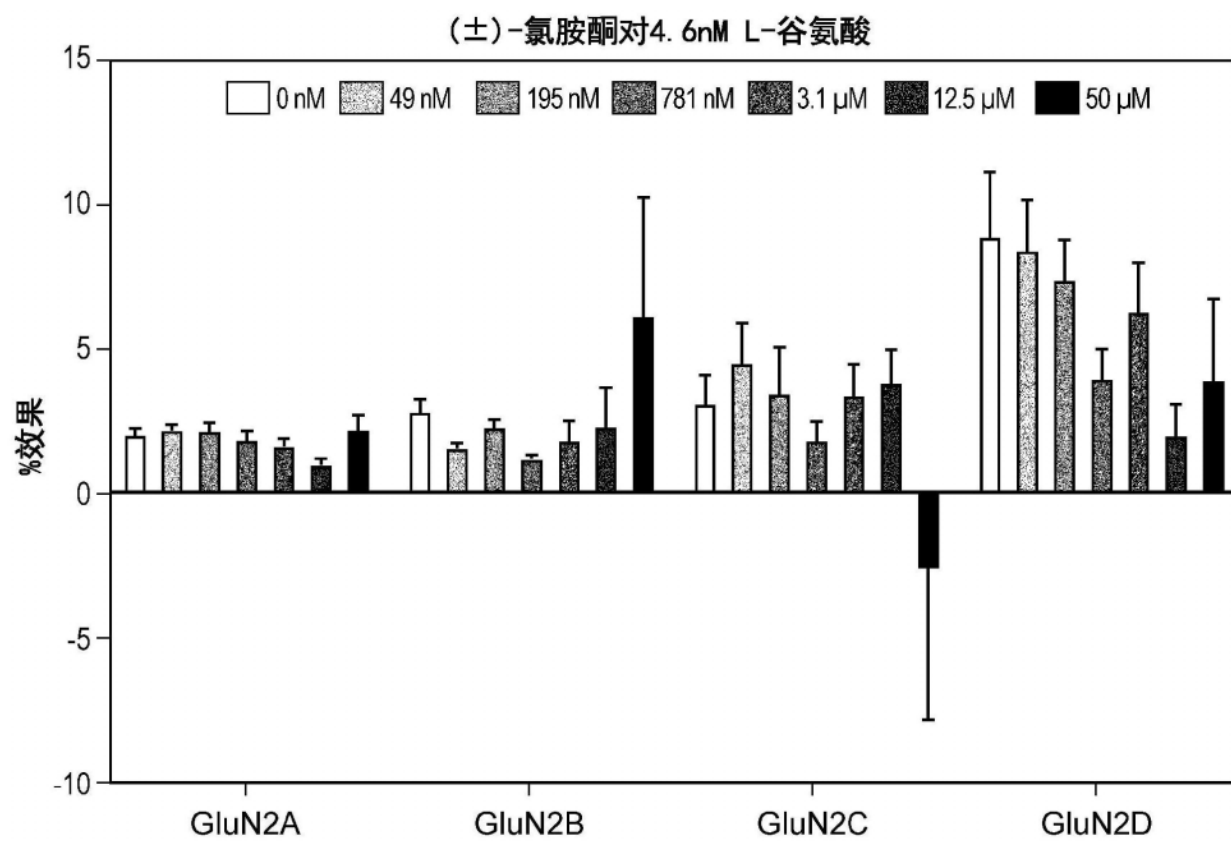


图9A

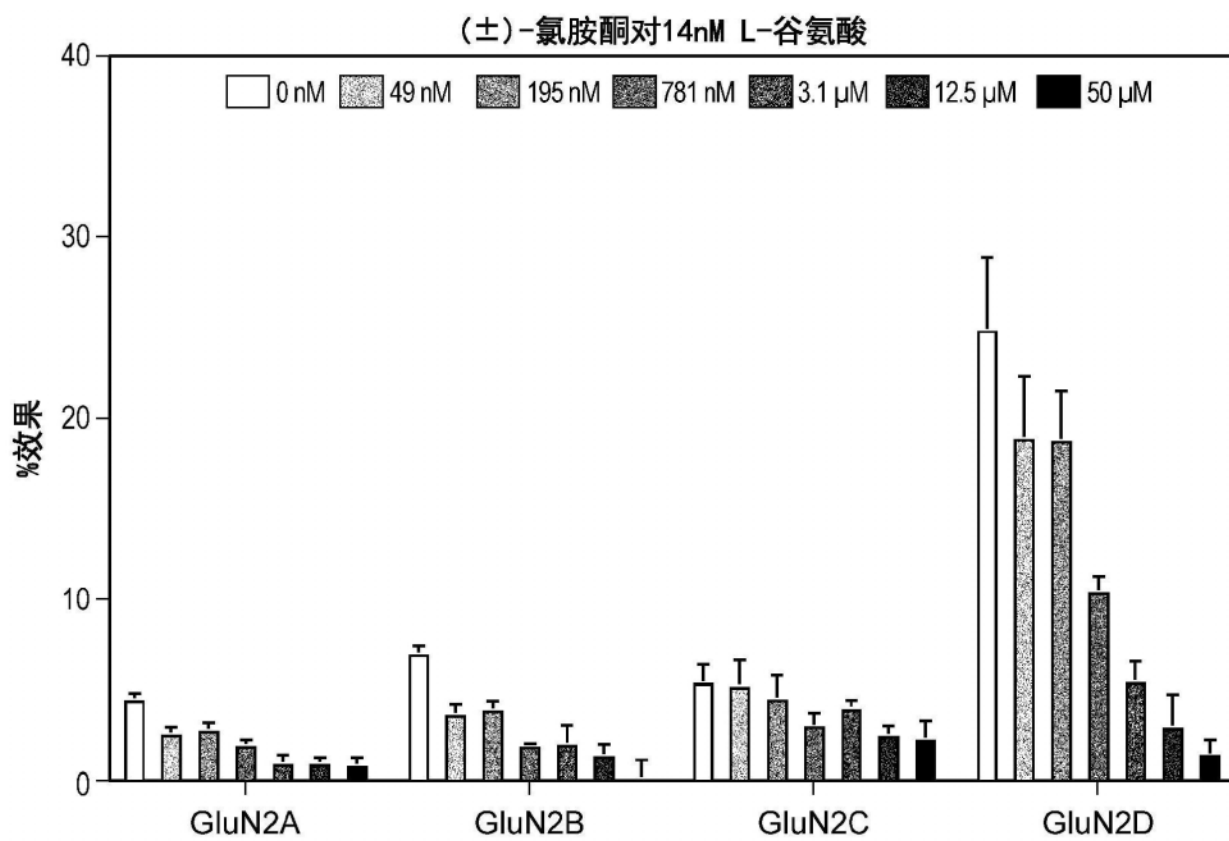


图9B

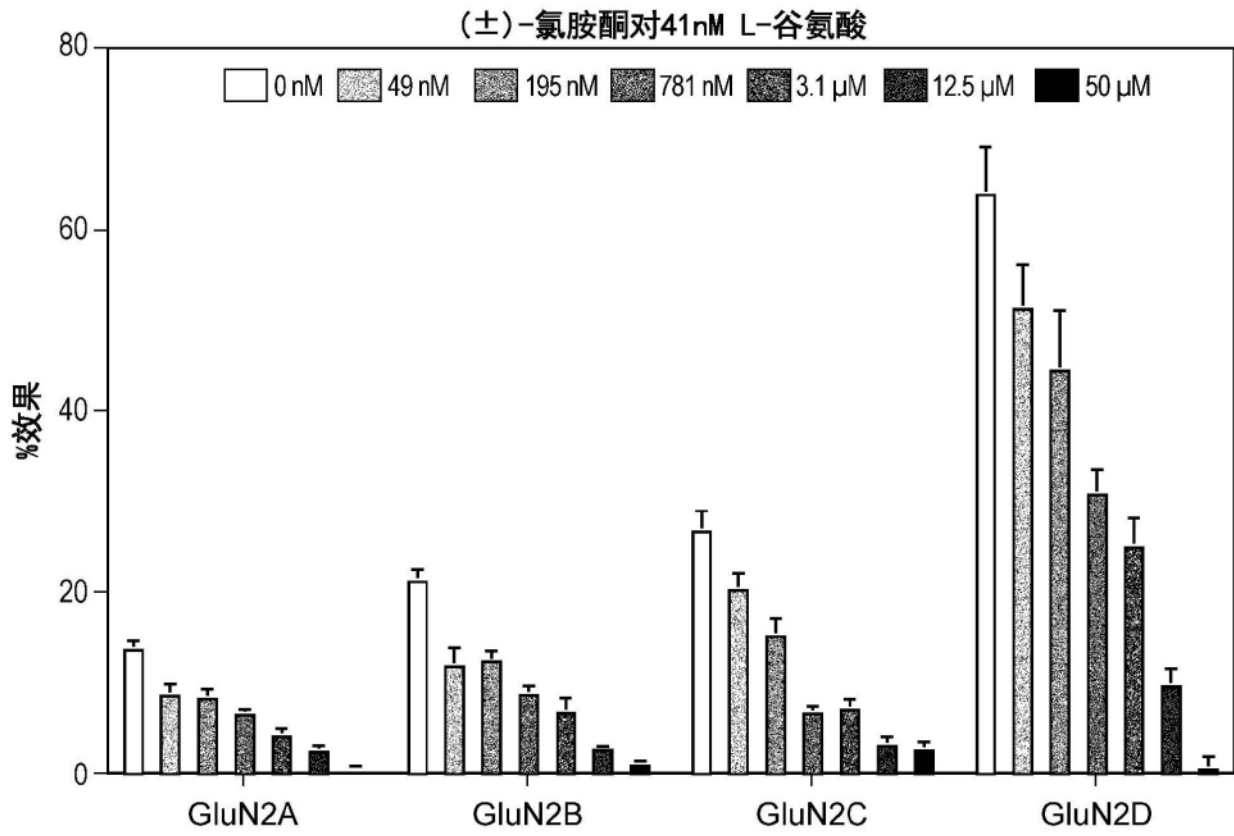


图9C

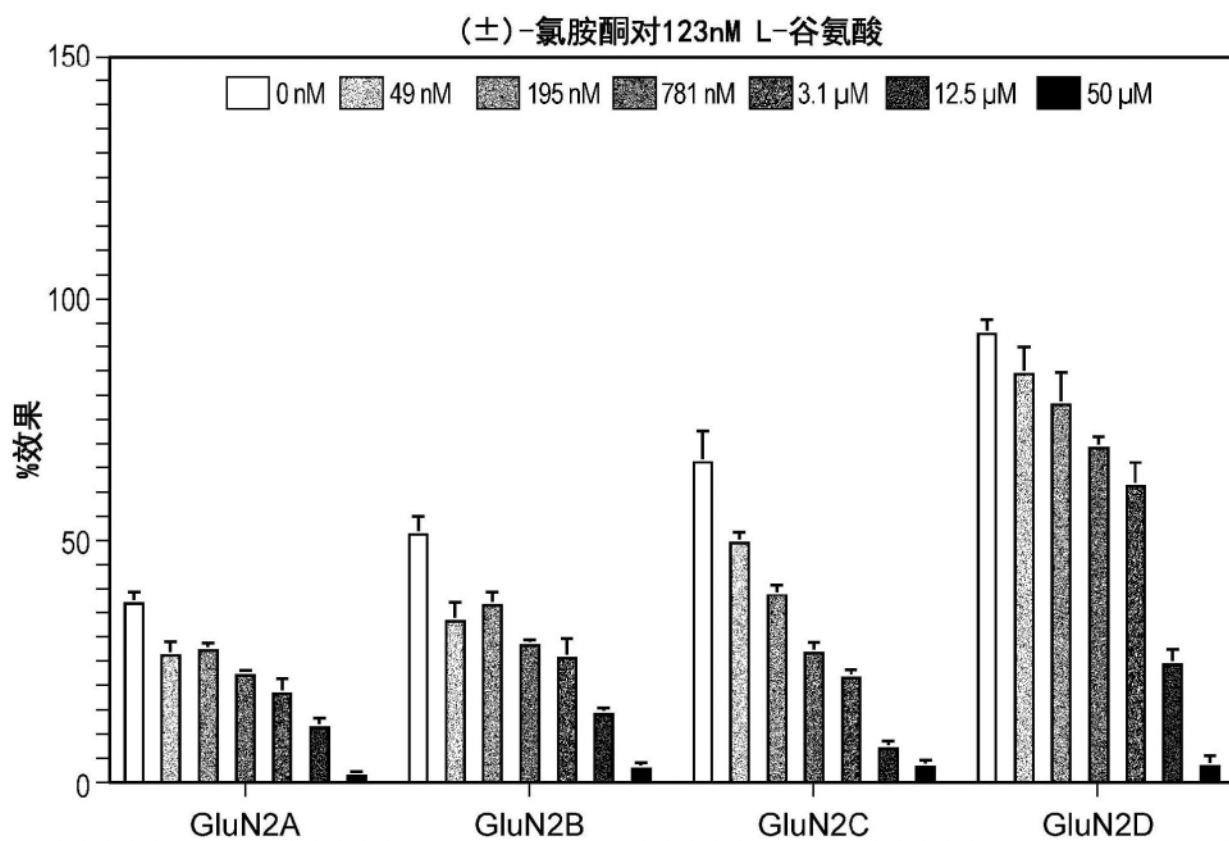


图9D

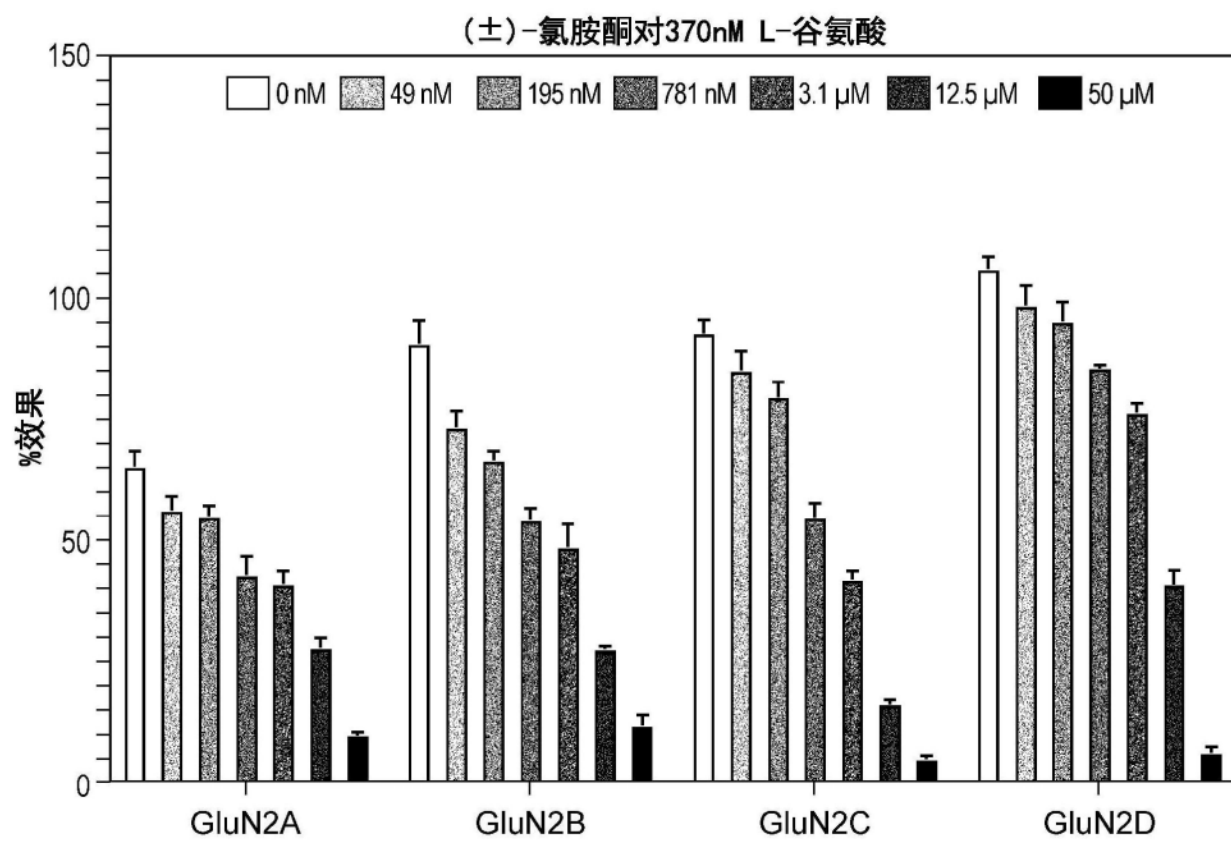


图9E

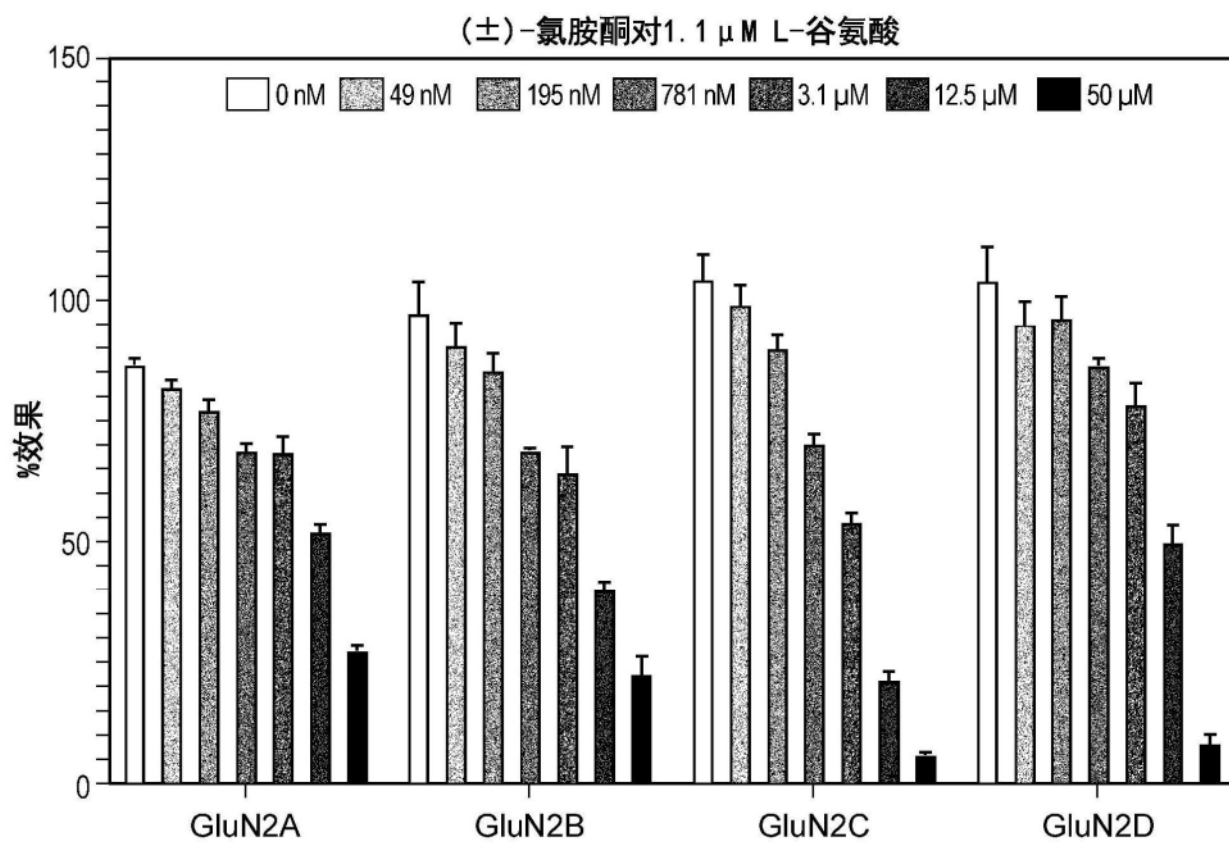


图9F

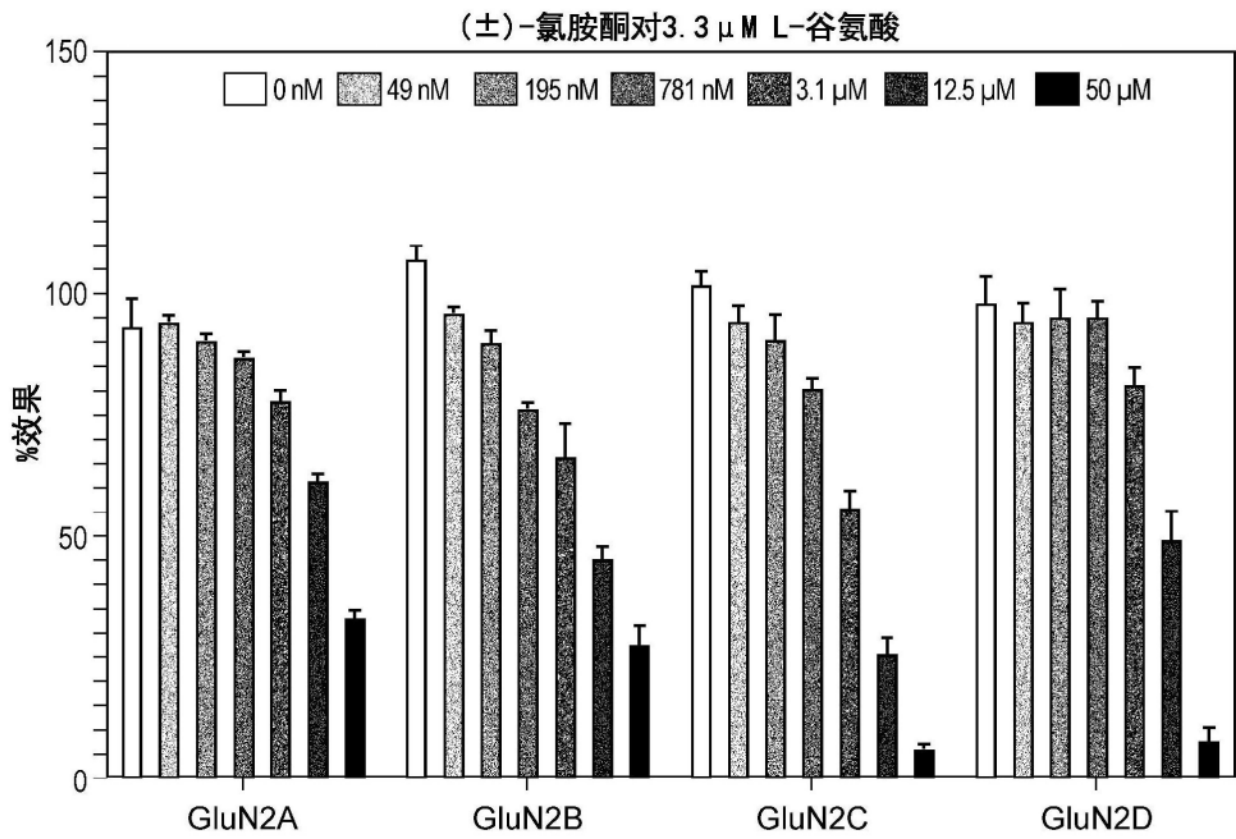


图9G

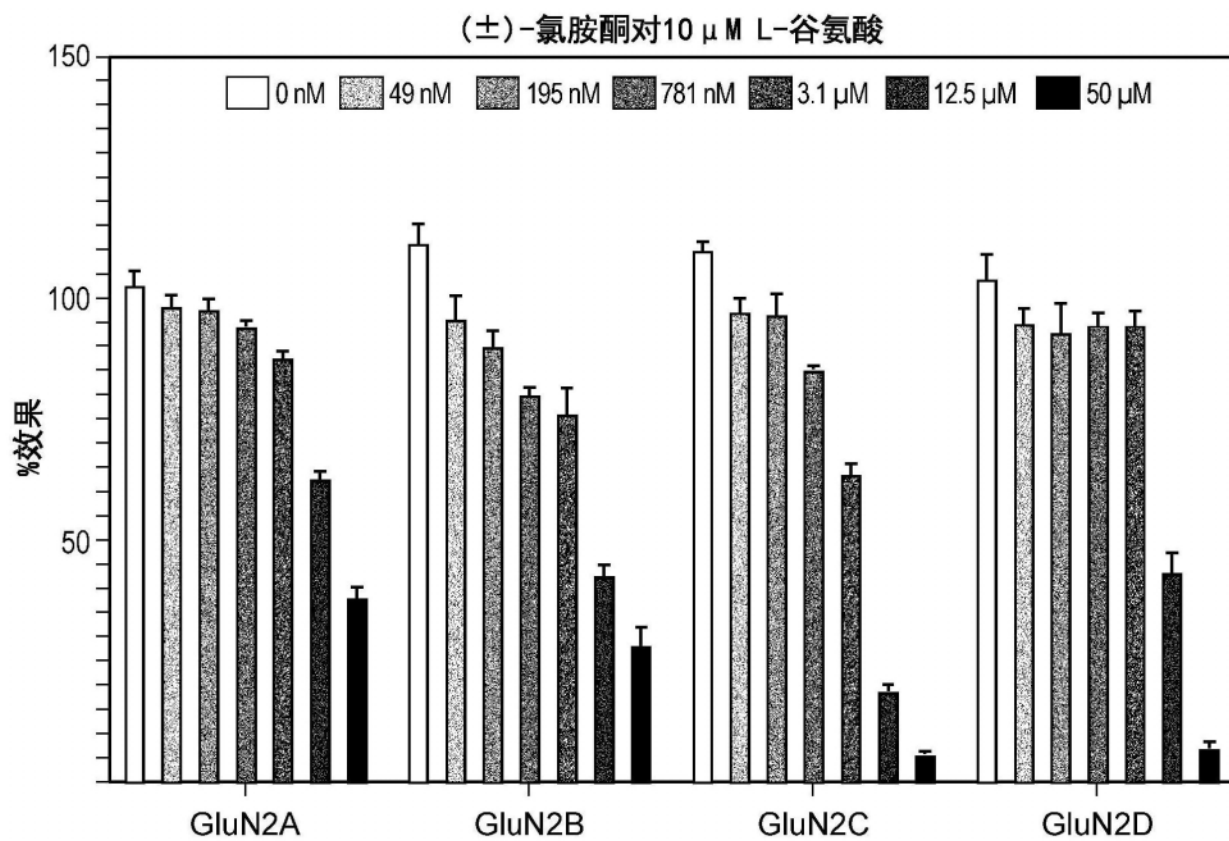


图9H

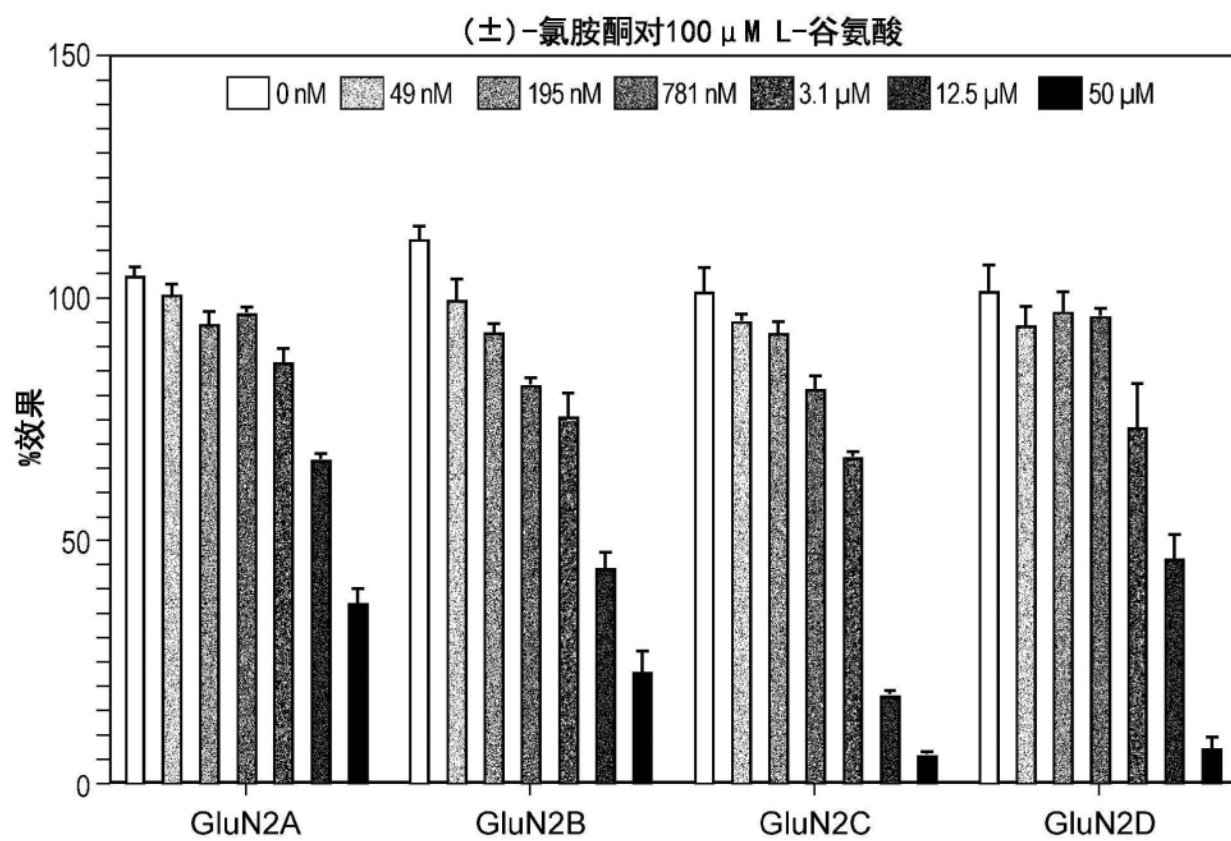


图9I

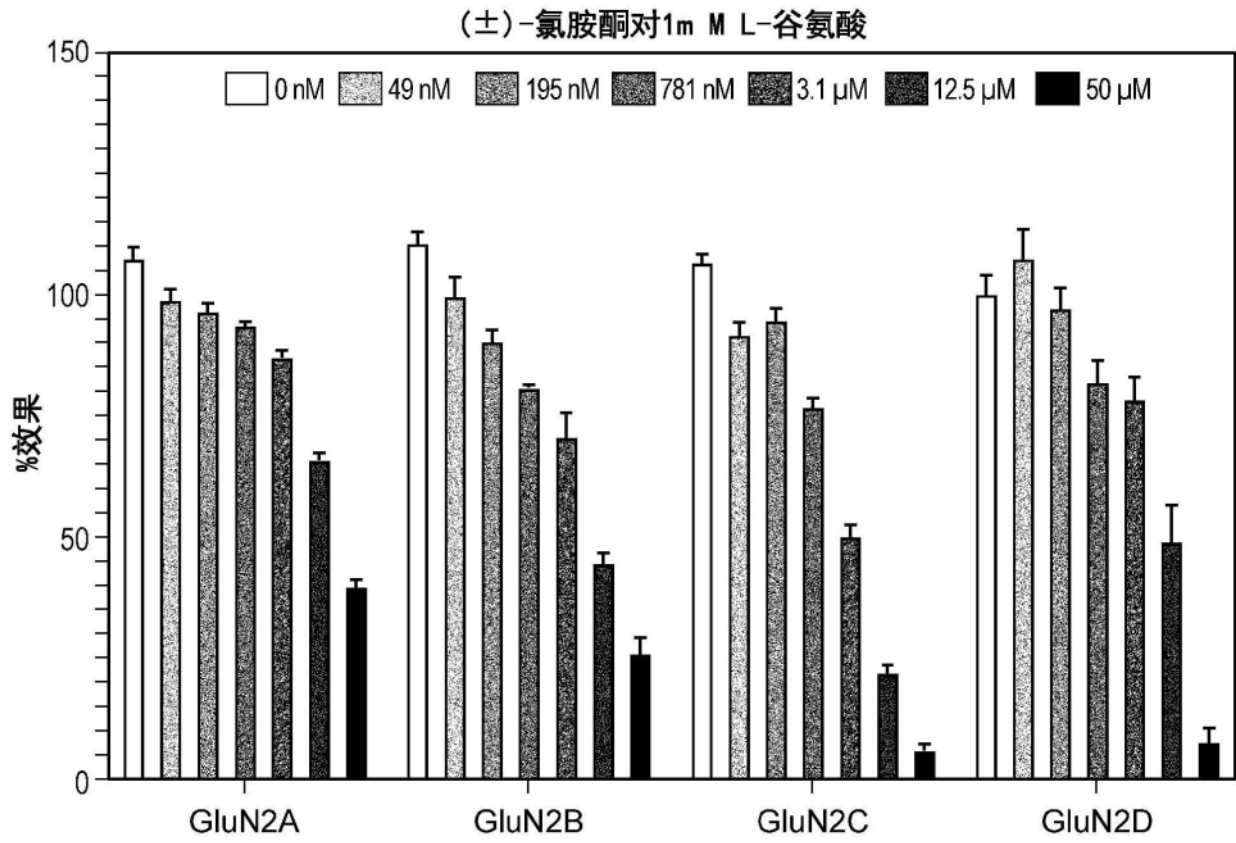


图9J

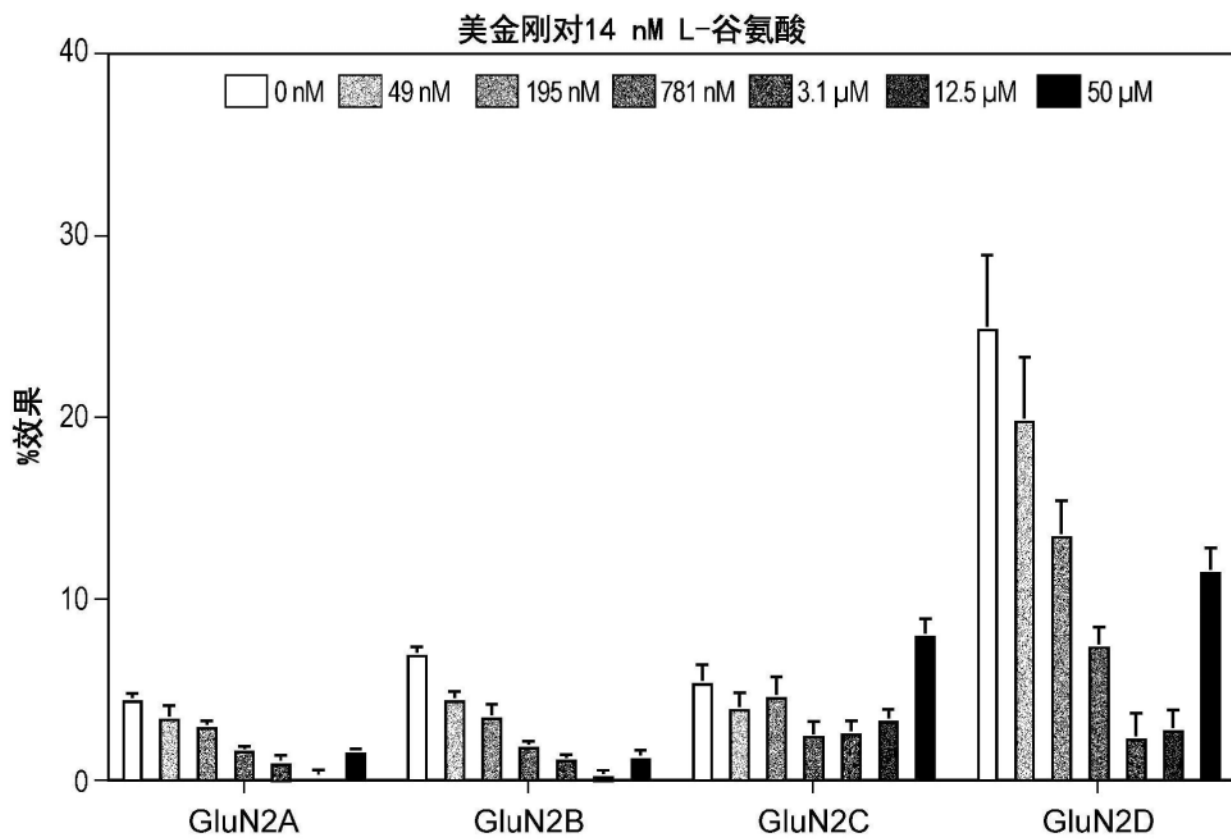


图10A

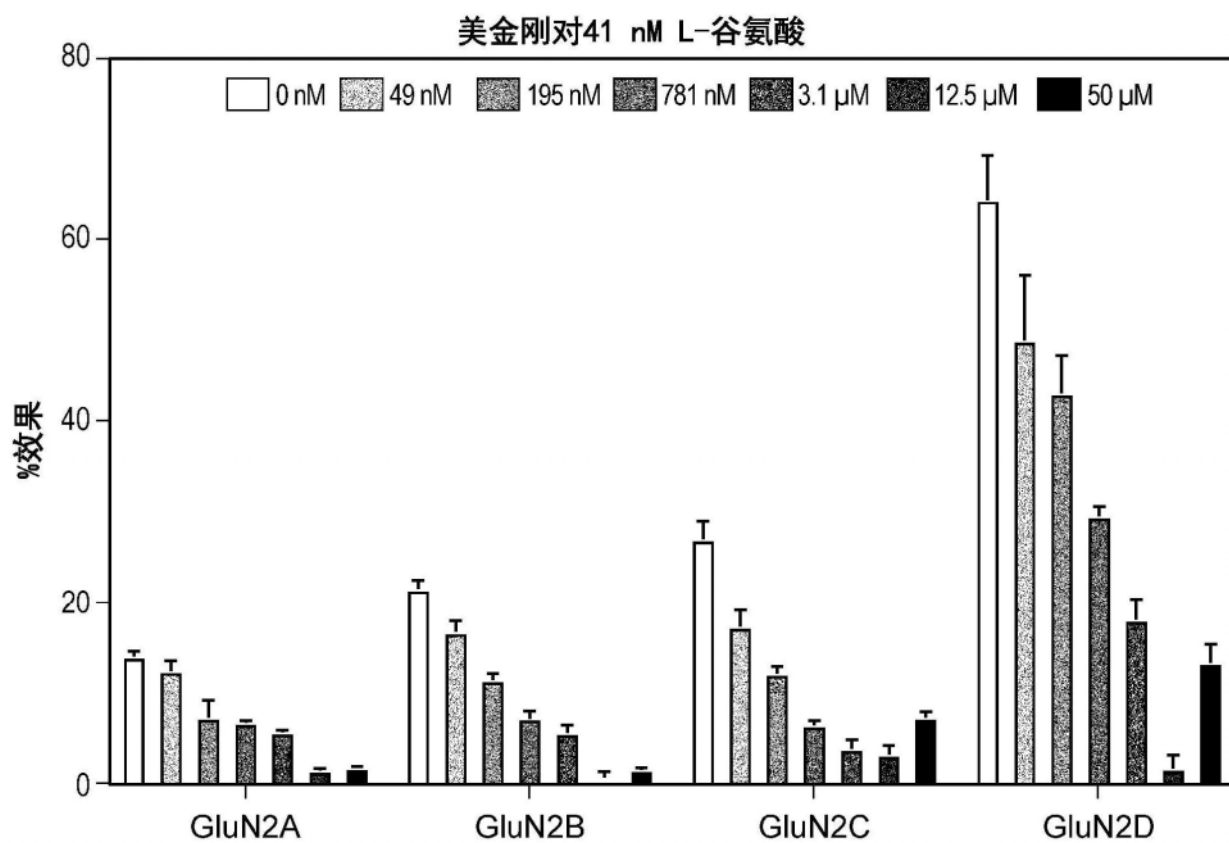


图10B

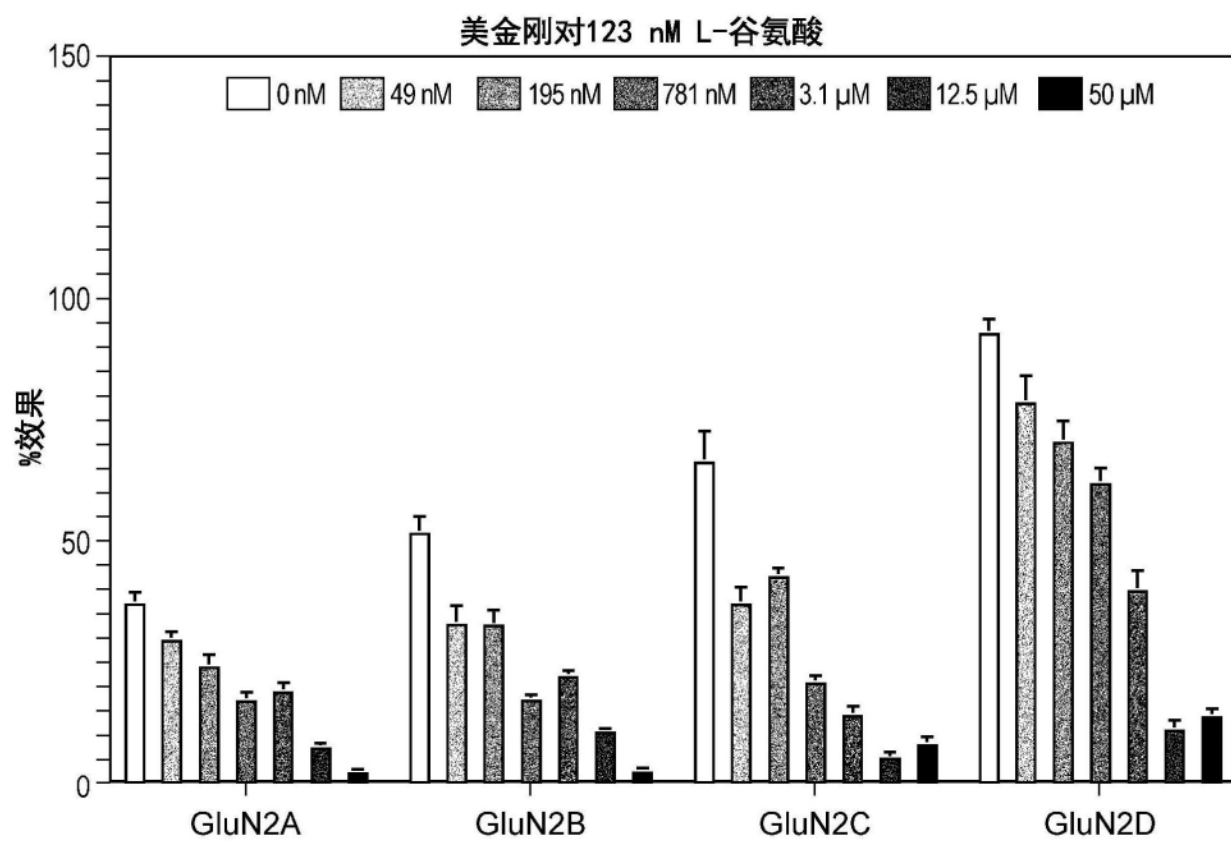


图10C

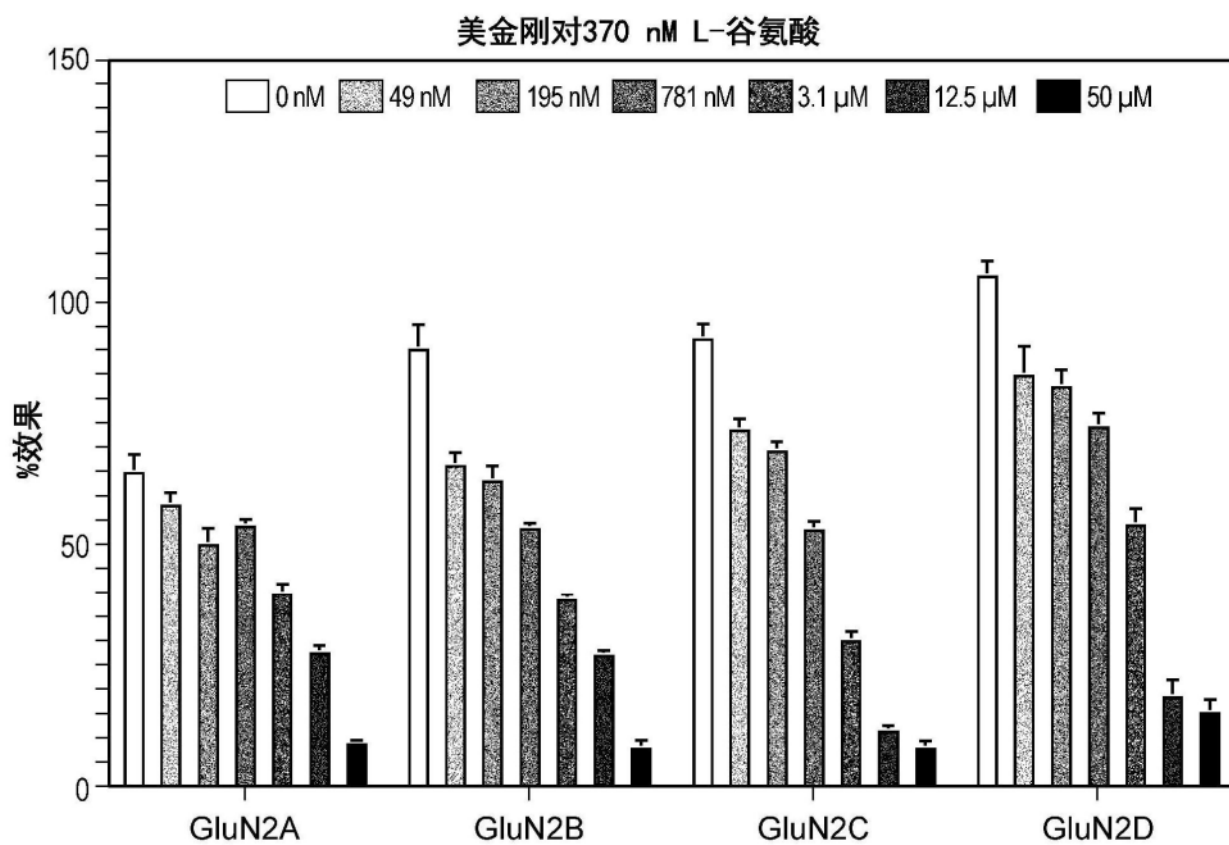


图10D

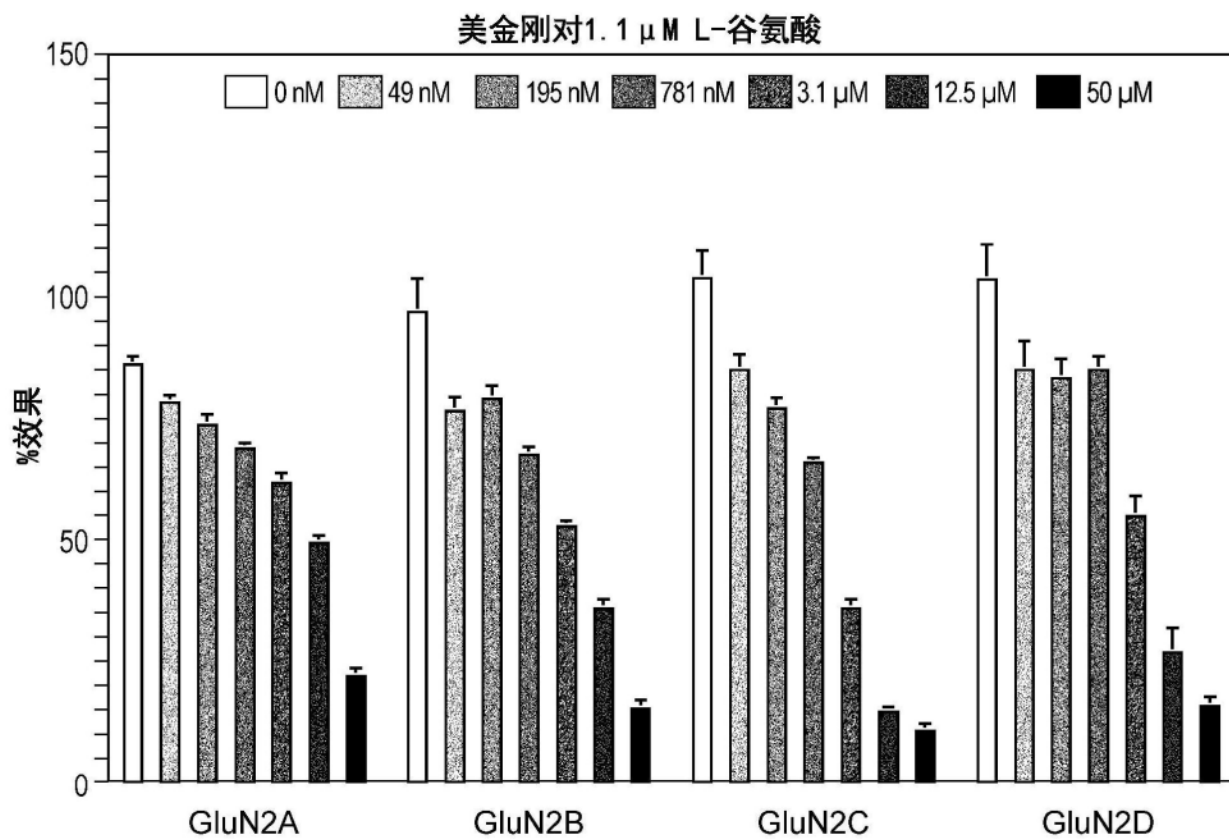


图10E

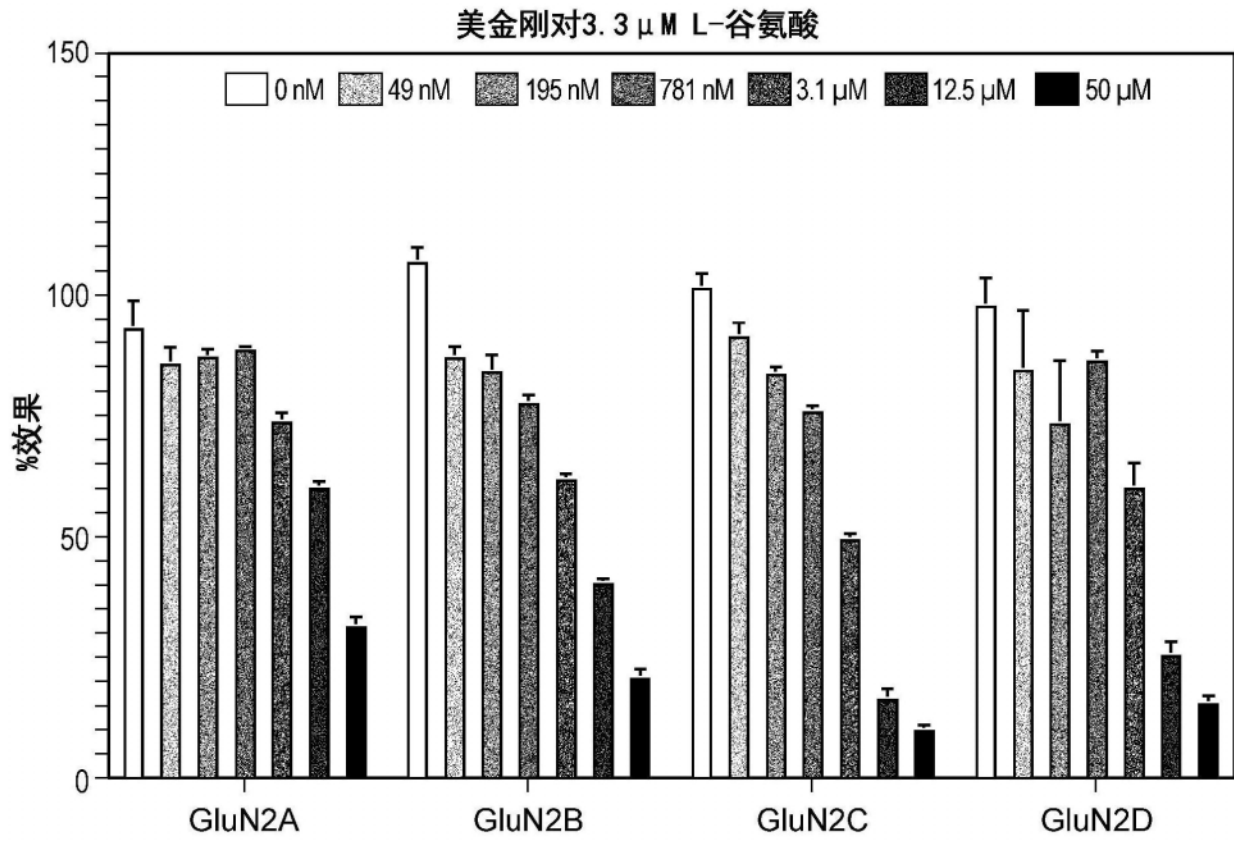


图10F

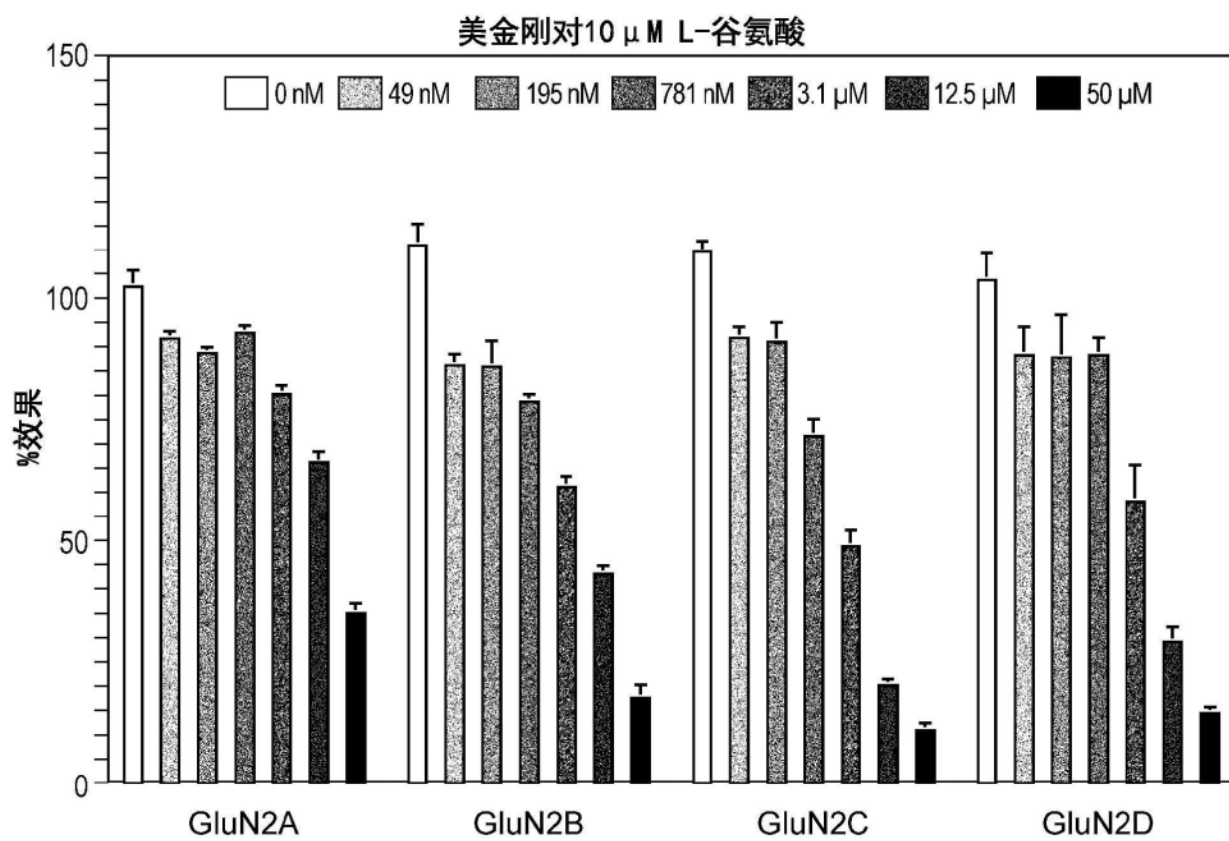


图10G

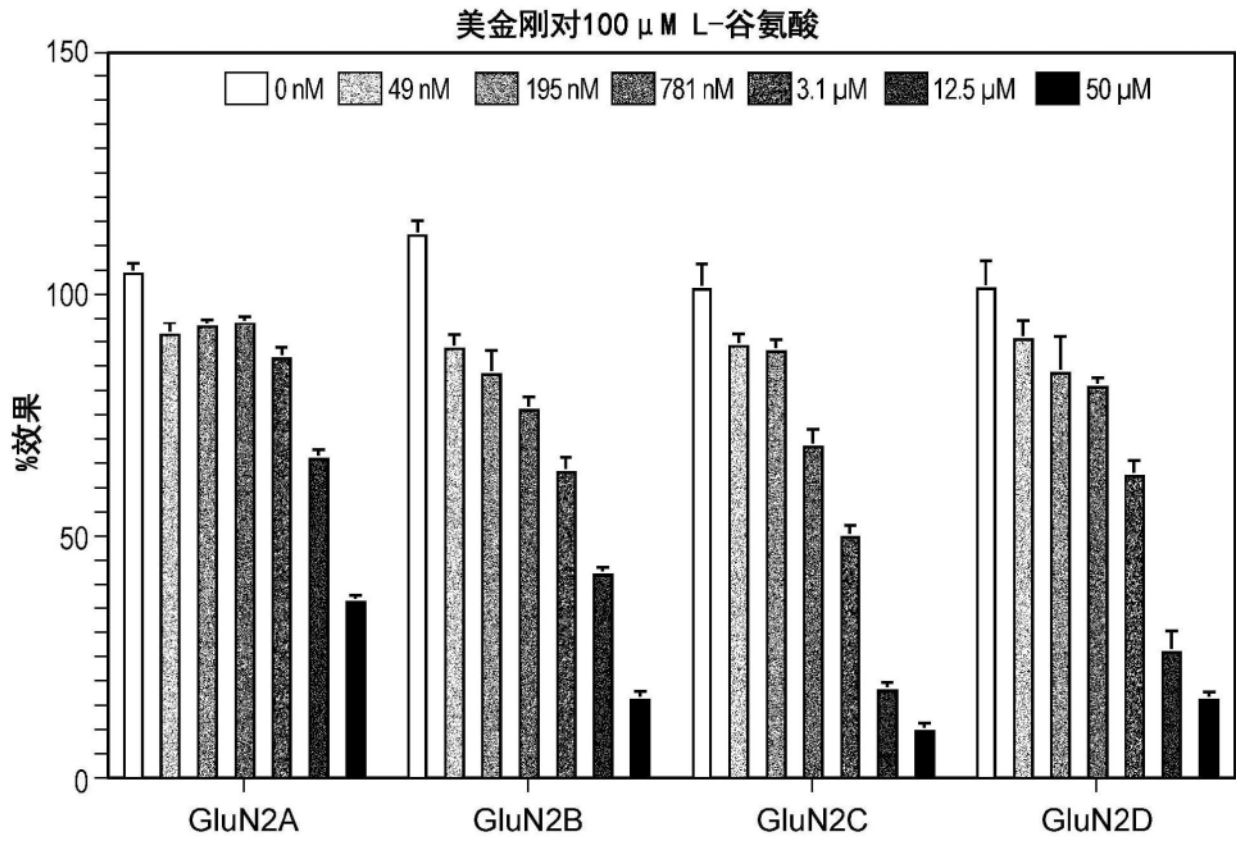


图10H

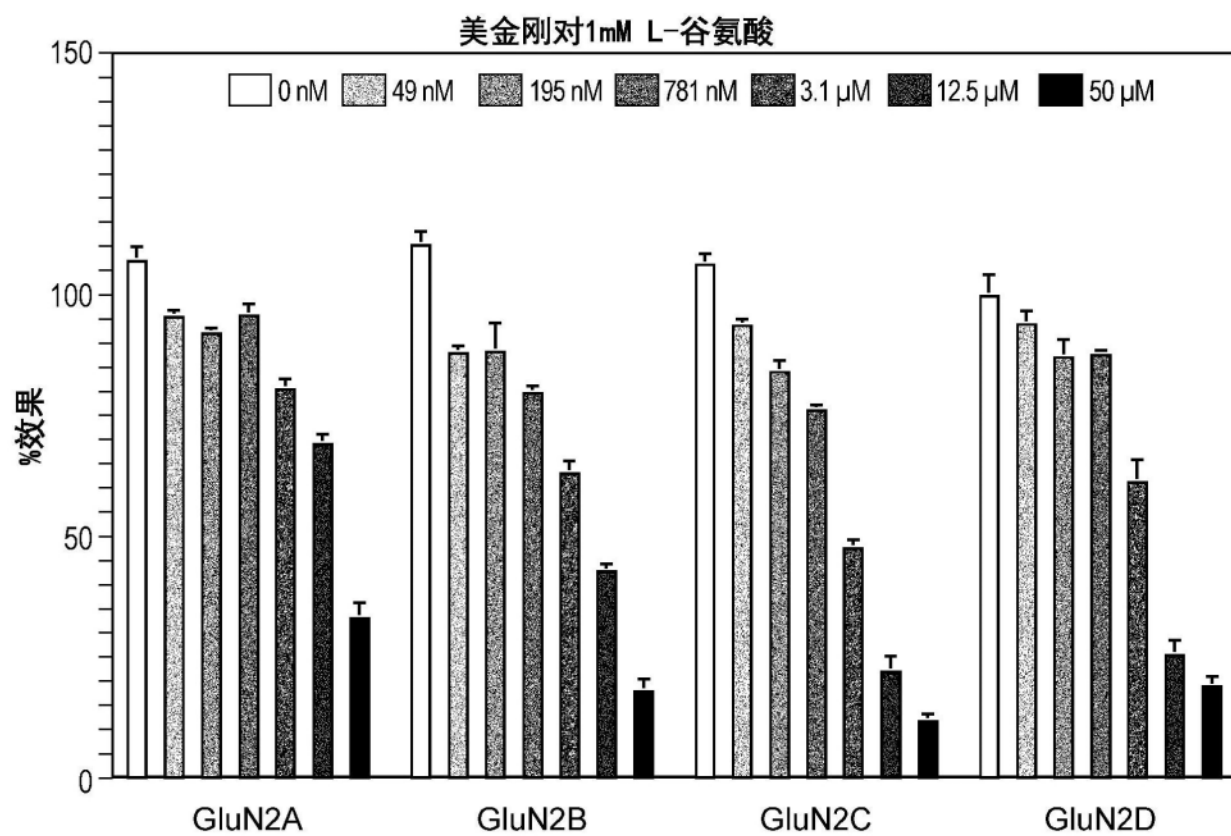


图10I

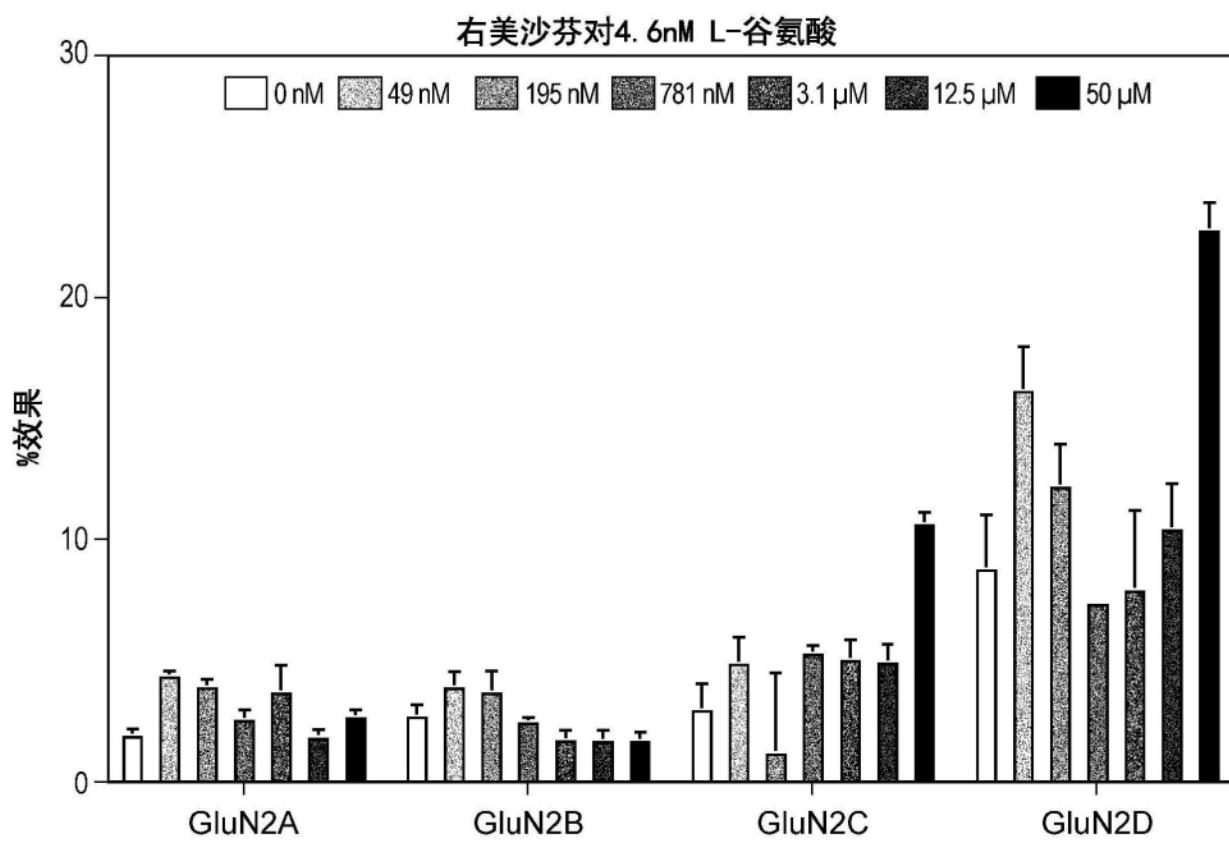


图11A

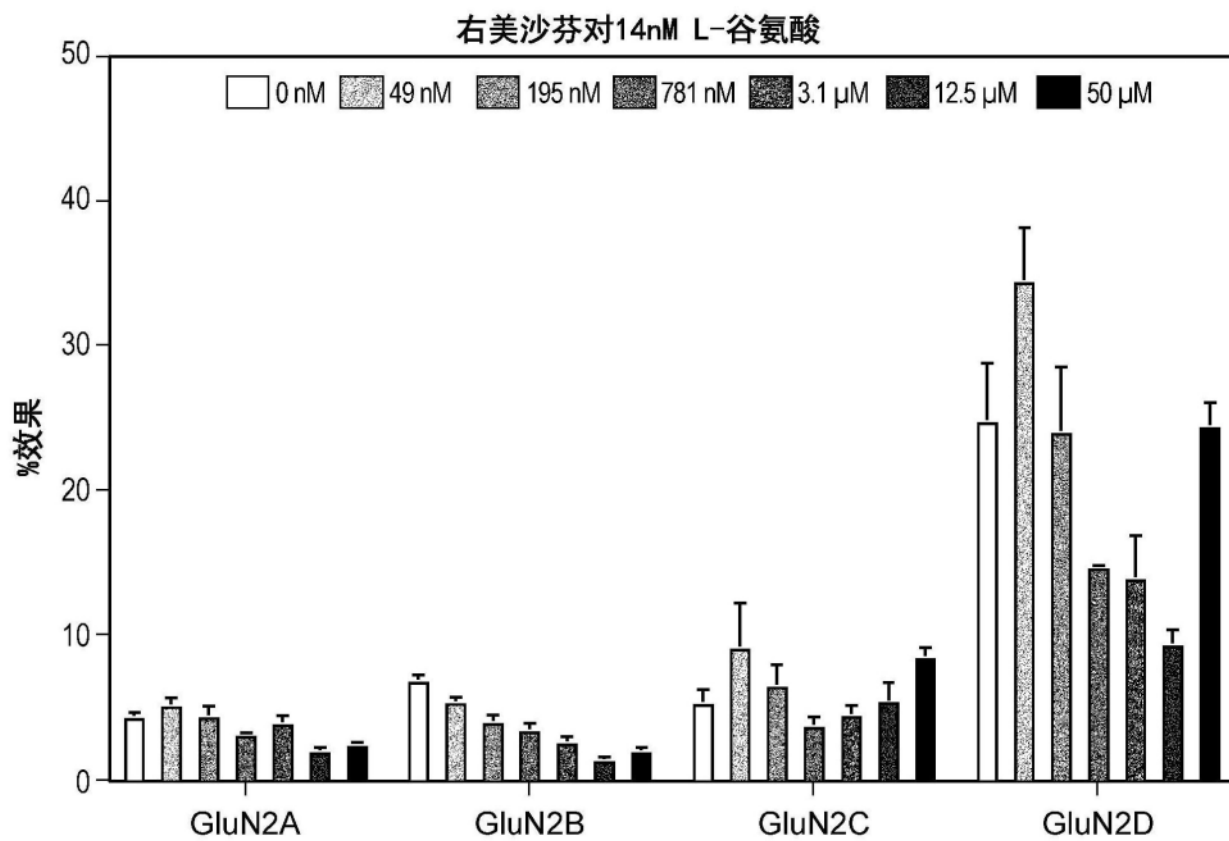


图11B

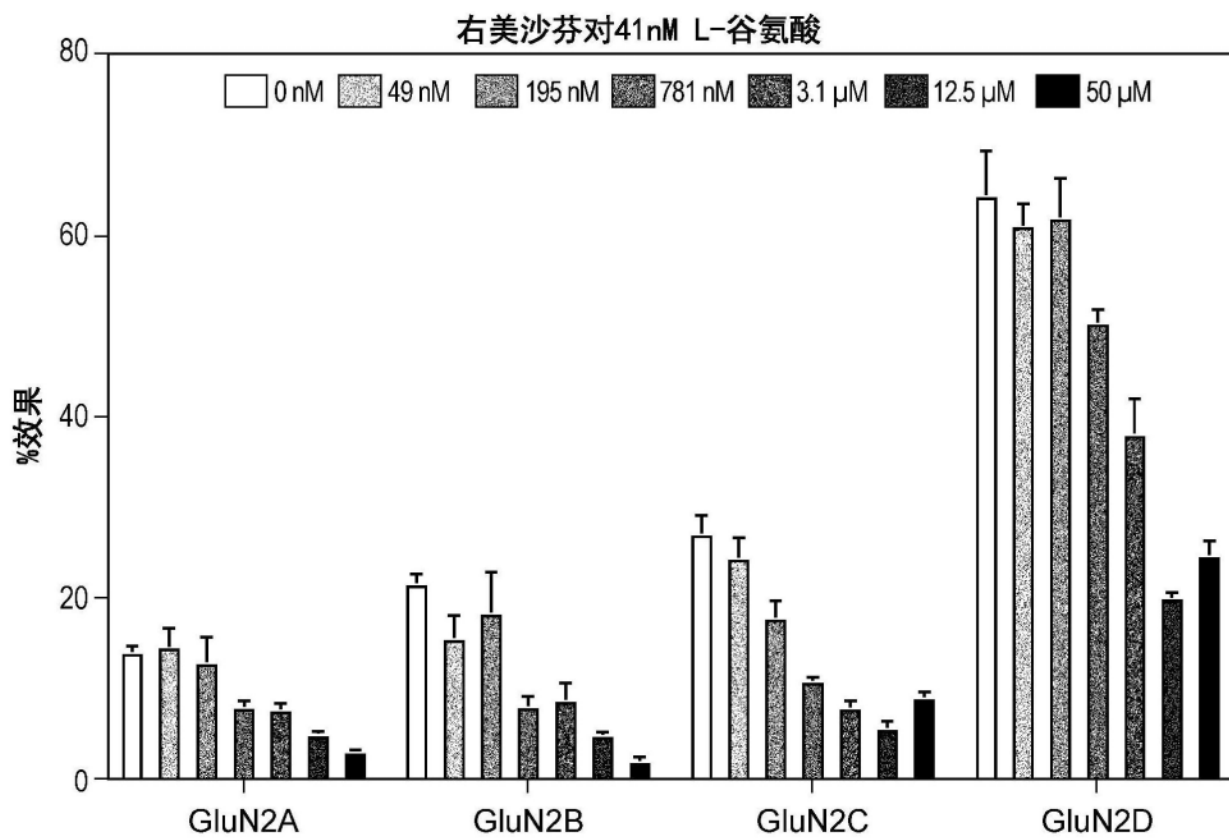


图11C

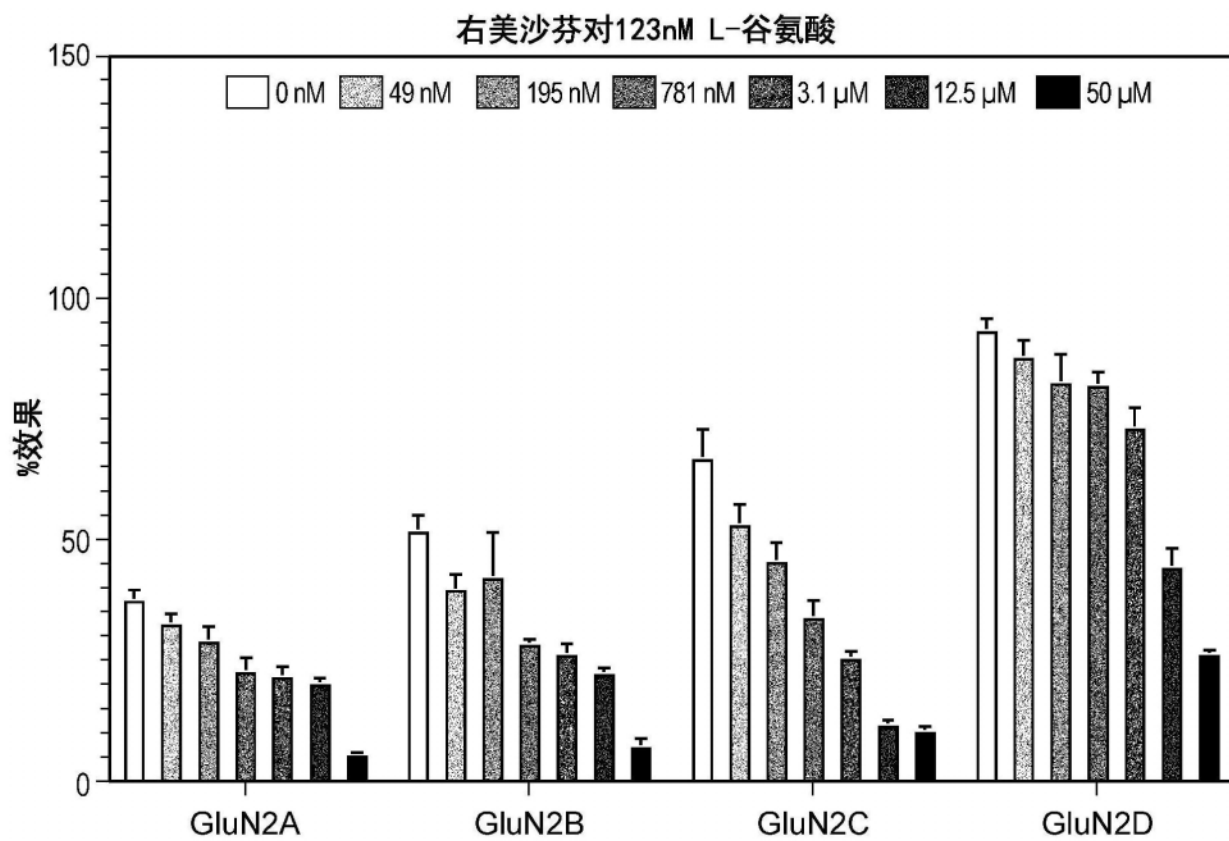


图11D

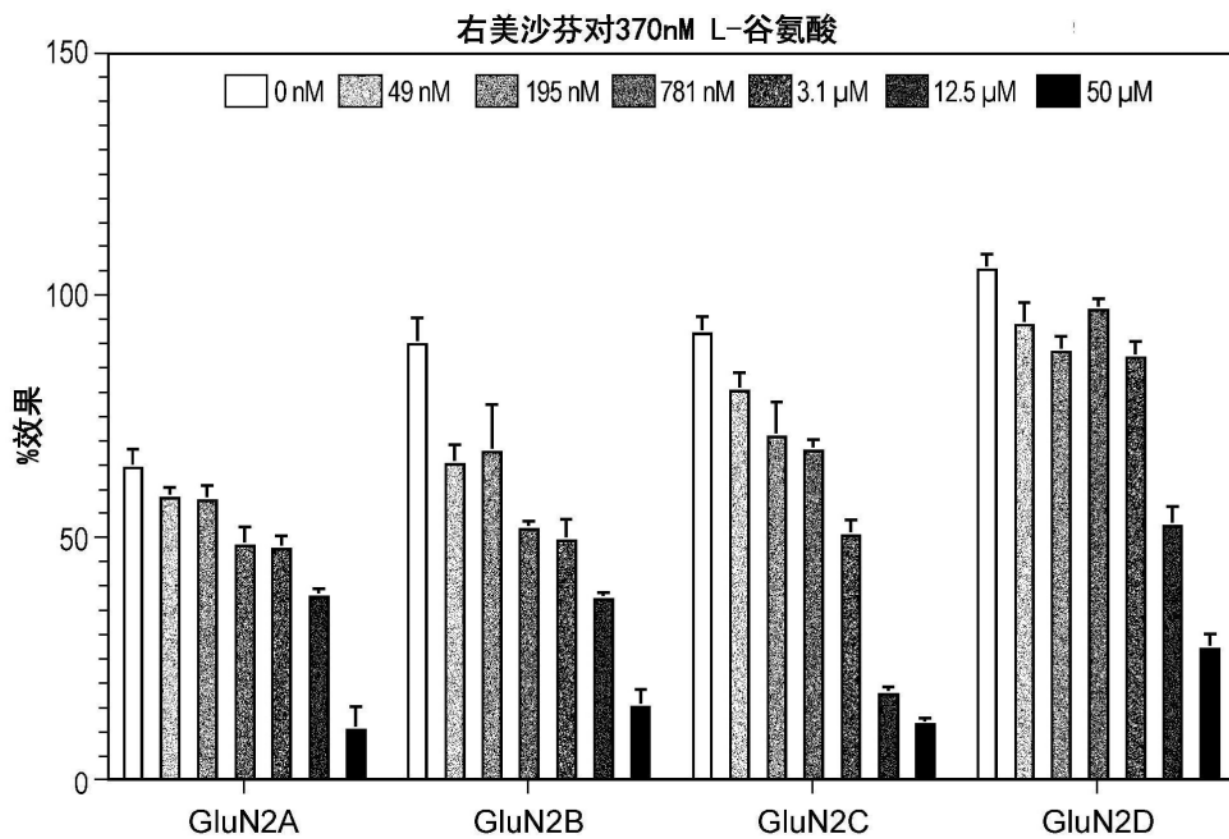


图11E

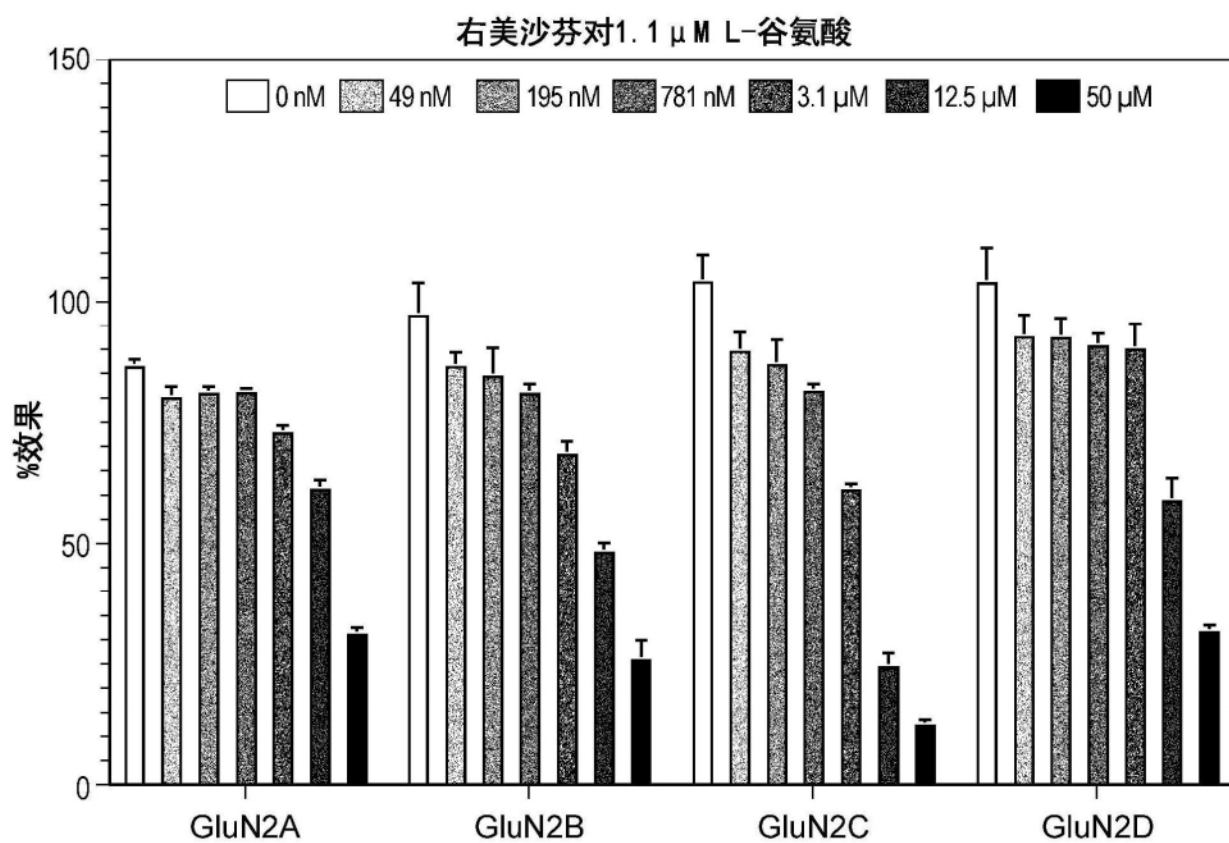


图11F

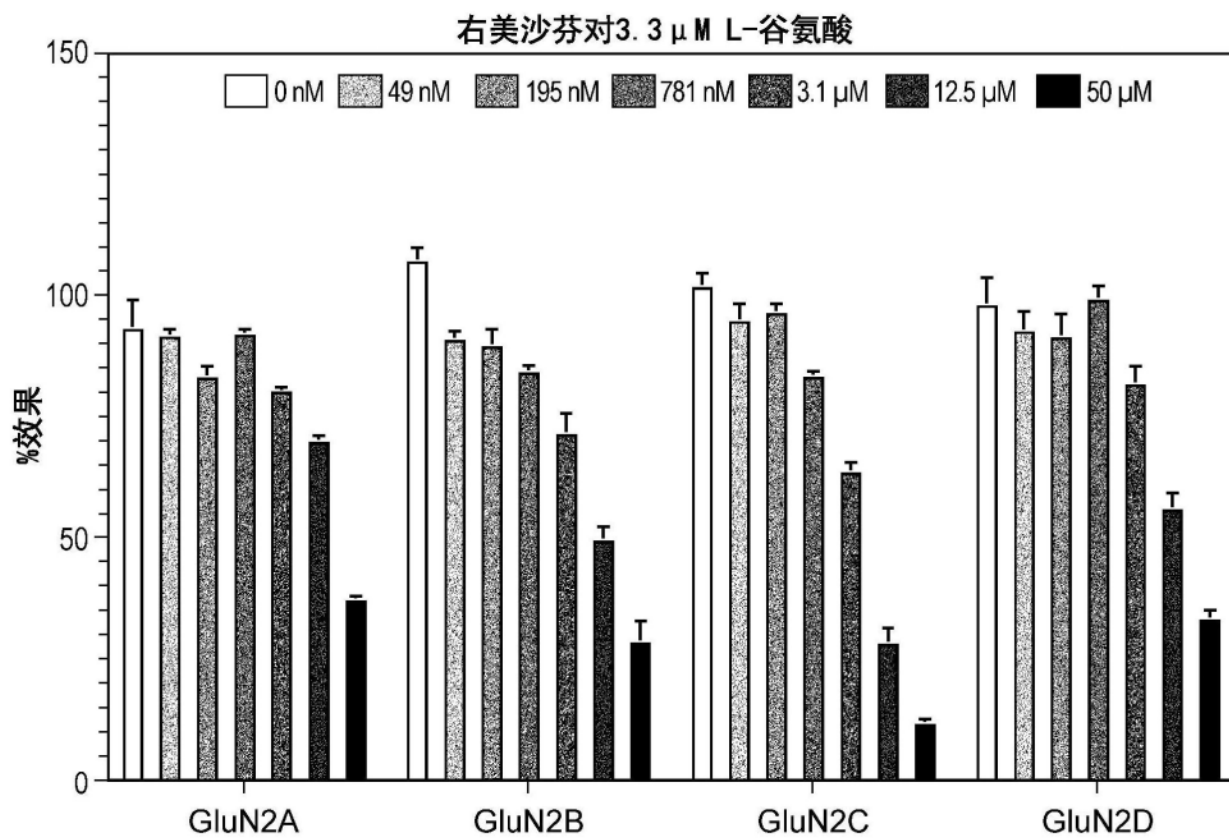


图11G

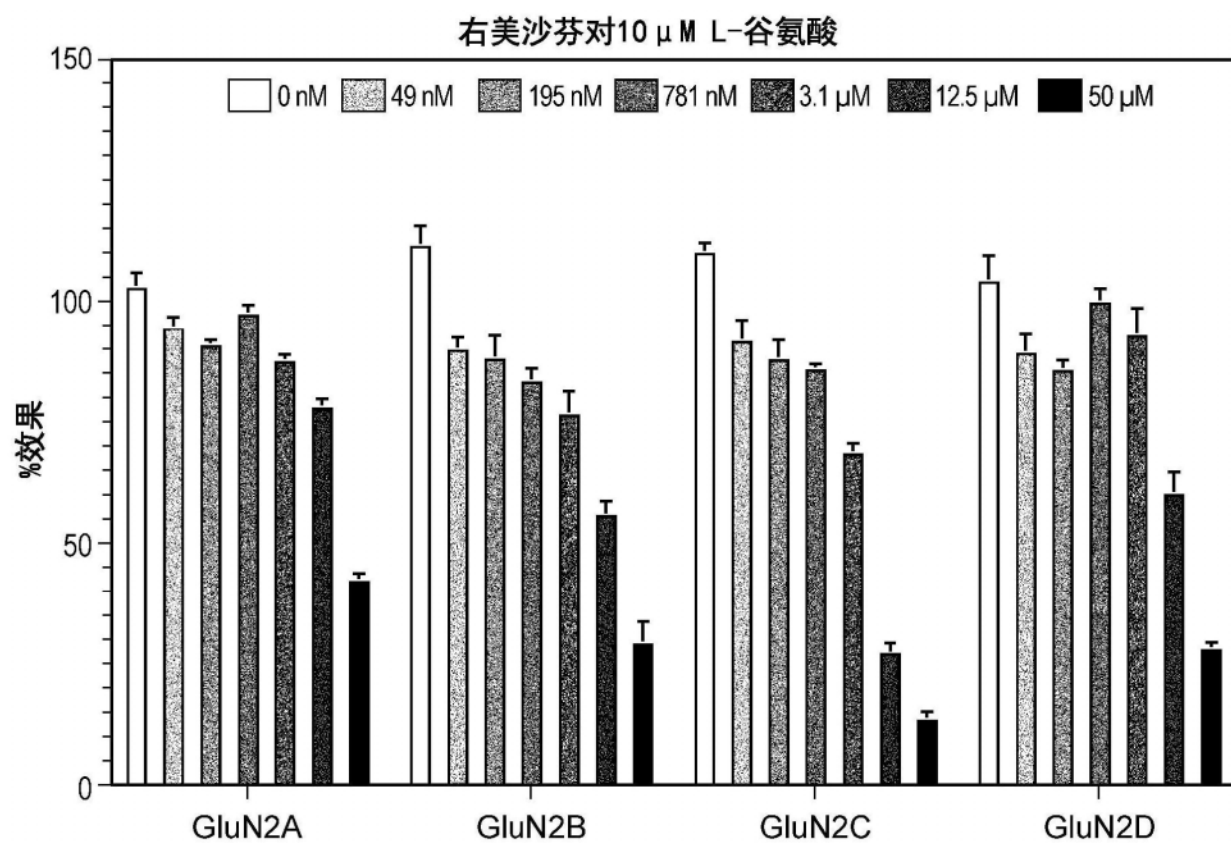


图11H

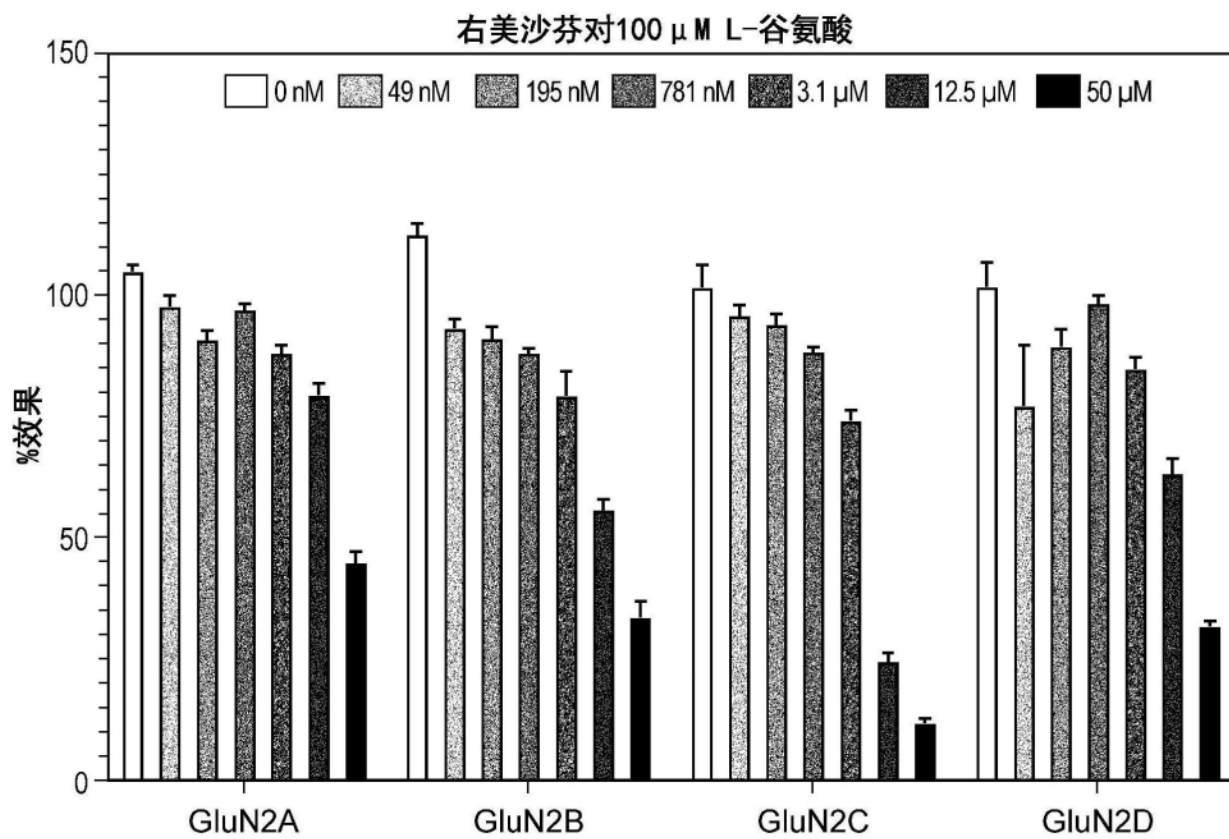


图11I

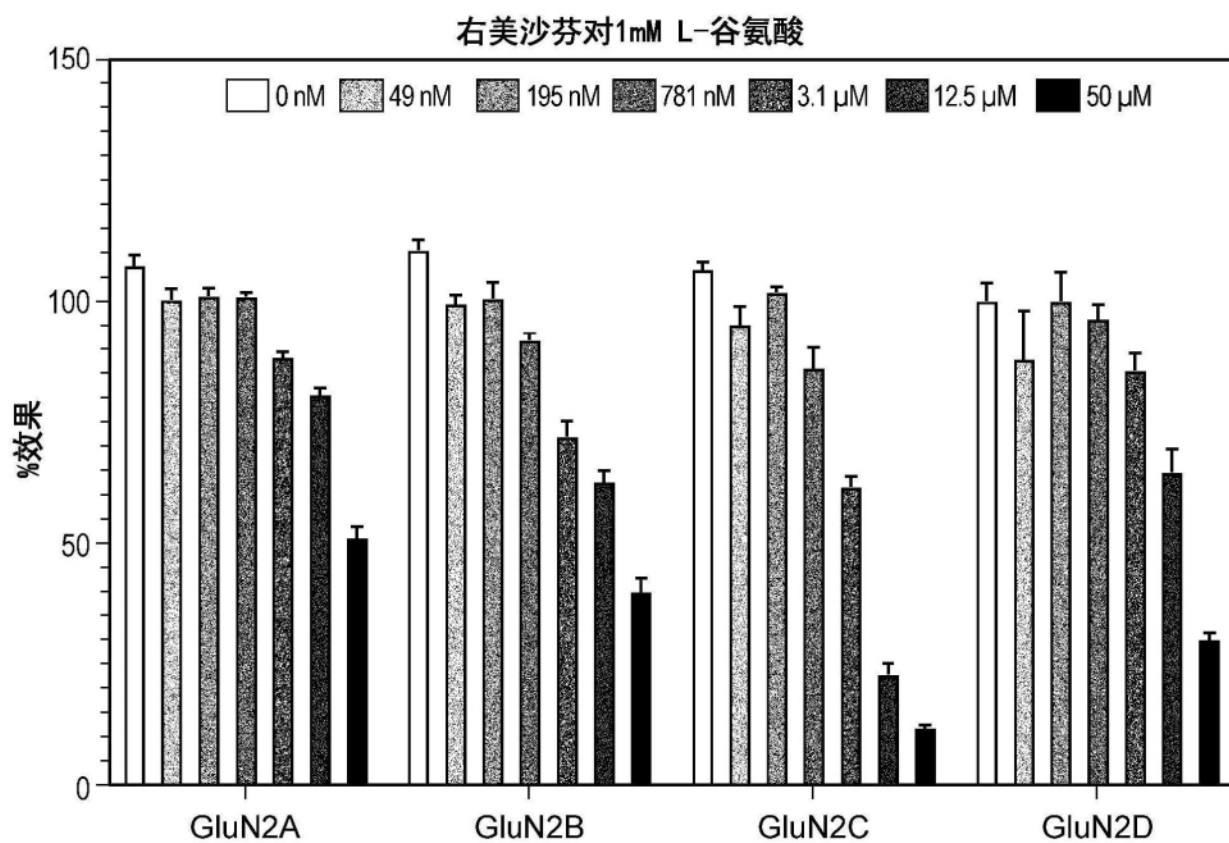


图11J

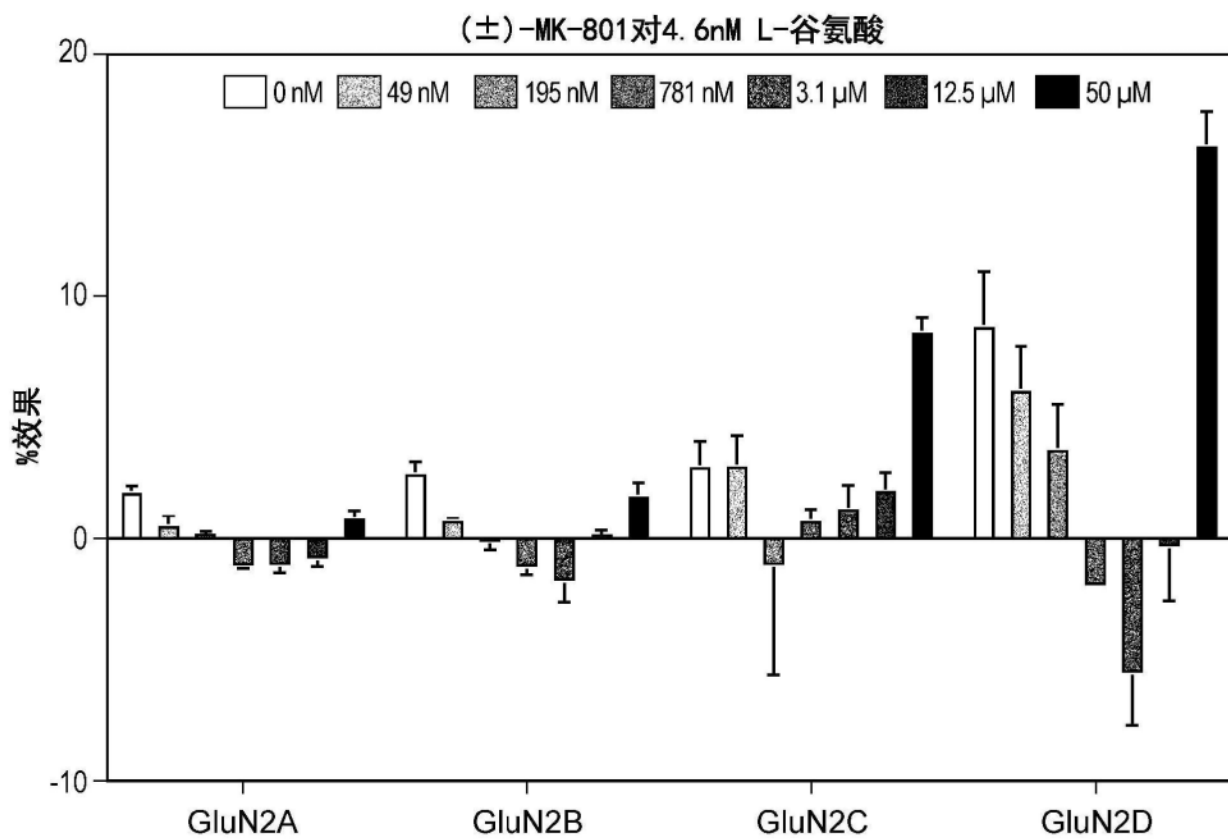


图12A

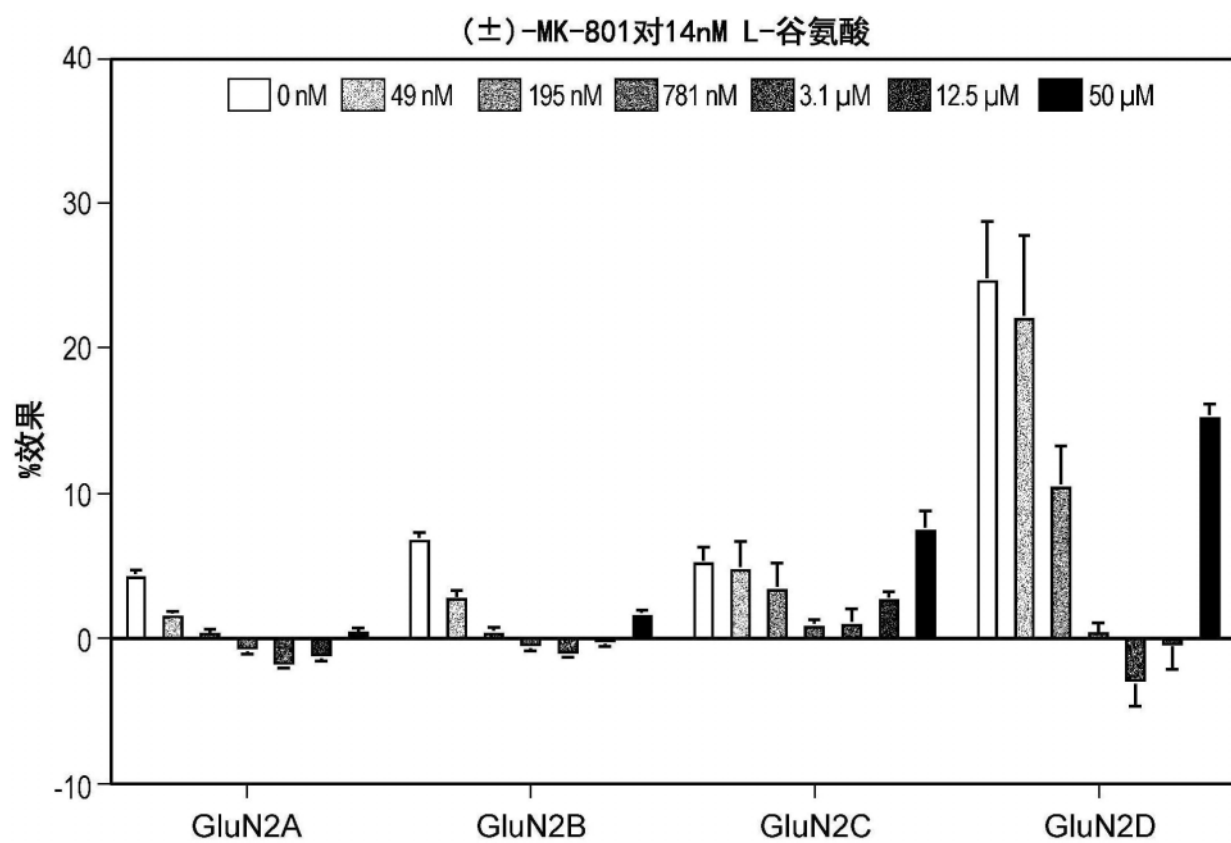


图12B

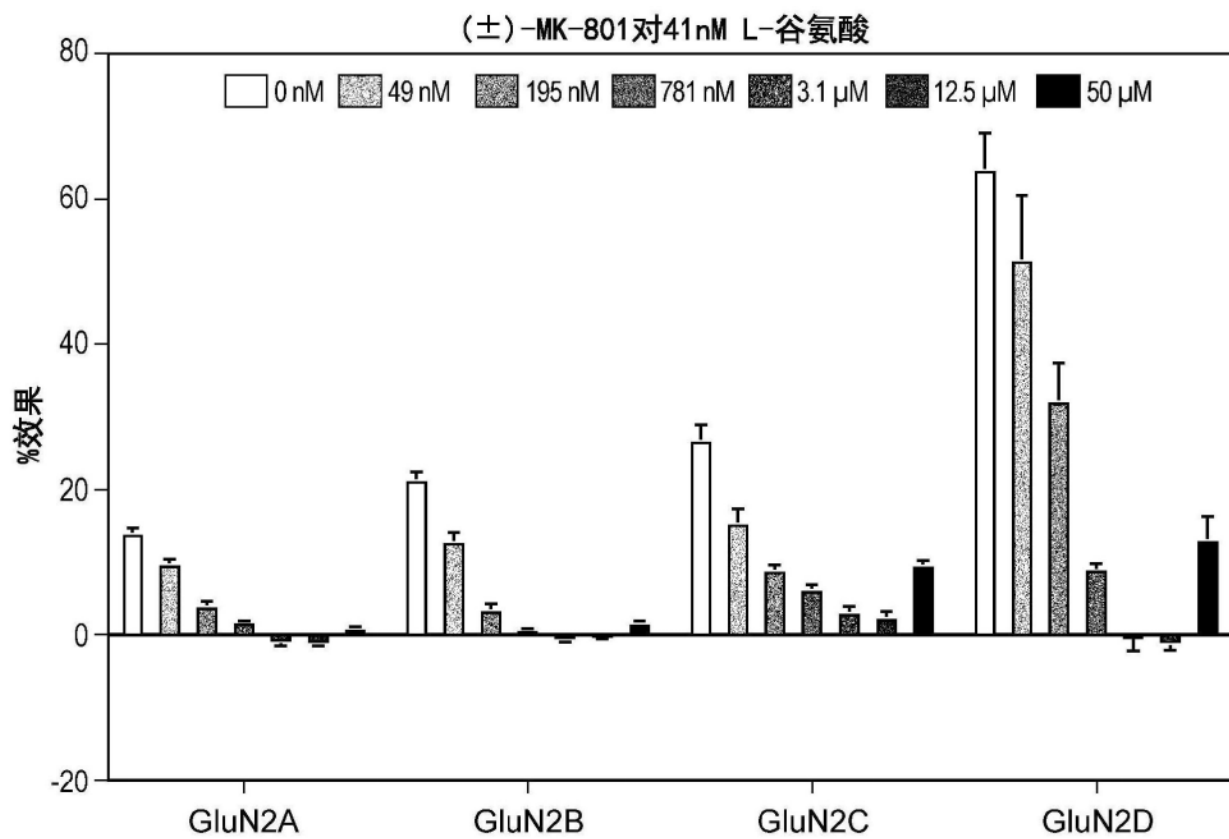


图12C

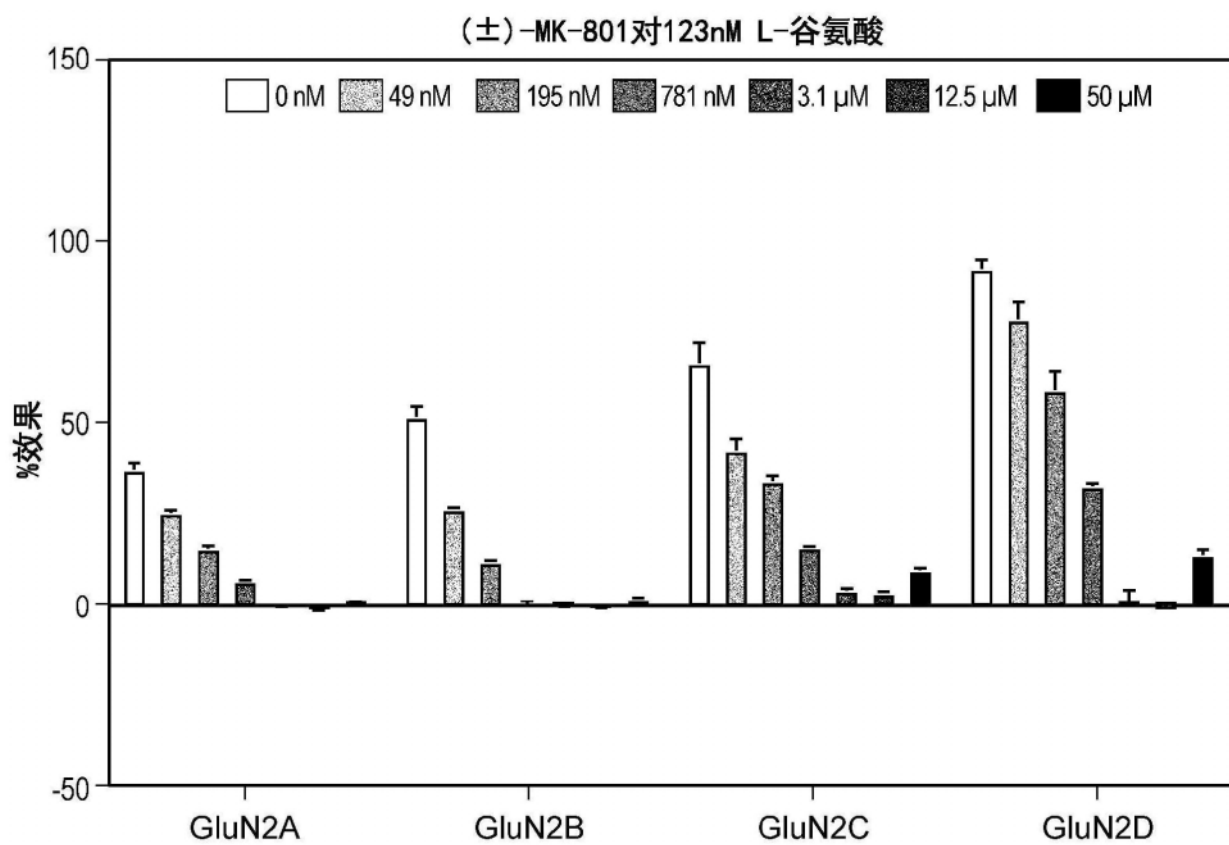


图12D

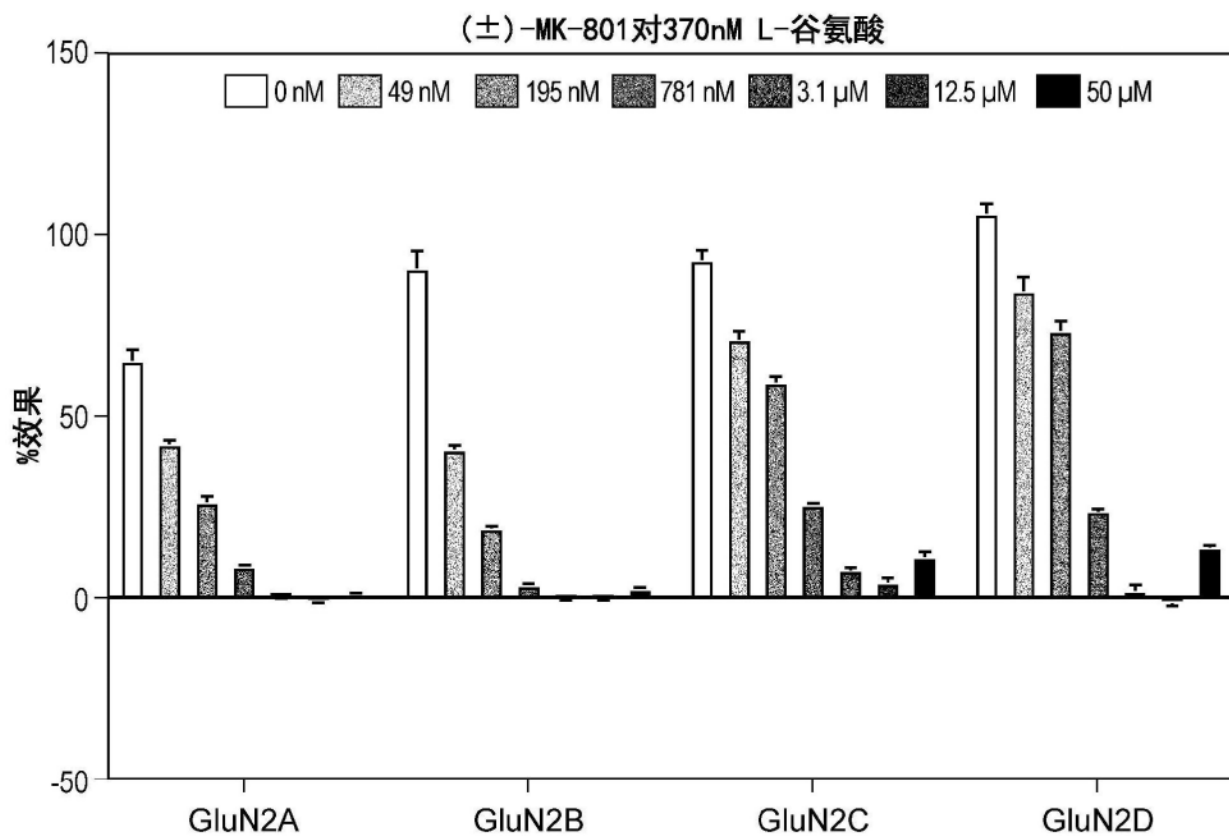


图12E

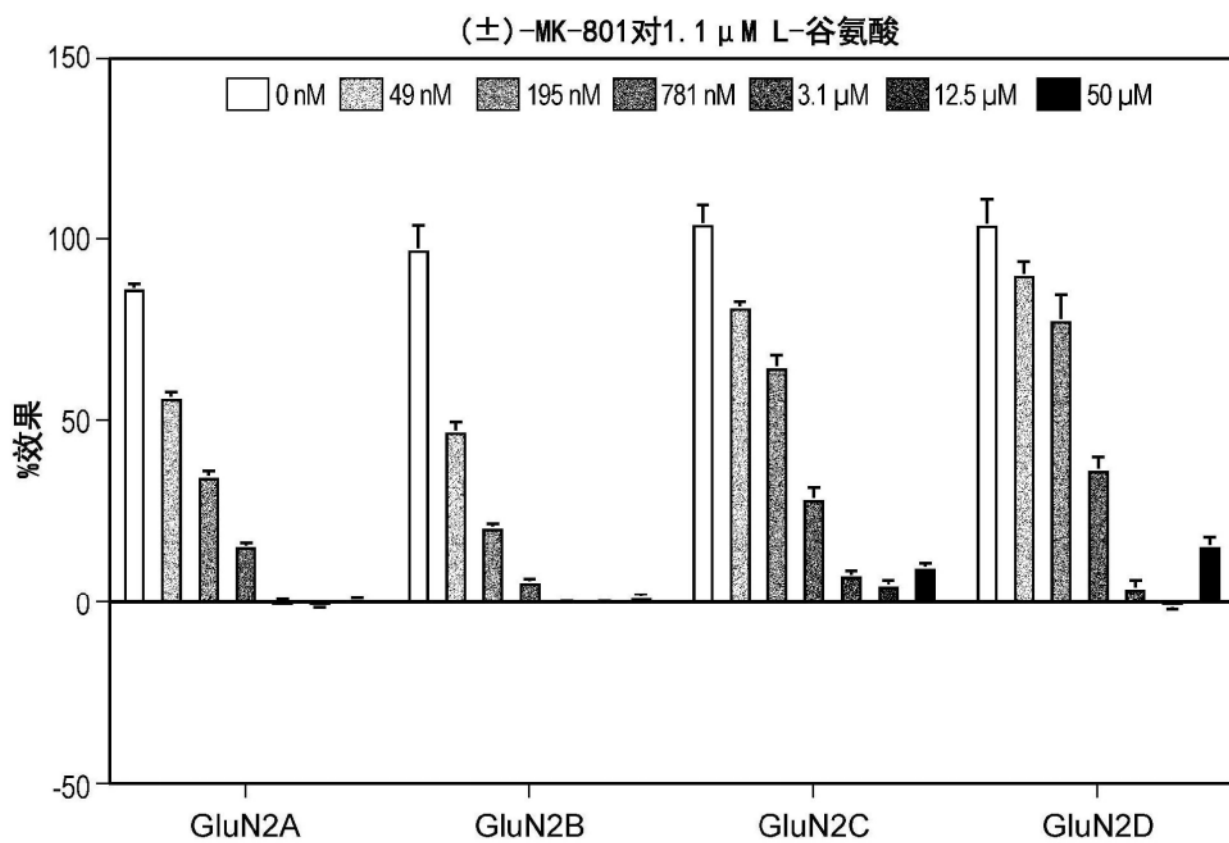


图12F

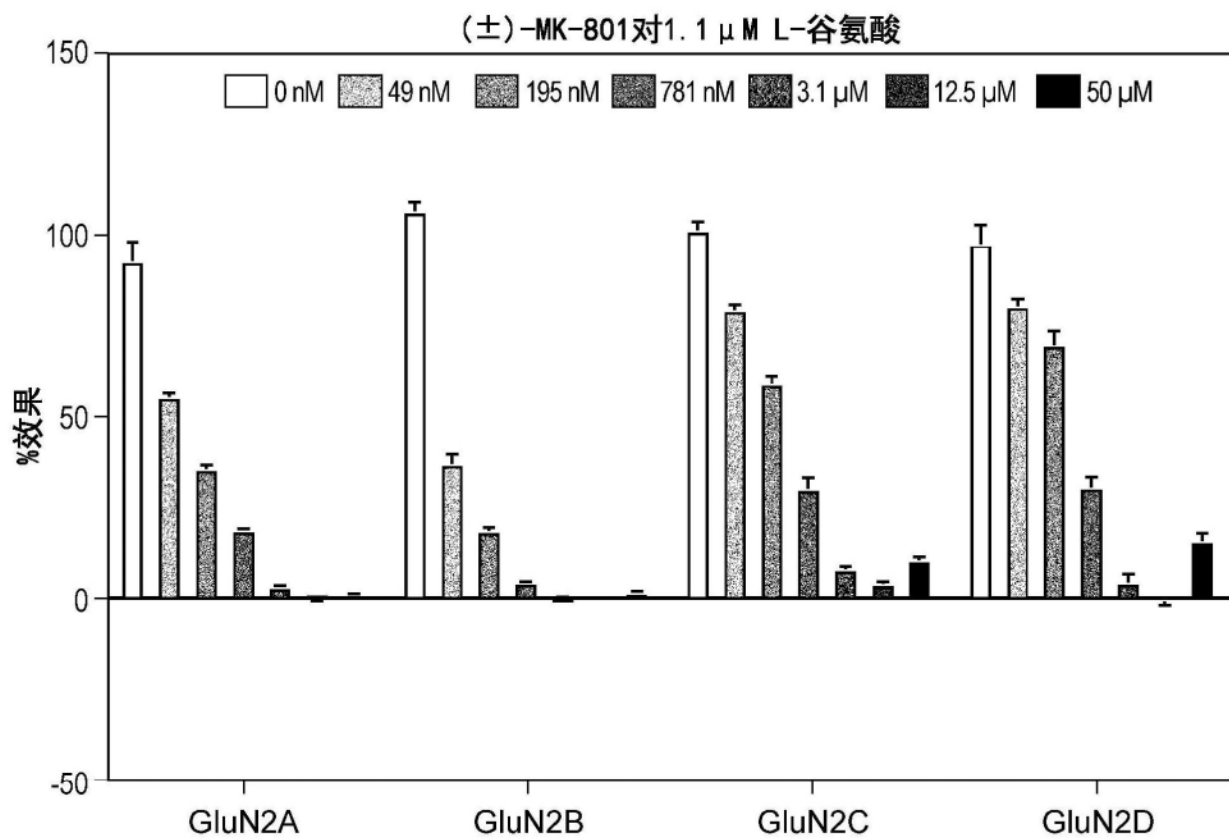


图12G

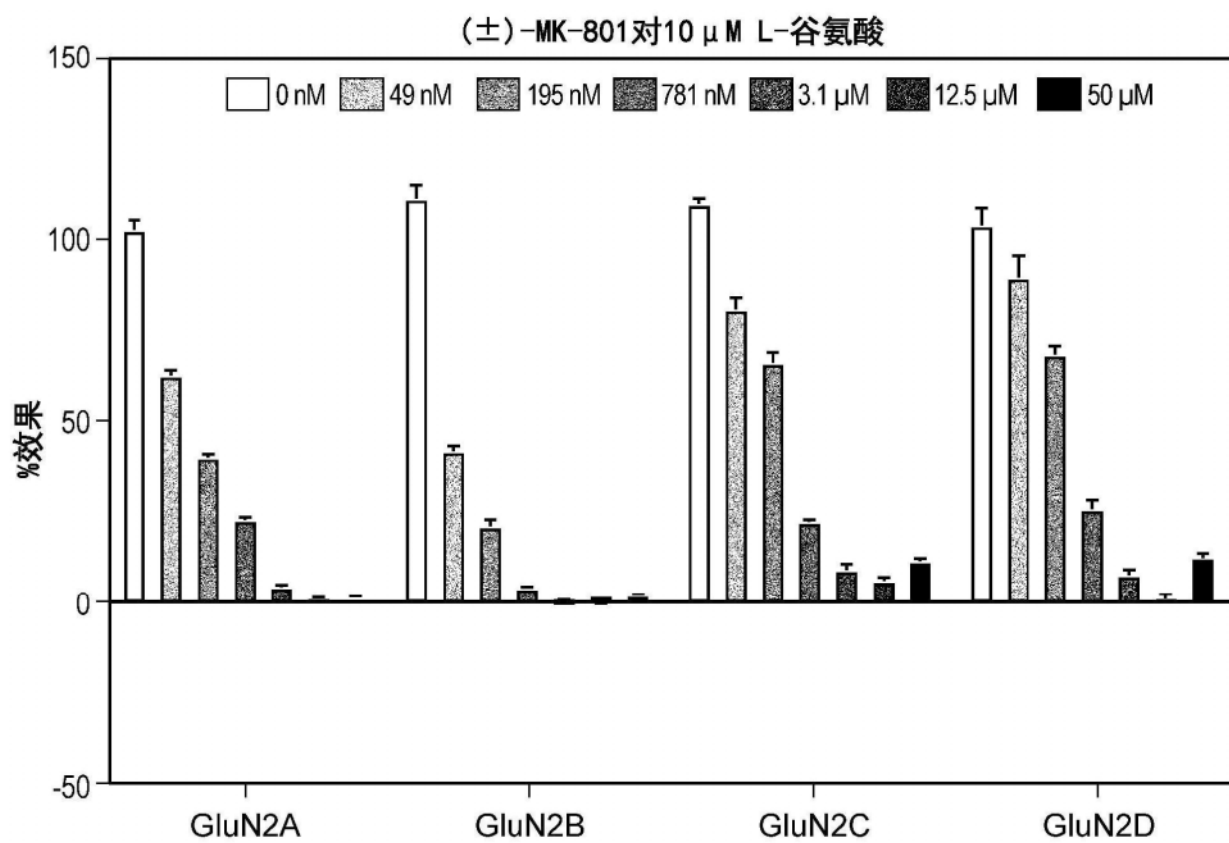


图12H

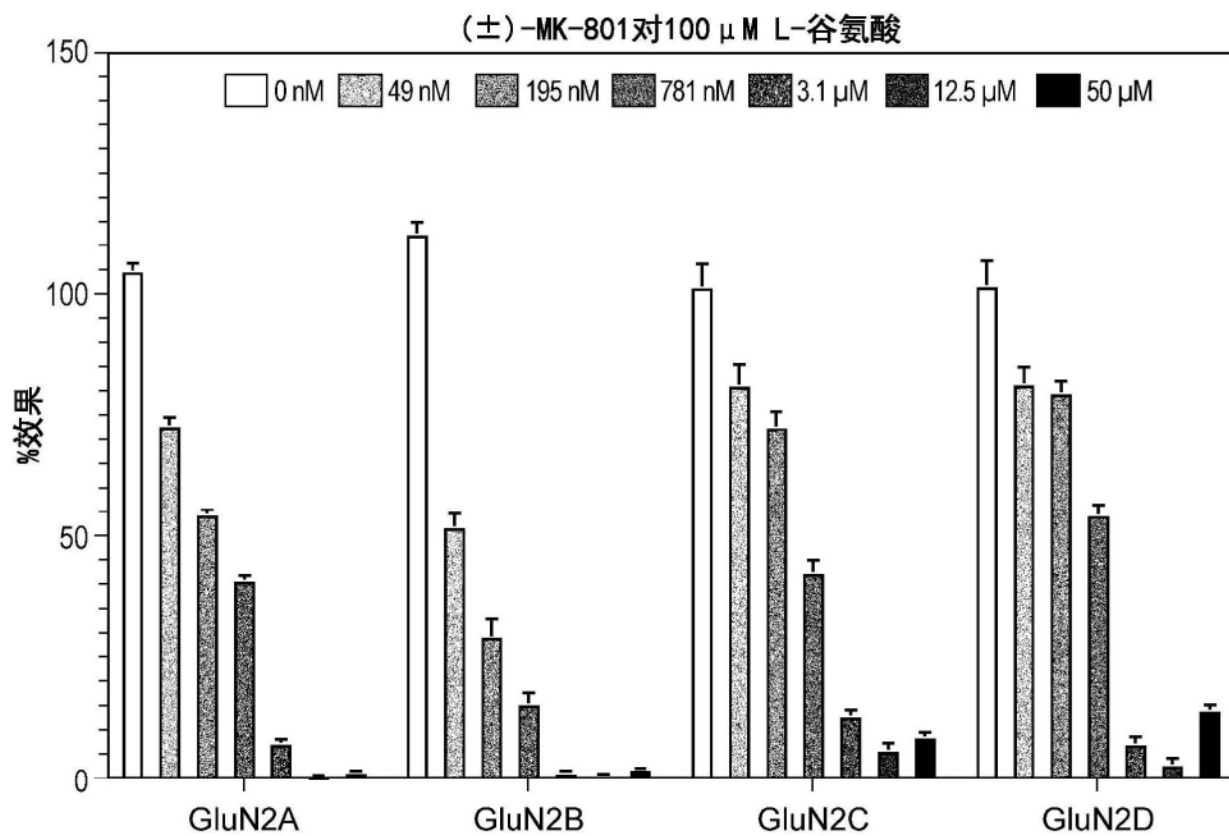


图12I

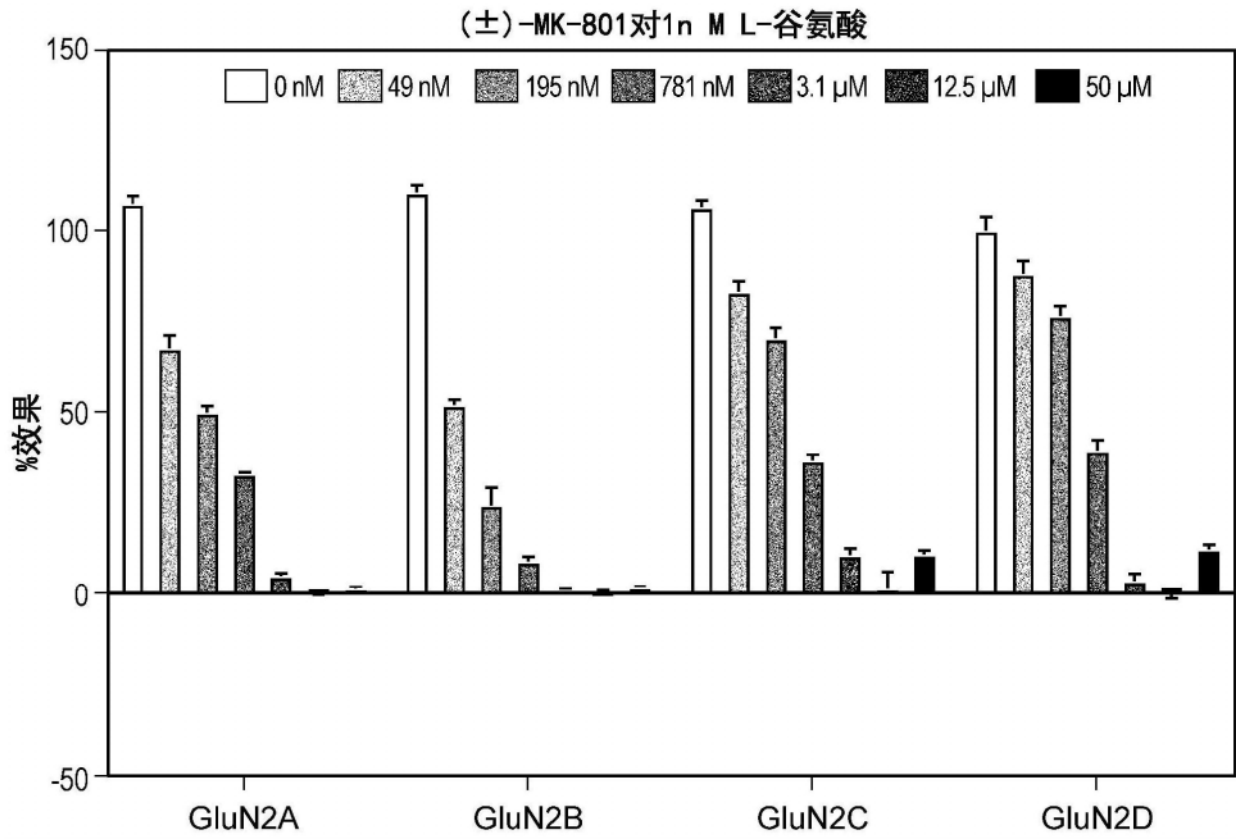


图12J

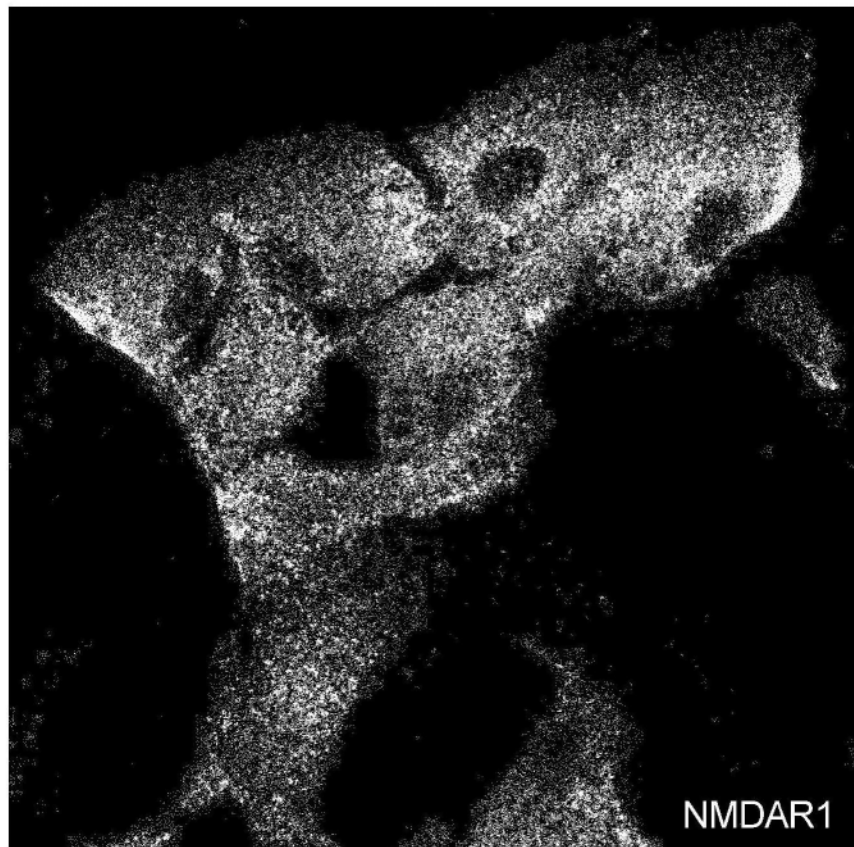


图13A

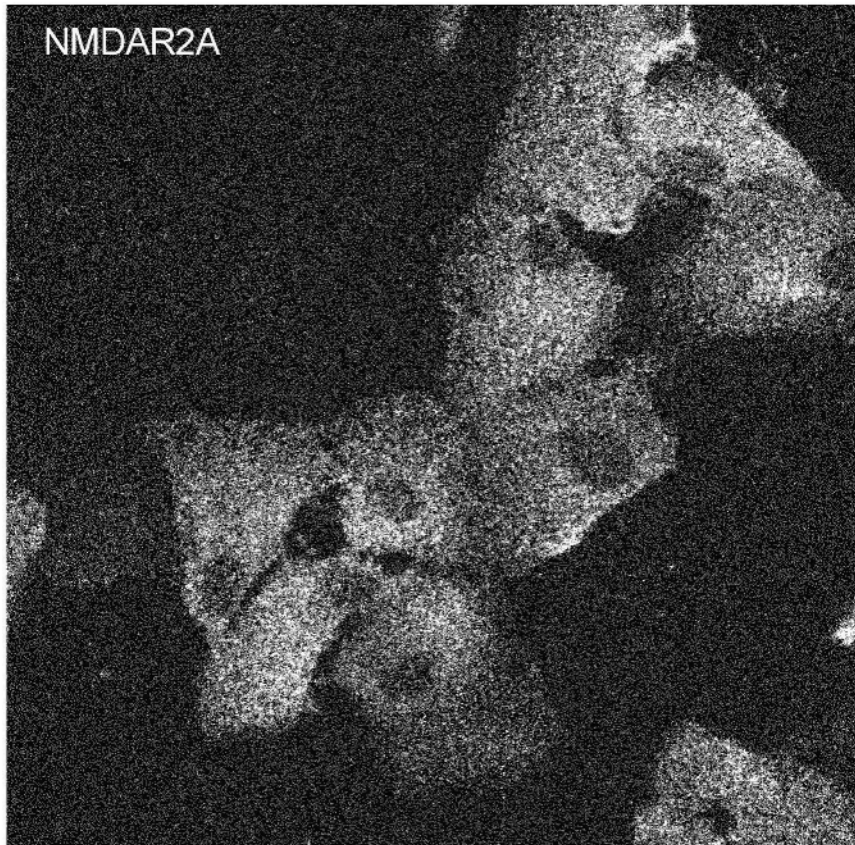


图13B

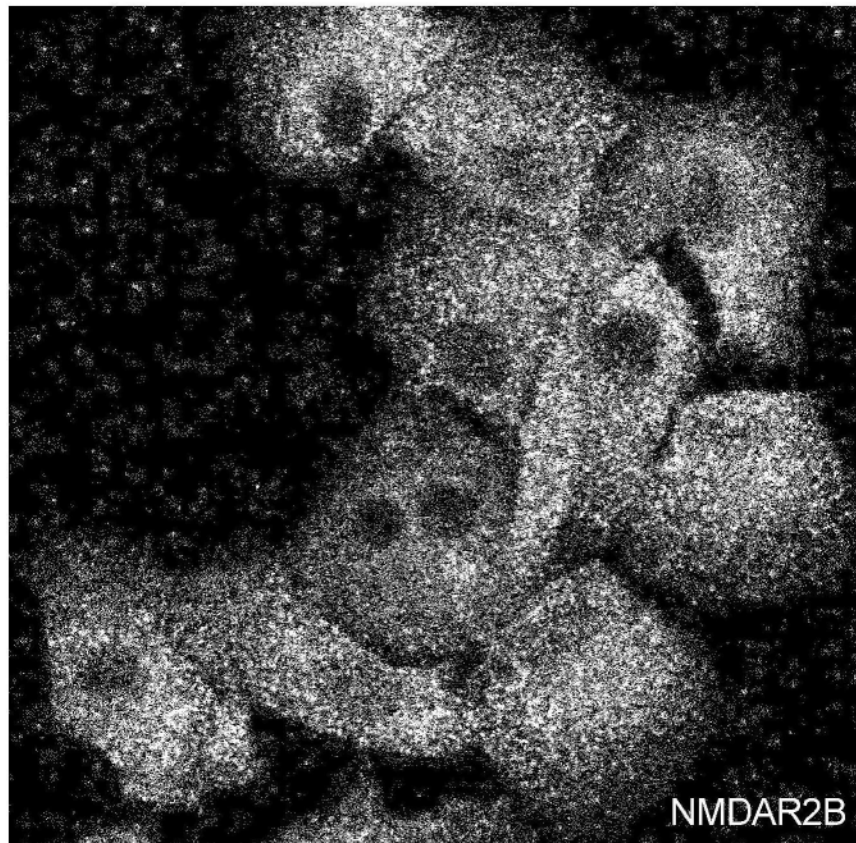


图13C

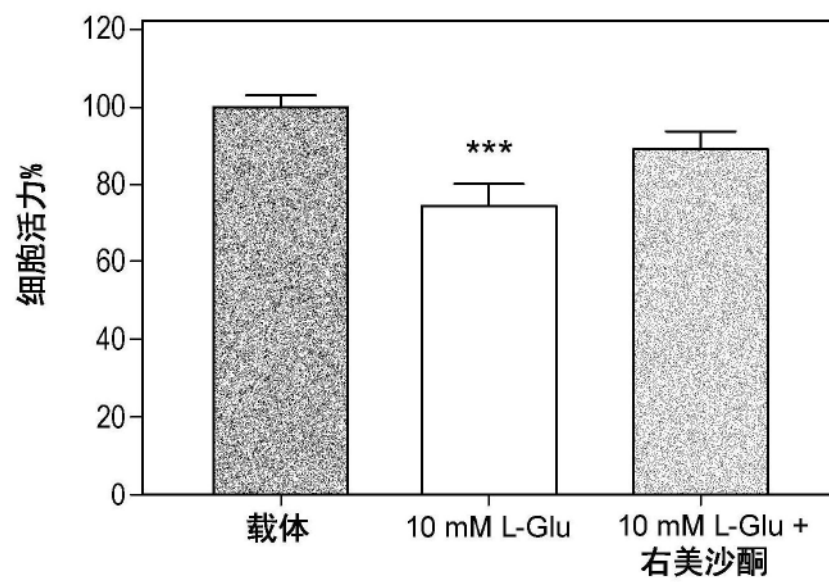


图14

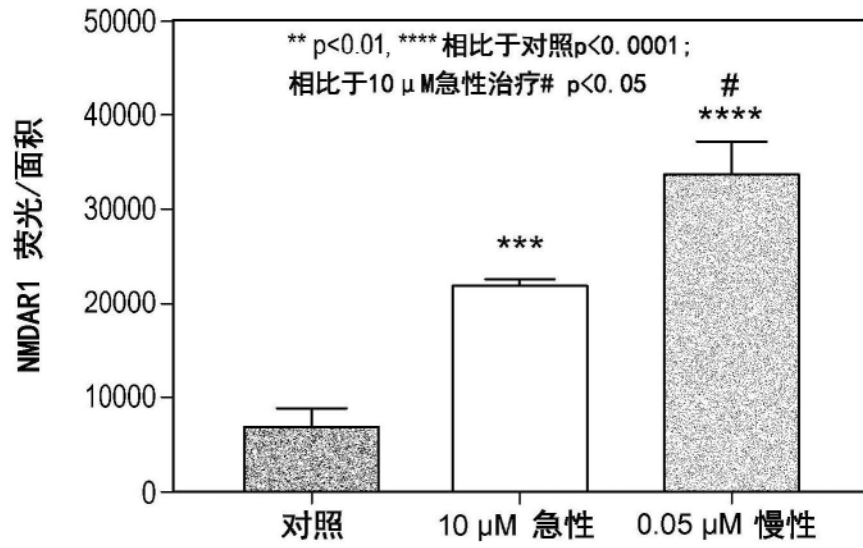


图15A

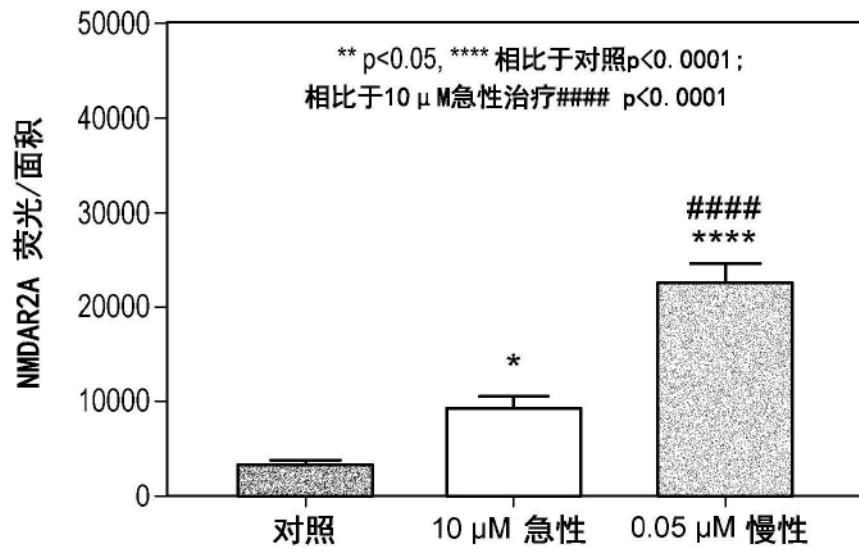


图15B

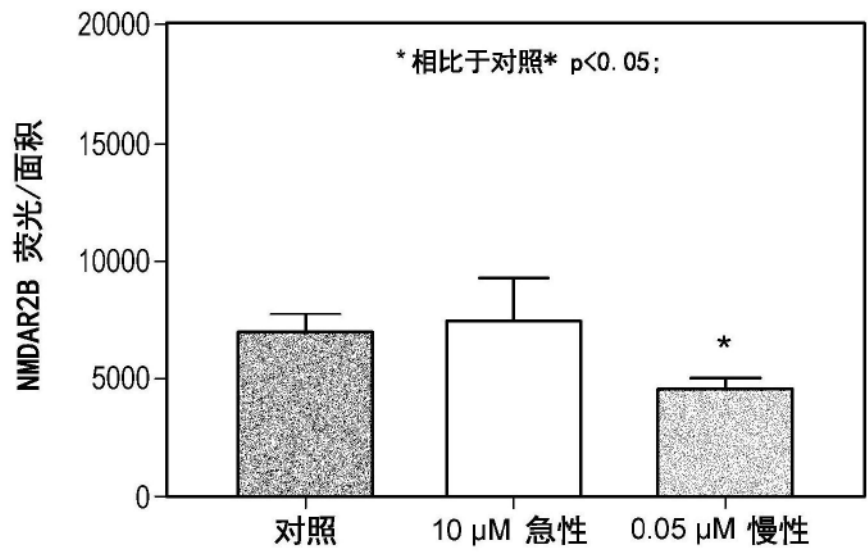


图15C

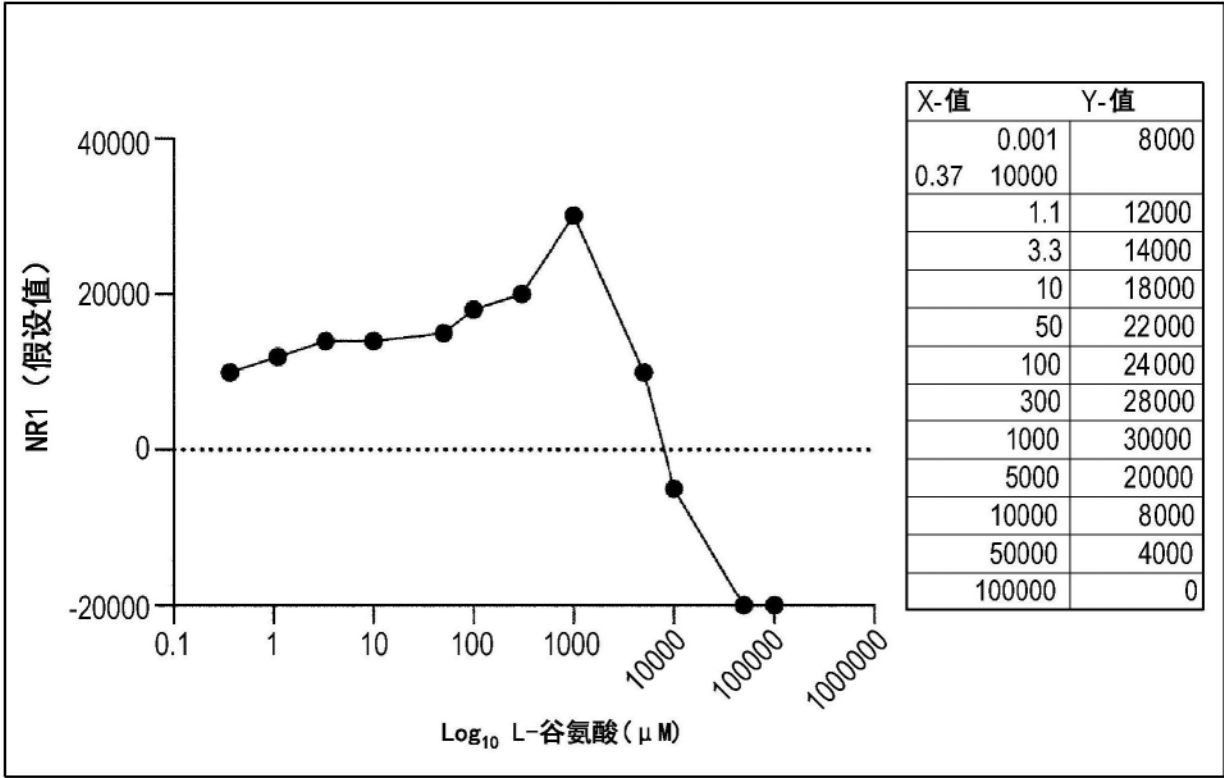


图16

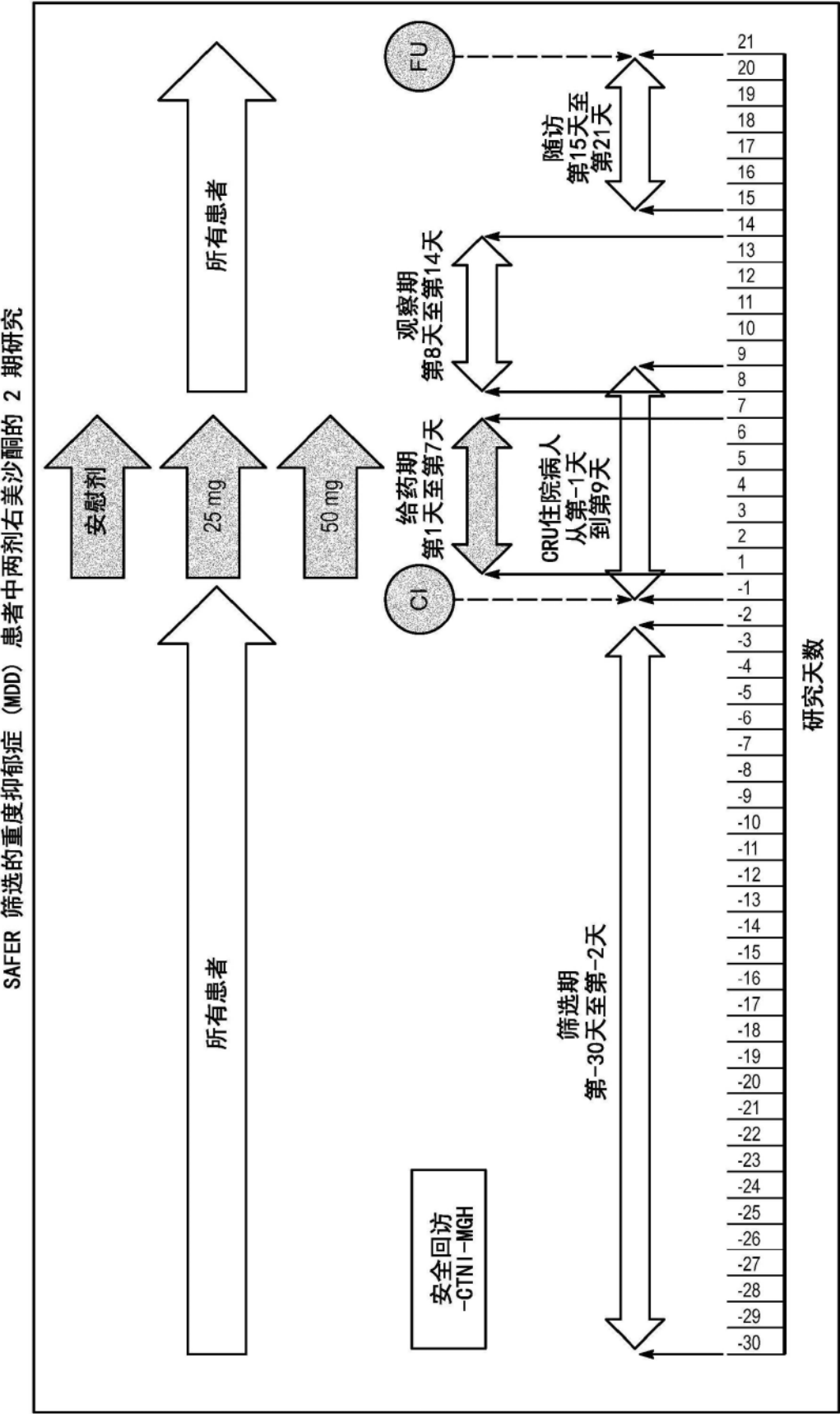


图17

治疗-紧急不良事件-全面汇总安全人群

	不良事件开始时的治疗			
	安慰剂 (N=22)	REL-1017 25mg (N=19)	REL-1017 50mg (N=21)	所有受试者 (N=62)
患有TEAE的受试者数量 (%)	12 (54.5%)	9 (47.4%)	15 (71.4%)	36 (58.1%)
患有危急 TEAE 的受试者数量 (%)	0	0	0	0
患有严重 TEAE 的受试者数量 (%)	0	0	0	0
患有相关 TEAE 的受试者数量 (%)	7 (31.8%)	6 (31.6%)	10 (47.6%)	23 (37.1%)
因 TEAR 停药的受试者人数 (%)	0	0	0	0
因 TEAE 终止研究的受试者人数 (%)	0	0	0	0
患有AESI 的受试者数量 (%)	2 (9.1%)	4 (21.1%)	2 (9.5%)	8 (12.9%).

图18

按系统器官类别和首选项安全人群划分的治疗-紧急不良事件

系统器官类别/首选项	安慰剂 (N=22)	REL-1017 25mg (N=19)	REL-1017 50mg (N=21)	所有受试者 (N=62)
患有任何TEAE的受试者[1]	12 (54.5%)	9 (47.4%)	15 (71.4%)	36 (58.1%)
肠胃疾病	8 (36.4%)	5 (26.3%)	5 (23.8%)	18 (29.0%)
便秘	3 (13.6%)	1 (5.3%)	3 (14.3%)	7 (11.3%)
恶心	2 (9.1%)	1 (5.3%)	2 (9.5%)	5 (8.1%)
腹泻	3 (13.6%)	0	0	3 (4.8%)
腹部不适	2 (9.1%)	0	0	2 (3.2%)
消化不良	0	2 (10.5%)	0	2 (3.2%)
气胀	0	1 (5.3%)	0	1 (1.6%)
胃食管返流疾病	1 (4.5%)	0	0	1 (1.6%)
呕吐	0	1 (5.3%)	0	1 (1.6%)
神经系统障碍	6 (27.3%)	4 (21.1%)	6 (28.6%)	16 (25.8%)
头痛	3 (13.6%)	2 (10.5%)	3 (14.3%)	8 (12.9%)
嗜睡	2 (9.1%)	1 (5.3%)	1 (4.8%)	4 (6.5%)
头晕	1 (4.5%)	1 (5.3%)	1 (4.8%)	3 (4.8%)
镇静	1 (4.5%)	1 (5.3%)	0	2 (3.2%)
昏厥前状态	0	0	1 (4.8%)	1 (1.6%)
震颤	0	0	1 (4.8%)	1 (1.6%)
感染和侵袭	2 (9.1%)	1 (5.3%)	1 (4.8%)	4 (6.5%)
上呼吸道感染	2 (9.1%)	0	0	2 (3.2%)
流行性感冒	0	0	1 (4.8%)	1 (1.6%)
尿道感染	0	1 (5.3%)	0	1 (1.6%)

图19A

按系统器官类别和首选项安全人群划分的治疗-紧急不良事件

系统器官类别/首选项	安慰剂 (N=22)	REL-1017 25mg (N=19)	REL-1017 50mg (N=21)	所有受试者 (N=62)
肌肉骨骼和结缔组织疾病				
背痛	0	1 (5.3%)	3 (14.3%)	4 (6.5%)
肢体不适	0	1 (5.3%)	2 (9.5%)	3 (4.8%)
	0	0	1 (4.8%)	1 (1.6%)
一般疾病和用药部位情况				
应用部位侵蚀	0	1 (5.3%)	2 (9.5%)	3 (4.8%)
疲劳	0	0	1 (4.8%)	1 (1.6%)
轻松感	0	1 (5.3%)	0	1 (1.6%)
	0	0	1 (4.8%)	1 (1.6%)
调查				
体重下降	0	0	3 (14.3%)	3 (4.8%)
血压增加	0	0	2 (9.5%)	2 (3.2%)
	0	0	1 (4.8%)	1 (1.6%)
精神障碍				
异常做梦	1 (4.5%)	0	1 (4.8%)	2 (3.2%)
坐立不安	1 (4.5%)	0	0	1 (1.6%)
	0	0	1 (4.8%)	1 (1.6%)
心脏异常				
心悸	0	1 (5.3%)	0	1 (1.6%)
	0	1 (5.3%)	0	1 (1.6%)
肝胆疾病				
药物性肝损伤	0	0	1 (4.8%)	1 (1.6%)
	0	0	1 (4.8%)	1 (1.6%)
代谢和营养障碍				
低钙血症	0	0	1 (4.8%)	1 (1.6%)
	0	0	1 (4.8%)	1 (1.6%)
肾脏和泌尿系统障碍				
频尿	0	1 (5.3%)	0	1 (1.6%)
	0	1 (5.3%)	0	1 (1.6%)
皮肤和皮下组织疾病				
瘙痒	0	1 (5.3%)	0	1 (1.6%)
	0	1 (5.3%)	0	1 (1.6%)

图19B

按系统器官类别和首选项安全人群划分的治疗-紧急不良事件

系统器官类别/首选项	安慰剂 (N=22)	REL-1017 25mg (N=19)	REL-1017 50mg (N=21)	所有受试者 (N=62)
患有任何TEAE的受试者[1]	2 (9.1%)	4 (21.1%)	2 (9.5%)	8 (12.9%)
神经系统障碍	2 (9.1%)	3 (15.8%)	1 (4.8%)	6 (9.7%)
头晕	1 (4.5%)	1 (5.3%)	0	2 (3.2%)
镇静	1 (4.5%)	1 (5.3%)	0	2 (3.2%)
嗜睡	0	1 (5.3%)	1 (4.8%)	2 (3.2%)
一般疾病和给药部位条件	0	1 (5.3%)	1 (4.8%)	2 (3.2%)
疲劳	0	1 (5.3%)	0	1 (1.6%)
轻松感	0	0	1 (4.8%)	1 (1.6%)

图20

临床医生管理的解离状态量表评分

访问/时间点	汇总统计	安慰剂 (N=22)	REL-1017 25 mg (N=19)	REL-1017 50 mg (N=21)	所有受试者 (N=62)
第一天, 初始剂量	总评分, n	22	19	21	62
	均值 (80) 中位数 最小, 最大	0.5 (1.4) 0.0 [0, 6]	1.6 (5.1) 0.0 [0, 22]	1.7 (7.6) 0.0 [0, 35]	1.2 (5.3) 0.0 [0, 35]
第1天, 2小时后剂量	总评分, n	21(95.5%) 1(4.5%)	18(94.7%) 1(5.3%)	20(95.2%) 1(4.8%)	59(95.2%) 3(4.8%)
	均值 (80) 中位数 最小, 最大	0.3 (1.3) 0.0 0, 6	0.2 (0.5) 0.0 0, 2	1.8 (4.3) 0.0 0, 14	0.8 (2.7) 0.0 0, 14
第7天(EOP), 2小时后剂量	总评分, n	21	19	21	61
	均值 (80) 中位数 最小, 最大	0.1 (0.7) 0.0 0, 3	0.4 (1.4) 0.0 0, 6	1.4 (3.5) 0.0 0, 12	0.6 (2.3) 0.0 0, 12
第9天 (排放)	总评分, n	21(100%) 0	18(94.7%) 1(5.3%)	18(85.7%) 3(14.3%)	57(93.4%) 4(6.6%)
	均值 (80) 中位数 最小, 最大	1.1 (5.0) 0.0 0, 23	0.0 (0.0) 0.0 0, 0	0.0 (0.0) 0.0 0, 0	0.4 (2.9) 0.0 0, 23
	总评分, n	20(95.2%) 1(4.8%)	19(100%) 0	21(100%) 0	60(98.4%) 1(1.6%)
	均值 (80) 中位数 最小, 最大	0.3 (1.3) 0.0 0, 6	0.2 (0.5) 0.0 0, 2	1.8 (4.3) 0.0 0, 14	0.8 (2.7) 0.0 0, 14

图21

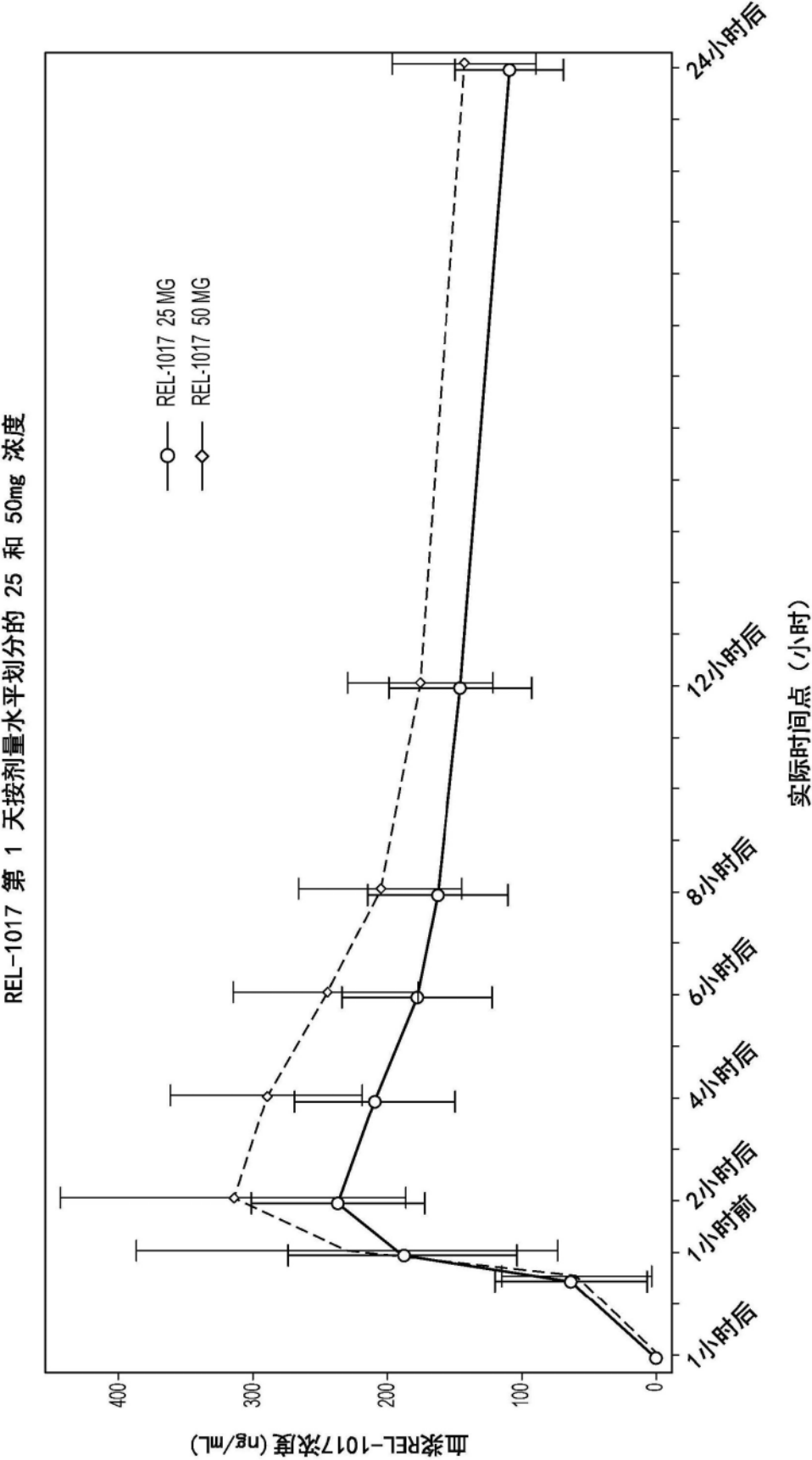


图22

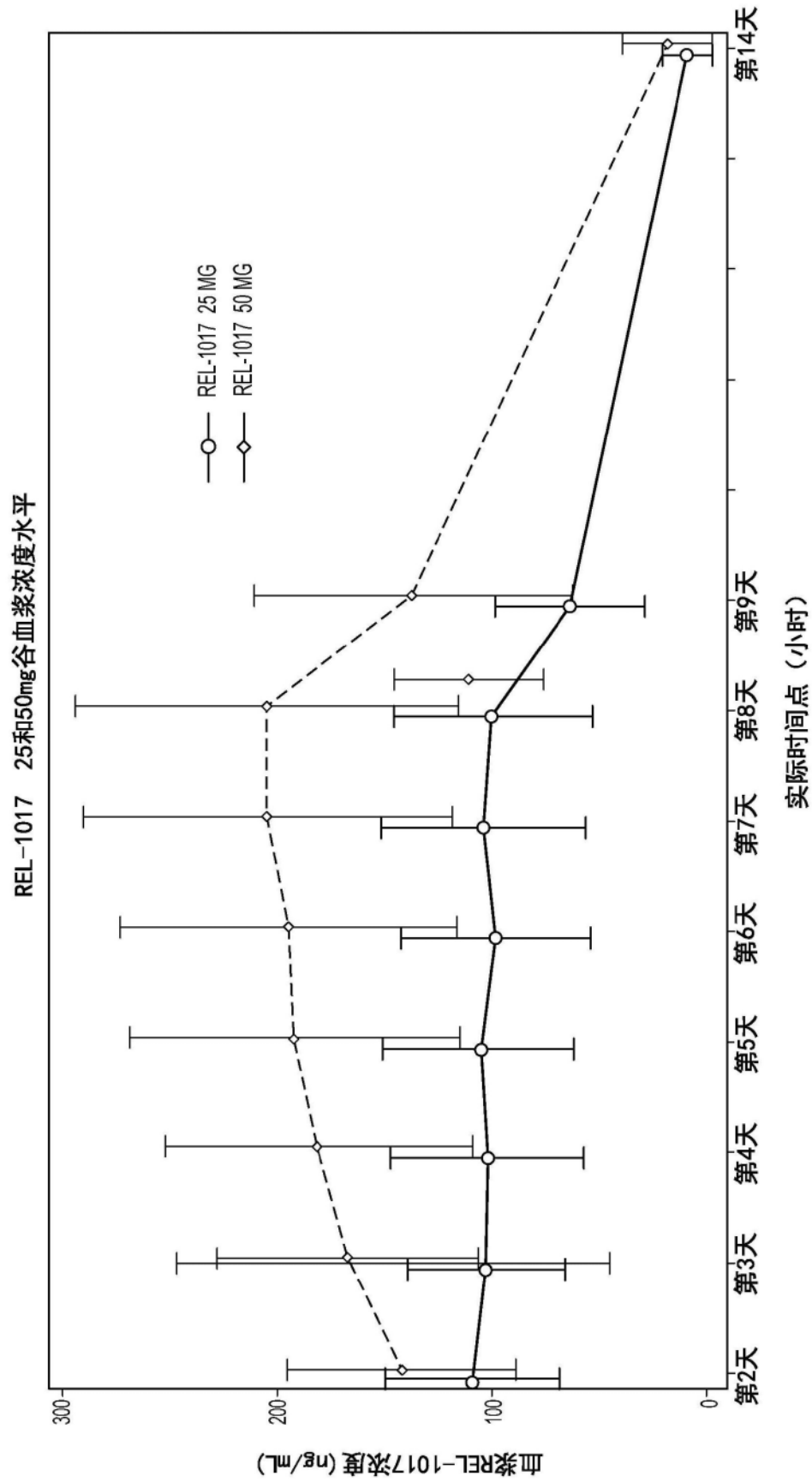


图23

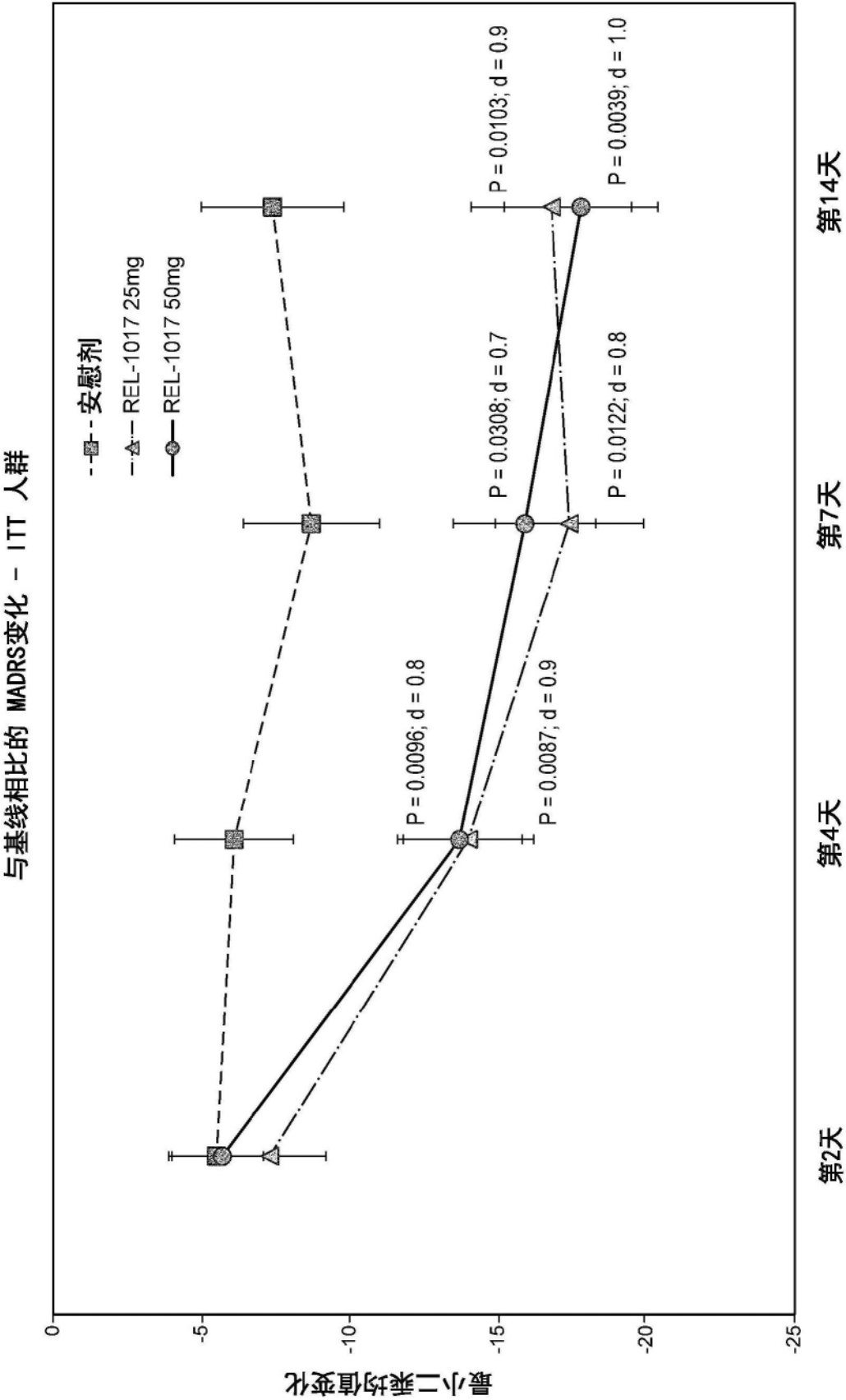


图24

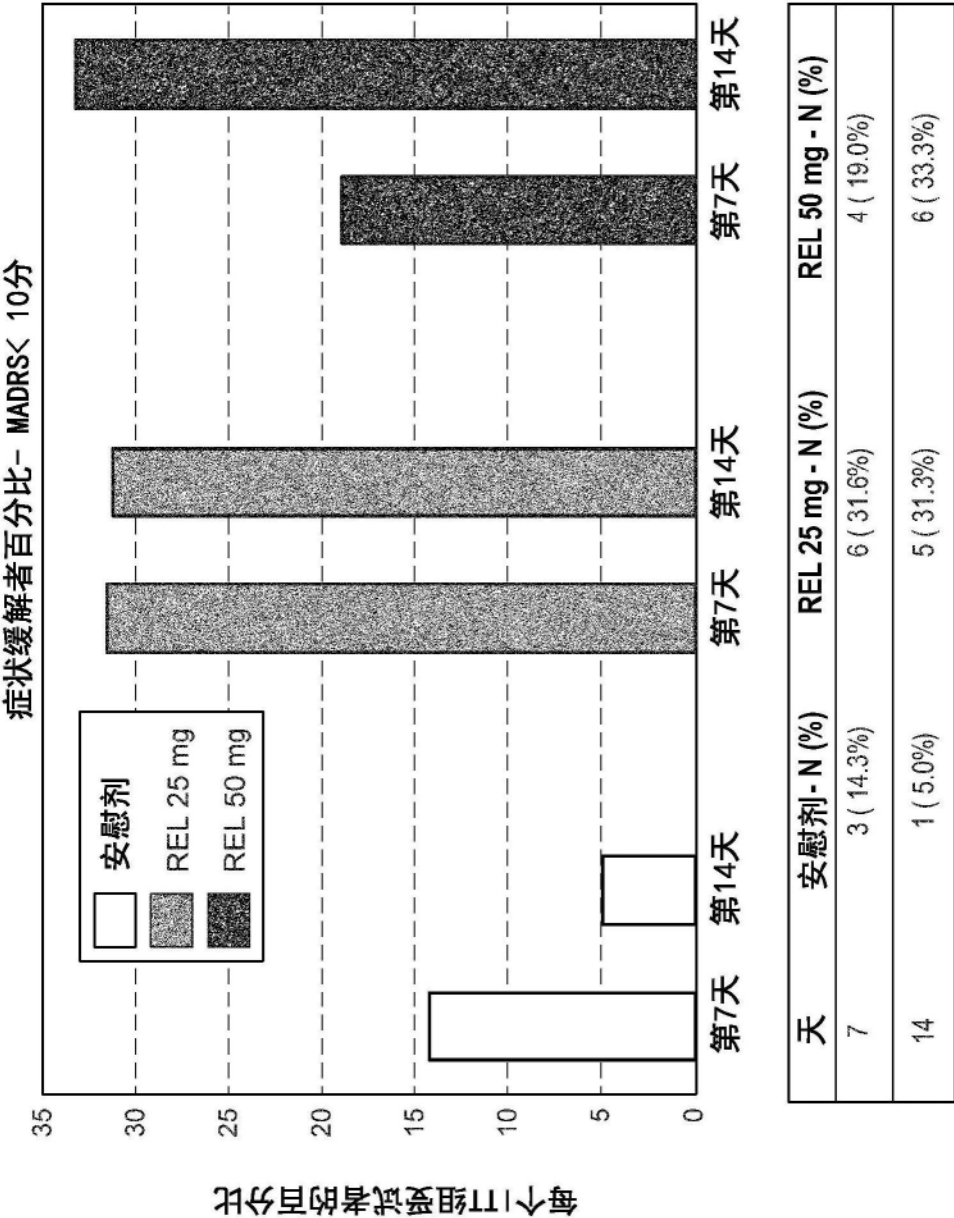


图25

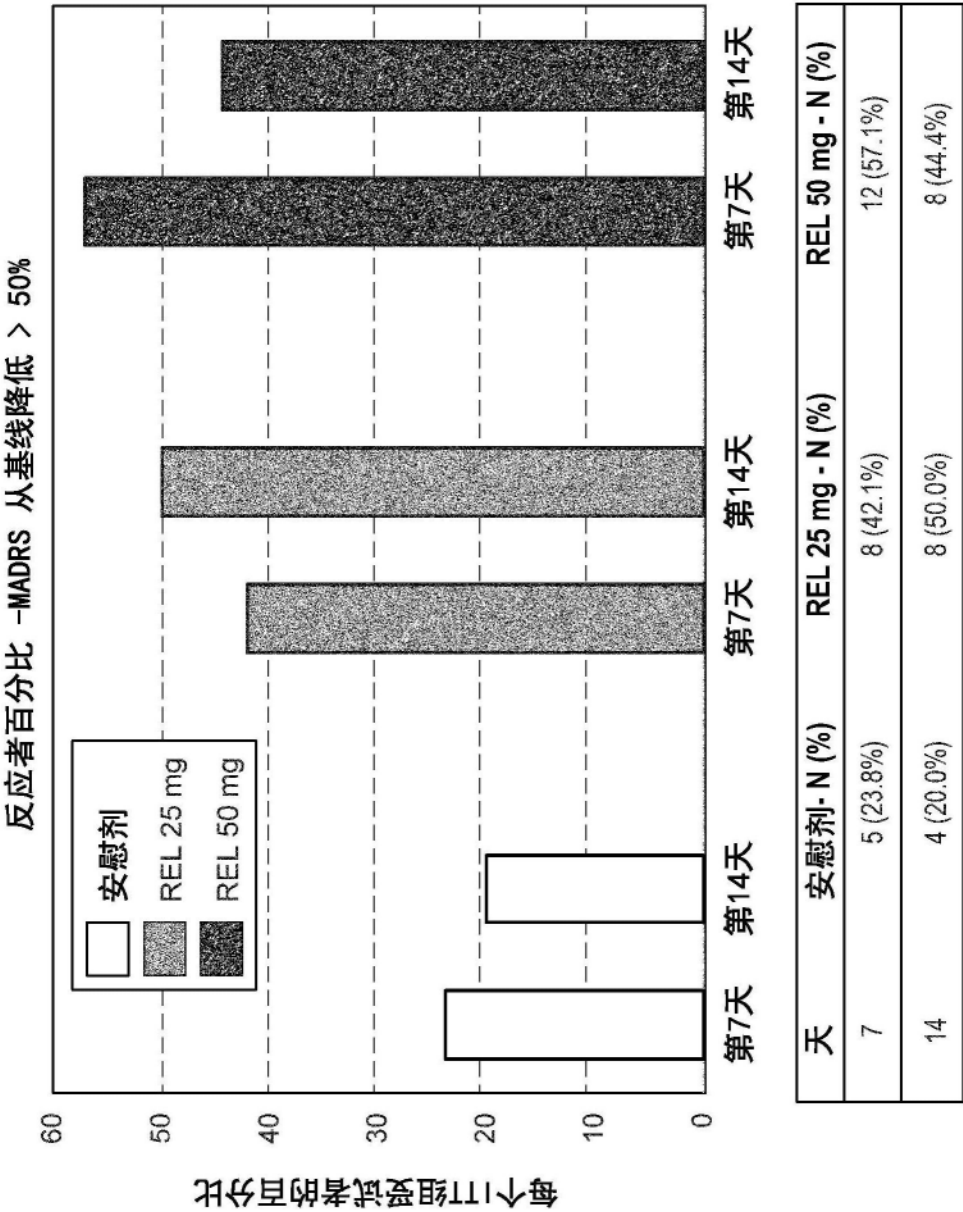


图26

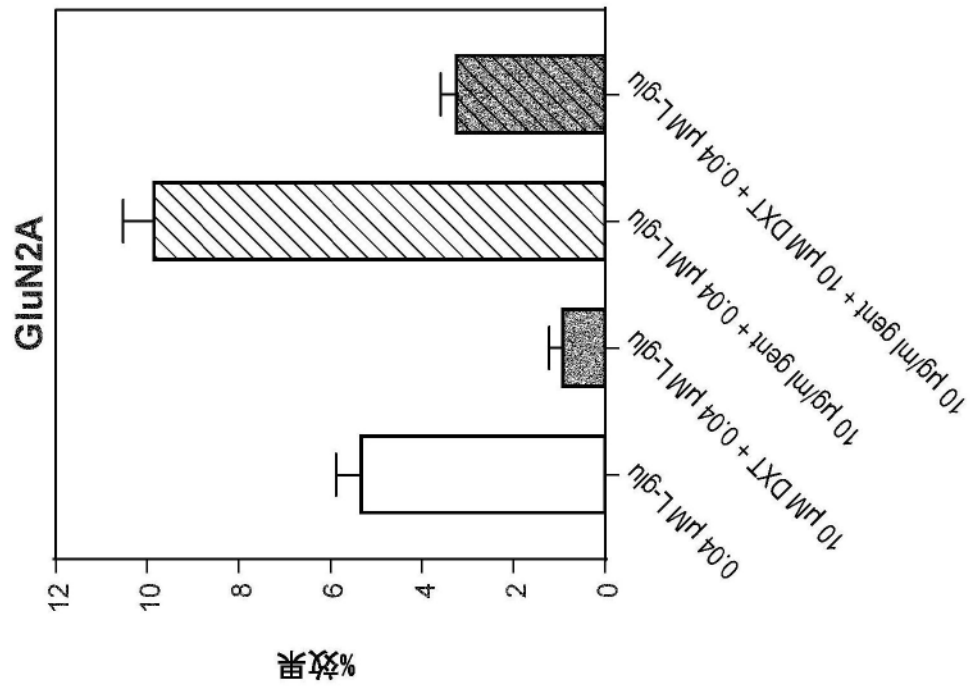


图27A

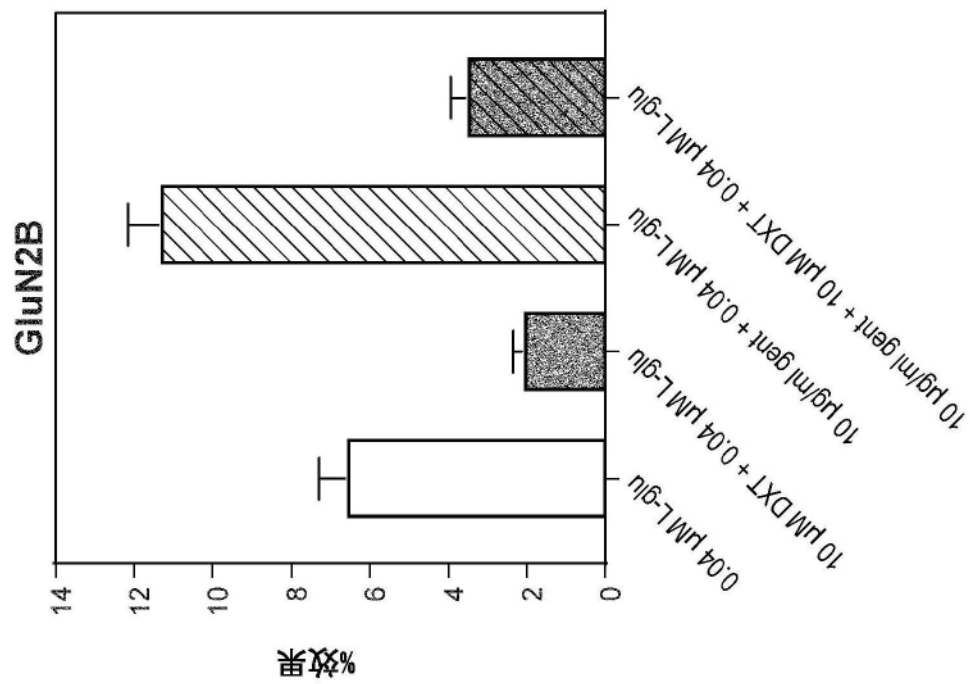


图27B

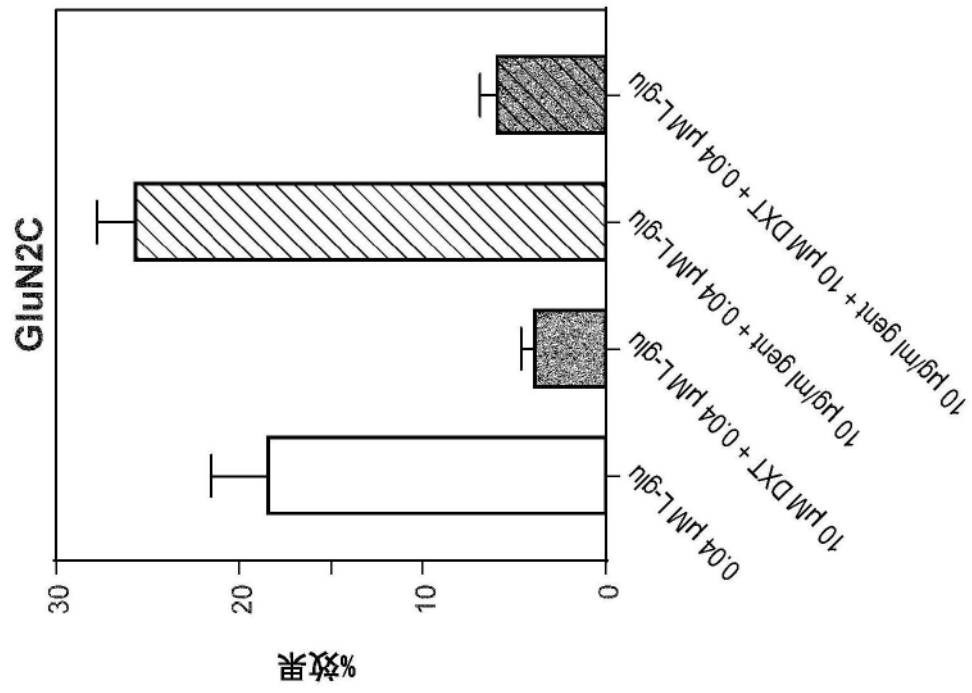


图27C

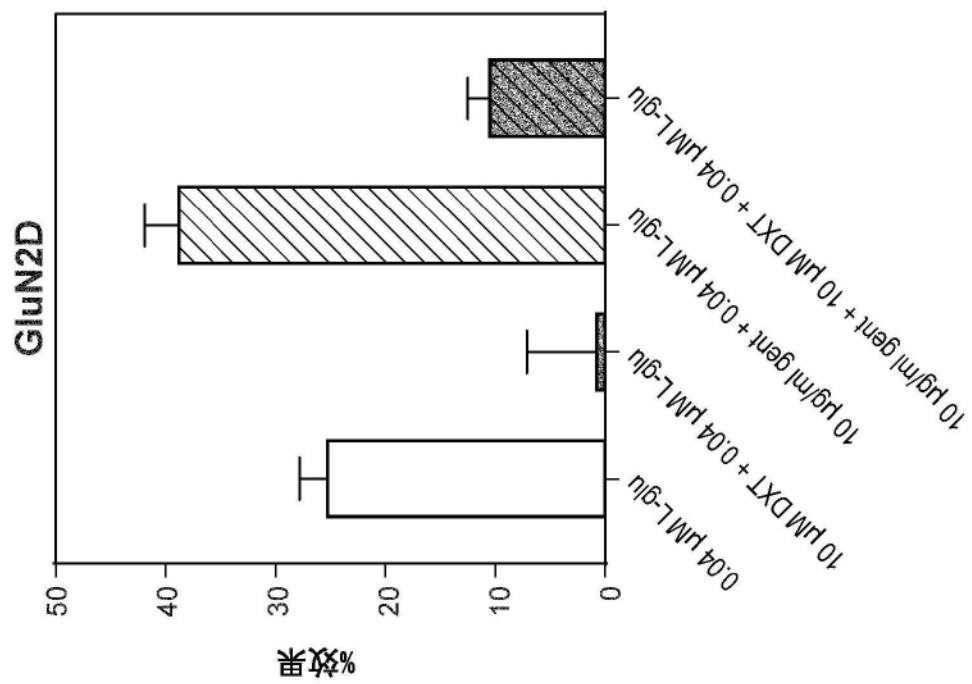


图27D

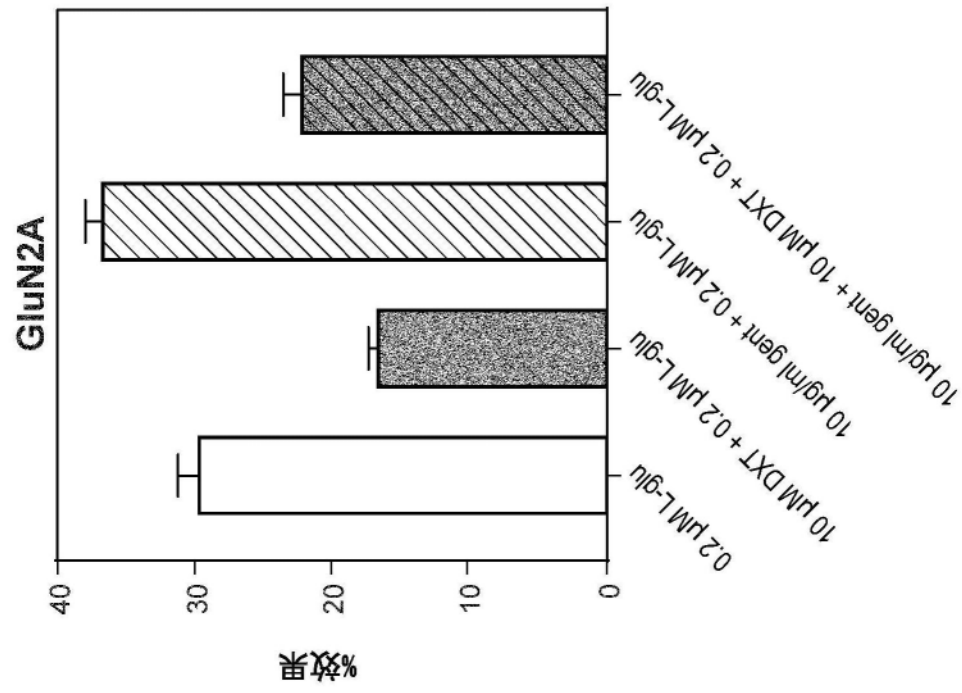


图28A

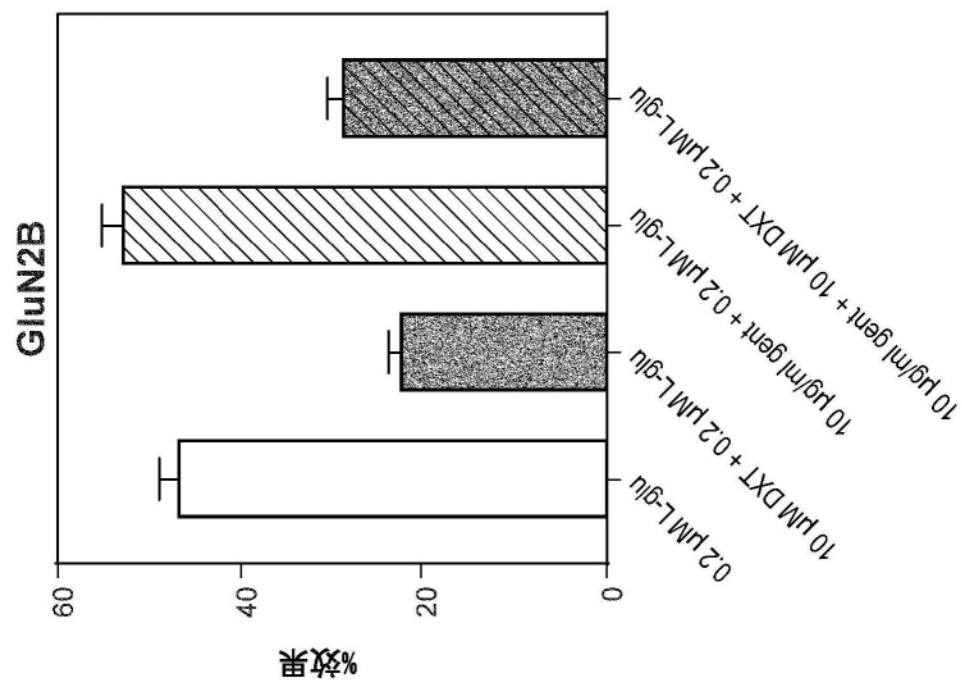


图28B

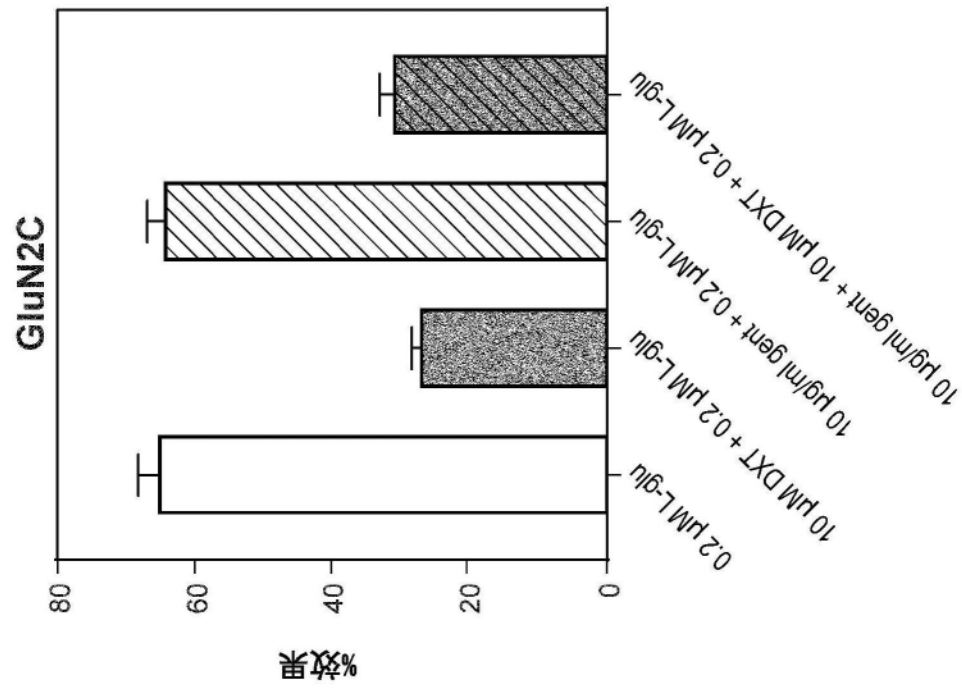


图28C

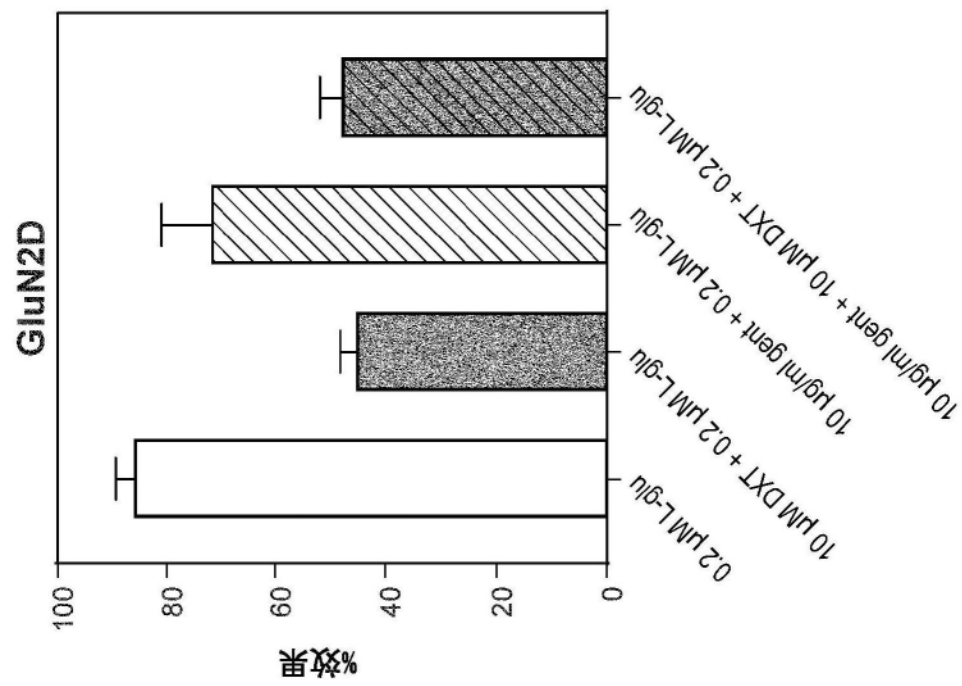


图28D

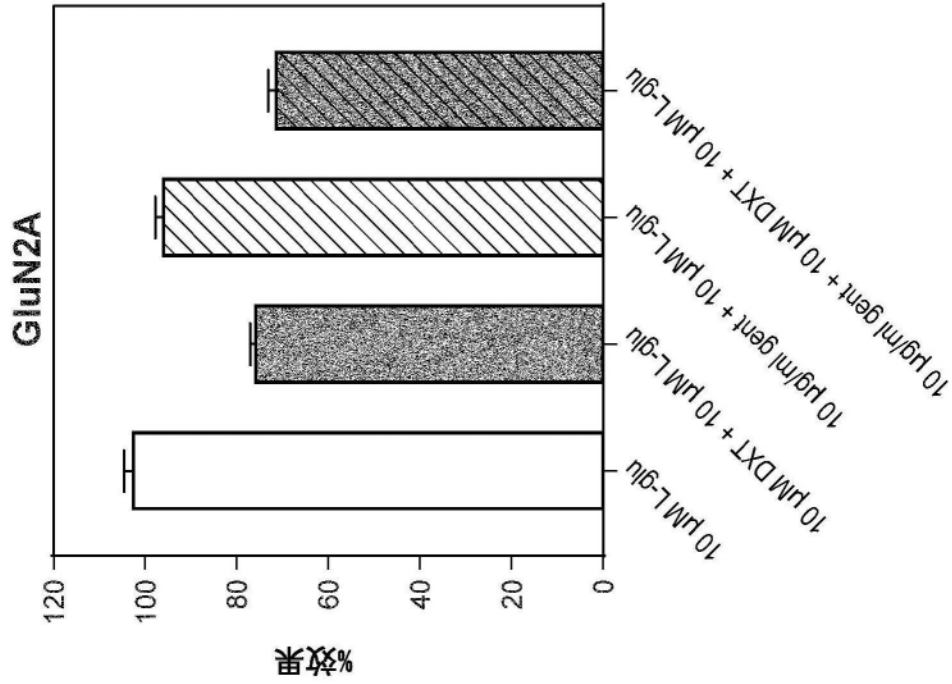


图29A

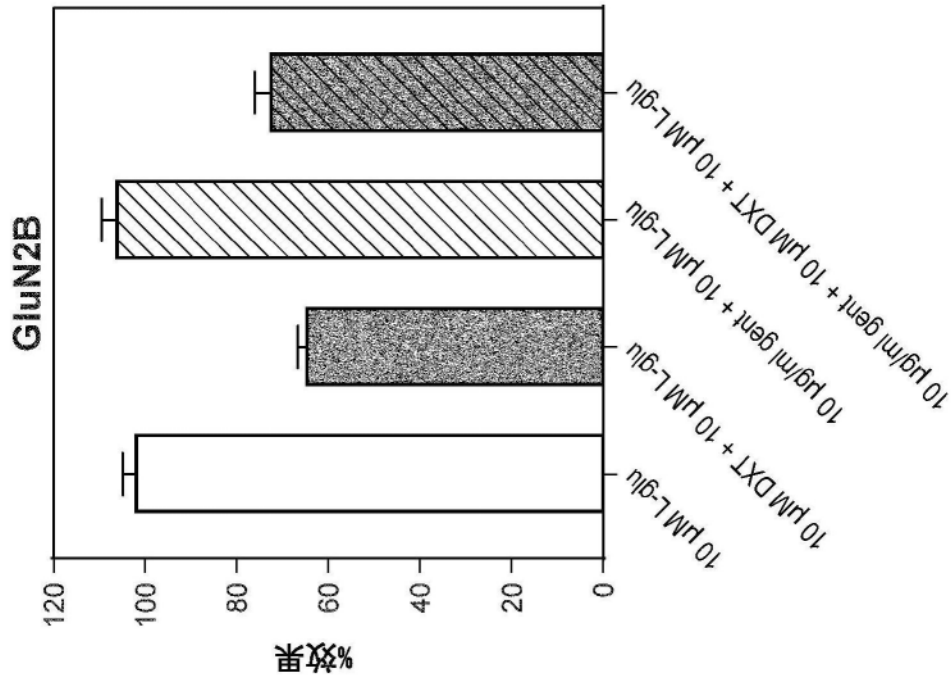


图29B

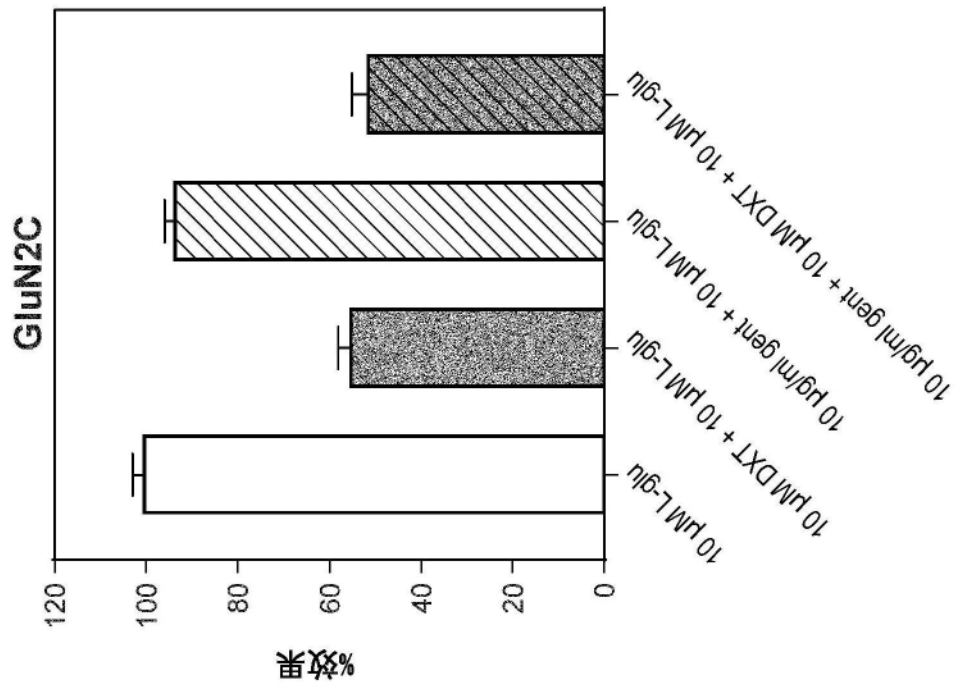


图29C

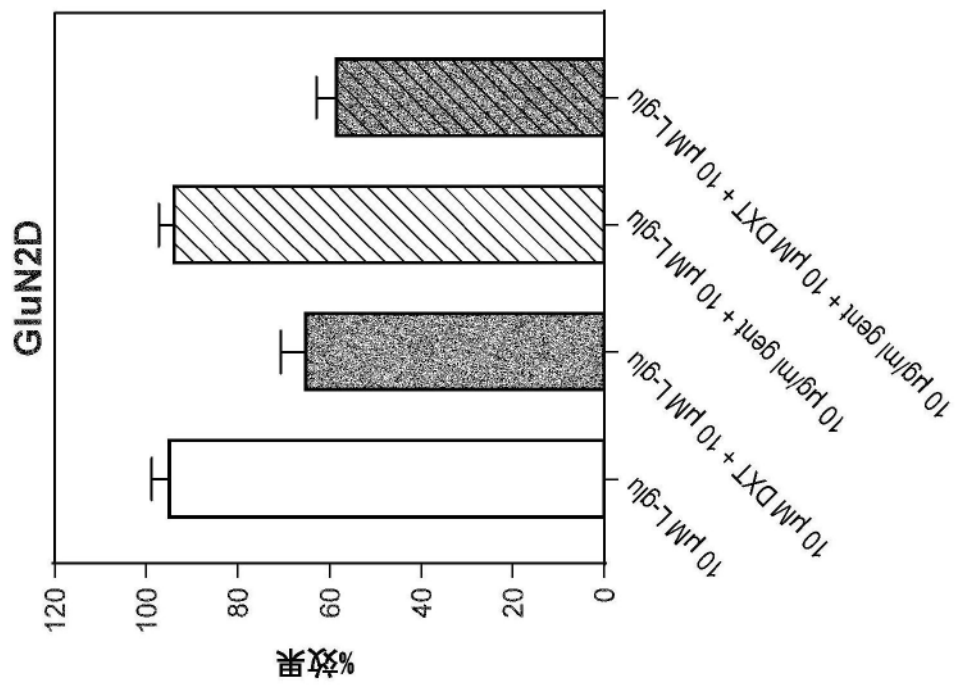


图29D

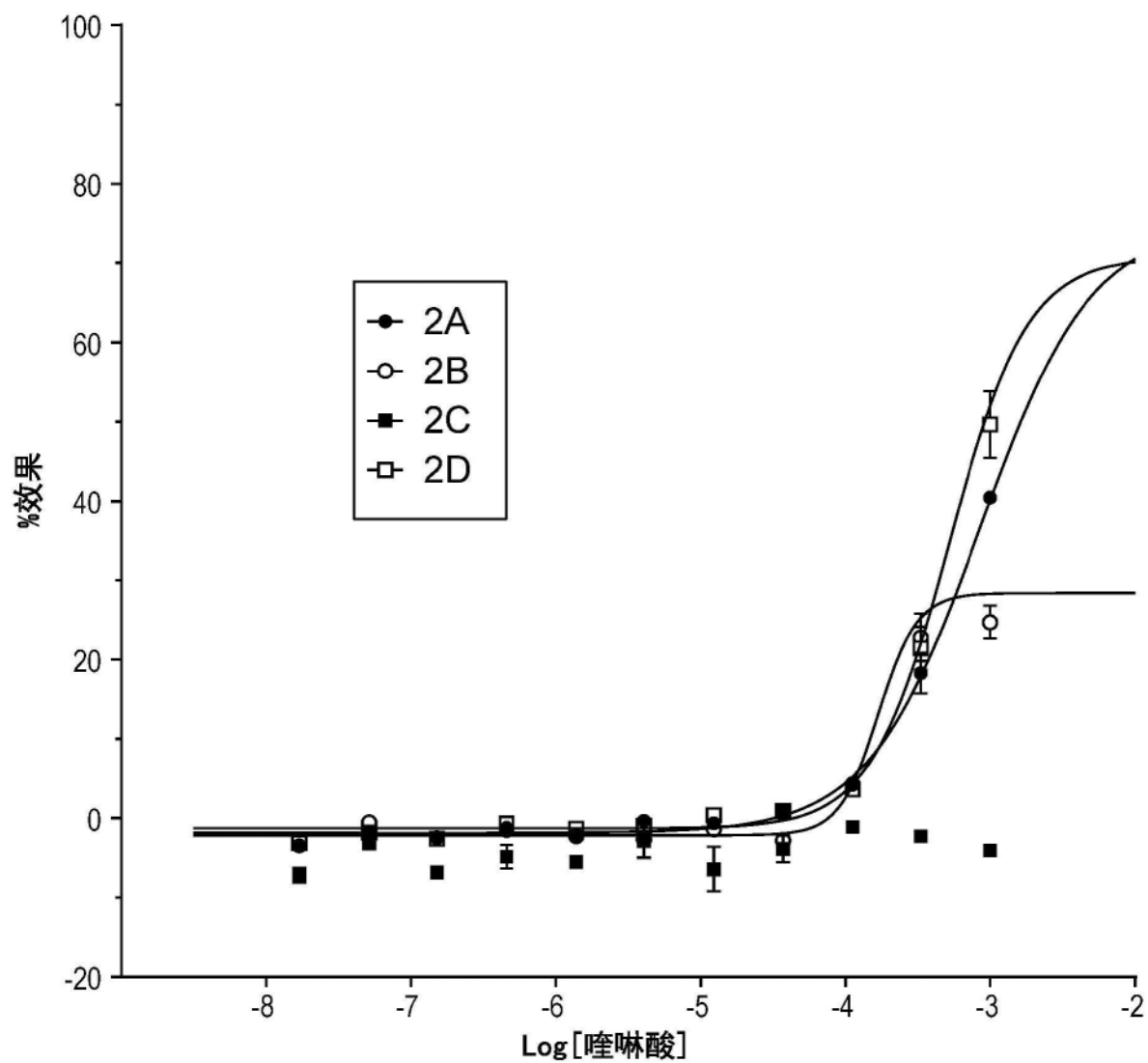


图30

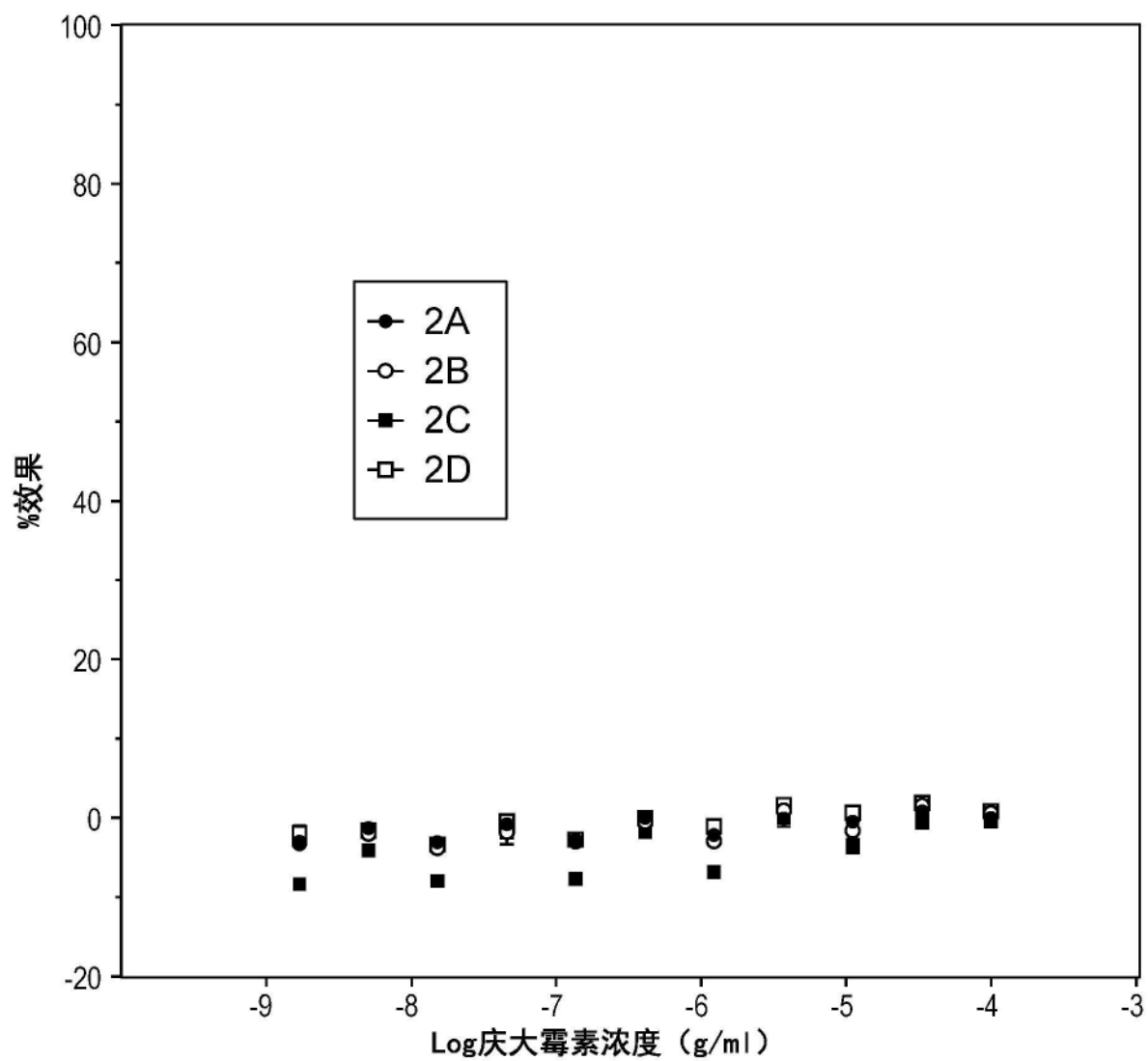


图31

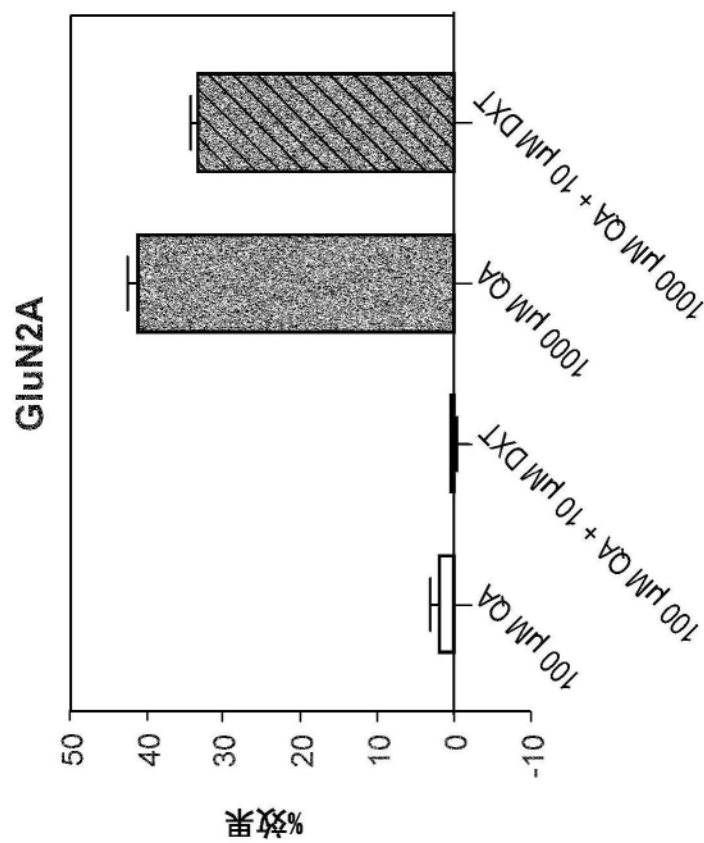


图32A

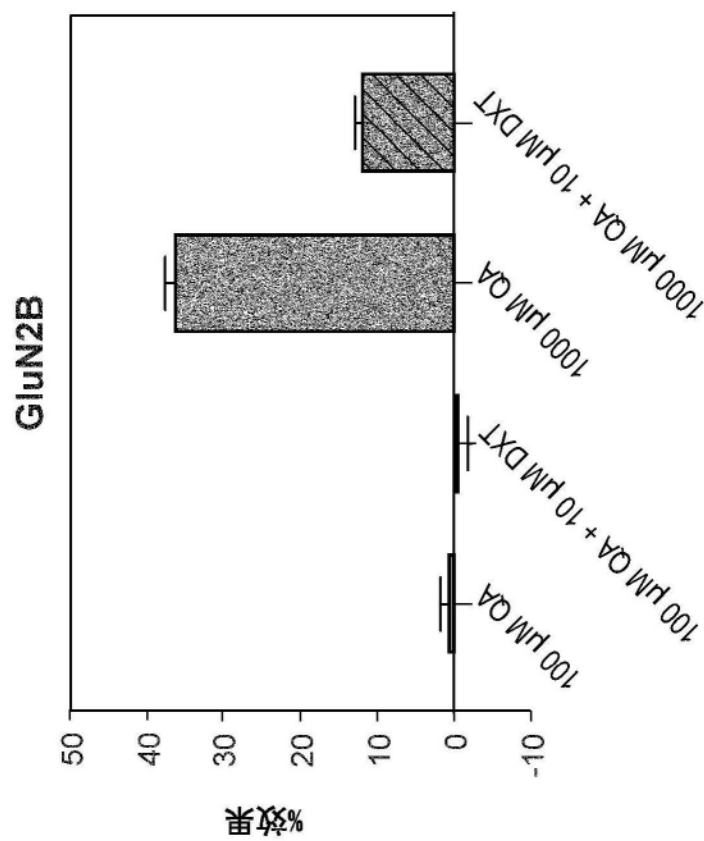


图32B

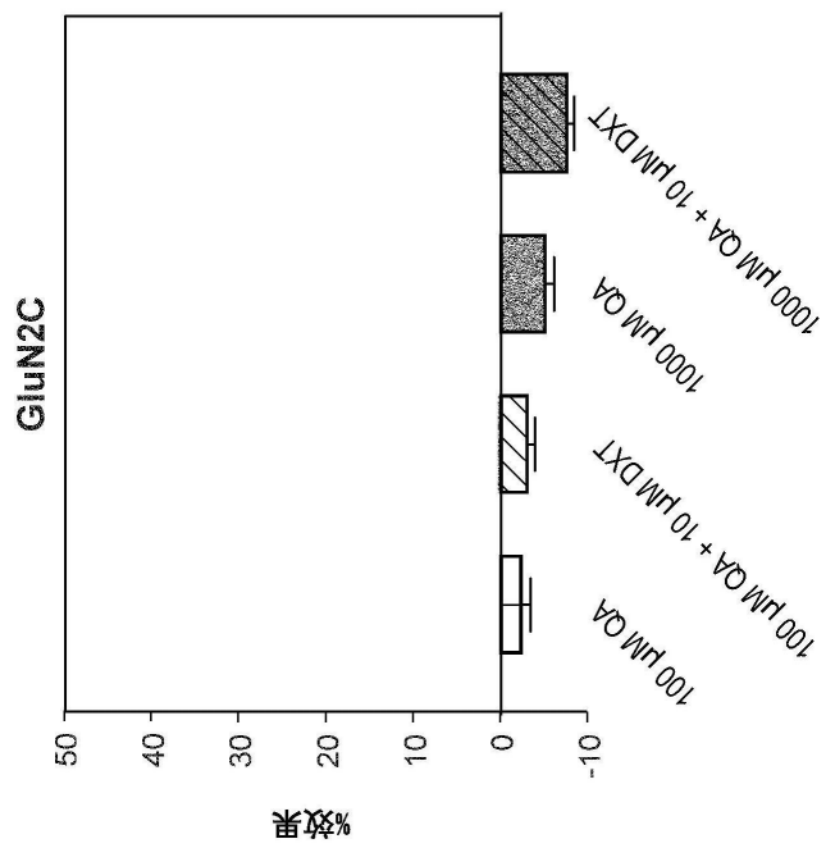


图32C

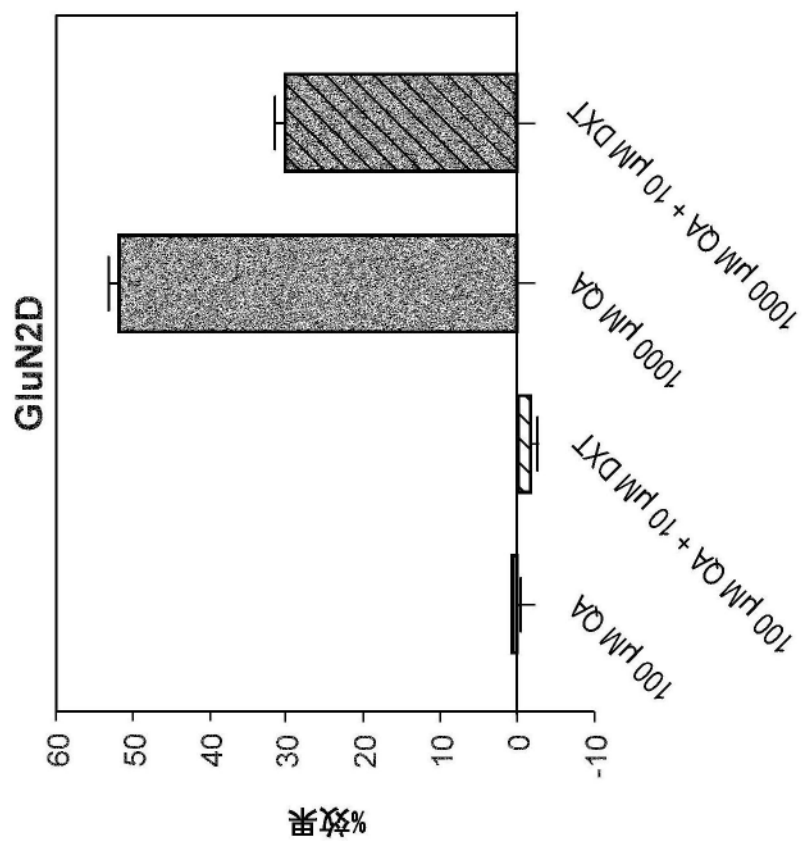


图32D

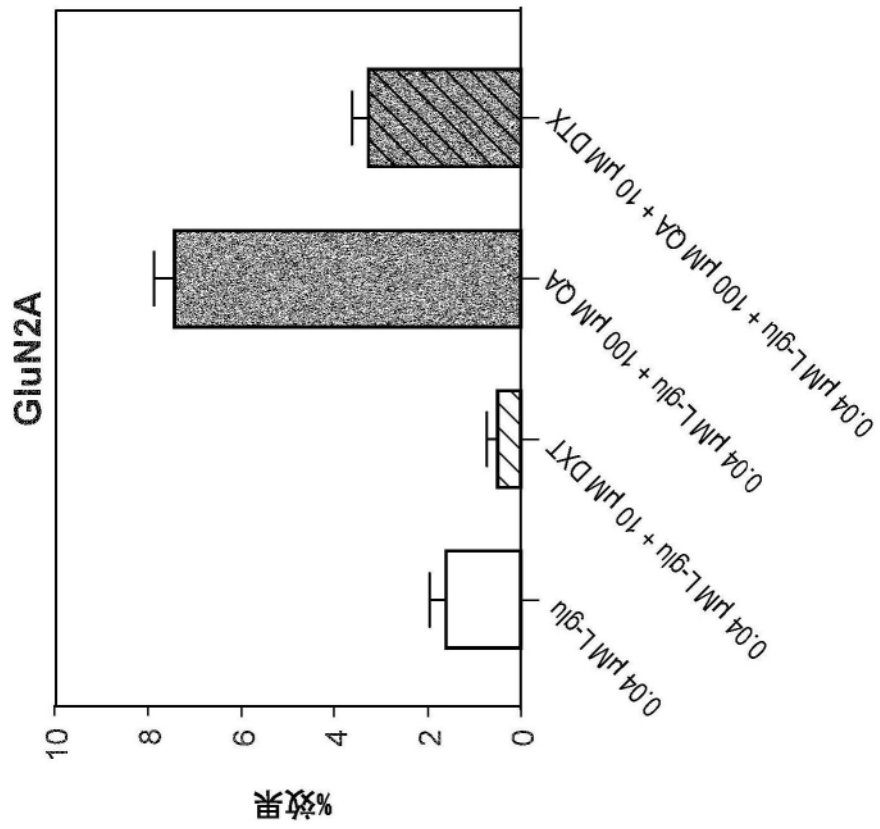


图33A

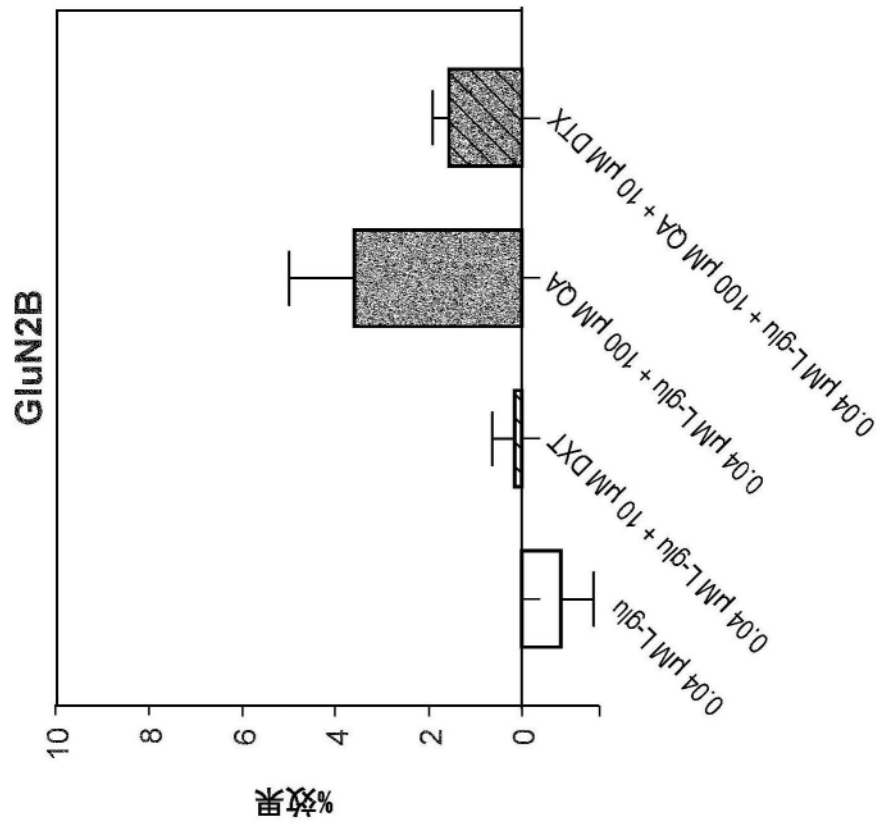


图33B

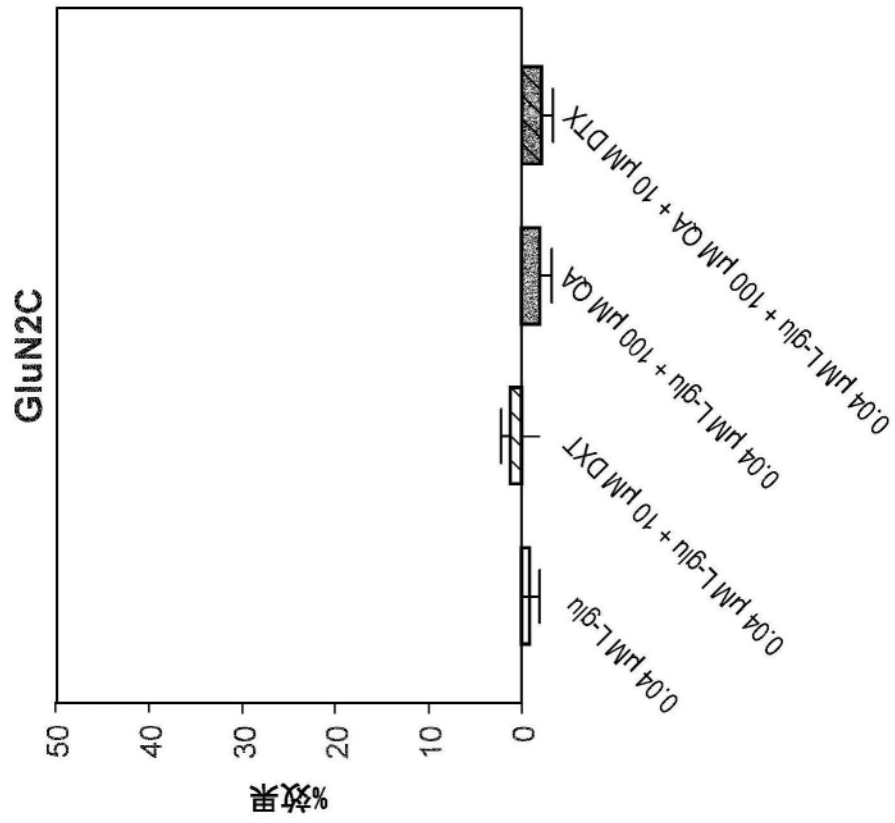


图33C

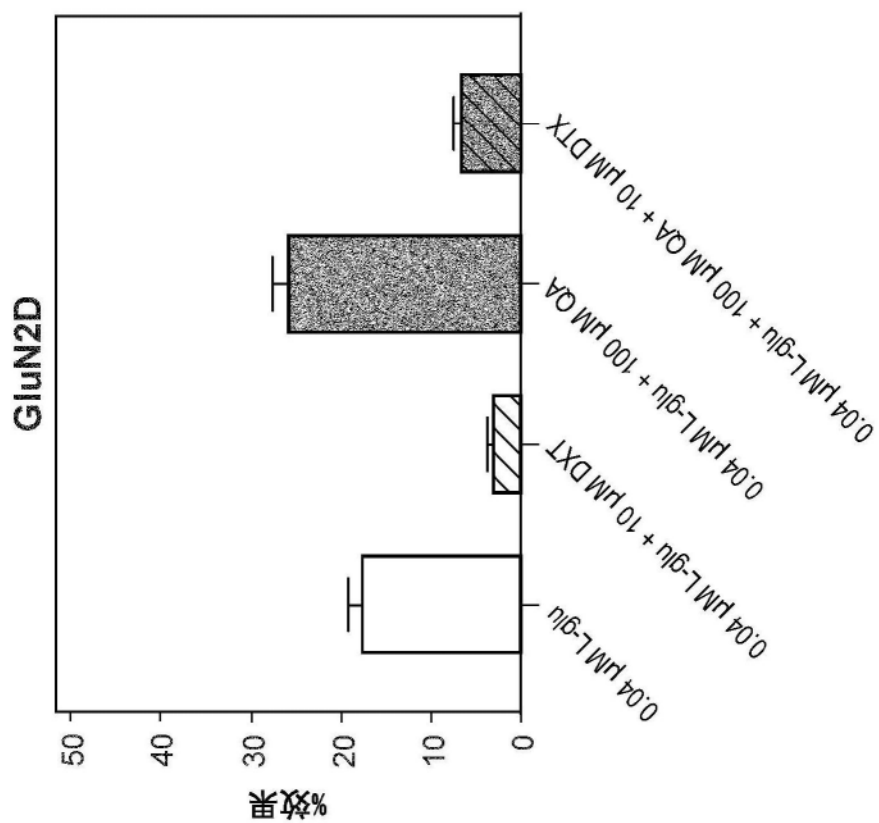


图33D

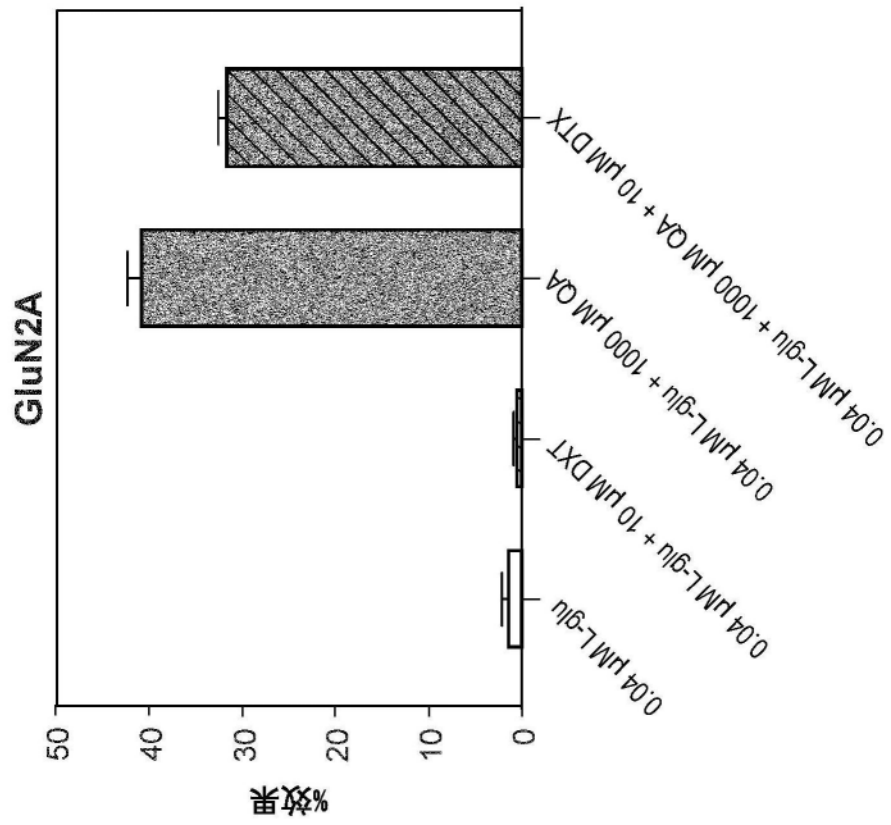


图34A

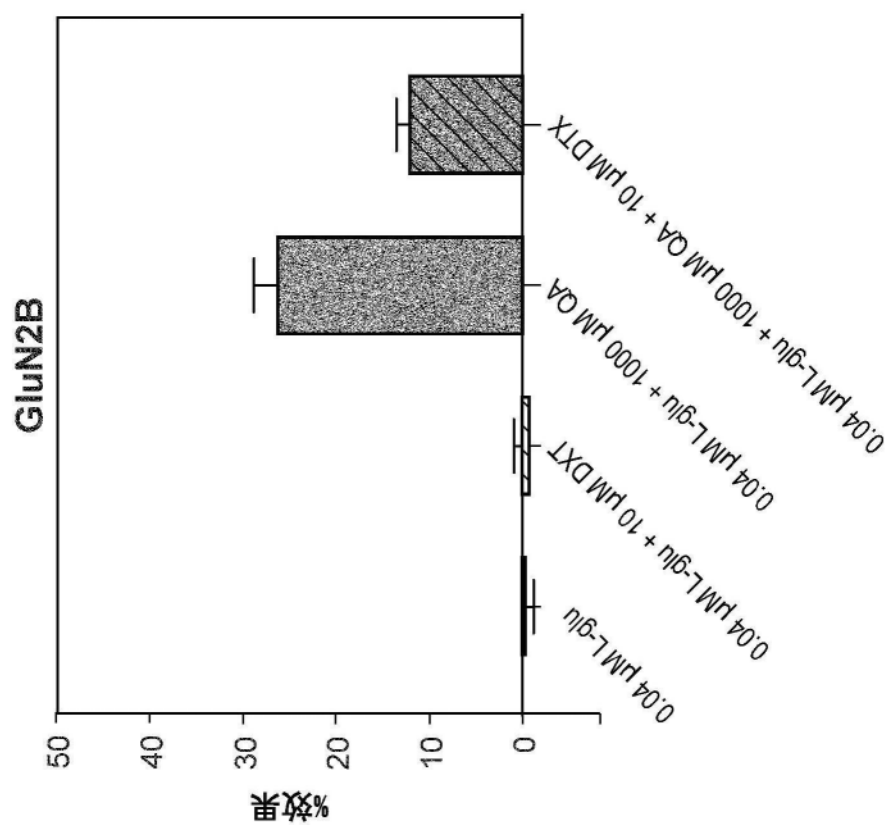


图34B

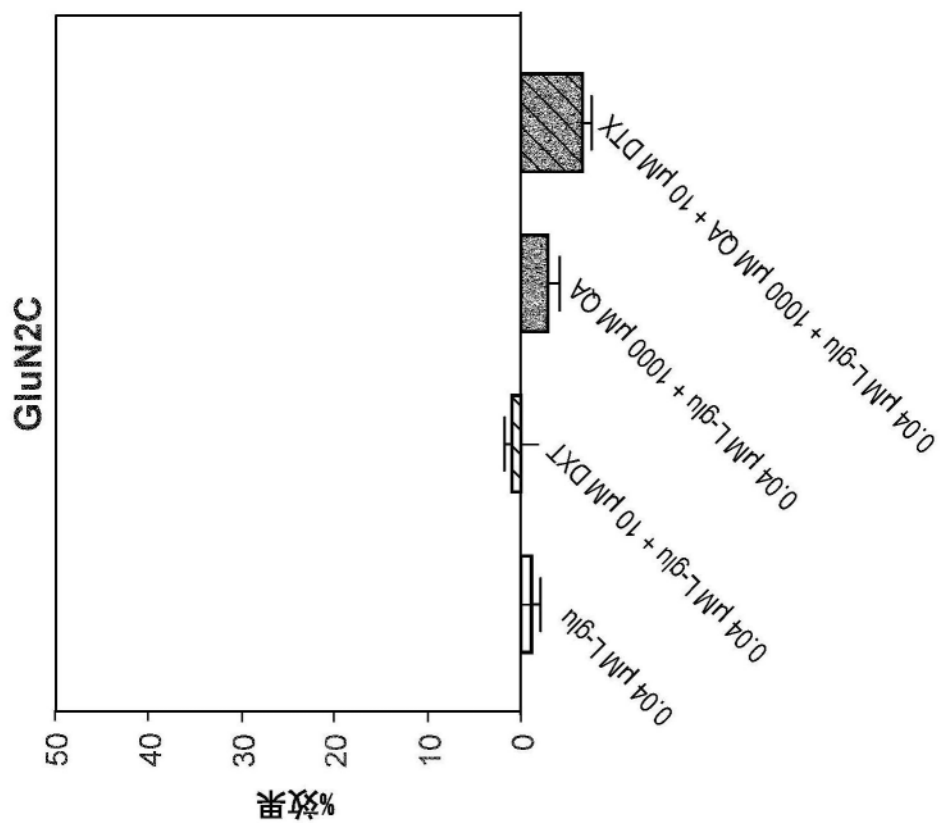


图34C

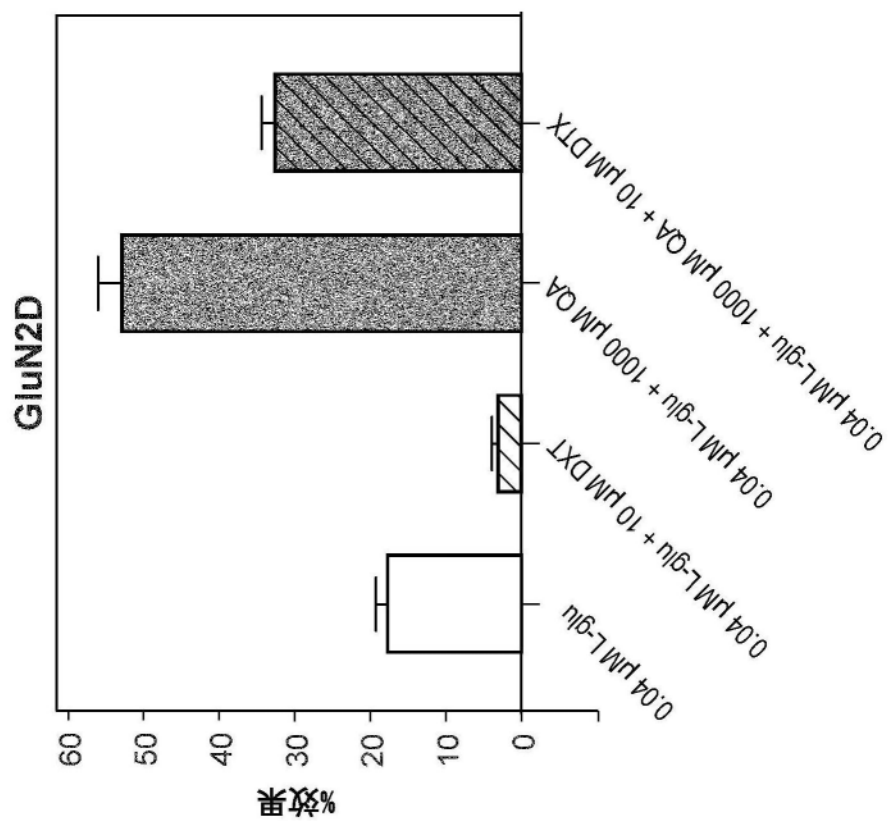


图34D

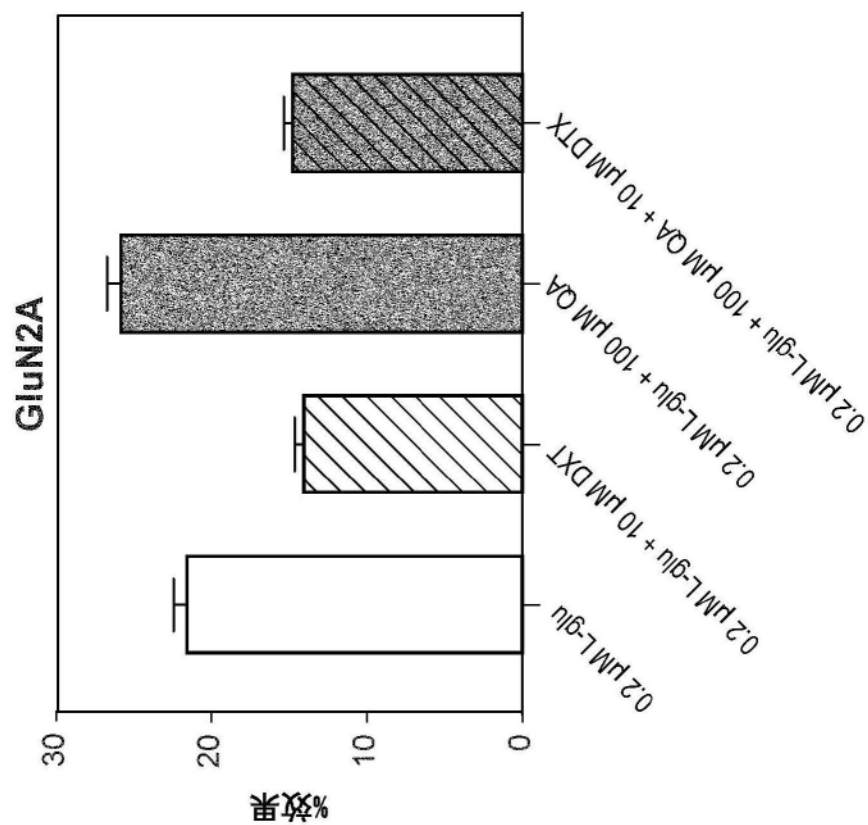


图35A

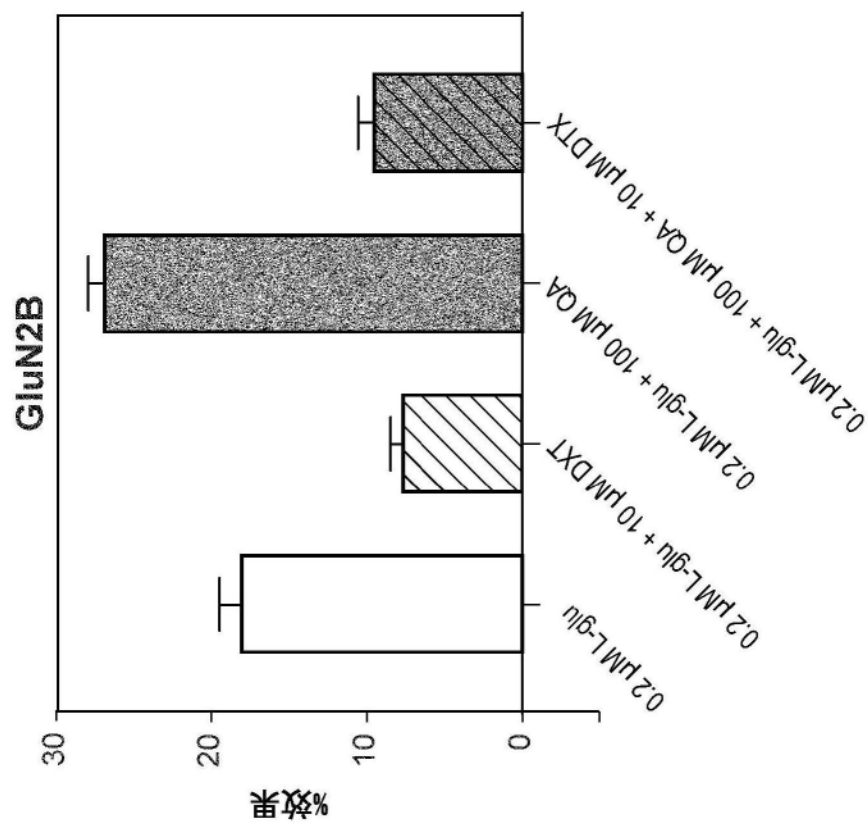


图35B

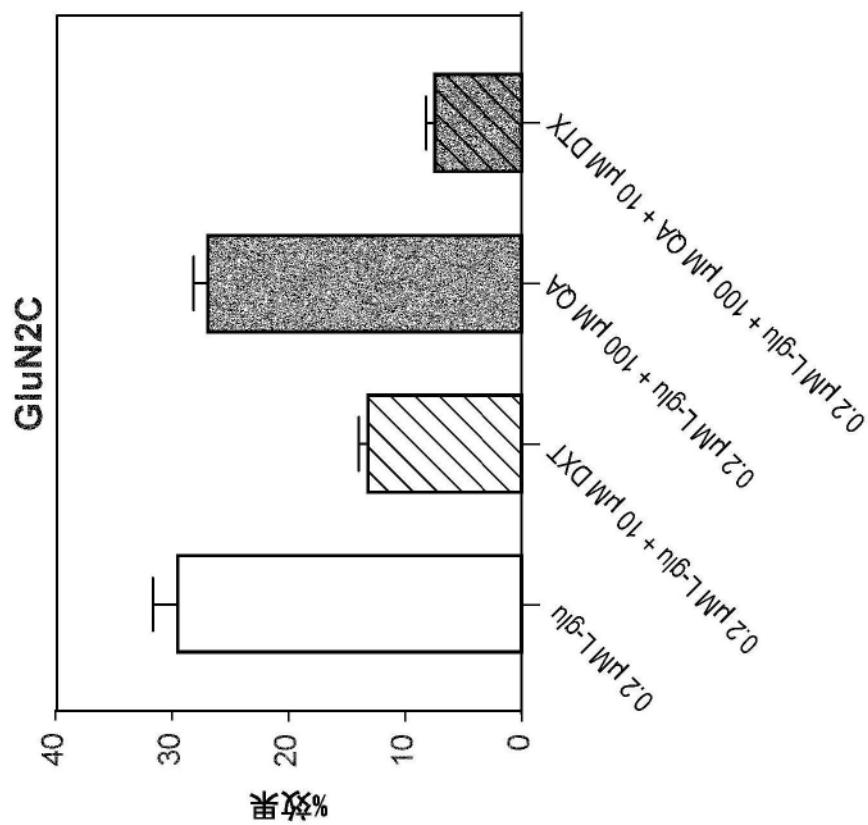


图35C

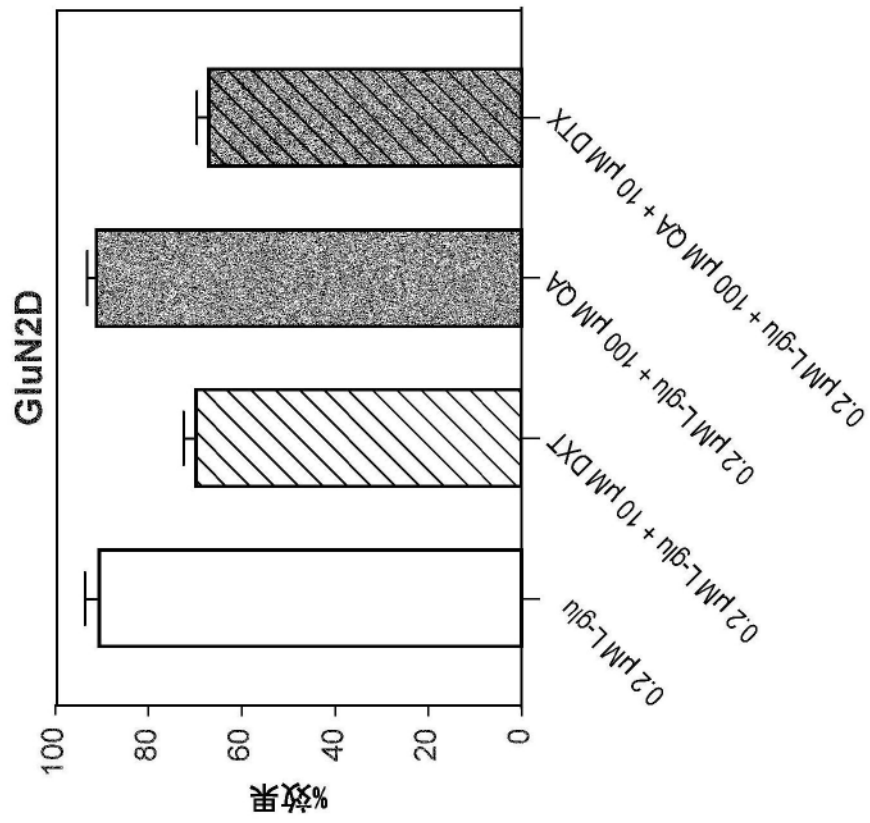


图35D

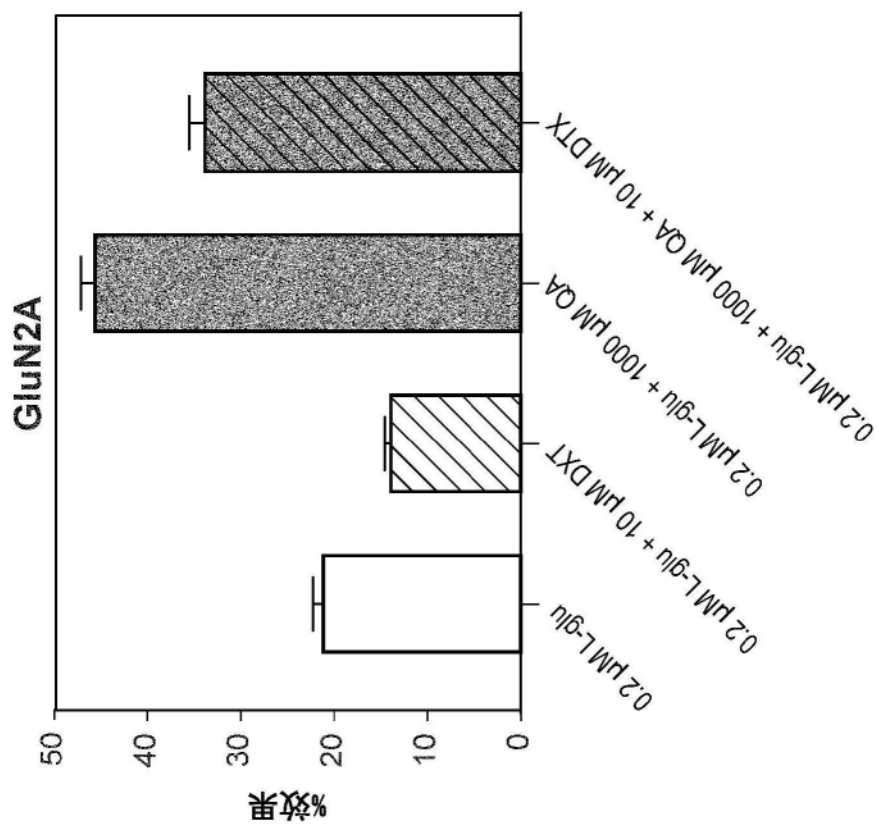


图36A

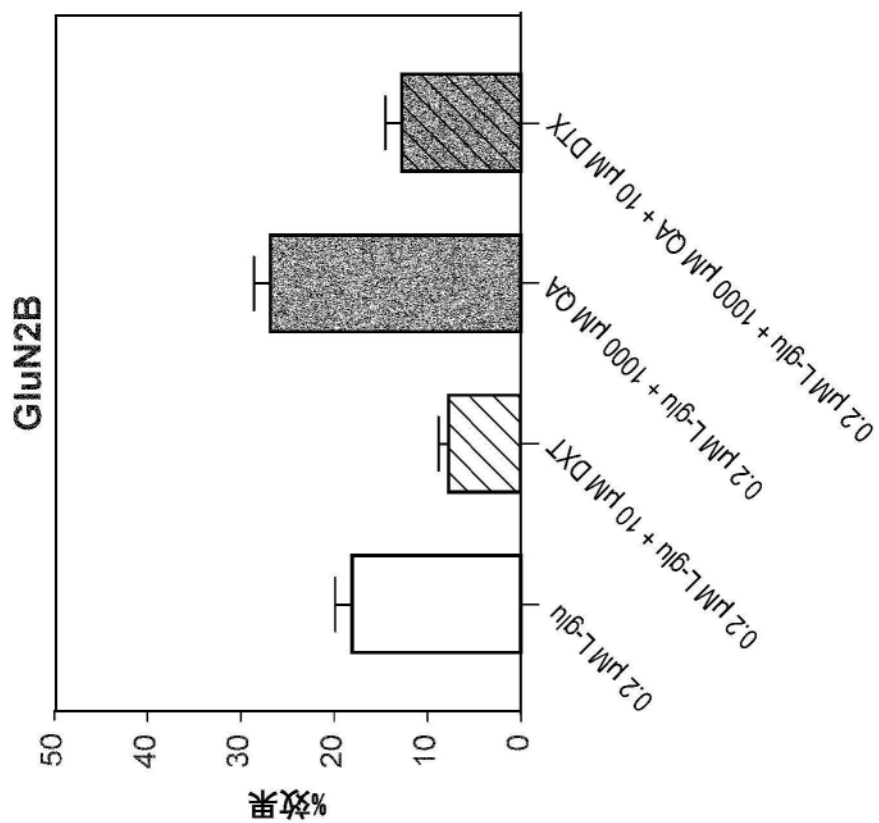


图36B

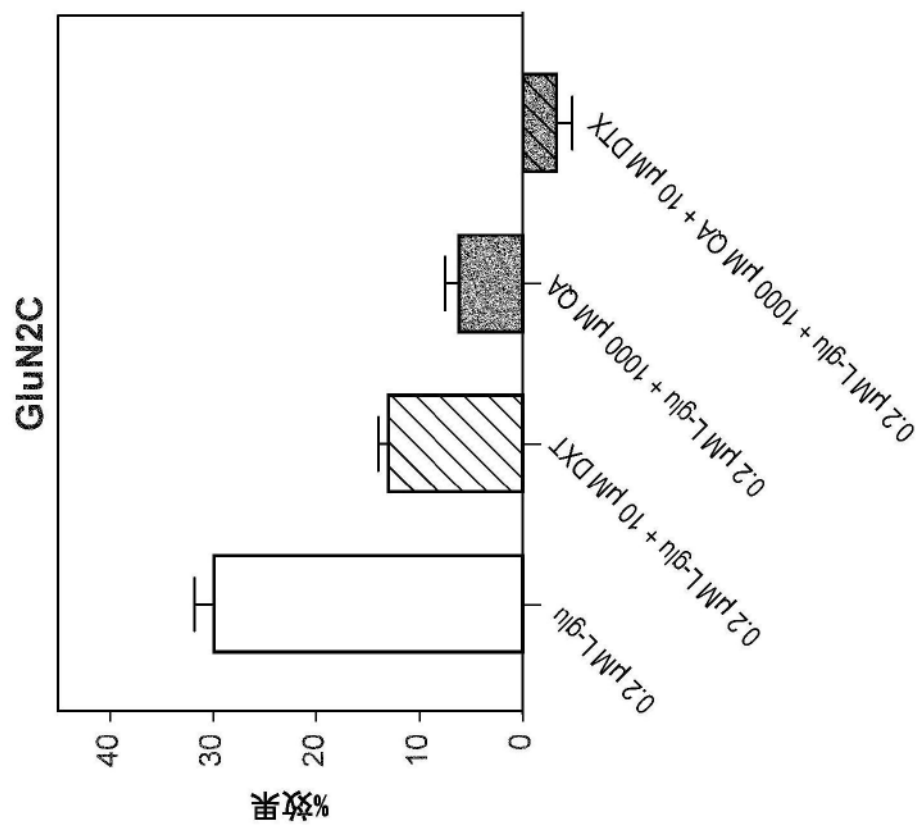


图36C

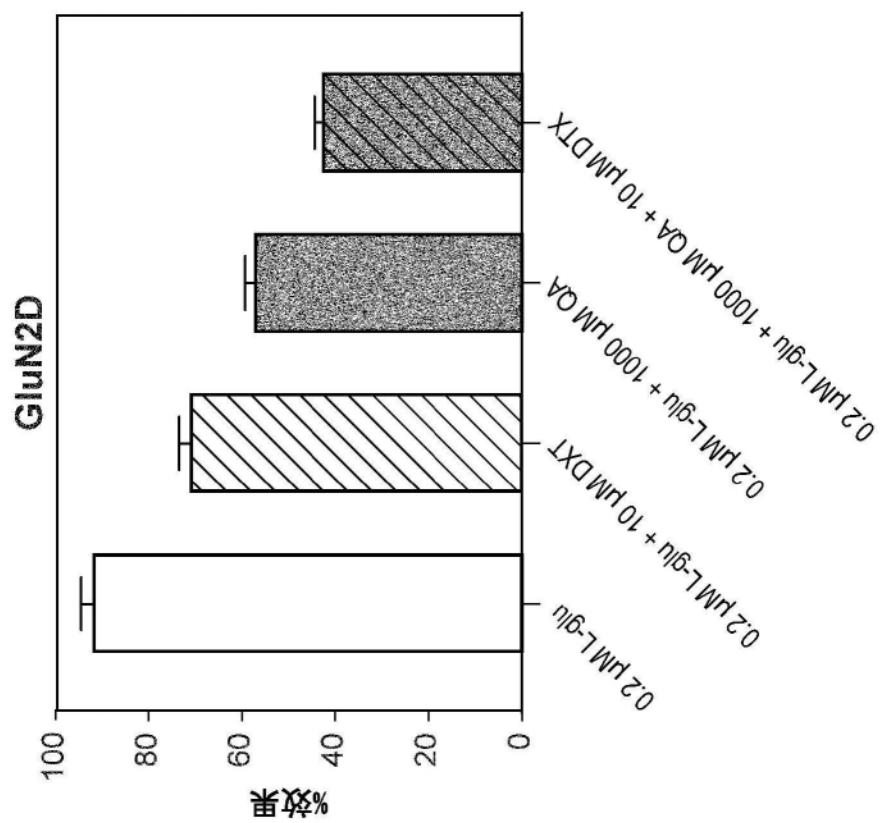


图36D

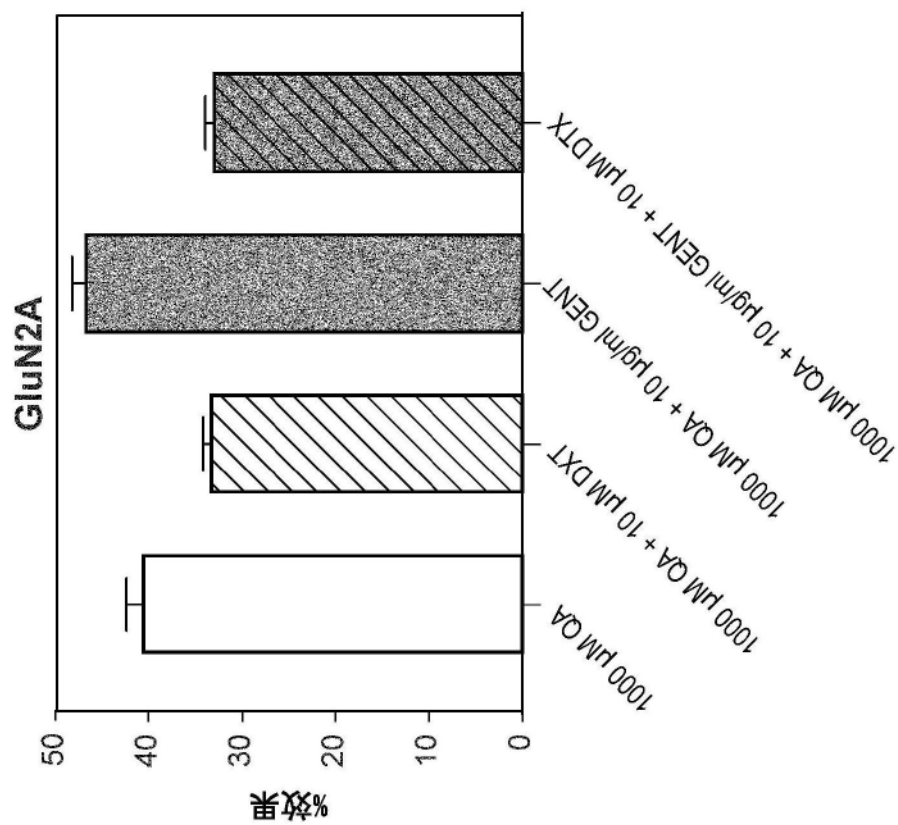


图37A

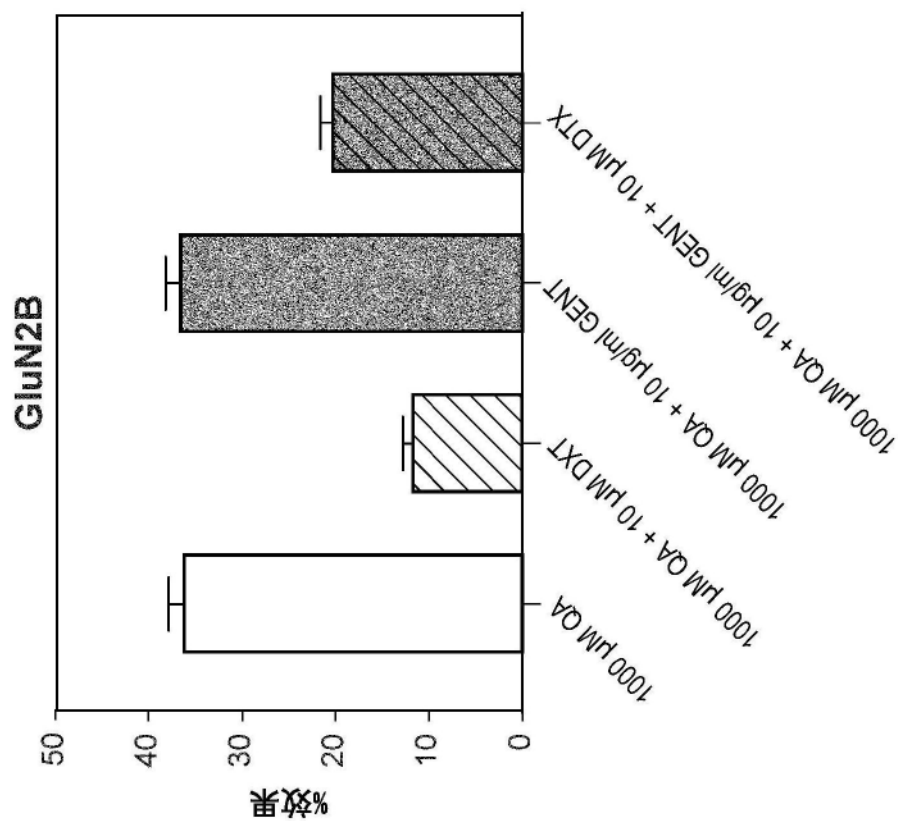


图37B

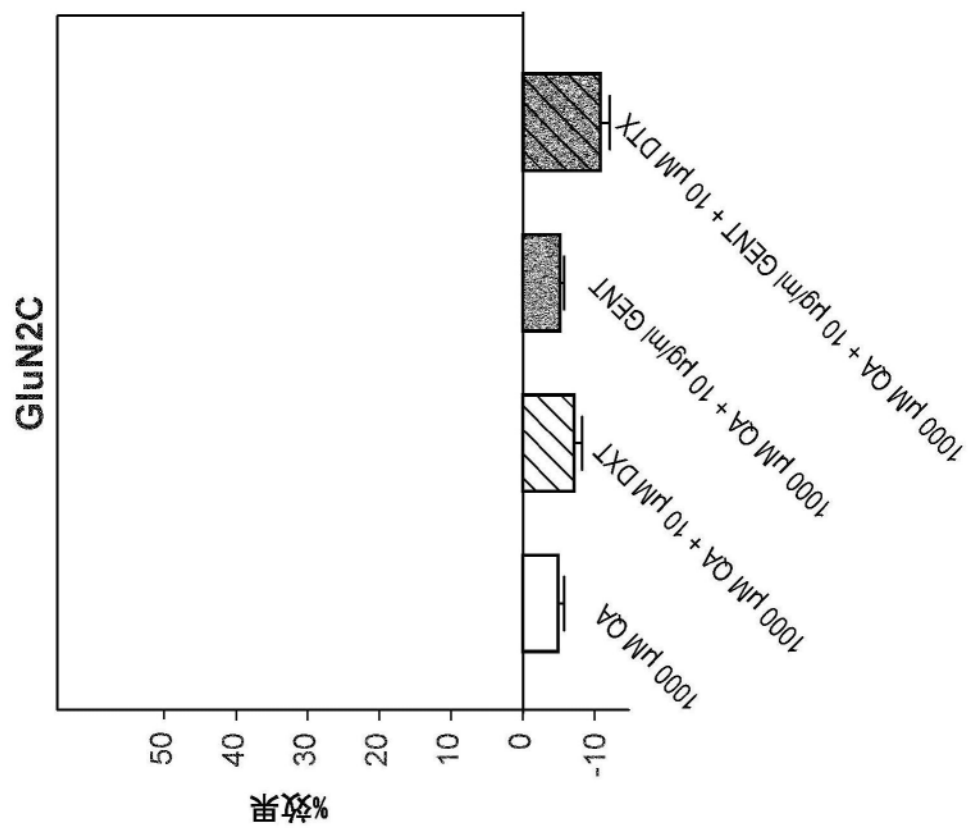


图37C

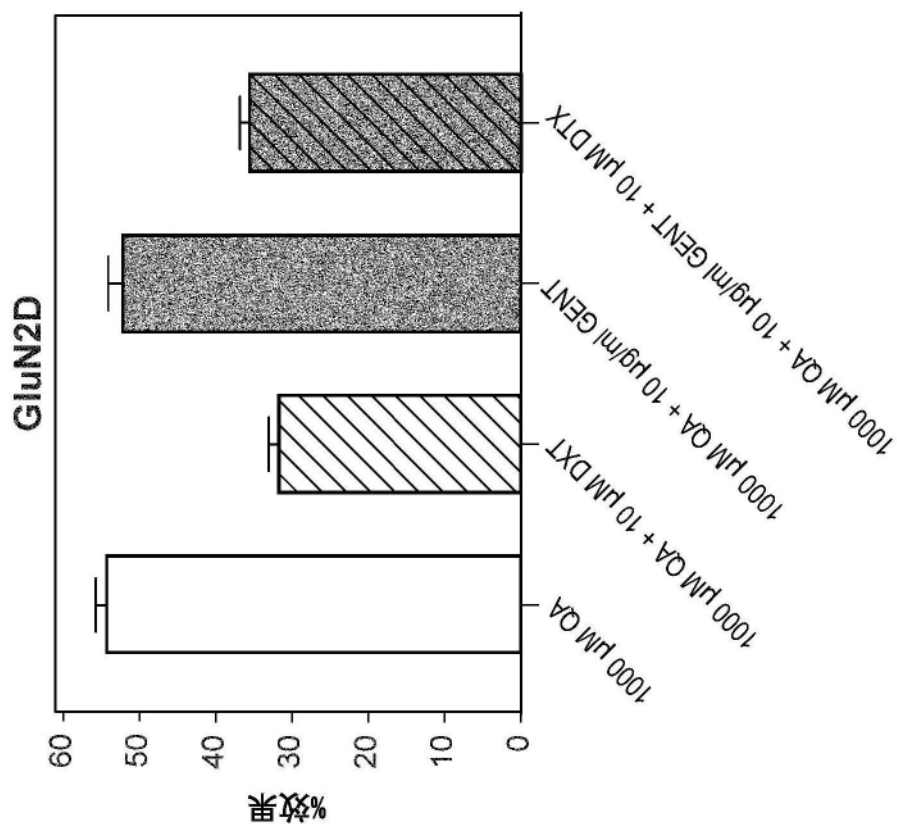


图37D

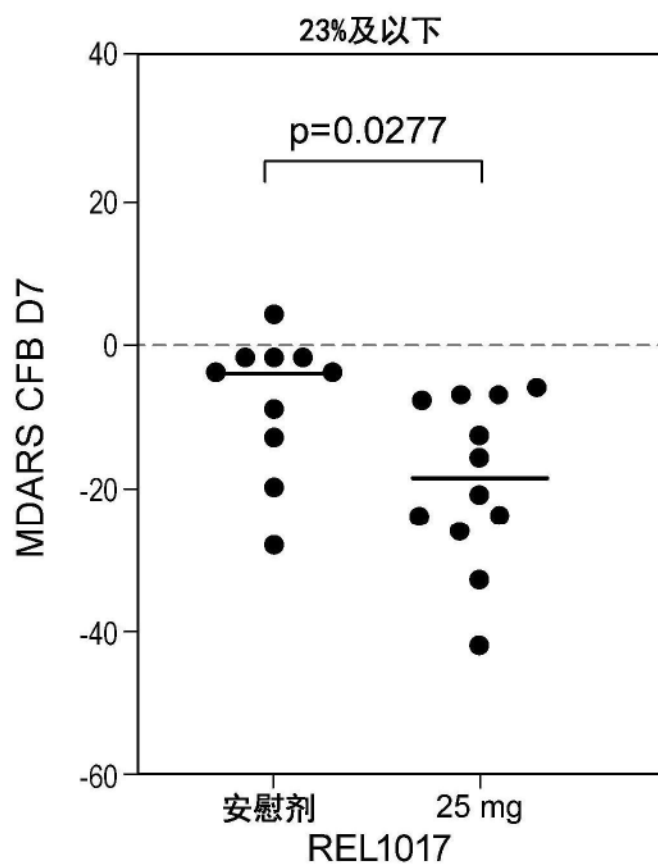


图38A

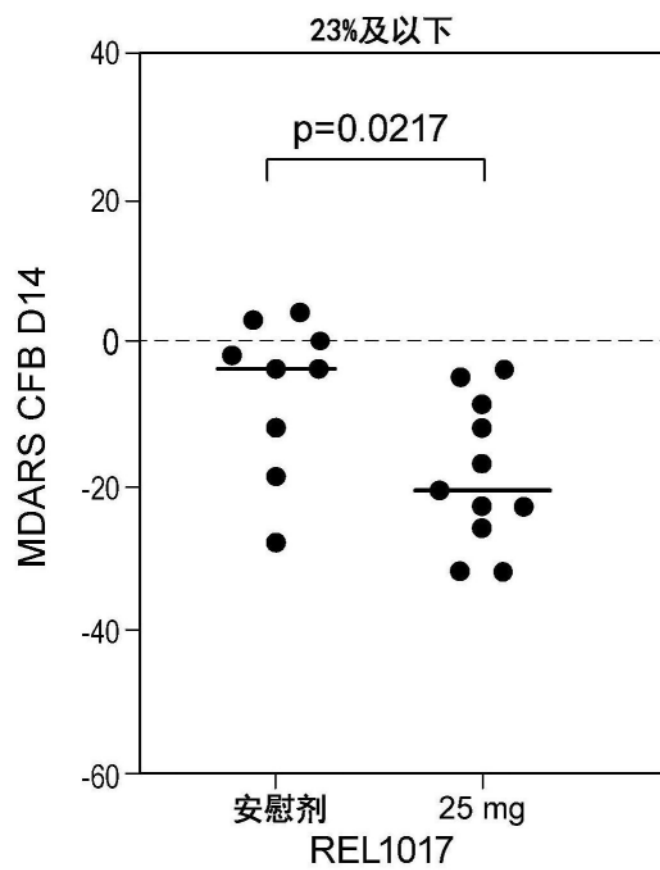


图38B

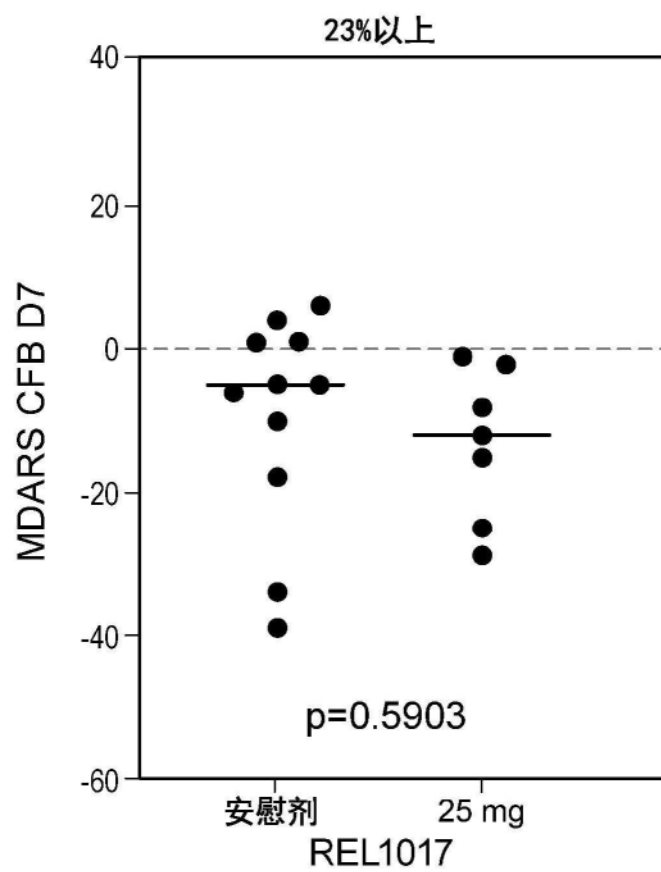


图38C

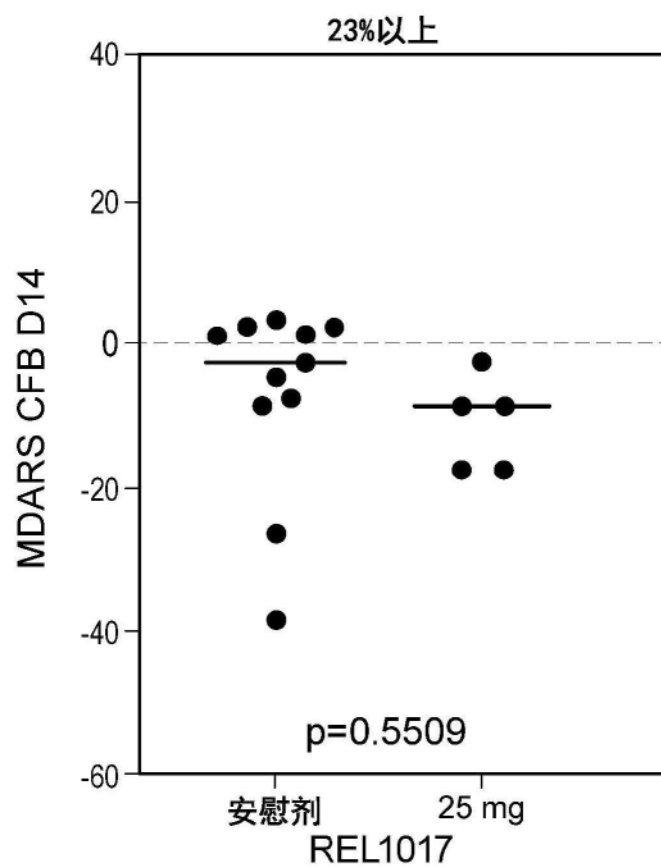


图38D

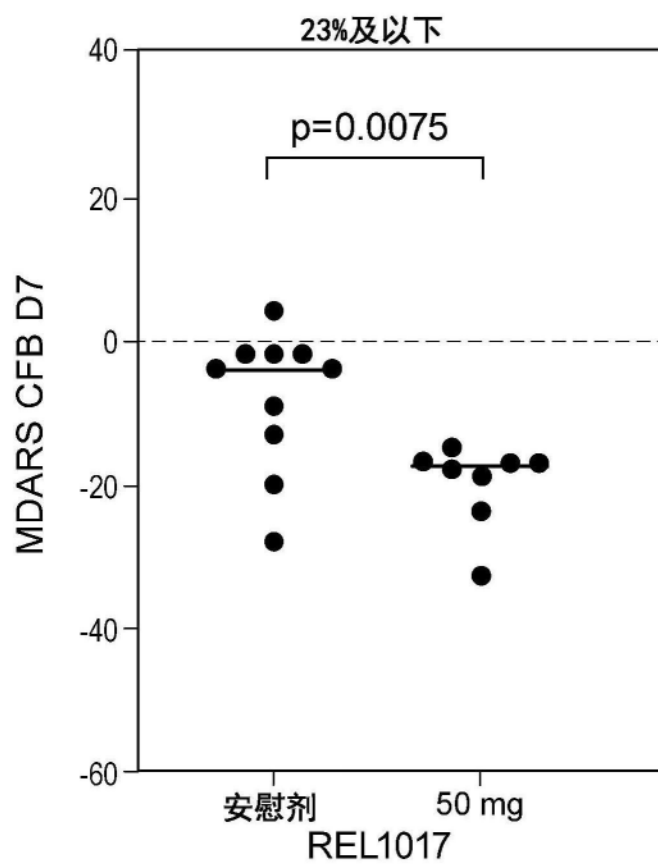


图38E

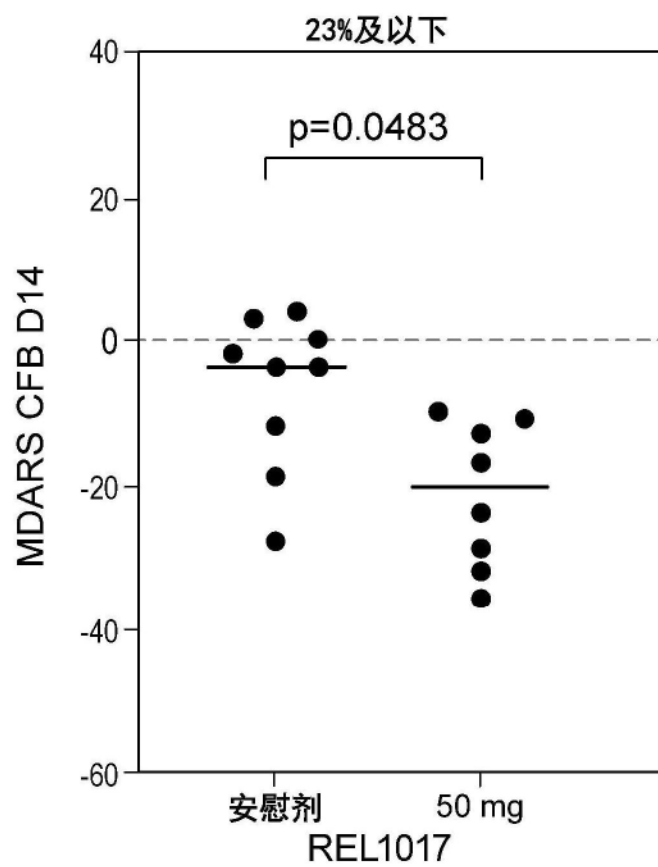


图38F

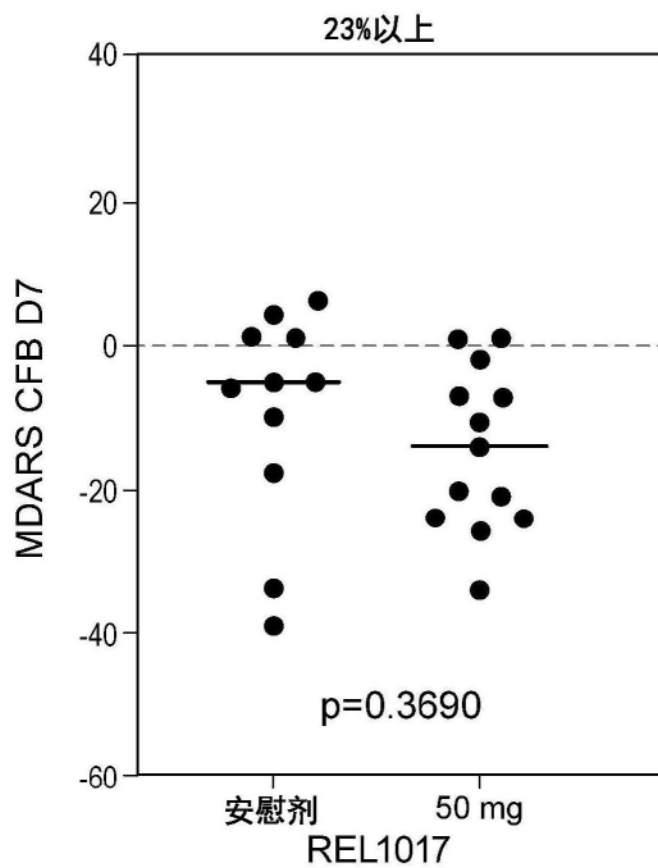


图38G

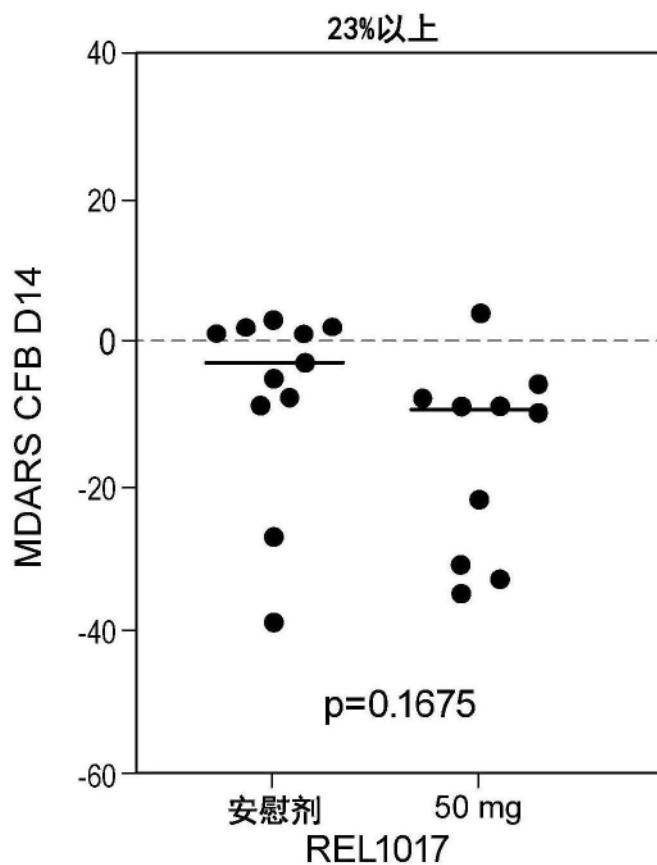


图38H

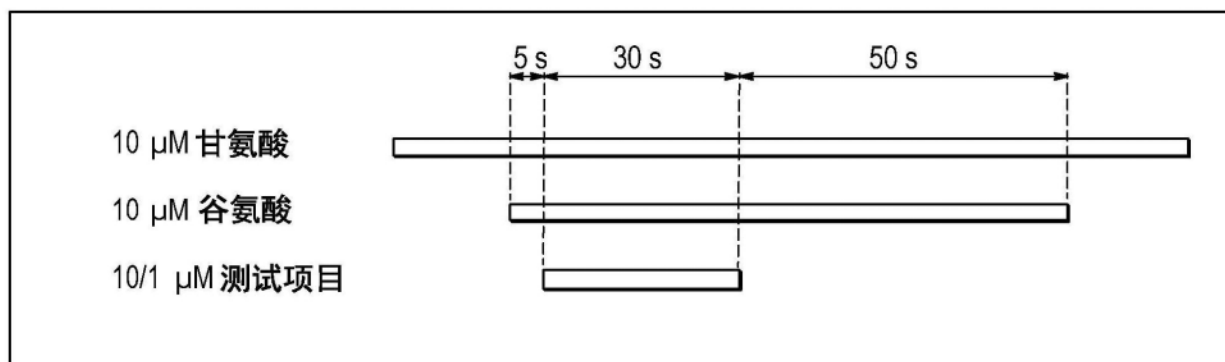


图39

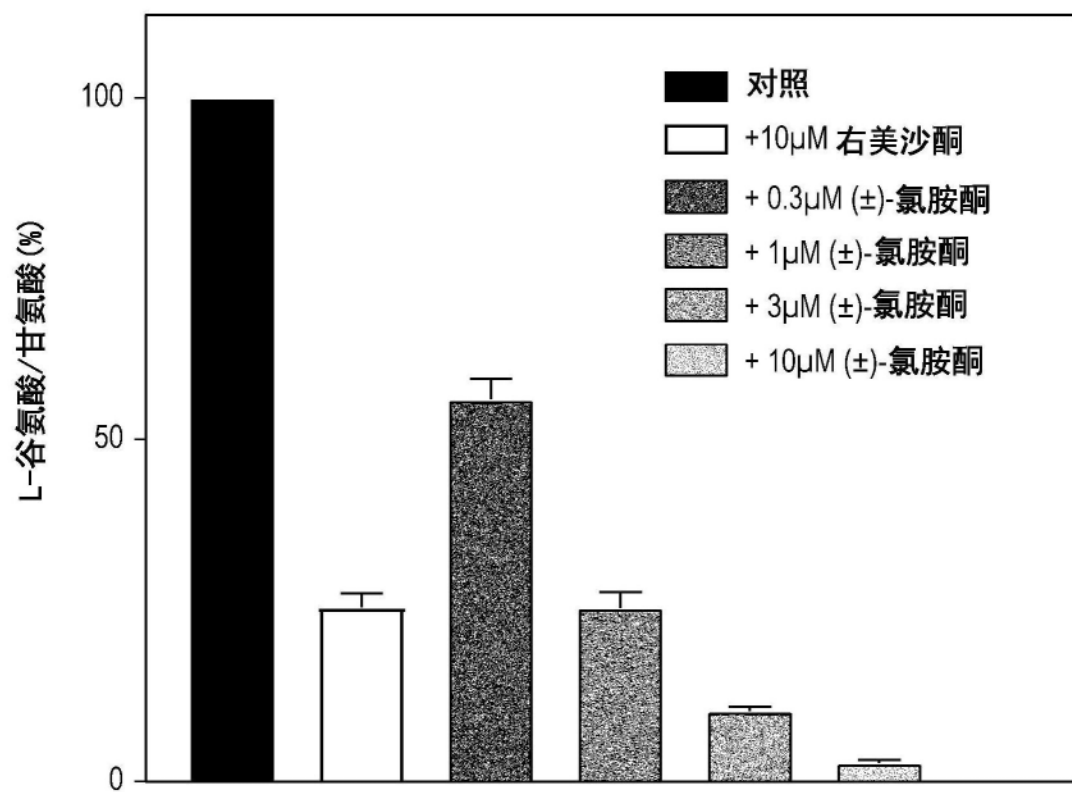


图40

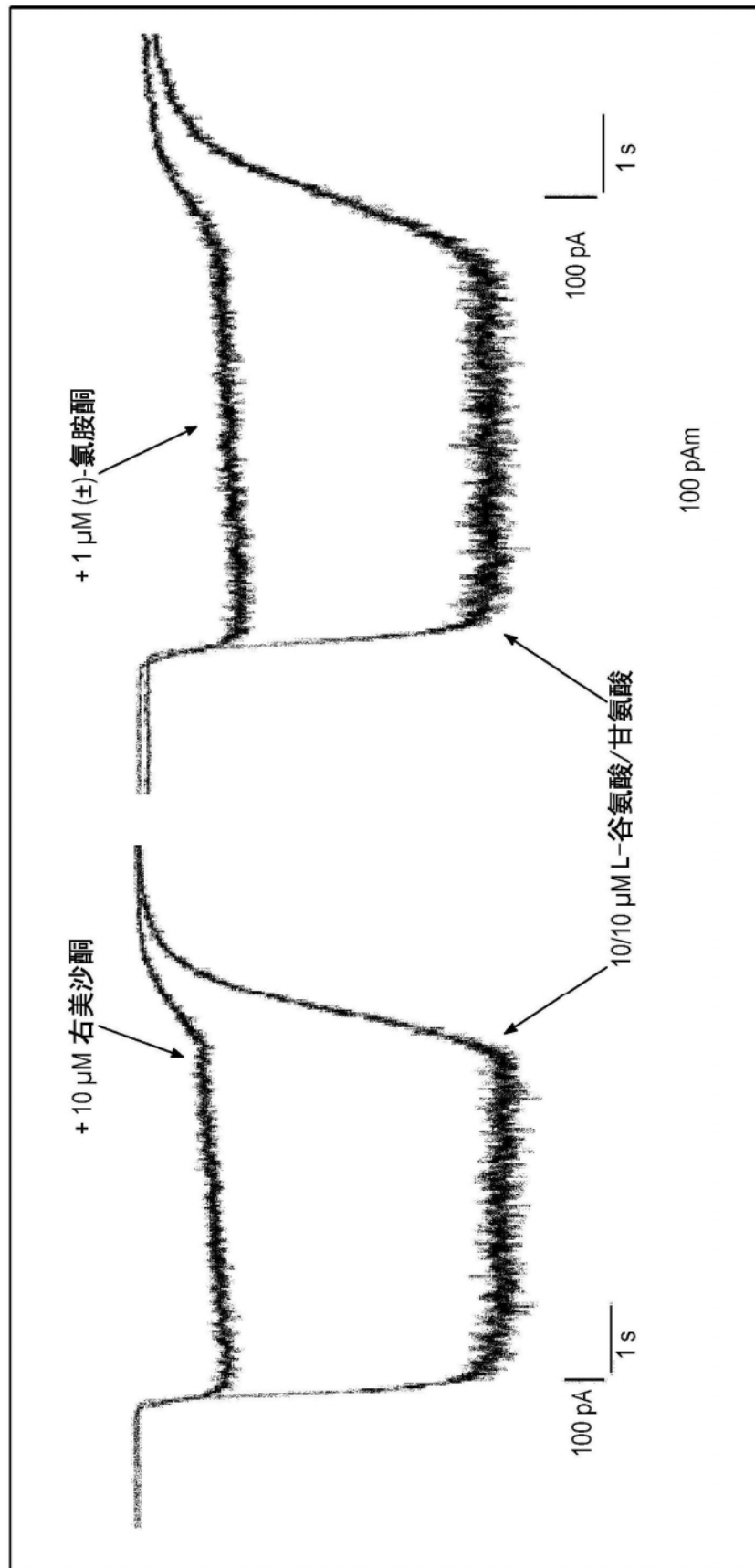


图41

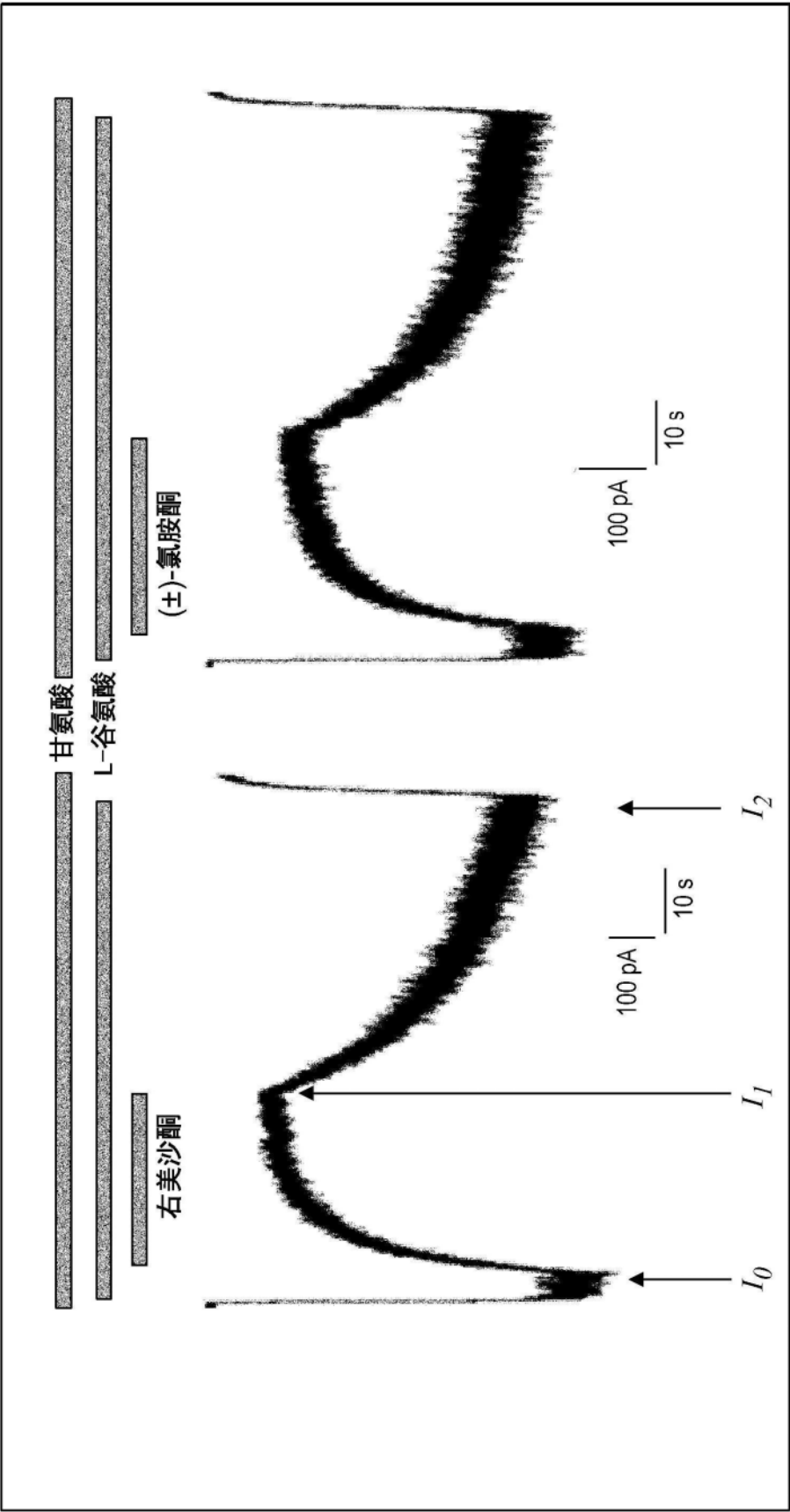


图42

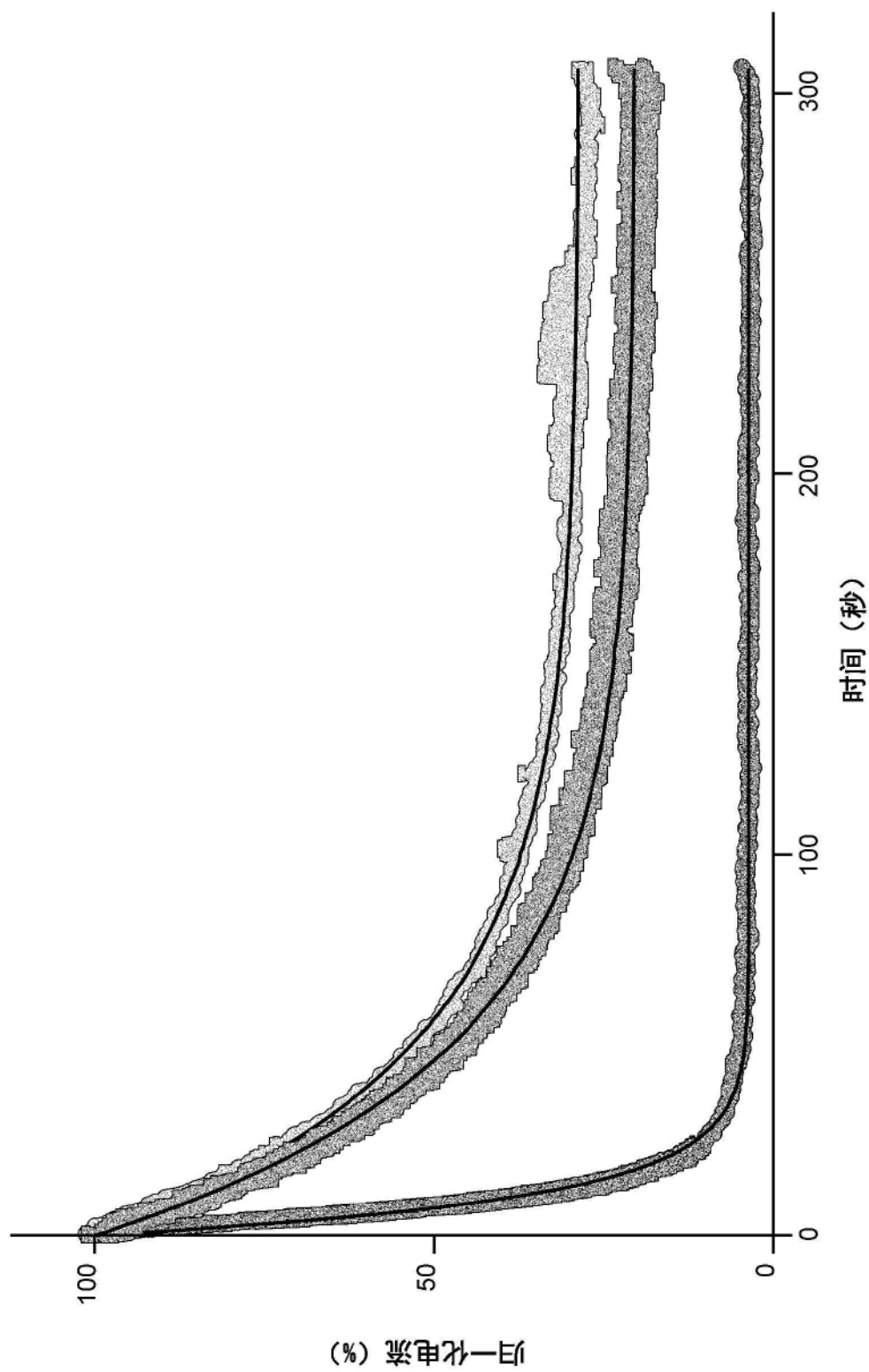


图43

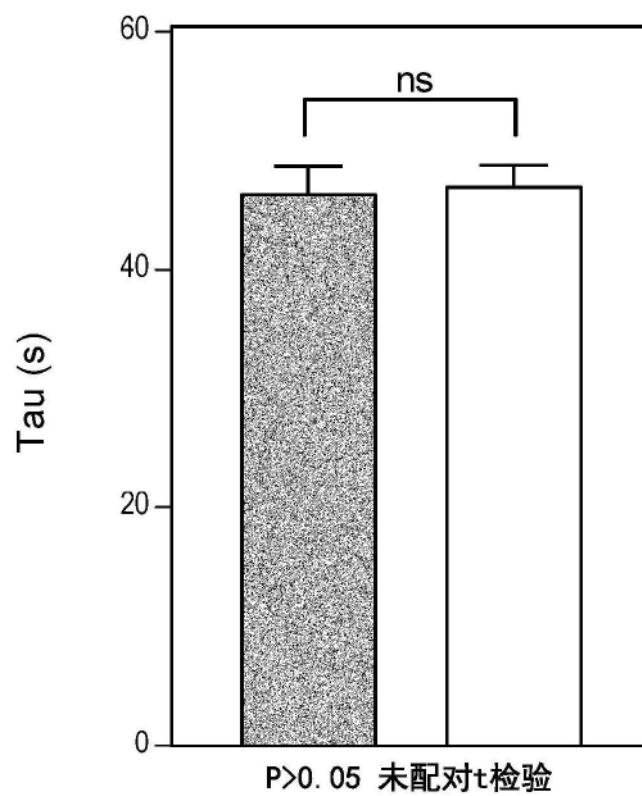


图44

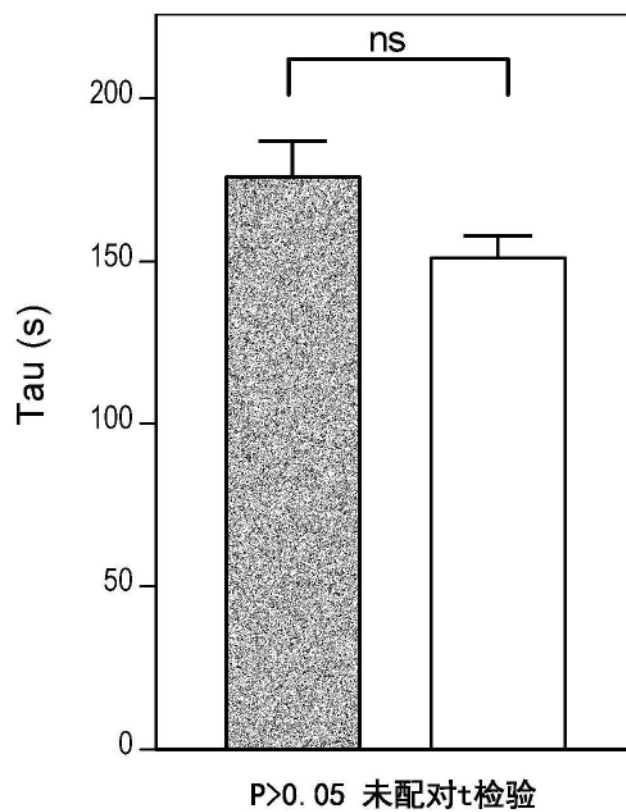


图46

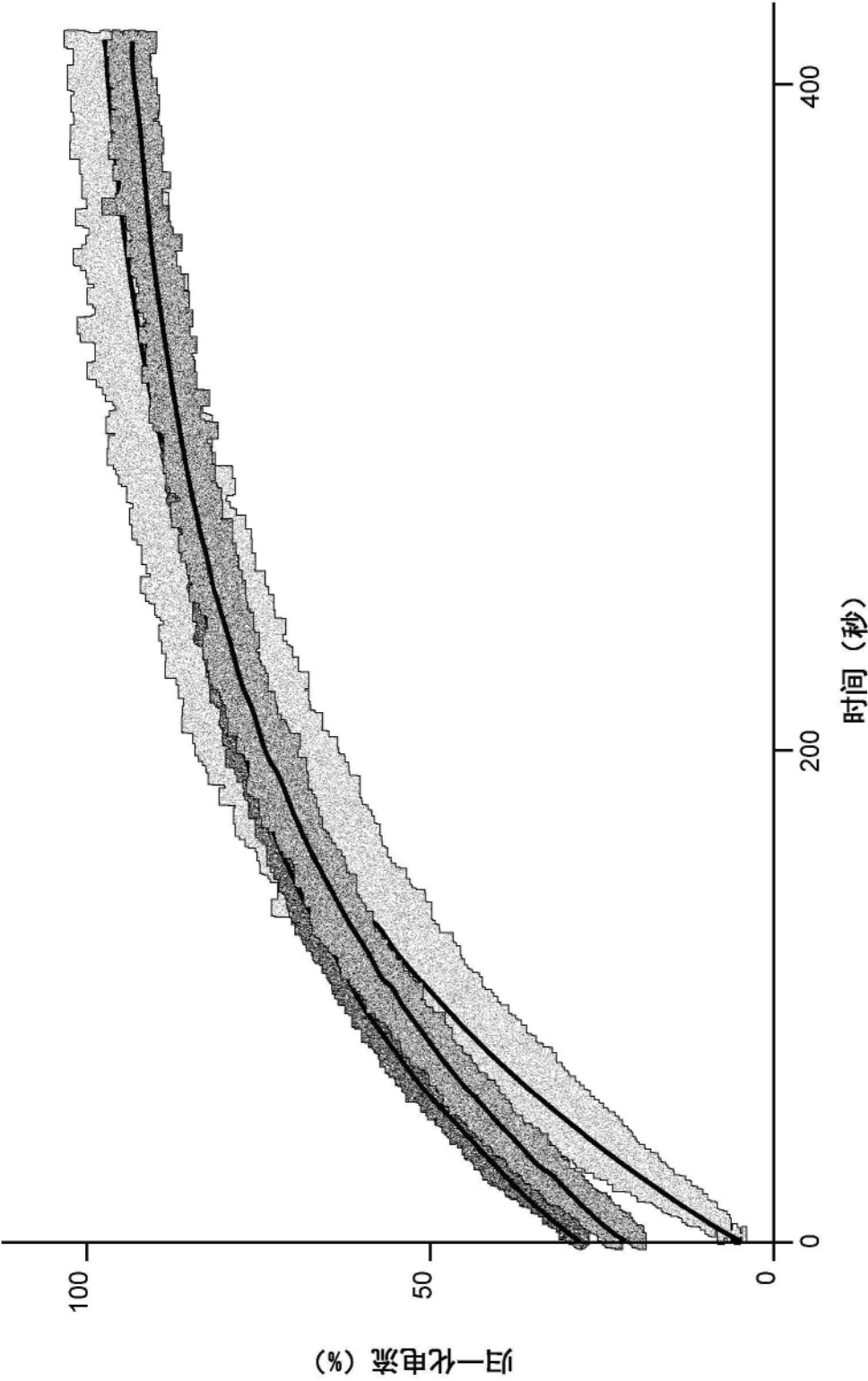


图45

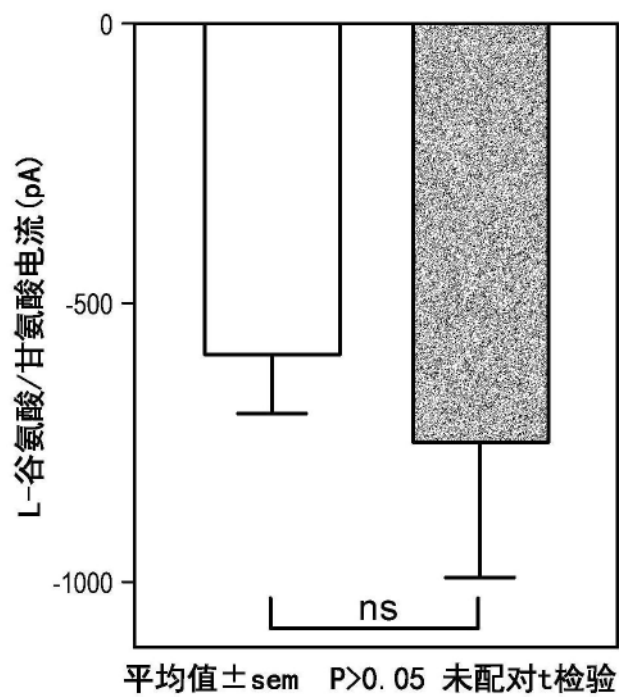


图47

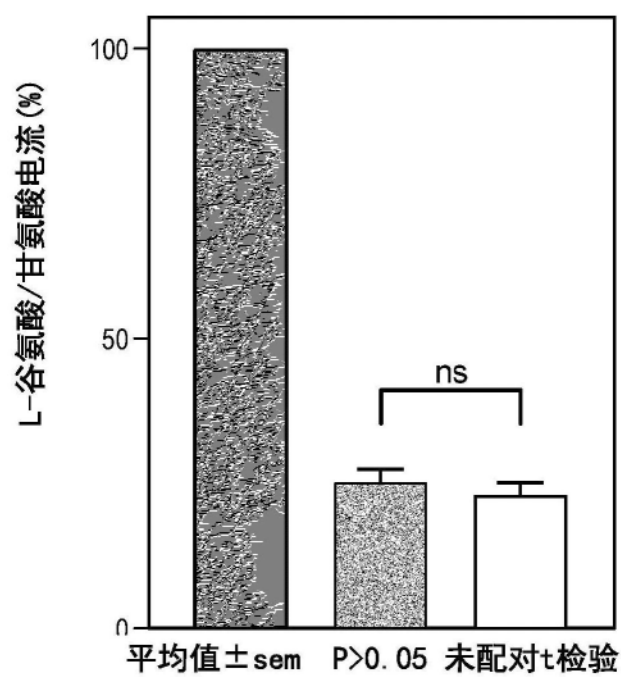


图48

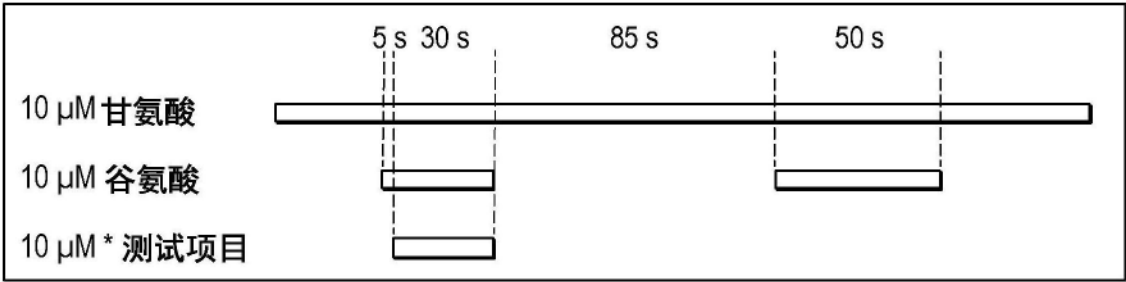


图49

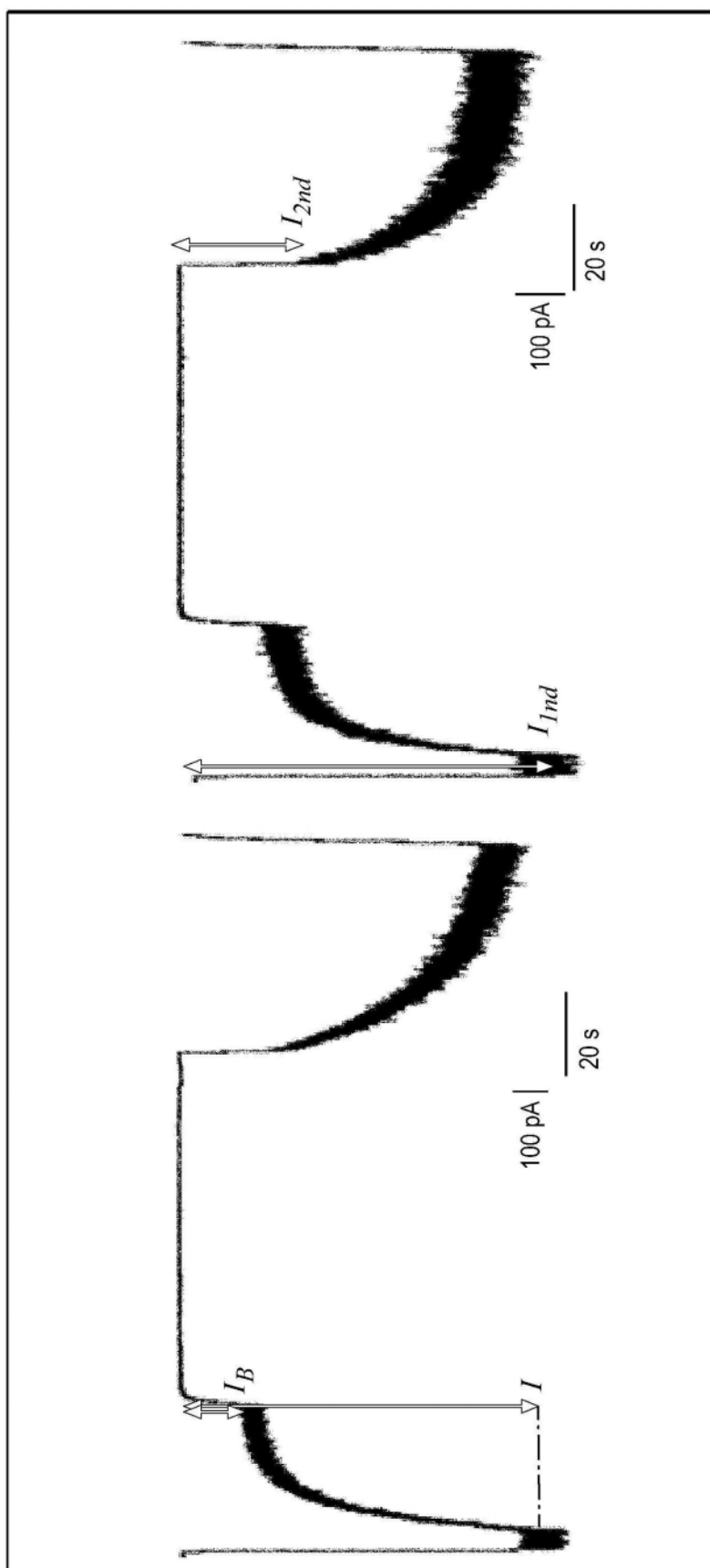


图50

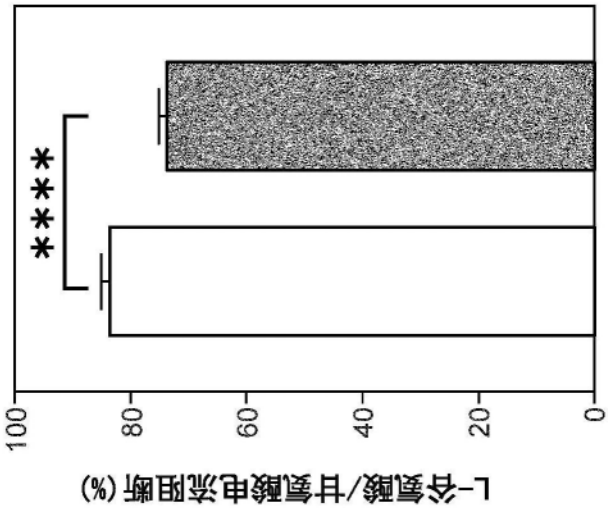


图51A

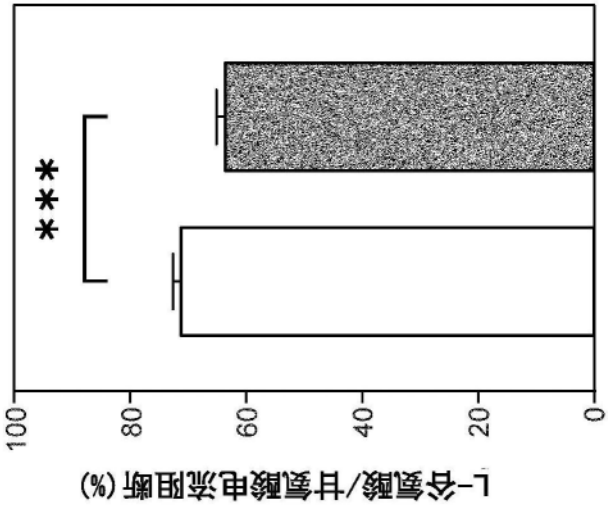


图51B

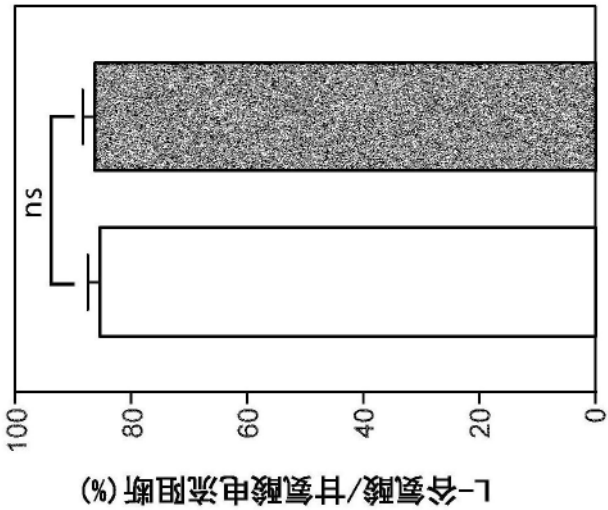


图51C

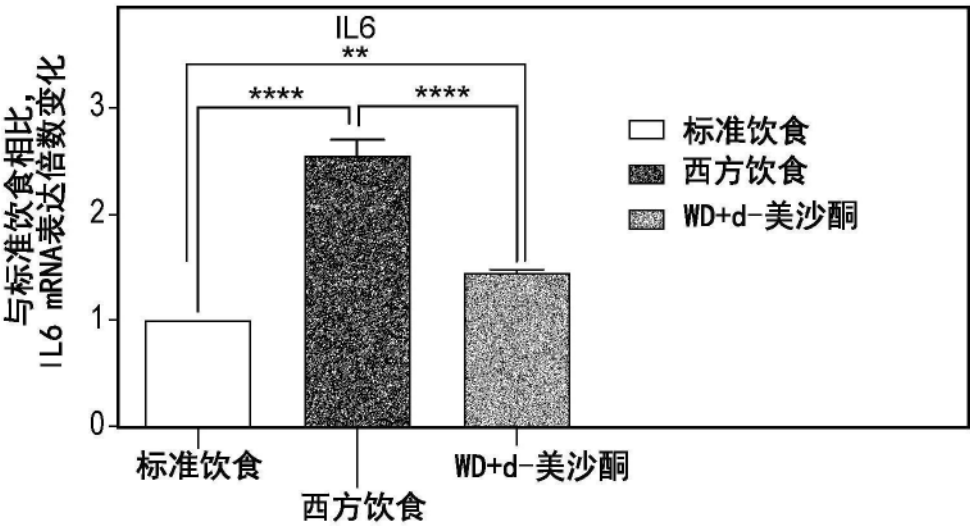


图52A

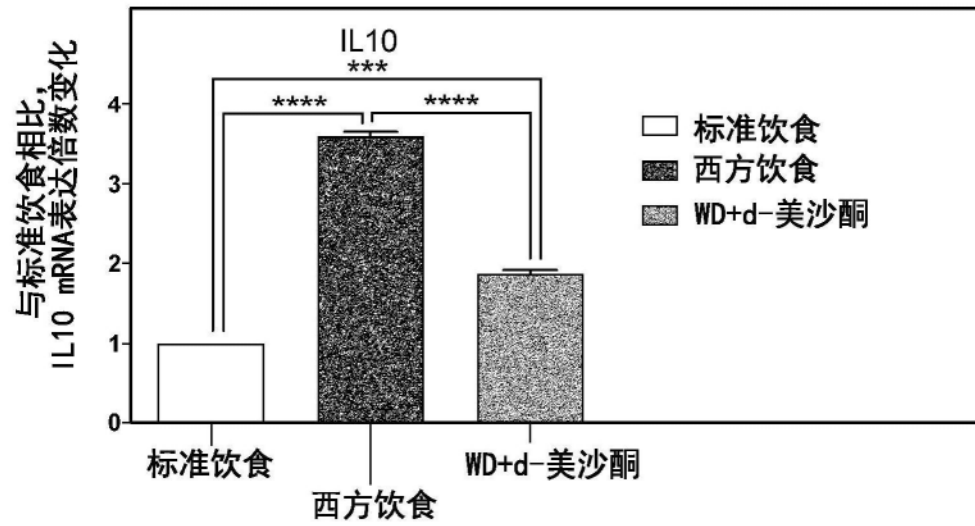


图52B

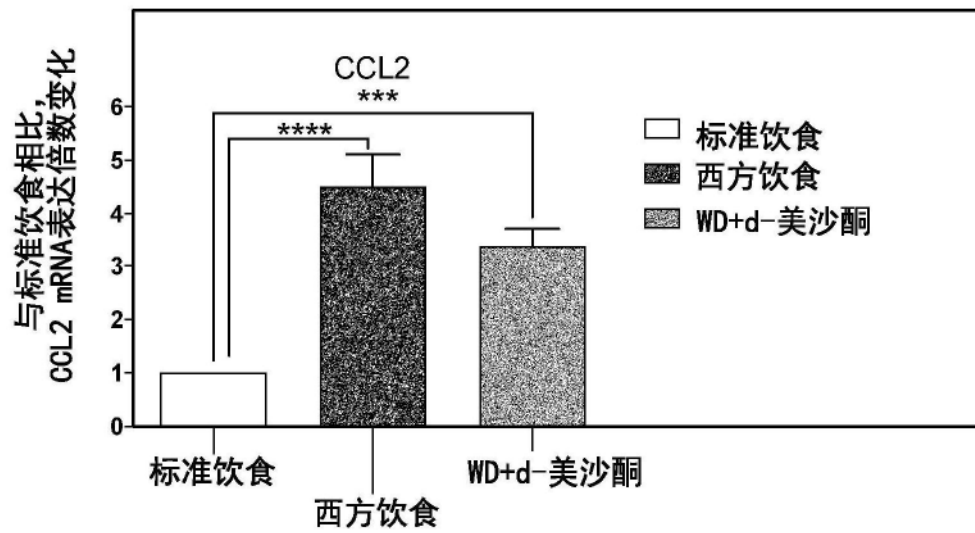


图52C

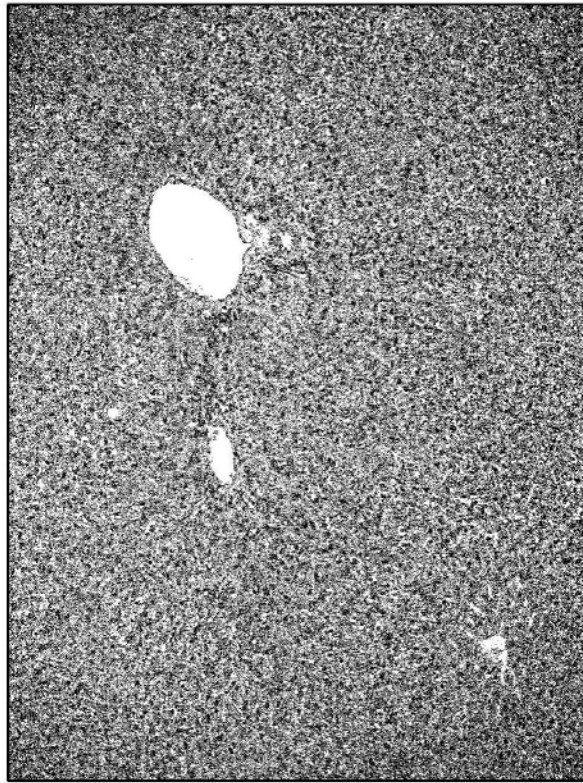


图53A

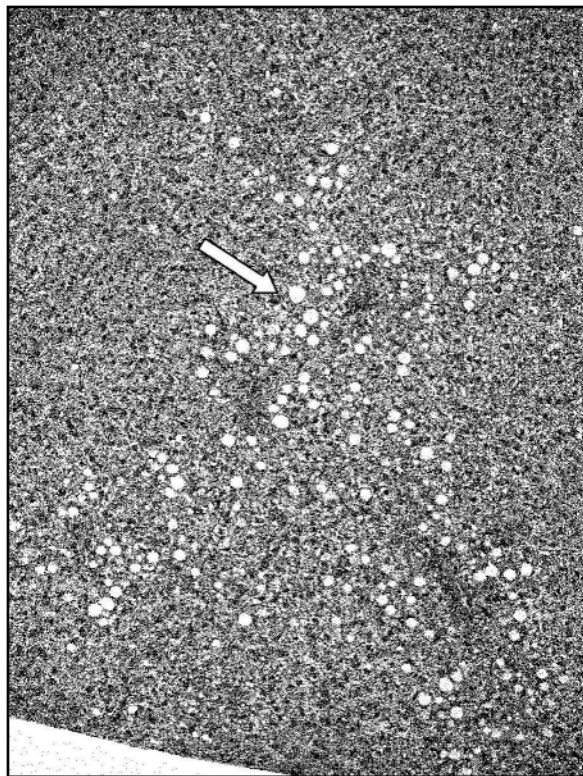


图53B

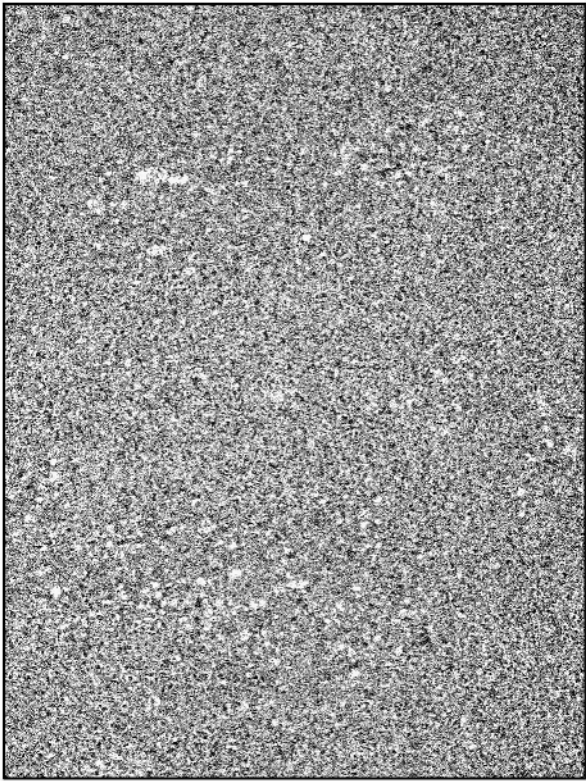


图53C

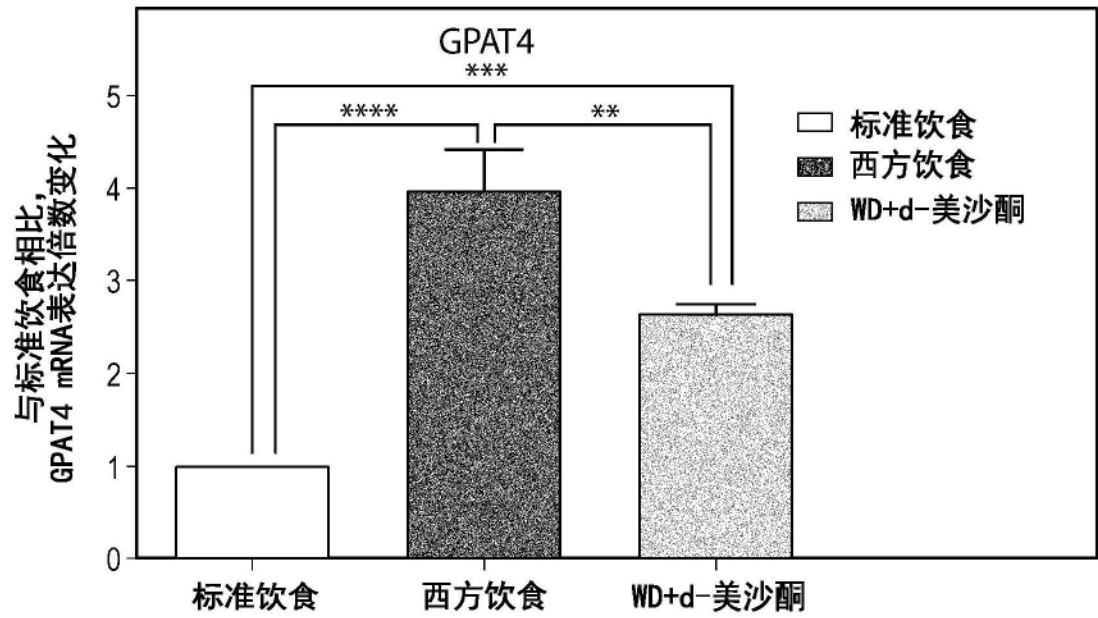


图54A

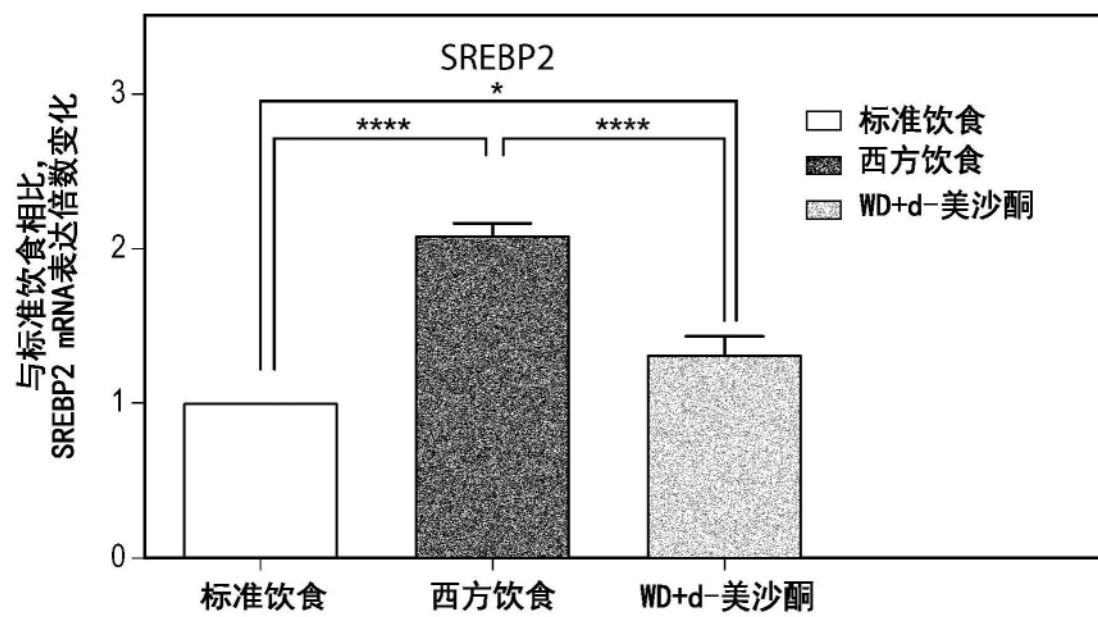


图54B

1. 一种改善神经精神障碍的病程和严重程度的方法,所述方法包括:

将组合物施用于患有神经精神障碍的受试者,所述神经精神障碍选自重度抑郁症、持续性抑郁症、破坏性情绪失调障碍、经前焦虑症、产后抑郁症、双相障碍、轻躁狂和躁狂症、广泛性焦虑障碍、社交焦虑障碍、躯体性症状障碍、丧亲抑郁症、调整性抑郁症、创伤后应激障碍、强迫症、慢性疼痛障碍、膀胱过度活动症和物质使用障碍;

其中所述组合物包含选自右美沙酮、右美沙酮代谢物、d-美沙多、d- α -乙酰美沙多、d- α -去甲美沙多、l- α -去甲美沙多及其药学上可接受的盐的物质。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述物质是用于治疗所述神经精神障碍的所述组合物中的唯一活性剂。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述物质是从其对映异构体中分离出来或从头合成的。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组合物的施用是在所述物质有效结合所述受试者的NMDA受体的条件下进行并且通过改变所述神经精神障碍的病程和严重程度使所述受试者得到缓解。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述缓解选自所述神经精神障碍的治愈、所述神经精神障碍的预防、所述神经精神障碍的严重程度的降低、以及所述神经精神障碍的持续时间的减少。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组合物的施用作为单一疗法发生。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组合物的施用作为第二物质的辅助治疗的一部分发生。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组合物的施用发生在对离子通道、神经递质系统、神经递质通路或选自离子型谷氨酸受体、5-HT_{2A}受体、5-HT_{2C}受体、阿片受体、AChR、SERT、NET、sigma 1受体、K通道、Na通道和Ca通道的受体的作用有效的条件下。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述组合物的施用发生在对所述离子型谷氨酸受体的作用有效的条件下,并且其中所述离子型谷氨酸受体是NMDAR。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中对所述离子型谷氨酸受体的作用包括对由细胞膜表达的NMDAR的电压依赖性通道阻断。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中对所述离子型谷氨酸受体的作用包括对由细胞膜表达的NMDAR的电压依赖性通道阻断,所述电压依赖性通道阻断对含有NR2C和NR2D亚基的NMDAR具有优先作用。

12. 根据权利要求9所述的方法,其中对所述离子型谷氨酸受体的作用包括诱导NMDAR亚基或有助于神经元可塑性并有助于突触蛋白的膜表达的其他突触蛋白的合成。

13. 根据权利要求1所述的方法,其中所述受试者是脊椎动物。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述脊椎动物是人。

15. 根据权利要求1所述的方法,其中所述物质是右美沙酮。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述右美沙酮是药学上可接受的盐的形式。

17. 根据权利要求15所述的方法,其中所述右美沙酮以0.1mg至5000mg的总日剂量递送。

18. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组合物的施用改善受试者中所述神经精神障

碍的病程和严重程度,并且其中所述缓解在选自首次施用所述物质后两周或更短、首次施用所述物质后7天或更短、首次施用所述物质后4天或更短以及首次施用所述物质后2天或更短的时间段内开始。

19. 根据权利要求15所述的方法,其中由施用所述组合物产生的右美沙酮的治疗效果在2期临床试验中达到大于或等于0.3的效应值或在2期临床试验中达到大于或等于0.5的效应值,或在2期临床试验中达到大于或等于0.7的效应值。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述治疗效果在停止治疗后持续至少一周。

21. 根据权利要求19所述的方法,其中在停止治疗后所述治疗效果的持续时间等于或大于治疗的持续时间。

22. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组合物的施用是除了向所述受试者施用一种或多种抗抑郁药物之外发生,或者与向所述受试者施用一种或多种抗抑郁药物组合发生。

23. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组合物的施用是除了向所述受试者施用镁、锌或锂中的一种或多种之外发生,或者与向所述受试者施用镁、锌或锂中的一种或多种组合发生。

24. 根据权利要求15所述的方法,其中施用所述组合物导致所述神经精神障碍的疾病改善。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述受试者的体重指数等于或小于35。

26. 根据权利要求1所述的方法,其中施用所述组合物用于改善认知功能、改善社交功能、改善睡眠、改善性功能、改善工作执行能力或改善社交活动的动机。

27. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组合物的施用是口服、含服、舌下、直肠、阴道、鼻腔、通过气溶胶、透皮、肠胃外、静脉内、皮下、硬膜外、鞘内、耳内、眼内或局部地实施。

28. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组合物的施用以每天25mg的剂量发生。

29. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组合物的施用包括施用负荷剂量的所述组合物,然后施用日剂量的所述组合物。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中所述组合物的负荷剂量包括的所述物质的量大于所述组合物的每个日剂量中存在的所述物质的量。

31. 根据权利要求30所述的方法,其中在施用所述组合物的第一天达到处于或高于稳态的血浆水平。

32. 根据权利要求30所述的方法,其中在施用所述组合物的4小时内达到处于或高于稳态的血浆水平。

33. 根据权利要求1所述的方法,其中在施用所述组合物后,所述物质在所述受试者中的总血浆水平为5ng/ml至3000ng/ml。

34. 根据权利要求1所述的方法,其中在施用所述组合物之后,所述物质在所述受试者中的未结合水平为0.1nM至1500nM。

35. 根据权利要求1所述的方法,其中所述组合物的施用作为间歇治疗方案发生,所述间歇治疗方案选自每隔一天、每三天一次、每周一次、每隔一周、每隔两周、每月一周、每隔一个月、每隔2个月、每隔3个月、每年1周和每年1个月。

36. 根据权利要求35所述的方法,其中所述组合物的施用与所选择的间歇治疗方案中的安慰剂交替。

37. 根据权利要求36所述的方法, 其中代替安慰剂或除了安慰剂之外, 所述方法包括施用镁、锌或锂中的一种或多种。

38. 根据权利要求1所述的方法, 进一步与数字应用程序相关联以监测所述障碍的病程, 包括对症状和体征以及功能和残疾结果的数字监测。

39. 根据权利要求8所述的方法, 其中所述受体是阿片受体并且选自MOR、KOR和DOR。

40. 一种用于治疗神经精神障碍的方法, 所述方法包括: 诊断患有选自重度抑郁症、持续性抑郁症、破坏性情绪失调障碍、经前焦虑症、产后抑郁症、双相障碍、轻躁狂和躁狂症、广泛性焦虑障碍、社交焦虑障碍、躯体性症状障碍、丧亲抑郁症、调整性抑郁症、创伤后应激障碍、强迫症、慢性疼痛障碍和物质使用障碍的神经精神障碍的个体;

制定治疗所述个体的神经精神障碍的过程; 以及

向所述个体施用物质作为治疗所述个体的MDD的所述过程的至少一部分, 所述物质选自右美沙酮、右美沙酮代谢物、d-美沙多、d- α -乙酰美沙多、d- α -去甲美沙多、l- α -去甲美沙多和其药学上可接受的盐。

41. 一种治疗MDD的方法, 所述方法包括:

诊断患有MDD的个体;

制定治疗所述个体的MDD的过程; 以及

将右美沙酮施用于所述个体作为治疗所述个体的MDD的过程的至少一部分。

42. 一种治疗神经精神障碍的方法, 所述方法包括:

在受试者中诱导NMDAR亚基、AMPA亚基或有助于神经元可塑性和组装的NMDAR通道的其他突触蛋白的转录、合成和膜表达;

其中所述受试者患有神经精神障碍, 所述神经精神障碍选自重度抑郁症、持续性抑郁症、破坏性情绪失调障碍、经前焦虑症、产后抑郁症、双相障碍、轻躁狂和躁狂症、广泛性焦虑障碍、社交焦虑障碍、躯体性症状障碍、丧亲抑郁症、调整性抑郁症、创伤后应激障碍、强迫症、慢性疼痛障碍、膀胱过度活动症和物质使用障碍; 以及

其中诱导NMDAR亚基、AMPA亚基或有助于神经元可塑性的其他突触蛋白的转录、合成和膜表达是通过向受试者施用选自右美沙酮、右美沙酮代谢物、d-美沙多、d- α -乙酰美沙多、d- α -去甲美沙多、l- α -去甲美沙多及其药学上可接受的盐的物质来完成的。

43. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述神经精神障碍的治疗导致所述神经精神障碍的缓解, 所述缓解选自所述神经精神障碍的治愈、所述神经精神障碍的预防、所述神经精神障碍的严重程度的降低, 以及所述神经精神障碍的发病率的降低。

44. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述受试者是脊椎动物。

45. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述脊椎动物是人。

46. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述物质是右美沙酮。

47. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述右美沙酮是药学上可接受的盐的形式。

48. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述右美沙酮以0.1mg至5000mg的总日剂量递送。

49. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述受试者从所述神经精神障碍中的缓解开始于首次施用所述物质后两周或更短时间内。

50. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述受试者从所述神经精神障碍中的缓解开始

于首次施用所述物质后7天或更短时间内。

51. 根据权利要求42所述的方法, 其中右美沙酮的治疗效果在2期临床试验中达到大于或等于0.3的效应值或在2期临床试验中达到大于或等于0.5的效应值, 或在2期临床试验中达到大于或等于0.7的效应值。

52. 根据权利要求51所述的方法, 其中所述治疗效果在停止治疗后持续至少一周。

53. 根据权利要求51所述的方法, 其中在停止治疗后所述治疗效果的持续时间等于或大于治疗的持续时间。

54. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述组合物的施用与向所述受试者施用抗抑郁药物组合发生。

55. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述组合物的施用与向所述受试者施用镁、锌或锂中的一种或多种组合发生。

56. 根据权利要求46所述的方法, 其中右美沙酮用作疾病调节剂或用于治疗诊断为MDD和相关神经精神障碍且体重指数等于或小于35的患者。

57. 根据权利要求42所述的方法, 其中施用所述组合物用于改善认知功能、改善社交功能、改善睡眠、改善性功能、改善工作执行能力。

58. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述组合物的施用是口服、含服、舌下、直肠、阴道、鼻腔、通过气溶胶、透皮、肠胃外、静脉内、皮下、硬膜外、鞘内、耳内、眼内或局部地实施。

59. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述组合物的施用以每天0.01-1000mg的剂量发生。

60. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述组合物的施用包括施用负荷剂量的所述组合物, 然后施用日剂量的所述组合物。

61. 根据权利要求60所述的方法, 其中所述组合物的负荷剂量包含的所述物质的量是所述组合物的每个日剂量中存在的所述物质的量的两倍或更多。

62. 根据权利要求42所述的方法, 其中在施用所述组合物的第一天达到稳态。

63. 根据权利要求42所述的方法, 其中在施用所述组合物的4小时内达到稳态。

64. 根据权利要求42所述的方法, 其中在施用所述组合物后, 所述物质在受试者中的未结合水平为5ng/ml至3000ng/ml。

65. 根据权利要求42所述的方法, 其中在施用所述组合物后, 所述物质在受试者中的未结合水平为0.5nM至1500nM。

66. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述组合物的施用作为间歇治疗方案发生, 所述间歇治疗方案选自每周一次、每隔一天、每三天一次、每周一次、每隔一周、每隔两天、每隔三天、每两周一次和每隔一月。

67. 根据权利要求66所述的方法, 其中所述组合物的施用与所选择的间歇治疗方案中的安慰剂交替。

68. 根据权利要求67所述的方法, 其中代替安慰剂或除了安慰剂之外, 它包括镁、锌或锂中的一种或多种。

69. 根据权利要求42所述的方法, 进一步与数字应用程序相关联以监测所述障碍的病程, 包括症状和体征以及功能和残疾结果。

70. 一种治疗以离子通道功能障碍为特征的疾病或障碍的方法, 所述方法包括:

诊断患有以离子通道功能障碍为特征的疾病或障碍的个体；

制定治疗所述个体的所述疾病或障碍的过程，其中治疗所述疾病或障碍的过程涉及所述离子通道功能障碍的解决；以及

向所述个体施用物质作为解决所述离子通道功能障碍的所述过程的至少一部分，所述物质选自右美沙酮、右美沙酮代谢物、d-美沙多、d- α -乙酰美沙多、d- α -去甲美沙多、l- α -去甲美沙多及其药学上可接受的盐。

71. 根据权利要求70所述的方法，其中所述离子通道是一个或多个NMDAR的组成部分。

72. 根据权利要求70所述的方法，其中所述离子通道是包含GluN2C亚基的NMDARs的组成部分。

73. 根据权利要求70所述的方法，其中所述离子通道是包含GluN2D亚基的NMDAR的组成部分。

74. 根据权利要求70所述的方法，其中所述离子通道是包含GluN2B亚基的NMDAR的组成部分。

75. 根据权利要求70所述的方法，其中所述离子通道是包含GluN2A亚基的NMDAR的组成部分。

76. 根据权利要求70所述的方法，其中所述离子通道是包含GluN3A亚基的NMDAR的组成部分。

77. 一种将障碍诊断为由病理性过度活跃的NMDAR通道引起、恶化或维持的障碍的方法，所述方法包括：

向受试者施用组合物，所述组合物包括选自右美沙酮、右美沙酮代谢物、d-美沙多、d- α -乙酰美沙多、d- α -去甲美沙多、l- α -去甲美沙多及其药学上可接受的盐的物质，所述受试者已被诊断患有至少一种病理生理学不明确的障碍，所述障碍选自神经障碍、神经精神障碍、眼科障碍、耳科障碍、代谢障碍、骨质疏松症、泌尿生殖系统障碍、肾功能不全、不孕症、卵巢功能早衰、肝脏病症、免疫性疾病、肿瘤疾病、心血管疾病；

通过在施用所述组合物之前和之后测量每种障碍特有的终点来确定所述组合物在所述至少一种障碍中的有效性；以及

诊断表现出特定终点改善的受试者具有由病理性过度活跃的NMDAR通道引起、恶化或维持的障碍。

78. 根据权利要求70所述的方法，其中所述离子通道是包含GluN3B亚基的NMDAR的组成部分。

79. 一种预防由包括COVID-19的感染性疾病引起的急性和慢性并发症的方法，所述急性和慢性并发症包括ARDS、DIC、以及肾、GI和神经系统并发症，所述方法包括：

向受试者施用组合物，所述组合物包含选自以下的物质：右美沙酮、右美沙酮代谢物、d-美沙多、d- α -乙酰美沙多、d- α -去甲美沙多、l- α -去甲美沙多及其药学上可接受的盐。

80. 一种用于治疗和诊断由包括COVID-19的感染性疾病引起的急性和慢性并发症的方法，所述急性和慢性并发症包括ARDS、DIC、以及肾、GI和神经系统并发症，所述方法包括：

向受试者施用组合物，所述组合物包含选自以下的物质：右美沙酮、右美沙酮代谢物、d-美沙多、d- α -乙酰美沙多、d- α -去甲美沙多、l- α -去甲美沙多及其药学上可接受的盐。

81. 一种治疗和诊断由NMDAR过度激活引起的肺部疾病、障碍和病症的方法，所述NMDAR

包括GluN1-GluN2D亚型的NMDAR,所述肺部疾病、障碍和病症包括哮喘、ARDS、COPD、肺纤维化和肺部感染、及其后遗症,所述方法包括:

向受试者施用组合物,所述组合物包含选自以下的物质:右美沙酮、右美沙酮代谢物、d-美沙多、d- α -乙酰美沙多、d- α -去甲美沙多、l- α -去甲美沙多及其药学上可接受的盐。

82.一种治疗GI疾病、障碍和病症的方法,所述GI疾病、障碍和病症包括肝脏和胰腺疾病,包括溃疡、肠易激综合征、炎性肠病、NAFLD、NASH和代谢疾病,所述方法包括:

向受试者施用组合物,所述组合物包含选自以下的物质:右美沙酮、右美沙酮代谢物、d-美沙多、d- α -乙酰美沙多、d- α -去甲美沙多、l- α -去甲美沙多及其药学上可接受的盐。

83.一种治疗肾脏和泌尿生殖系统疾病、障碍和病症的方法,所述肾脏和泌尿生殖系统疾病、障碍和病症包括肾功能衰竭、不孕症、卵巢早衰、经前期综合征和子宫内膜异位症,所述方法包括:

向受试者施用组合物,所述组合物包含选自以下的物质:右美沙酮、右美沙酮代谢物、d-美沙多、d- α -乙酰美沙多、d- α -去甲美沙多、l- α -去甲美沙多及其药学上可接受的盐。

84.一种治疗心血管障碍和病症的方法,所述心血管障碍和病症包括缺血性心脏病和充血性心力衰竭,所述方法包括:

向受试者施用组合物,所述组合物包含选自以下的物质:右美沙酮、右美沙酮代谢物、d-美沙多、d- α -乙酰美沙多、d- α -去甲美沙多、l- α -去甲美沙多及其药学上可接受的盐。

85.一种用于诊断或预防或治疗由NMDAR的过度激活引起的急性和慢性疾病、障碍和病症的方法,所述NMDAR的过度激活是由与包括SARS-CoV-2病毒感染在内的传染源反应的内源性炎症分子引起的,所述内源性炎症分子包括啞啞酸和其他炎症分子,所述方法包括:

向受试者施用组合物,所述组合物包含选自以下的物质:右美沙酮、右美沙酮代谢物、d-美沙多、d- α -乙酰美沙多、d- α -去甲美沙多、l- α -去甲美沙多及其药学上可接受的盐。

86.一种诊断或预防或治疗由NMDAR的过度激活引起的包括哮喘在内的急性和慢性肺病的方法,所述NMDAR的过度激活是由内源性或内源性物质引起的并且包括NMDAR GluN1-GluN2D亚型的过度激活,所述方法包括:

向受试者施用组合物,所述组合物包含选自以下的物质:右美沙酮、右美沙酮代谢物、d-美沙多、d- α -乙酰美沙多、d- α -去甲美沙多、l- α -去甲美沙多及其药学上可接受的盐。