

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
30 décembre 2009 (30.12.2009)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2009/156680 A2

(51) Classification internationale des brevets :
A61K 31/27 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/445 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
A61K 31/551 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2009/051041

(22) Date de dépôt international :
2 juin 2009 (02.06.2009)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0802996 2 juin 2008 (02.06.2008) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
SANOFI-AVENTIS [FR/FR]; 174 avenue de France,
F-75013 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : BERGIS,
Olivier [FR/FR]; c/o Sanofi-Aventis, Département
Brevets, 174 avenue de France, F-75013 Paris (FR).
PICHAT, Philippe [FR/FR]; c/o Sanofi-Aventis,
Département Brevet, 174 avenue de France, F-75013
Paris (FR). URANI, Alexandre [FR/FR]; c/o Sanofi-
Aventis, Département Brevets, 174 avenue de France,
F-75013 Paris (FR).

(74) Mandataire : MERLIER, Josiane; Sanofi-Aventis,
Département Brevets, 174 avenue de France, F-75013
Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ,
CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée
dès réception de ce rapport (règle 48.2.g))

(54) Title : COMBINATION OF A NICOTINIC RECEPTOR PARTIAL AGONIST AND OF AN
ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITOR, PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING SAME AND USE
THEREOF IN THE TREATMENT OF COGNITIVE DISORDERS

(54) Titre : ASSOCIATION D'UN AGONISTE PARTIEL DES RECEPTEURS NICOTINIQUES ET D'UN INHIBITEUR
D'ACETYLCHOLINESTERASE, COMPOSITION PHARMACEUTIQUE LA CONTENANT ET SON UTILISATION DANS
LE TRAITEMENT DES TROUBLES COGNITIFS

(57) Abstract : The present invention relates to the combination of an alpha-7 nicotinic receptor partial agonist and of an
acetylcholinesterase inhibitor. The invention also relates to a pharmaceutical composition comprising the combination according
to the invention and to the use thereof in the treatment of cognitive disorders.

(57) Abrégé : L'invention serapporte à l'association d'un agoniste partiel des récepteurs nicotiniques de type alpha 7 et d'un
inhibiteur d'acétylcholinestérase. L'invention se rapporte également à une composition pharmaceutique comprenant l'association
selon l'invention et à son utilisation dans le traitement des troubles cognitifs.



WO 2009/156680 A2

ASSOCIATION D'UN AGONISTE PARTIEL DES RECEPTEURS
NICOTINIQUES ET D'UN INHIBITEUR D'ACETYLCHOLINESTERASE,
COMPOSITION PHARMACEUTIQUE LA CONTENANT ET SON UTILISATION
DANS LE TRAITEMENT DES TROUBLES COGNITIFS.

5

L'invention se rapporte à l'association d'un agoniste
partiel des récepteurs nicotiniques de type alpha 7 et d'un
inhibiteur d'acétylcholinestérase, à une composition
10 pharmaceutique comprenant l'association de l'invention et à
son utilisation dans le traitement des troubles cognitifs,
et plus particulièrement des troubles cognitifs liés à la
maladie d'Alzheimer.

15 Par troubles cognitifs, on entend les déficits des
fonctions intellectuelles supérieures qui concernent, entre
autres, les troubles de la mémoire à court terme et à long
terme, de la mémoire de travail, des processus attentionnels
et de la vigilance, de la mémoire sémantique, de la mémoire
20 spatiale, les troubles des fonctions exécutives supérieures
(abstraction et planification, jugement).

Les patients atteints de troubles cognitifs liés à la
maladie d'Alzheimer sont actuellement traités par
25 l'administration d'inhibiteurs de l'acétylcholinestérase.

L'une des difficultés des traitements des troubles cognitifs
liés à la maladie d'Alzheimer par les inhibiteurs de
l'acétylcholinestérase réside dans le fait que de nombreux
30 patients traités développent progressivement des effets
secondaires indésirables avec la répétition des
administrations. Ainsi, 10% à 15% des patients traités sont
obligés d'arrêter les traitements du fait des effets
secondaires de type gastro-intestinaux (nausées,

- vomissements, diarrhées) et 40% des patients traités ne peuvent recevoir une dose thérapeutique optimale du fait de ces effets secondaires. En outre, seuls 30% à 50% des patients traités répondent au traitement et les effets thérapeutiques observés ne consistent souvent qu'en une simple stabilisation modérée des symptômes (voir pour revue le rapport Alzheimer's disease, Decision Resources, USA, June 2006).
- 10 Il est par conséquent nécessaire de trouver des médicaments plus efficaces pour traiter les patients souffrants de troubles cognitifs, et plus particulièrement des troubles cognitifs liés à la maladie d'Alzheimer, qui de plus présenteraient moins d'effets secondaires indésirables.
- 15 L'invention vise à répondre à ce problème technique, en proposant une association d'un agoniste partiel des récepteurs nicotiniques de type alpha 7 et d'un inhibiteur d'acétylcholinestérase.
- 20 Les agonistes partiels des récepteurs nicotiniques de type alpha 7 ($\alpha 7$ -nAChRs) ont été décrits comme possédant des propriétés pro-cognitives dans plusieurs modèles animaux interrogeant différents types de mémoire ou de fonctions cognitives (Biton et al., Neuropsychopharmacology, 2007, 32 :1-16 ; Pichat et al., Neuropsychopharmacology, 2007, 25 32 :17-34).
- 30 L'utilisation d'un agoniste partiel et non d'un agoniste complet représente une avancée technologique significative. En effet, le récepteur nicotinique alpha 7 est connu pour présenter des phénomènes de désensibilisation rapide et prononcée. Un agoniste partiel, contrairement à un agoniste complet, ne désensibilisera que très peu le récepteur, ce qui se traduira par une persistance des effets thérapeutiques avec la répétition des traitements.

L'association de l'invention présente une action améliorée par rapport à l'action des deux principes actifs pris individuellement. En effet, on observe un effet supérieur de l'association sur l'amplitude de l'effet pharmacologique pro-cognitif par rapport à l'effet produit par les deux principes actifs pris individuellement.

Cet effet supérieur de l'association permettrait :

- de diminuer la dose prescrite et donc permet une meilleure tolérance du traitement (diminution des effets secondaires gastro-intestinaux) ;
- la possibilité d'une durée de traitement des patients plus longue, du fait de la meilleure tolérance ;
- l'augmentation du pourcentage de patients répondeurs au traitement associatif par rapport au traitement par les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase seuls.

Un premier objet de l'invention concerne une association d'un agoniste partiel des récepteurs nicotiniques de type alpha 7 et d'un inhibiteur d'acétylcholinestérase.

Un deuxième objet de l'invention concerne une composition pharmaceutique comprenant, à titre de principe actif, une telle association.

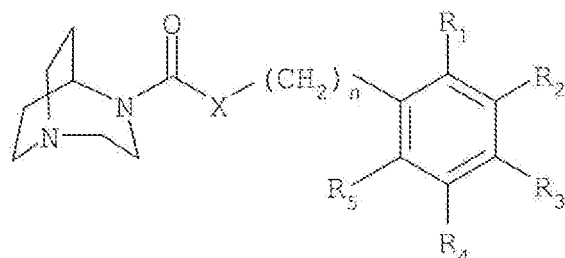
Un troisième objet de l'invention se rapporte à l'utilisation d'une telle association pour le traitement des troubles cognitifs d'origines variées, et plus particulièrement des troubles cognitifs liés à la maladie d'Alzheimer.

Ainsi, un premier objet de l'invention se rapporte à l'association d'un agoniste partiel des récepteurs nicotiniques de type alpha 7 et d'un inhibiteur d'acétylcholinestérase.

Parmi les agonistes partiels des récepteurs nicotiniques de type alpha 7 de l'invention, on peut citer les agonistes

partiels des récepteurs nicotiniques de type alpha 7 de formule générale (I)

5



(I)

dans laquelle

- 10 X représente un atome d'oxygène ou un groupe de formule NZ dans laquelle Z représente un atome d'hydrogène ou un groupe (C₁-C₆)alkyle,
 n représente le nombre 0, 1 ou 2, et
 R₁, R₂, R₃, R₄ et R₅ représentent chacun, indépendamment l'un
 15 de l'autre, un atome d'hydrogène ou d'halogène ou un groupe trifluorométhyle, trifluorométhoxy, cyano, hydroxy, (C₁-C₆)alkyle, (C₁-C₆)alcoxy, phénoxy ou phényle éventuellement substitué par un atome d'halogène ou un
 groupe trifluorométhyle, cyano, hydroxy, (C₁-C₆)alkyle ou
 20 (C₁-C₆)alcoxy, ou bien encore R₂ et R₃ forment ensemble un groupe de formule -OCH₂O- ou -CH₂CH₂CH₂CH₂-,
 à l'état de base ou de sel d'addition à un acide, d'hydrate ou de solvate.

- 25 Les composés de formule générale (I) sont décrits dans le document WO 00/58311.

Dans le cadre de la présente invention, on entend par

- C_t-C_z où t et z peuvent prendre les valeurs de 1 à 6 : une
 30 chaîne carbonée pouvant avoir de t à z atomes de carbone, par exemple C₁-C₃ une chaîne carbonée qui peut avoir de 1 à 3 atomes de carbone ;
 - un atome d'halogène : un atome de fluor, de chlore, de brome ou d'iode ;
 35 - un groupe alkyle : un groupe aliphatique saturé linéaire ou ramifié. A titre d'exemples, on peut citer les groupes méthyle, éthyle, propyle, isopropyle, butyle, isobutyle, tertbutyle, pentyle, etc ;
 - un groupe alcoxy : un radical -O-alkyle dont le groupe

alkyle est tel que précédemment défini.

Les composés de formule générale (I) définis ci-dessus ont été décrits dans le document WO 00/58311 en tant

- 5 qu'agonistes partiels des récepteurs nicotiniques de type alpha 7.

- 10 Les sels des composés de formule générale (I) utilisables selon l'invention peuvent être préparés avec des acides pharmaceutiquement acceptables, mais les sels d'autres acides utiles, par exemple, pour la purification ou l'isolement des composés de formule (I), font également partie de l'invention.

- 15 Les composés de formule générale (I) peuvent exister sous forme d'hydrates ou de solvates, à savoir sous forme d'associations ou de combinaisons avec une ou plusieurs molécules d'eau ou avec un solvant. De tels hydrates et solvates font également partie de l'invention.

- 20 Les composés de formule générale (I) peuvent comporter un ou plusieurs atomes de carbone asymétriques. Ils peuvent donc exister sous forme d'énantiomères ou de diastéréoisomères. Ces énantiomères, diastéréoisomères, ainsi que leurs mélanges, y compris les mélanges racémiques, font partie de l'invention.

- 25 Un premier groupe de composés de formule (I) utilisables selon l'invention est celui dans lequel X représente un atome d'oxygène.

- 30 Un second groupe de composés de formule (I) utilisables selon l'invention est celui dans lequel n représente le nombre 0.

- 35 Un troisième groupe de composés de formule (I) utilisables selon l'invention est celui dans lequel R₁, R₂, R₃, R₄ et R₅ représentent chacun, indépendamment l'un de l'autre, un atome d'hydrogène ou d'halogène.

Un quatrième groupe de composés de formule (I) utilisables selon l'invention est celui dans lequel R_1 , R_2 , R_4 et R_5 représentent chacun un atome d'hydrogène et R_3 représente un atome d'halogène.

Un cinquième groupe de composés de formule (I) utilisables selon l'invention est celui dans lequel
X représente un atome d'oxygène ;
n représente le nombre 0 ;
 R_1 , R_2 , R_4 et R_5 représentent chacun un atome d'hydrogène et R_3 représente un atome d'halogène.

Parmi les composés de formule (I) utilisables dans le cadre de l'invention, on peut citer notamment le 1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonane-4-carboxylate de 4-bromophényle, à l'état de base ou de sel d'addition à un acide, d'hydrate ou de solvate.

Un exemple de sel du 1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonane-4-carboxylate de 4-bromophényle utilisable selon l'invention est le sel de fumarate ((2E)-but-2-enedioate).

Conformément à l'invention, on peut préparer les composés de formule générale (I) selon le procédé décrit dans la demande WO 00/58311.

Exemple : Préparation du (2E)-but-2-enedioate de 1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonane-4-carboxylate de 4-bromophényle

Dans un réacteur double enveloppe de 6 L, on place 232,45 g de 1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonane-4-carboxylate de 4-bromophényle (WO 00/58311) dans 2331 mL d'éthanol. Le milieu réactionnel est porté à 60°C. Une solution de 87,17 g d'acide fumarique dans un 1000 mL d'éthanol et 97 mL d'eau, préalablement chauffée à 60°C, est alors ajoutée. On distille ensuite 1900 mL de solvant puis le milieu réactionnel est refroidi à 20°C en 2,5h. Après 2,5h de contact à 20°C, le (2E)-but-2-enedioate de 1,4-

diazabicyclo[3.2.2]nonane-4-carboxylate de 4-bromophényle est filtré, lavé par 2 fois 400 mL d'éthanol puis séché sous vide à 50°C.

5 Point de fusion (DSC) : 175°C

RMN ¹H (400MHz, DMSO-d₆) δ(ppm) : 1.80 (sl ^(a), 2H), 2.10 (sl, 2H), 3.10 (sl, 6H), 3.71 (sl, 1H), 3.84 (sl, 1H), 4.25 (sl, 0.5H), 4.40 (sl, 0.5H), 6.58 (s, 2H), 7.14 (m, 2H), 7.57 (m, 2H), 11 (sl, 2H). (a) sl = singulet large.

10

Au sens de la présente invention, l'inhibiteur d'acétylcholinestérase peut être choisi parmi tous les inhibiteurs d'acétylcholinestérase connus dans la littérature. A titre d'exemple, on peut citer notamment la

15 rivastigmine (Exelon®) et le donepezil (Aricept®).

Ainsi, un exemple d'association selon l'invention est l'association constituée du (2E)-but-2-ènedioate de 1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonane-4-carboxylate de 4-bromophényle et

20 de la rivastigmine.

Un autre exemple d'association selon l'invention est l'association constituée du (2E)-but-2-ènedioate de 1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonane-4-carboxylate de 4-bromophényle et du donepezil.

25 Un second objet de l'invention concerne une composition pharmaceutique comprenant, à titre de principe actif, une association telle que définie précédemment, et un ou plusieurs excipients pharmaceutiquement acceptables.

La composition pharmaceutique contient une dose minimale

30 active de chaque principe actif présent dans l'association selon l'invention.

L'invention concerne également une composition pharmaceutique contenant une dose sub-active de chaque

principe actif présent dans l'association selon l'invention. L'emploi de telles doses sub-actives peut permettre d'éviter les effets secondaires d'un ou des principes actifs présents dans l'association selon l'invention.

- 5 Les excipients sont choisis selon la forme pharmaceutique et le mode d'administration souhaités, parmi les excipients habituels qui sont connus de l'homme du métier. La composition peut être administrée par voie orale, parentérale ou rectale.
- 10 Les formes unitaires d'administration appropriées comprennent les formes par voie orale telles que les comprimés, les gélules molles ou dures, les poudres, les granules et les solutions ou suspensions orales, les formes d'administration sublinguale, buccale, intrachéale,
- 15 intraoculaire, intranasale, par inhalation, les formes d'administration topique, transdermique, sous-cutanée, intra-musculaire ou intraveineuse, les formes d'administration rectale et les implants. Pour l'application topique, on peut utiliser les principes actifs selon
- 20 l'invention dans des crèmes, gels, pommades ou lotions.

Selon l'invention, les deux principes actifs sont administrés selon la même voie, par exemple la voie orale, ou l'un des principes actifs est administré selon une première voie, par exemple la voie orale, et l'autre

25 principe actif est administré selon une voie différente, par exemple la voie parentérale.

Lorsqu'on prépare une composition sous forme de comprimé, on mélange les ingrédients actifs avec un ou plusieurs excipients pharmaceutiques, tels que la gélatine, l'amidon,

30 le lactose, le stéarate de magnésium, le talc, la silice, la gomme arabique, le mannitol, la cellulose microcristalline, l'hypromellose ou analogues.

On peut enrober les comprimés de saccharose, d'un dérivé cellulosique ou d'autres matières adaptées à l'enrobage. Les

35 comprimés peuvent être réalisés par différentes techniques, telles que la compression directe, la granulation sèche ou humide ou la fusion à chaud.

On peut également obtenir une composition pharmaceutique sous forme de gélule en mélangeant les ingrédients actifs avec un diluant et en versant le mélange obtenu dans des gélules molles ou dures.

- 5 Pour une administration parentérale, on utilise des suspensions aqueuses, des solutions salines isotoniques ou des solutions stériles et injectables qui contiennent des agents pharmacologiquement compatibles, par exemple le propylèneglycol ou le butylèneglycol.
- 10 Selon la pratique habituelle, le dosage approprié à chaque patient est déterminé par le médecin selon le mode d'administration, l'âge, le poids et la réponse dudit patient.

- Les doses dépendent de l'effet recherché, de la durée du traitement et de la voie d'administration utilisée.
- 15

Par exemple par voie orale, les doses journalières de chacun des principes actifs de l'association selon l'invention sont les suivantes :

- agonistes partiels des récepteurs nicotiniques de type alpha 7: entre 0,5 et 500 mg par jour et par personne, notamment entre 1 et 100 mg par jour et par personne ;
 - inhibiteur d'acétylcholinestérase : entre 3 et 200 mg par jour et par personne, notamment entre 5 et 100 mg par jour et par personne.
- 20

- 25 Il peut y avoir des cas particuliers où des dosages plus élevés ou plus faibles sont appropriés. De tels dosages ne sortent pas du cadre de l'invention.

- Les doses respectives de l'agoniste partiel des récepteurs nicotiniques de type alpha 7 et de l'inhibiteur d'acétylcholinestérase sont généralement sensiblement identiques entre elles ou bien peuvent différer l'une de l'autre.
- 30

- A titre d'exemple, une forme unitaire d'administration de l'agoniste partiel des récepteurs nicotiniques de type alpha 7 sous forme de comprimé comprend les ingrédients suivants :
- 35

	Composé	4 mg
	Mannitol	174 mg
	Croscarmellose sodique	6 mg
	Amidon de maïs	15 mg
5	Hydroxypropyl-méthylcellulose	2 mg
	Stéarate de magnésium	3 mg

Egalement à titre d'exemple, une forme unitaire d'administration de l'inhibiteur d'acétylcholinestérase sous forme de comprimé peut comprendre 10 mg de l'inhibiteur d'acétylcholinestérase et des excipients usuels, par exemple de la cellulose microcristalline, de la silice colloïdale, du talc, de la croscarmellose sodique, du stéarate de magnésium.

L'administration de chacun des principes actifs peut également être effectuée de façon simultanée, séparée ou de manière étalée dans le temps (administration séquentielle).

Lorsque l'administration est effectuée de façon simultanée, les deux principes actifs peuvent être réunis au sein d'une composition pharmaceutique unique, comprenant les deux principes actifs, telle qu'un comprimé ou une gélule.

Les deux principes actifs peuvent également, que leur administration soit simultanée ou non, être présents dans des compositions pharmaceutiques distinctes. A cet effet, l'association selon l'invention peut se présenter sous forme de kit comprenant, d'une part, au moins un agoniste partiel des récepteurs nicotiniques de type alpha 7 tel que défini dans ce qui précède et, d'autre part, au moins un inhibiteur d'acétylcholinestérase tel que défini dans ce qui précède, l'agoniste partiel des récepteurs nicotiniques de type alpha 7 et l'inhibiteur d'acétylcholinestérase étant dans des compartiments distincts et étant destinés à être administrés de façon simultanée, séparée ou étalée dans le temps (administration séquentielle).

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'une association telle que décrite précédemment pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des

troubles cognitifs, et plus particulièrement des troubles cognitifs liés à la maladie d'Alzheimer.

L'invention a également pour objet une méthode de traitement des troubles cognitifs, et plus particulièrement des troubles cognitifs liés à la maladie d'Alzheimer, qui comprend l'administration à un patient d'une dose minimale active ou sub-active d'un agoniste partiel des récepteurs nicotiniques de type alpha 7 tel que défini précédemment, et d'une dose minimale active ou sub-active d'un inhibiteur d'acétylcholinestérase tel que défini dans ce qui précède, lesdites doses étant administrées de façon simultanée, séparée ou séquentielle, comme cela est décrit précédemment.

Les effets de l'association sur les troubles cognitifs ont été évalués grâce à deux tests de psychopharmacologie comportementale chez le rongeur (rat et souris).

Ces tests visent un des principaux types de troubles cognitifs que sont les troubles de la mémoire et plus particulièrement les troubles de la mémoire épisodique visuelle.

Le but est de mettre en évidence l'effet supérieur de l'association sur l'amplitude de l'effet pharmacologique pro-cognitif par rapport à l'effet produit par les deux principes actifs pris individuellement dans le traitement de ces troubles cognitifs.

1. Test de l'oubli spontané chez le rat non déficitaire

Une première étude a visé à mettre en évidence chez le rat adulte une synergie procognitive de l'association selon l'invention dans une tâche de mémoire visuelle épisodique, utilisant un protocole d'oubli spontané dans le test de reconnaissance d'objet.

1.) Phase d'habituation : Dans ce protocole, les animaux sont d'abord soumis à une séance d'habituation au contexte environnemental (une enceinte en bois de 65 x 45 x 45 cm)

pendant une durée de 2 minutes. Le temps passé en locomotion active est mesuré à l'aide d'un chronomètre.

2.) Phase d'apprentissage : 24 heures plus tard, deux objets
5 exactement identiques (soit des triangles en métal, soit des
pyramides réalisées en Lego) sont disposés dans le
dispositif expérimental. Chaque rat est déposé au milieu de
l'enceinte, le museau contre la paroi opposée de celle où
sont situés les objets/stimulus. On respecte une alternance
10 équitable dans chacun des groupes de rats, des couples
d'objets présentés. Les animaux sont laissés dans l'enceinte
expérimentale jusqu'à ce qu'ils atteignent une durée
d'exploration des deux objets égale à 20 secondes, sur une
durée maximale de 3 minutes. Dès que les 20 secondes
15 d'exploration sont atteintes, le rat est remis dans sa cage
de stabulation. Cette procédure permet d'homogénéiser le
niveau d'imprégnation des animaux pour les objets familiers,
et donc d'obtenir un niveau d'apprentissage comparable d'un
animal à l'autre.

20

3.) Séance de rappel : La séance de rappel a lieu après un
délai d'oubli de 24h pour tous les groupes. Les rats sont
confrontés à un couple d'objets constitué de l'objet
rencontré lors de la phase d'apprentissage, et d'un objet
25 inconnu. Les rats sont déposés de la même façon que pour la
séance d'apprentissage.

Cet essai dure 3 minutes pendant lesquelles on mesure le
temps passé à explorer chacun des 2 objets.

Si l'animal présente une remémoration significative de
30 l'objet préalablement mémorisé, il explorera majoritairement
l'objet nouveau. A l'inverse, si l'animal a oublié l'objet
familier, les durées d'exploration de l'objet nouveau et de
l'objet familier seront similaires.

35 Pour les séances d'apprentissage et de rappel, l'exploration
d'un objet est comptabilisée si l'animal oriente son museau
vers l'objet, à l'intérieur d'un périmètre de 2 centimètres
autour de celui-ci, ou s'il le touche avec son museau ou ses
pattes. Si le rat tourne autour de l'objet ou s'assoit

dessus, ces comportements ne sont pas considérés comme exploratoires.

Les données brutes sont exprimées en secondes.

5

Les composés à tester sont administrés par voie orale 60 minutes (étude rats) avant chacun des trois séances du protocole.

10 Quatre groupes expérimentaux sont constitués, recevant respectivement :

1 - véhicule (Méthyl-cellulose + Tween seul)

2 - agoniste partiel des récepteurs nicotiniques de type alpha 7 (dose inactive)

15 3 - inhibiteur d'acétylcholinestérase (dose inactive)

4 - agoniste partiel des récepteurs nicotiniques de type alpha 7 (dose inactive) + inhibiteur d'acétylcholinestérase (dose inactive)

20 Lors de la séance de rappel, 24 heures après la séance d'apprentissage, les durées d'exploration des deux objets, exprimés en secondes et l'indice de reconnaissance (durée d'exploration de l'objet nouveau/durée total d'exploration des objets nouveau et familier) sont mesurés.

25 - Des durées d'exploration semblables vis-à-vis de l'objet familier et de l'objet nouveau traduisent un oubli de l'objet familier et donc une déficience de la mémoire visuelle épisodique.

Au contraire, une durée d'exploration plus importante de

30 l'objet nouveau que de l'objet familier, traduit une remémoration significative de l'objet familier et donc une amélioration de la mémoire visuelle épisodique.

- Un indice de reconnaissance peu élevé traduit un oubli de l'objet familier et donc une déficience de la mémoire

35 visuelle épisodique.

Au contraire, un indice de reconnaissance élevé traduit une remémoration significative de l'objet familier et donc une amélioration de la mémoire visuelle épisodique.

Les résultats qui suivent ont été obtenus en constituant les quatre groupes expérimentaux suivants, recevant respectivement :

- Groupe 1 : véhicule (Méthyl-cellulose + Tween seul)
 - 5 - Groupe 2 : (2E)-but-2-enedioate de 1,4-diazabicyclo-[3.2.2]nonane-4-carboxylate de 4-bromophényle 0,1 mg/kg, p.o. (dose inactive)
 - Groupe 3 : Rivastigmine 0,03 mg/kg, p.o. (dose inactive)
 - Groupe 4 : (2E)-but-2-enedioate de 1,4-diazabicyclo-
 - 10 [3.2.2]nonane-4-carboxylate de 4-bromophényle 0,1 mg/kg, p.o. + Rivastigmine 0,03 mg/kg, p.o. (dose inactive)
- Les doses ci-dessus sont exprimées en équivalent base.

La figure 1 et le tableau 1 présentent le temps passé en locomotion pendant la séance d'habituation pour chacun des

15 groupes expérimentaux.

Tableau 1

Groupe expérimental	Locomotion (secondes)
1	24,80 ± 1,38
2	21,15 ± 1,14
3	24,94 ± 2,38
4	23,31 ± 1,40

20

Après une seule administration de chacun des deux composés ou de la combinaison des deux, aucune modification de la locomotion n'est observée lors de la séance d'habituation au contexte environnemental.

25

Le tableau 2 et les figures 2 et 3 présentent :

- la durée d'exploration (en secondes) des deux objets, nouveau et familier ; et
 - l'indice de reconnaissance tel que défini ci-dessus ;
- 30 pendant la séance de rappel pour chacun des groupes expérimentaux.

Lors de la séance de rappel, 24 heures après la séance d'apprentissage, les animaux traités par le véhicule seul ou

par la dose inactive de chacun des deux composés ((2E)-but-2-enedioate de 1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonane-4-carboxylate ou Rivastigmine) ne présentent aucune discrimination significative entre l'objet familier et l'objet nouveau.

5 Ceci traduit un oubli de l'objet familier.

A l'inverse, les animaux traités par la combinaison des doses inactives de chacun des composés testés présentent une très importante exploration de l'objet nouveau par rapport à l'objet familier, traduisant une remémoration significative
10 de l'objet familier. Cet effet est observé sur les durées d'exploration des deux objets, exprimées en secondes, et sur l'indice de reconnaissance (tableau 2 et figures 2 et 3).

Tableau 2

15

Groupe expérimental	Durée d'exploration (secondes)		Indice de reconnaissance (nouveau/ (nouveau+familier))
	Objet familier	Nouvel objet	
1	11,96 ± 1,51	12,09 ± 1,74	0,48 ± 0,05
2	10,47 ± 0,84	11,10 ± 1,44	0,50 ± 0,04
3	10,10 ± 1,56	9,42 ± 1,86	0,48 ± 0,05
4	6,14 ± 0,98	10,92 ± 1,18	0,66 ± 0,05

Les résultats ci-dessus montrent que, dans un test de mémoire visuelle épisodique, l'association selon l'invention a bien un effet procognitif supérieur par rapport à l'effet
20 procognitif produit par les deux principes actifs pris individuellement.

2. Test du déficit de mémoire épisodique visuelle à court terme induit par des injections intra-cérébro-ventriculaires
25 (ICV) de protéine β -amyloïde 25-35 chez la souris.

Les peptides β -amyloïdes sont les constituants majoritaires des plaques séniles observées dans la maladie d'Alzheimer. Le fragment peptidique A β 25-35 contient les 11 acides aminés
30 nécessaires et suffisants pour induire une toxicité neurologique. C'est la raison pour laquelle des injections

intra-cérébro-ventriculaire (ICV) de ce peptide sont considérées comme un modèle pathophysiologique de la maladie d'Alzheimer à forte validité prédictive.

- 5 Le peptide amyloïde A β 25-35 est dissout dans de l'eau distillée à une concentration finale de 3 mg/ml. Il est ensuite incubé à 37°C pendant 4 jours afin de former des agrégats de peptide toxique. Les animaux contrôles reçoivent le peptide mélangé (« scrambled peptide »), constitué des
10 mêmes acides aminés, mais organisés selon une séquence aléatoire. Ce peptide mélangé ne présente aucune toxicité neuronale (non toxique).

- Le peptide est injecté par voie intra-cérébro-ventriculaire
15 à des souris de souche CD1 anesthésiées à l'isoflurane. Une micro-seringue équipée d'une aiguille de 28 gauges et de 3 mm de longueur est utilisée. L'aiguille est insérée unilatéralement, 1 mm à droite de la ligne central
équidistante de chaque œil et à une égale distance entre
20 l'axe des yeux et l'axe des oreilles. 3 μ l du peptide agrégé sont injectés pendant une durée d'une minute. Les souris sont utilisées pour les épreuves comportementales entre 6 à 14 jours après l'injection intracérébrale.

- 25 Le protocole expérimental comportemental utilisé est comparable à celui utilisé dans le test de l'oubli spontané chez le rat, décrit ci-dessus.

- 1.) Phase d'habituation : Dans ce protocole, les souris sont
30 d'abord soumises à une séance d'habituation au contexte environnemental (une enceinte en PVC gris clair de 52 x 52 x 40 cm, éclairage à 6 Lux) pendant une durée de 10 minutes. Le temps passé en locomotion active est mesuré à l'aide d'un chronomètre.

35

- 2.) Phase d'apprentissage : 24 heures plus tard, deux objets exactement identiques (soit des triangles en métal (5.5 x 3.3 cm), soit une brique carrée Lego rouge (3.0 x 3.0 x 3.0 cm)) sont disposés dans le dispositif expérimental. Chaque

souris est déposée au milieu de l'enceinte, le museau contre la paroi opposée de celle où sont situés les objets/stimulus. On respectera une alternance équitable dans chacun des groupes de souris, des couples d'objets présentés. Les animaux sont laissés dans l'enceinte expérimentale jusqu'à ce qu'ils atteignent une durée d'exploration des deux objets égale à 10 secondes, sur une durée maximale de 3 minutes. Dès que les 10 secondes d'exploration sont atteintes, la souris est remise dans sa cage de stabulation. Cette procédure permet d'homogénéiser le niveau d'imprégnation des animaux pour les objets familiers, et donc d'obtenir un niveau d'apprentissage comparable d'un animal à l'autre.

3.) Séance de rappel : La séance de rappel a lieu après un délai d'oubli de 1 heure pour tous les groupes. Ce délai d'oubli court induit de bonnes performances de rappel chez les animaux contrôles et permet de mettre en évidence un déficit induit par l'injection de peptide toxique chez les autres animaux. Les souris sont confrontées à un couple d'objets constitué de l'objet rencontré lors de la phase d'apprentissage, et d'un objet inconnu. Les souris sont déposées dans l'enceinte de la même façon que pour la séance d'apprentissage.

Cet essai dure 5 minutes pendant lesquelles on mesure le temps passé à explorer chacun des 2 objets.

Un animal contrôle présentera, pour ce délai d'oubli court, une exploration plus importante de l'objet nouveau, traduisant une remémoration significative de l'objet familier. A l'inverse, des animaux déficitaires présenteront des durées d'exploration des deux objets non statistiquement différentes.

Pour les séances d'apprentissage et de rappel, l'exploration d'un objet est comptabilisée si l'animal oriente son museau vers l'objet, à l'intérieur d'un périmètre de 2 centimètres autour de celui-ci, ou s'il le touche avec son museau ou ses pattes. Si le rat tourne autour de l'objet ou s'assoit dessus, ces comportements ne sont pas considérés comme exploratoires.

Les données brutes sont exprimées en secondes.

Les composés à tester sont administrés par voie
5 intrapéritonéale, 60 minutes avant chacune des trois séances
du protocole.

Cinq groupes expérimentaux ont été constitués, recevant
respectivement :

- 10 1 - peptide mélangé contrôle (non toxique), véhicule
 - 2 - Peptide $A\beta_{25-35}$ (toxique), véhicule
 - 3 - Peptide $A\beta_{25-35}$, inhibiteur d'acétylcholinestérase (dose
inactive)
 - 4 - Peptide $A\beta_{25-35}$, agoniste partiel des récepteurs
15 nicotinniques de type alpha 7 (dose inactive)
 - 5 - Peptide $A\beta_{25-35}$, inhibiteur d'acétylcholinestérase (dose
inactive) + agoniste partiel des récepteurs nicotinniques de
type alpha 7 (dose inactive)
- 20 Lors de la séance de rappel, c'est-à-dire 1 heure après la
séance d'apprentissage, les durées d'exploration des deux
objets, exprimés en secondes sont mesurées.
- Des durées d'exploration semblables vis-à-vis de l'objet
familier et de l'objet nouveau traduisent un oubli de
25 l'objet familier et donc une abolition totale des
performances de rappel à court terme.
 - Au contraire, une durée d'exploration plus importante de
l'objet nouveau que de l'objet familier, traduit une bonne
performance de rappel de mémoire à court terme.
- 30 L'indice de reconnaissance (durée d'exploration de l'objet
nouveau/durée total d'exploration des objets nouveau et
familier) est également mesuré.
- Un indice de reconnaissance peu élevé traduit un oubli de
35 l'objet familier et donc une abolition totale des
performances de rappel à court terme.
 - Au contraire, un indice de reconnaissance élevé traduit
une remémoration significative de l'objet familier et donc
une bonne performance de rappel de mémoire à court terme.

Les résultats qui suivent ont été obtenus en constituant les cinq groupes expérimentaux suivants, recevant respectivement :

- 5 1 - peptide mélangé contrôle (non toxique), véhicule
2 - Peptide A β_{25-35} (toxique), véhicule
3 - Peptide A β_{25-35} , Donepezil, 0,1 mg/kg (dose inactive)
4 - Peptide A β_{25-35} , (2E)-but-2-enedioate de 1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonane-4-carboxylate de 4-bromophényle,
10 0,1 mg/kg (dose inactive)
5 - Peptide A β_{25-35} , Donepezil, 0,1 mg/kg + (2E)-but-2-enedioate de 1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonane-4-carboxylate de 4-bromophényle, 0,1 mg/kg (dose inactive)
Les doses ci-dessus sont exprimées en équivalent base.

15

- Après une seule administration de chacun des deux composés ou de la combinaison des deux, aucune modification de la locomotion n'est observée lors de la séance d'habituation au contexte environnemental. De même, aucune modification des
20 durées d'exploration des deux objets identiques lors de la séance d'apprentissage n'a été relevée.

Le tableau 3 et les figures 4 et 5 présentent :

- 25 - la durée d'exploration (en secondes) des deux objets, nouveau et familier ; et
- l'indice de reconnaissance tel que défini ci-dessus ;
pendant la séance de rappel pour chacun des groupes expérimentaux.

- 30 Lors de la séance de rappel, les animaux traités par le peptide contrôle non toxique présentent des performances de rappel de mémoire à court terme intactes, se traduisant par une exploration significativement plus importante de l'objet nouveau que de l'objet familier.

- 35 A l'inverse, les animaux ayant reçu le peptide toxique montrent une abolition totale des performances de rappel à court terme se traduisant par une exploration identique de l'objet familier et de l'objet nouveau.

La dose de (2E)-but-2-enedioate de 1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonane-4-carboxylate de 4-bromophényle et la dose de Donepezil sont, chacune d'entre elles, inactives par elles-mêmes et ne conduisent pas à une amélioration des performances.

En revanche, lorsque ces deux produits sont co-administrés, il est observé un effet promnésique très marqué, se traduisant par un retour à des performances de rappel à court-terme similaires, voire supérieures, à celles des animaux traités par le peptide non toxique (tableau 3 et figures 4 et 5).

Tableau 3

Groupe expérimental	Durée d'exploration (secondes)		Indice de reconnaissance (nouveau/ (nouveau+familier))
	Objet familier	Nouvel objet	
1	4,50 ± 0,90	10,00 ± 1,40	0,69 ± 0,05
2	6,50 ± 0,90	6,20 ± 0,80	0,49 ± 0,04
3	4,60 ± 0,70	5,00 ± 0,80	0,52 ± 0,05
4	4,30 ± 0,70	6,30 ± 0,60	0,60 ± 0,04
5	3,70 ± 0,70	11,30 ± 1,90	0,75 ± 0,04

Les résultats ci-dessus montrent que, dans un test de déficit de mémoire épisodique visuelle à court terme, l'association selon l'invention conduit à un effet promnésique supérieur marqué par rapport à l'effet promnésique produit par les deux principes actifs pris individuellement.

L'ensemble des résultats obtenus dans les deux séries d'expérimentations ci-dessus démontre l'effet supérieur de l'association selon l'invention en terme d'efficacité par rapport à chacun des principes actifs administrés de façon isolée et au même dosage, sur les troubles de la mémoire épisodique visuelle dans une tâche de reconnaissance d'objets chez le rongeur. Cet effet supérieur est observé

non seulement chez des d'animaux non déficitaires dont les performances sont améliorées, mais également dans un modèle pathophysiologique de la maladie d'Alzheimer, utilisant des injections intracérébrales de peptide amyloïde toxique.

5

Cet effet supérieur est représentatif de l'efficacité de l'association selon l'invention sur les troubles cognitifs, et plus particulièrement sur les troubles cognitifs liés à la maladie d'Alzheimer, pathologie pour laquelle ce type de

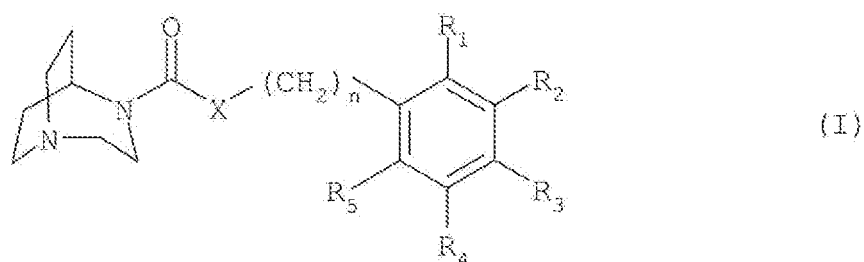
10 fonction cognitive est connue pour être particulièrement altérée.

REVENDICATIONS

1. Association d'un agoniste partiel des récepteurs
nicotiniques de type alpha 7 et d'un inhibiteur
5 d'acétylcholinestérase.

2. Association selon la revendication 1, caractérisée en
ce que l'agoniste partiel des récepteurs nicotiniques de
type alpha 7 est un composé de formule générale (I)

10



15 dans laquelle

X représente un atome d'oxygène ou un groupe de formule NZ
dans laquelle Z représente un atome d'hydrogène ou un groupe
(C₁-C₆)alkyle,

n représente le nombre 0, 1 ou 2, et

20 R₁, R₂, R₃, R₄ et R₅ représentent chacun, indépendamment l'un
de l'autre, un atome d'hydrogène ou d'halogène ou un groupe
trifluorométhyle, trifluorométhoxy, cyano, hydroxy,
(C₁-C₆)alkyle, (C₁-C₆)alcoxy, phénoxy ou phényle
éventuellement substitué par un atome d'halogène ou un

25 groupe trifluorométhyle, cyano, hydroxy, (C₁-C₆)alkyle ou
(C₁-C₆)alcoxy, ou bien encore R₂ et R₃ forment ensemble un
groupe de formule -OCH₂O- ou -CH₂CH₂CH₂CH₂-,

à l'état de base ou de sel d'addition à un acide, d'hydrate
ou de solvate.

30 3. Association selon la revendication 2, caractérisée en
ce que

X représente un atome d'oxygène ;

n représente le nombre 0 ;

R₁, R₂, R₄ et R₅ représentent chacun un atome d'hydrogène et

35 R₃ représente un atome d'halogène.

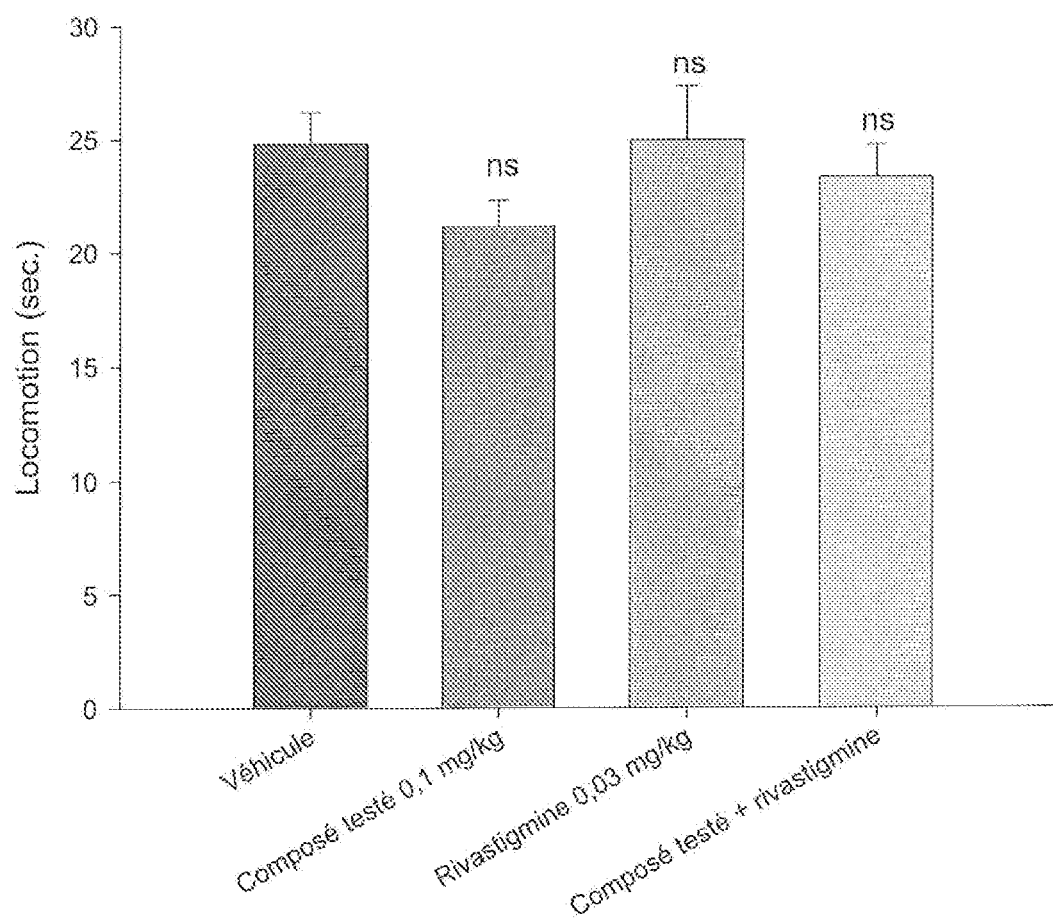
4. Association selon la revendication 2 ou 3, caractérisée en ce que l'agoniste partiel des récepteurs nicotiniques de type alpha 7 est le 1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonane-4-carboxylate de 4-bromophényle, à l'état de base ou de sel d'addition à un acide, d'hydrate ou de solvate.
5. Association selon la revendication 5, caractérisée en ce que le 1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonane-4-carboxylate de 4-bromophényle est sous forme de sel de (2E)-but-2-enedioate.
- 10 6. Association selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que l'inhibiteur d'acétylcholinestérase est choisi parmi la rivastigmine et le donepezil.
- 15 7. Association selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que l'agoniste partiel des récepteurs nicotiniques de type alpha 7 est le (2E)-but-2-enedioate de 1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonane-4-carboxylate de 4-bromophényle et l'inhibiteur d'acétylcholinestérase est la rivastigmine.
- 20 8. Association selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que l'agoniste partiel des récepteurs nicotiniques de type alpha 7 est le (2E)-but-2-enedioate de 1,4-diazabicyclo[3.2.2]nonane-4-carboxylate de 4-bromophényle et l'inhibiteur d'acétylcholinestérase est le
- 25 donepezil.
9. Composition pharmaceutique comprenant à titre de principes actifs, l'association selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, ainsi qu'au moins un excipient pharmaceutiquement acceptable.
- 30 10. kit comprenant, d'une part, un agoniste partiel des récepteurs nicotiniques de type alpha 7 tel que défini dans l'une quelconque des revendications 1 à 5 et, d'autre part, un inhibiteur d'acétylcholinestérase, l'agoniste partiel des
- 35 récepteurs nicotiniques de type alpha 7 et l'inhibiteur d'acétylcholinestérase étant dans des compartiments

distincts et étant destinés à être administrés de façon simultanée, séparée ou étalée dans le temps (administration séquentielle).

- 5 11. Utilisation d'une association selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des troubles cognitifs.
12. Utilisation selon la revendication 11, caractérisée en ce que les troubles cognitifs sont liés à la maladie
- 10 d'Alzheimer.

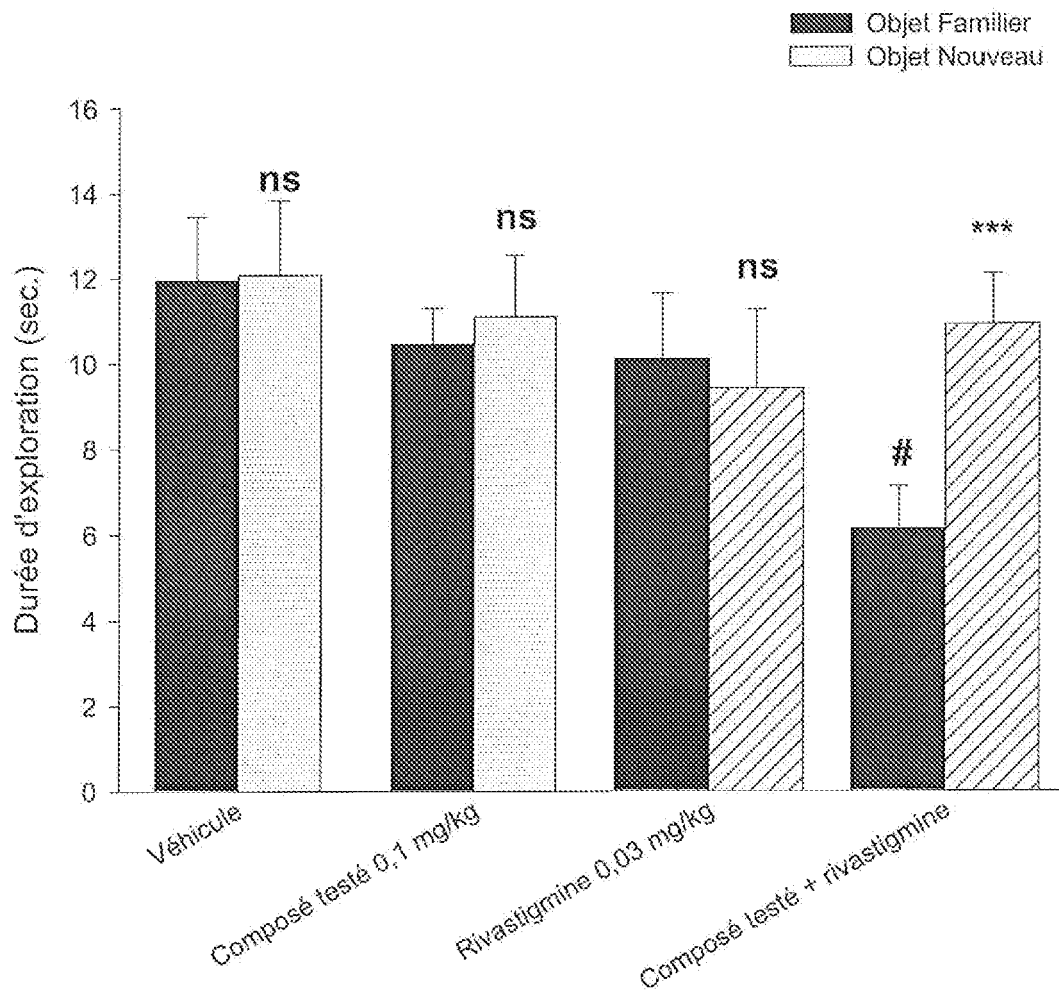
1/5

Figure 1



2/5

Figure 2

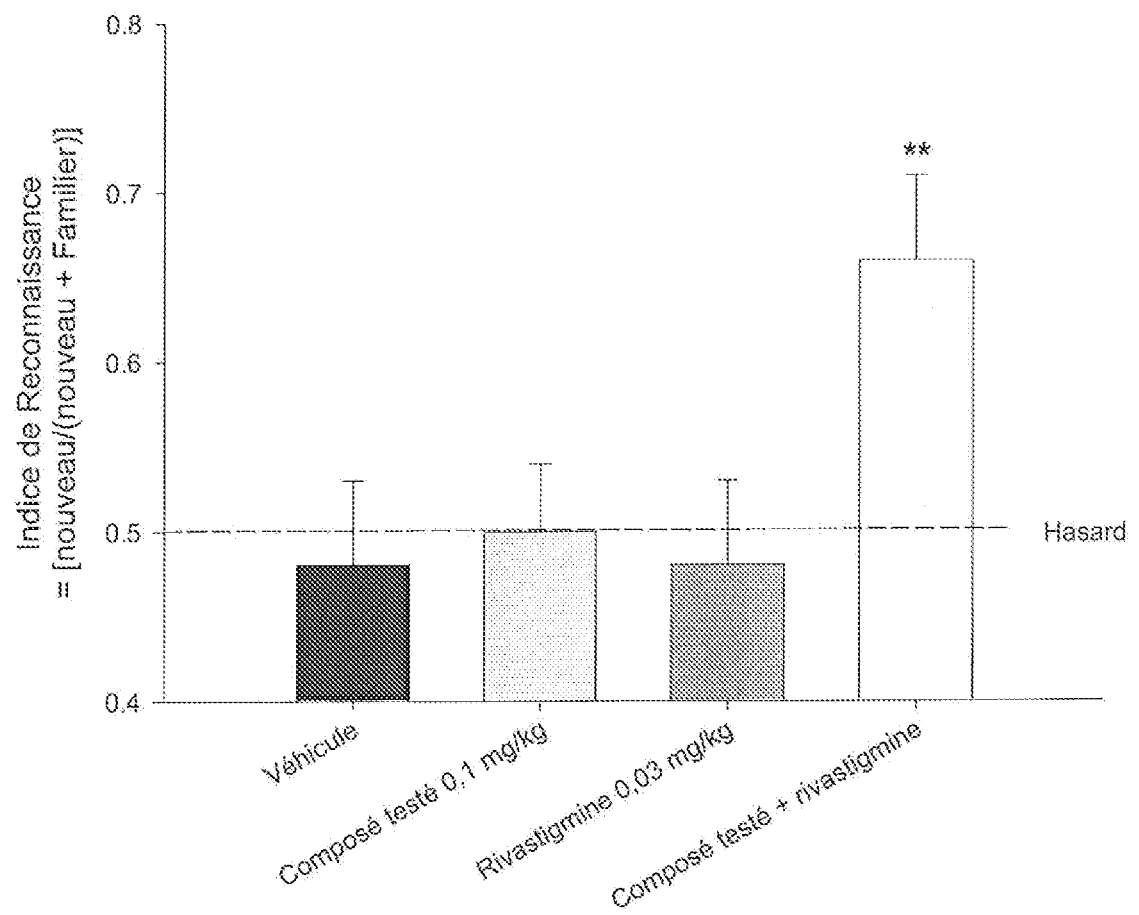


*** $p < 0.001$ objet nouveau vs objet familier

$p < 0.05$ vs groupe contrôle (véhicule)

3/5

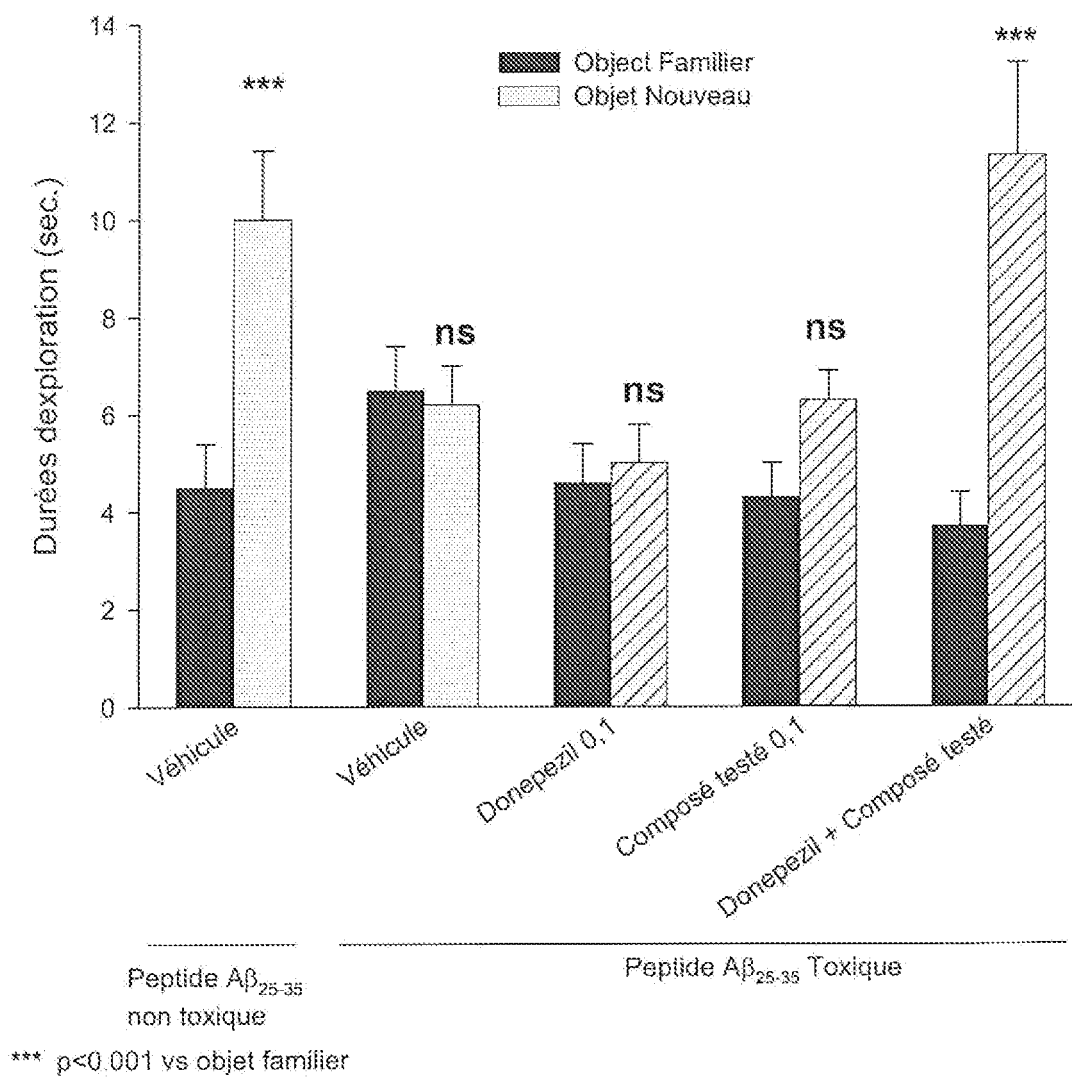
Figure 3



** $p < 0.01$ vs groupe contrôle (véhicule)

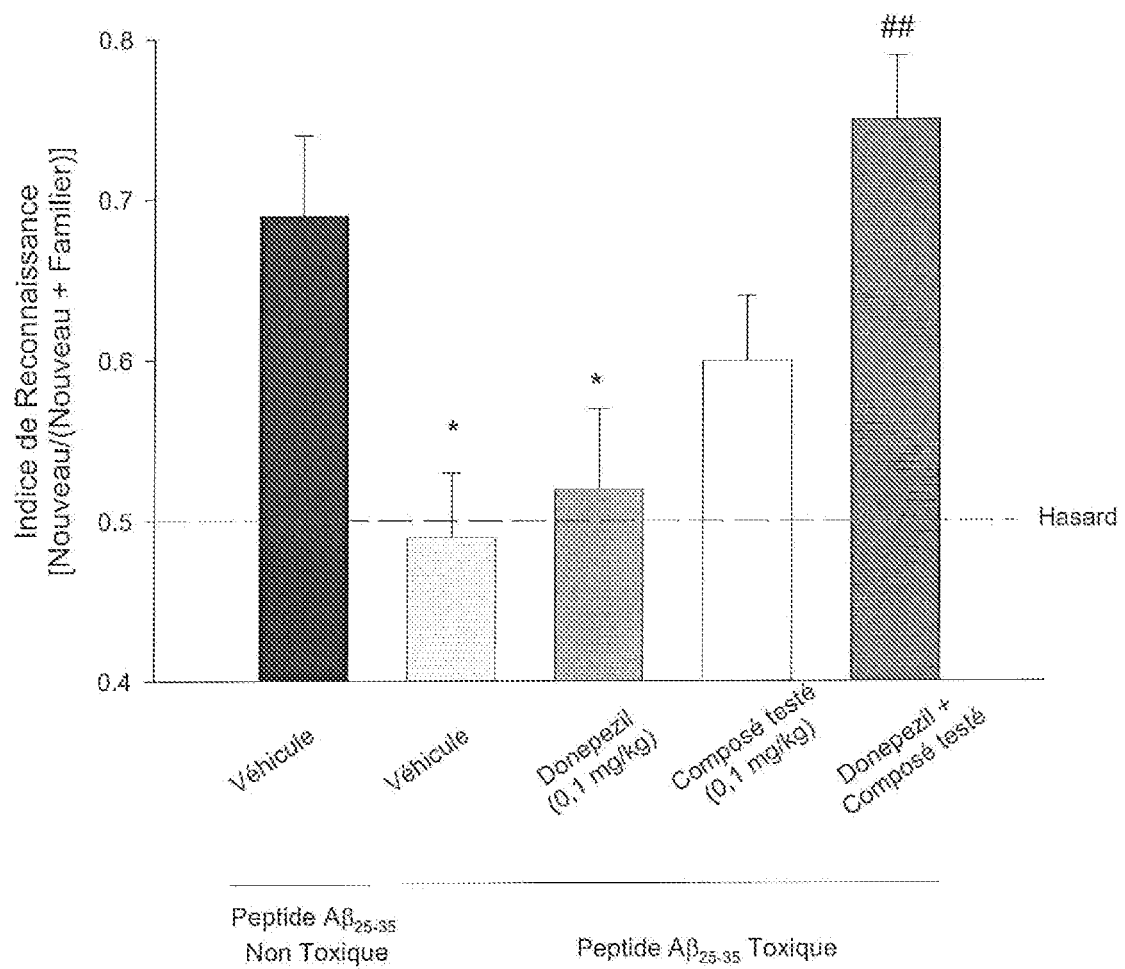
4/5

Figure 4



5/5

Figure 5



* p < 0.05 vs peptide non toxique/véhicule

p < 0.01 vs peptide toxique/véhicule