



MD/EP 3500253 T2 2020.09.30

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3500253 (13) T2

(51) Int. Cl.: A61K 31/27 (2006.01.01)
A61K 31/445 (2006.01.01)
A61K 31/5377 (2006.01.01)
A61K 31/55 (2006.01.01)
A61P 25/28 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2019 0714 (22) Data de depozit: 2017.08.14 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 17768234.1, 2017.08.14 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3500253, 2020.06.24 (31) Numărul cererii prioritare: 201641028166 (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2016.08.18 (33) Țara cererii prioritare: IN	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 09/2020, 2020.09.30 (80) Data publicării mențiunii eliberării de către OEB: EPB nr. 26/2020, 2020.06.24 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 07/2019, 2019.07.31
(71) Solicitant: Suven Life Sciences Limited, IN (72) Inventatori: NIROGI Ramakrishna, IN; SHINDE Anil Karbhari, IN; MOHAMMED Abdul Rasheed, IN; JAYARAJAN Pradeep, IN; BHYRAPUNENI Gopinadh, IN; JASTI Venkateswarlu, IN (73) Titular: Suven Life Sciences Limited, IN (74) Mandatar autorizat: FOCȘA Valentin	

(54) Combinație de agoniști inverși ai receptorului histaminic 3 cu inhibitori ai acetilcolinesterazei

(57) Rezumat:

1

Prezenta invenție se referă la combinația de agonist invers al receptorului histamină-3 și inhibitor de acetilcolinesterază. De asemenea, prezenta invenție se referă la agonistul invers al receptorului histamină-3 (H3R) sau a sărurilor sale acceptabile farmaceutic în combinație cu sau ca adjuvant la inhibitorul acetilcolinesterazei și utilizarea

2

lor în tratamentul tulburărilor cognitive. Prezenta invenție se referă suplimentar la compoziția farmaceutică care conține combinația menționată.

Revendicări: 18

Figuri: 7

MD/EP 3500253 T2 2020.09.30

**(54) Combination of histamine-3 receptor inverse agonists with
acetylcholinesterase inhibitors**

(57) Abstract:

1

The present invention relates to the combination of histamine-3 receptor inverse agonist and acetylcholinesterase inhibitor. Also, the present invention provides histamine-3 receptor (H3R) inverse agonist, or the pharmaceutically acceptable salt(s) thereof in combination with or as adjunct to

2

acetylcholinesterase inhibitor and their use in the treatment of cognitive disorders. The present invention further provides the pharmaceutical composition containing the said combination.

Claims: 18

Fig.: 7

Descriere:**(Descrierea se publică în redacția solicitantului)****DOMENIUL INVENȚIEI**

Prezenta invenție se referă la agoniștii inverși ai receptorului histaminei 3 (H₃R) sau la sărurile lor acceptabile farmaceutic în combinație cu sau pe lângă inhibitorii acetilcolinesterazei. Prezenta invenție se referă de asemenea la utilizarea combinației și a compoziției farmaceutice care conține combinația respectivă în tratamentul tulburărilor cognitive.

BAZA INVENȚIEI

Boala Alzheimer (AD) este cauza cea mai comună a demenței la nivel global. Se estimează că o creștere exponențială a numărului de cazuri AD în trecut și în următoarele câteva decenii va crea o mare presiune pe sistemele sociale și sanitare atât din economiile dezvoltate, cât și cele în curs de dezvoltare. AD cauzează de asemenea o povară emoțională și financiară imensă pentru familia pacientului și pentru comunitate.

Lista curentă a medicamentelor de îmbunătățire cognitivă autorizate pentru AD nu este lungă și, din perspectivă istorică, s-a concentrat pe inhibitorii acetilcolinesterazei (donepezil, rivastigmina și galantamina). Aceste medicamente inhibă hidroliza acetilcolinei (ACh) în acetat și colină ținând enzima acetilcolinesteraza (AChE). Creșterea nivelurilor ACh în sinapsă poate stimula receptorii colinergici, favorizând funcția memoriei. Deși inhibitorii acetilcolinesterazei (AChEI) pot întârzia temporar avansarea declinului cognitiv în AD, efectele sunt modeste. ACh fiind prezentă în sistemul nervos atât central, cât și periferic, AChEI produc mai multe efecte secundare nedorite cum ar fi tulburări gastrointestinale, bradicardie și salivare în exces, asociate cu o acțiune asupra receptorilor colinergici muscarinici periferici (Expert Opinion on Drug Safety, 3, 2004, 425-440). Limitările clasei de medicamente a inhibitorilor AChE sunt tolerabilitatea redusă, eficiența pe termen scurt și necesitatea titrării constante a dozei pe măsură ce boala înaintază (Cochrane Database Systematic Reviews, 2006, CD005593), ducând la nerespectarea tratamentului de către pacienți. Incidența și gravitatea acestor efecte secundare cresc odată cu doza și în general sunt mai pronunțate la debutul tratamentului sau după creșterea dozei. Prin urmare este încă nevoie de terapie alternativă pentru tratarea bolilor cognitive.

H₃R este un receptor cuplat cu proteina G (GPCR), exprimat în principal în partea anterioară a cortexului, hipocampusului și a corpului striat. H₃R funcționează atât ca autoreceptor, cât și ca heteroreceptor. Modulează sinteza și eliberarea mai multor neurotransmițători care au un rol important în cogniție, dispoziție și selecție senzorială. Rapoartele preliminare din literatură sugerează că antagoniștii/agoniștii inverși H₃R pot avea utilitate promițătoare pentru tratarea diferitelor afecțiuni ale SNC inclusiv AD, schizofrenia, tulburarea de hiperactivitate cu deficit de atenție (ADHD), epilepsia, narcolepsia, durerea neuropată și tulburări metabolice. S-a arătat că antagonismul acestui receptor de către mai mulți compuși investigați îmbunătățește învățarea și memoria în modele animale.

Cerere de brevet WO2015032966, WO2014136075 și US20150080379 descriu combinația de antagonist H₃R și inhibitorii acetilcolinesterazei pentru tratamentul AD. Khan Nadia et al: "The dual-acting H₃ receptor antagonist and AChE inhibitor UW-MD-71 dose-dependently enhances memory retrieval and reverses dizocipine-induced memory impairment in rats" Behavioural Brain Research. Vol 297, 20 octombrie 2015 (2015-10-20), pag. 155-164, XP029331734, ISSN: 0166-4328 DOI: 10.1016/j.bbr.2015.10.022. Totuși, nici una din aceste combinații nu sunt aprobate pentru tratamentul AD.

Tratamentul bolii AD fiind cronic, este nevoie disperată de opțiuni de tratament mai bune și mai sigure. Tratamentul actual aprobat pentru AD include utilizarea antagonistului AChEI sau NMDA individual sau ca o combinație de antagonist AChEI și NMDA. Este însă nevoie de medicamente/combinație noi pentru tratarea pacienților cu AD. O strategie terapeutică pentru pacienții AD este vizarea unei îmbunătățiri cu un adjuvant a terapilor existente, care ar aduce o ameliorare suplimentară pentru pacienți, ar reduce povara îngrijitorilor și ar permite pacienților să se bucure de o mai bună calitate a vieții fără a fi necesară îngrijire instituțională și/sau spitalizare.

Deoarece cauza și dezvoltarea demenței depind de mecanisme diferite, poate fi avantajoasă folosirea combinației de medicamente care acționează în mecanisme diferite pentru tratamentul AD. Aceasta ar putea ajuta la reducerea efectelor secundare cu o mai bună respectare a tratamentului și asigurarea administrării pe o perioadă îndelungată.

Compușii din prezenta invenție sunt agonști inverși ai H₃R cu afinitate mare și selectivitate foarte mare față de subtipuri ale receptorilor strâns înrudiți și îmbunătățesc învățarea și memoria la animale. Compușii agonști inverși ai H₃R menționați aici sunt descriși în US9079888B2 (publicat ca US2014/135304). Prepararea acestor compuși este indicată în brevetul respectiv.

Prezenta invenție prevede agonști inverși ai H₃R sau sărurile lor acceptabile farmaceutic, care pot mări funcția cognitivă a pacienților care urmează tratament cu inhibitorii acetilcolinesterazei. Prezenta invenție se bazează pe descoperirea că acești compuși cu afinitate de agonști inverși ai H₃R cresc și prelungesc efectul inhibitorilor acetilcolinesterazei. Combinația din prezenta invenție demonstrează un efect sinergetic în activitatea farmacologică. Această administrare combinată a agonistului invers al H₃R și a inhibitorului acetilcolinesterazei poate duce la un efect benefic pentru îmbunătățirea eficienței terapeutice la om.

REZUMATUL INVENȚIEI

Obiectivul prezentei invenții este prevederea unei terapii combinate îmbunătățite pentru tratarea bolilor cognitive, cum ar fi boala Alzheimer, schizofrenia, boala Parkinson, demența cu corpi Lewy, demența vasculară, demența fronto-temporală, sindromul Down sau sindromul Tourette.

În primul aspect, prezenta invenție se referă la o combinație de agonist invers al receptorului histaminic 3 și inhibitor al acetilcolinesterazei; unde agonistul invers al receptorului histaminic 3 este selectat dintre:

N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida;
N-[4-(1-Ciclopropilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida; și
N-[4-(1-Izopropilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida;
sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora.

Intr-un alt aspect, prezenta invenție se referă la o combinație de agonist invers al receptorului histaminic 3 și inhibitor al acetilcolinesterazei; unde agonistul invers al receptorului histaminic 3 este N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia.

Intr-un alt aspect, prezenta invenție se referă la o combinație de agonist invers al receptorului histaminic 3 și inhibitor al acetilcolinesterazei; unde agonistul invers al receptorului histaminic 3 este N-[4-(1-Ciclopropilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia.

Intr-un alt aspect, prezenta invenție se referă la o combinație de agonist invers al receptorului histaminic 3 și inhibitor al acetilcolinesterazei; unde agonistul invers al receptorului histaminic 3 este N-[4-(1-Izopropilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia.

Intr-un alt aspect, prezenta invenție se referă la o combinație de agonist invers al receptorului histaminic 3 și inhibitor al acetilcolinesterazei; unde inhibitorul acetilcolinesterazei este selectat dintre donepezil, galantamină și rivastigmină sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora.

Intr-un alt aspect, prezenta invenție se referă la o combinație de N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida și donepezil sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora.

Intr-un alt aspect, prezenta invenție se referă la combinația de N-[4-(1-Ciclopropilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida și donepezil sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora.

Intr-un alt aspect, prezenta invenție se referă la combinația de N-[4-(1-Izopropilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida și donepezil sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora.

Intr-un alt aspect, prezenta invenție se referă la combinația respectivă pentru utilizare în tratamentul tulburărilor cognitive.

Intr-un alt aspect, prezenta invenție se referă la combinația respectivă pentru utilizare în tratamentul tulburărilor cognitive cum ar fi boala Alzheimer, schizofrenia, boala Parkinson, demența cu corpi Lewy, demența vasculară, demența fronto-temporală, sindromul Down sau sindromul Tourette.

Intr-un alt aspect, prezenta invenție se referă la un agonist invers al receptorului histaminic 3 pentru utilizare în tratamentul adjuvant al tulburărilor cognitive cum ar fi boala

Alzheimer, schizofrenia, boala Parkinson, demența cu corpi Lewy, demența vasculară, demența fronto-temporală, sindromul Down sau sindromul Tourette la pacienți care urmează tratament cu un inhibitor al acetilcolinesterazei.

5 Intr-un alt aspect, prezenta invenție se referă la compusul N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia pentru utilizare în tratamentul adjuvant al tulburărilor cognitive cum ar fi boala Alzheimer, schizofrenia, boala Parkinson, demența cu corpi Lewy, demența vasculară, demența fronto-temporală, sindromul Down sau sindromul Tourette la pacienți care urmează tratament cu donepezil.

10 Intr-un alt aspect, prezenta invenție se referă la compusul N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia pentru utilizare în combinație cu sau pe lângă un inhibitor al acetilcolinesterazei pentru tratamentul tulburărilor cognitive cum ar fi boala Alzheimer, schizofrenia, boala Parkinson, demența cu corpi Lewy, demența vasculară, demența fronto-temporală, sindromul Down sau sindromul Tourette.

15 Intr-un alt aspect, prezenta invenție se referă la utilizarea unei combinații de agonist invers al receptorului histaminic 3 și inhibitor al acetilcolinesterazei pentru tratamentul tulburărilor cognitive cum ar fi boala Alzheimer, schizofrenia, boala Parkinson, demența cu corpi Lewy, demența vasculară, demența fronto-temporală, sindromul Down sau sindromul Tourette.

20 Intr-un alt aspect, prezenta invenție se referă la utilizarea unei combinații de N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida și donepezil sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora pentru tratamentul tulburărilor cognitive cum ar fi boala Alzheimer, schizofrenia, boala Parkinson, demența cu corpi Lewy, demența vasculară, demența fronto-temporală, sindromul Down sau sindromul Tourette.

25 Intr-un alt aspect, prezenta invenție se referă la o compoziție farmaceutică ce conține agonistul invers al receptorului histaminic 3 și inhibitorul acetilcolinesterazei și excipienți acceptabili farmaceutic sau o combinație a acestora.

Intr-un alt aspect, prezenta invenție se referă la o compoziție farmaceutică ce conține N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida și donepezil sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora și excipienți acceptabili farmaceutic sau o combinație a acestora.

30 Intr-un alt aspect, prezenta invenție se referă la o compoziție farmaceutică ce conține agonistul invers al receptorului histaminic 3 și inhibitorul acetilcolinesterazei sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora împreună cu excipienți acceptabili farmaceutic sau o combinație a acestora pentru utilizare în tratamentul tulburărilor cognitive cum ar fi boala Alzheimer, schizofrenia, boala Parkinson, demența cu corpi Lewy, demența vasculară, demența fronto-temporală, sindromul Down sau sindromul Tourette.

35

SCURTĂ DESCRIERE A DIAGRAMELOR

40 **Figura 1a** indică rezultatele efectului unui co-tratament cu compus 1 și donepezil asupra proprietăților de creștere a cogniției folosind modelul de recunoaștere a obiectelor.

Figura 1b indică rezultatele efectului unui co-tratament cu compus 1 și galantamină asupra proprietăților de creștere a cogniției folosind modelul de recunoaștere a obiectelor.

45 **Figura 1c** indică rezultatele efectului unui co-tratament cu compus 1 și rivastigmină asupra proprietăților de creștere a cogniției folosind modelul de recunoaștere a obiectelor.

Figura 2 indică rezultatele efectului unui co-tratament cu compus 3 și donepezil asupra proprietăților de creștere a cogniției folosind modelul de recunoaștere a obiectelor.

50 **Figura 3** indică efectul compusului 1 în combinație cu donepezil asupra nivelurilor extracelulare ale acetilcolinei în cortexul prefrontal median al șobolanilor Wistar masculi.

Figura 4 indică efectul compusului 1 în combinație cu rivastigmină asupra nivelurilor extracelulare ale acetilcolinei în cortexul prefrontal median al șobolanilor Wistar masculi.

Figura 5 indică efectul compusului 2 în combinație cu donepezil asupra nivelurilor extracelulare ale acetilcolinei în cortexul prefrontal median al șobolanilor Wistar masculi.

55 **Figura 6** indică efectul compusului 3 în combinație cu donepezil asupra nivelurilor extracelulare ale acetilcolinei în cortexul prefrontal median al șobolanilor Wistar masculi.

Figura 7 indică rezultatele efectului combinației de compus 1 și donepezil asupra nivelurilor theta provocate prin stimulare în hipocampusul dorsal al șobolanilor Wistar masculi anesteziați.

DESCRIERE DETALIATĂ

Dacă nu se indică altceva, următorii termeni folosiți în specificație și în revendicări au înțelesurile indicate mai jos:

- 5 Termenul "agonist invers al receptorului histaminic 3", în sensul folosit în prezenta, se referă la un ligand sau medicament care se leagă cu receptorii H₃ constitutiv activi, îi stabilizează și astfel reduc activitatea (activitate intrinsecă negativă). Blochează sau inhibă funcția / legarea agonistului la receptorul H₃ și exercită efectul farmacologic opus unui agonist al receptorului.

Exemplele de agonist invers al receptorului histaminic 3 includ

10

N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida;
N-[4-(1-Ciclopropilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida; și
N-[4-(1-Izopropilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida;
sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora.

15

Exemplele de sare acceptabilă farmaceutic a compușilor identificați mai sus includ nelimitativ

20

N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida diclorhidrat;
N-[4-(1-Ciclopropilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida tartrat; și
N-[4-(1-Izopropilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida tartrat.

25

Termenul "inhibitor al acetilcolinesterazei", în sensul folosit în prezenta, înseamnă un compus chimic sau un medicament care inhibă descompunerea enzimei acetilcolinesteraza în acetilcolină, crescând nivelul și durata de acționare ale neurotransmițătorului acetilcolina. Exemplele de inhibitori ai acetilcolinesterazei sunt donepezil, rivastigmina și galantamina. De preferință, inhibitorul acetilcolinesterazei este donepezil și rivastigmina. Mai preferabil inhibitorul acetilcolinesterazei este donepezil.

30

Donepezil este un medicament aprobat pentru tratarea demenței ușoare, moderate și severe a bolii Alzheimer. Donepezil este un inhibitor reversibil al enzimei acetilcolinesteraza și este comercializat sub marca Aricept® ca sare clorhidrat.

Rivastigmina este un medicament aprobat pentru tratarea demenței ușoare, moderate și severe a bolii Alzheimer. Rivastigmina este un inhibitor reversibil al colinesterazei și este comercializat sub marca Exelon® și Exelon Patch® ca sare tartrat.

35

Galantamina este un medicament aprobat pentru tratarea demenței ușoare, moderate și severe a bolii Alzheimer. Galantamina este un inhibitor reversibil, competitiv al acetilcolinesterazei și este comercializat sub marca Razadyne® ca sare bromhidrat.

40

Expresia "cantitate eficientă terapeutic" înseamnă o cantitate a unui compus din prezenta invenție care (i) tratează boala, afecțiunea sau tulburarea specifică, (ii) elimină unul sau mai multe simptome ale bolii, afecțiunii sau tulburării specifice și (iii) întârzie declanșarea unuia sau mai multor simptome ale bolii, afecțiunii sau tulburării specifice descrise în prezenta.

45

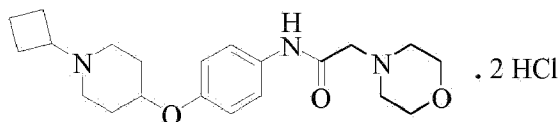
Termenul "sare acceptabilă farmaceutic", în sensul folosit în prezenta, se referă la sărurile compusului activ, care se prepară prin reacție cu acidul organic sau anorganic sau derivatul acid corespunzător, în funcție de substituenții specifici care se găsesc pe compușii descriși în prezenta.

Termenul "pacient", în sensul folosit în prezenta, se referă la un animal. De preferință termenul "pacient" se referă la un mamifer. Termenul mamifer include animale cum ar fi șoareci, șobolani, caini, iepuri, porci, maimuțe, cai și oameni. Mai preferabil pacientul este uman.

50

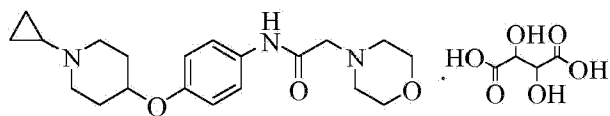
Termenul "boala Alzheimer", în sensul folosit în prezenta, se referă la o demență care cauzează probleme de memorie, gândire și comportament. Boala Alzheimer poate fi ușoară, moderată până la severă.

Compusul 1 folosit în prezenta este N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il) acetamida diclorhidrat având structura chimică

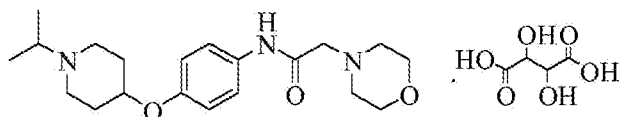


55

Compusul 2 folosit în prezenta este N-[4-(1-Ciclopropilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il) acetamida tartrat având structura chimică



5 Compusul 3 folosit in prezenta este N-[4-(1-Izopropilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il) acetamida având structura chimică



10 Termenul "tratament" sau "tratare", in sensul folosit în prezenta, se referă la orice tratament al unei boli la un mamifer, inclusiv: (a) încetinirea sau oprirea dezvoltării simptomelor clinice; și/sau (b) determinarea regresiei simptomelor clinice.

15 Termenul "compus pentru utilizare", in sensul folosit in prezenta, include una sau mai multe dintre următoarele: (1) utilizarea unui compus, (3) utilizare în tratament sau (4) utilizare în prepararea compoziției farmaceutice / medicamentului pentru tratament sau cuprinzând administrarea unei cantități eficiente a compusului activ la un subiect in nevoie.

20 Termenul "boală cognitivă", în sensul folosit în prezenta, se referă la un grup de tulburări de sănătate mintală care afectează în principal învățarea, memoria, percepția și rezolvarea problemelor și includ amnezie, demență și delir. Tulburările cognitive pot fi cauzate de boală, tulburare sau toxicitate. Exemplele de boli cognitive includ, nelimitativ, boala Alzheimer, schizofrenia, boala Parkinson, demența cu corpi Lewy (LBD), demența vasculară, demența fronto-temporală (FTD), sindromul Down sau sindromul Tourette. De preferință tulburarea cognitivă este boala Alzheimer.

25 Termenul "adjuvant" sau "tratament adjuvant", în sensul folosit în prezenta, se referă la un tratament suplimentar al unui pacient care a primit deja cel puțin o altă terapie pentru tulburări cognitive. Un medicament folosit ca terapie adjuvantă se administrează unui pacient pentru a îmbunătăți acțiunea tratamentului primar.

Aplicări

30 Prezenta invenție include nelimitativ toate combinațiile descrise în prezenta, însă aspectele preferate și elementele invenției sunt discutate în prezenta sub forma următoarelor aplicări.

Intr-o aplicare, prezenta invenție se referă la combinația de agonist invers al receptorului histaminic 3 și inhibitor al acetilcolinesterazei; unde agonistul invers al receptorului histaminic 3 este N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida diclorhidrat.

35 Intr-o altă aplicare, prezenta invenție se referă la combinația de agonist invers al receptorului histaminic 3 și inhibitor al acetilcolinesterazei; unde agonistul invers al receptorului histaminic 3 este N-[4-(1-Ciclopropilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida tartrat.

Intr-o altă aplicare, prezenta invenție se referă la combinația de agonist invers al receptorului histaminic 3 și inhibitor al acetilcolinesterazei; unde agonistul invers al receptorului histaminic 3 este N-[4-(1-Izopropilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida tartrat.

40 Intr-o altă aplicare, prezenta invenție se referă la combinația de N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida și rivastigmină sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora.

45 Intr-o altă aplicare, prezenta invenție se referă la combinația de N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida și galantamină sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora.

Intr-o altă aplicare, prezenta invenție se referă la combinația de N-[4-(1-Ciclopropilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida și rivastigmină sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora.

50 Intr-o altă aplicare, prezenta invenție se referă la combinația de N-[4-(1-Ciclopropilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida și galantamină sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora.

Intr-o altă aplicare, prezenta invenție se referă la combinația de N-[4-(1-Izopropilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida și rivastigmină sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora.

Intr-o altă aplicare, prezenta invenție se referă la combinația de N-[4-(1-Izopropilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida și galantamină sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora.

5 Intr-o altă aplicare, prezenta invenție se referă la combinația de N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida diclorhidrat și donepezil clorhidrat.

Intr-o altă aplicare, prezenta invenție se referă la combinația de N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida diclorhidrat și rivastigmină tartrat.

10 Intr-o altă aplicare, prezenta invenție se referă la combinația de N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida diclorhidrat și galantamină bromhidrat.

Intr-o altă aplicare, prezenta invenție se referă la combinația de N-[4-(1-Ciclopropilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida tartrat și donepezil clorhidrat.

Intr-o altă aplicare, prezenta invenție se referă la combinația de N-[4-(1-Ciclopropilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida tartrat și rivastigmină tartrat.

15 Intr-o altă aplicare, prezenta invenție se referă la combinația de N-[4-(1-Ciclopropilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida tartrat și galantamină bromhidrat.

Intr-o altă aplicare, prezenta invenție se referă la combinația de N-[4-(1-Izopropilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida tartrat și donepezil clorhidrat.

20 Intr-o altă aplicare, prezenta invenție se referă la combinația de N-[4-(1-Izopropilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida tartrat și rivastigmină tartrat.

Intr-o altă aplicare, prezenta invenție se referă la combinația de N-[4-(1-Izopropilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida tartrat și galantamină bromhidrat.

25 Intr-o altă aplicare, prezenta invenție prevede combinația de agonist invers al receptorului histaminic 3 și inhibitor al acetilcolinesterazei care este mai eficientă decât agonistul invers al receptorului histaminic 3 și inhibitorul acetilcolinesterazei individual.

Intr-o altă aplicare, prezenta invenție prevede combinația de N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida diclorhidrat și donepezil clorhidrat care este mai eficientă decât N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida diclorhidrat și donepezil clorhidrat individual.

30 Intr-o altă aplicare sarea acceptabilă farmaceutic a agonistului invers al receptorului histaminic 3 include, nelimitativ, sarea diclorhidrat, oxalat, succinat, tartrat etc.. De preferință, sarea acceptabilă farmaceutic este diclorhidrat și tartrat. Mai preferabil, sarea acceptabilă farmaceutic este diclorhidrat.

35 Intr-o altă aplicare, prezenta invenție se referă la combinația de N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida diclorhidrat și inhibitor al acetilcolinesterazei pentru utilizare în tratarea bolii Alzheimer.

40 Intr-un alt aspect, prezenta invenție se referă la N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia pentru utilizare în tratamentul adjuvant al bolii Alzheimer la un pacient sub tratament cu inhibitorul acetilcolinesterazei.

Intr-un alt aspect, prezenta invenție se referă la N-[4-(1-Ciclopropilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia pentru utilizare în tratamentul adjuvant al bolii Alzheimer la un pacient sub tratament cu inhibitorul acetilcolinesterazei.

45 Intr-un alt aspect, prezenta invenție se referă la N-[4-(1-Izopropilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia pentru utilizare în tratamentul adjuvant al bolii Alzheimer la un pacient sub tratament cu inhibitorul acetilcolinesterazei.

50 Intr-o altă aplicare, prezenta invenție se referă la N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida diclorhidrat pentru utilizare în tratamentul adjuvant al bolii Alzheimer la un pacient sub tratament cu donepezil sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

Intr-o altă aplicare, prezenta invenție se referă la N-[4-(1-Ciclopropilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida tartrat pentru utilizare în tratamentul adjuvant al bolii Alzheimer la un pacient sub tratament cu donepezil sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

55 Intr-o altă aplicare, prezenta invenție se referă la N-[4-(1-Izopropilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida tartrat pentru utilizare în tratamentul adjuvant al bolii Alzheimer la un pacient sub tratament cu donepezil sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

60 Intr-o altă aplicare, prezenta invenție se referă la utilizarea combinației de agonist invers al receptorului histaminic 3 și inhibitor al acetilcolinesterazei în prepararea unui medicament pentru tratamentul tulburărilor cognitive.

Intr-o altă aplicare, prezenta invenție se referă la utilizarea combinației de agonist invers al receptorului histaminic 3 și inhibitor al acetilcolinesterazei în prepararea unui medicament pentru tratamentul tulburărilor cognitive selectate dintre boala Alzheimer, schizofrenia, boala Parkinson, demența cu corpi Lewy, demența vasculară, demența fronto-temporală, sindromul

5 Down sau sindromul Tourette.

Intr-o altă aplicare, prezenta invenție se referă la utilizarea combinației de agonist invers al receptorului histaminic 3 și inhibitor al acetilcolinesterazei în prepararea unui medicament pentru tratarea bolii Alzheimer.

10 Intr-o altă aplicare, prezenta invenție se referă la utilizarea agonistului invers al receptorului histaminic 3 în prepararea unui medicament pentru tratarea bolii Alzheimer în combinație cu inhibitorul acetilcolinesterazei.

Intr-o altă aplicare, prezenta invenție se referă la utilizarea agonistului invers al receptorului histaminic 3 în prepararea unui medicament pentru tratarea bolii Alzheimer pe lângă inhibitorul acetilcolinesterazei.

15 Intr-o altă aplicare, prezenta invenție se referă la utilizarea N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamidei sau a unei sări acceptabile farmaceutic a acesteia în prepararea unui medicament pentru tratarea bolii Alzheimer în combinație cu donepezil sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

20 Intr-o altă aplicare, prezenta invenție se referă la utilizarea N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida diclorhidratului în prepararea unui medicament pentru tratarea bolii Alzheimer în combinație cu donepezil sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia.

Intr-o altă aplicare, prezenta invenție se referă la utilizarea N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida diclorhidratului în prepararea unui medicament pentru tratarea bolii Alzheimer în combinație cu donepezil clorhidrat.

25 Intr-o altă aplicare, prezenta invenție se referă la combinația pentru tratarea bolii Alzheimer, unde boala Alzheimer este boala Alzheimer ușoară.

Intr-o altă aplicare, prezenta invenție se referă la combinația pentru tratarea bolii Alzheimer, unde boala Alzheimer este boala Alzheimer moderată.

30 Intr-o altă aplicare, prezenta invenție se referă la combinația pentru tratarea bolii Alzheimer, unde boala Alzheimer este boala Alzheimer severă.

Intr-o altă aplicare, prezenta invenție se referă la combinația în care ingredientele active se pot administra unui pacient concomitent sau separat.

35 Intr-un alt aspect, ingredientele active ale combinației din prezenta invenție se administrează în mod normal prin prepararea ingredientelor active într-o compoziție farmaceutică în conformitate cu practica farmaceutică standard.

Intr-un alt aspect, ingredientele active ale combinației din prezenta invenție se pot administra pe cale orală, nazală, locală, dermică sau parenterală.

40 Intr-un alt aspect, ingredientele active ale combinației din prezenta invenție se pot administra pe cale identică sau diferită. De exemplu, agonistul invers al receptorului histaminic 3 din prezenta invenție se poate administra oral, iar inhibitorul acetilcolinesterazei se poate administra transdermic.

45 Compozițiile farmaceutice din prezenta invenție se pot prepara într-un mod convențional folosind unul sau mai mulți excipienți acceptabili farmaceutic. Excipienții acceptabili farmaceutic sunt solvenți, agenți de descompunere, lianți, lubrifianți, agenți de îmbunătățire a curgerii, polimeri, agenți de acoperire, solvenți, co-solvenți, conservanți, umectanți, agenți de îngroșare, agenți antispumanti, îndulcitori, aromatizanti, antioxidanți, coloranți, solubilizatori, plastifianți, dispersanți etc.. Excipienții sunt selectați dintre celuloză microcristalină, manitol, lactoză, amidon pre-gelatinizat, amidonglicolat de sodiu, amidon de porumb sau derivați ai acestuia, povidonă, cros-povidonă, stearat de calciu, monostearat de gliceril, palmitostearat de gliceril, talc, dioxid de siliciu coloidal, stearat de magneziu, sodiu lauril sulfat, sodiu stearil fumarat, stearat de zinc, acid stearic sau ulei vegetal hidrogenat, gumă arabică, magnezie, glucoză, grăsimi, ceruri, uleiuri naturale sau hidrogenate, apă, soluție de clorură de sodiu fiziologică sau alcoolii, de exemplu, etanol, propanol sau glicerol, soluții de zahăr, cum ar fi soluții de glucoză sau soluții de manitol etc. sau un amestec al diferiților excipienți.

55 Intr-un alt aspect, compușii activi din invenție pot fi preparați sub formă de pilule, tablete, tablete cu înveliș, capsule, pulbere, granule, pelete, plasturi, implanturi, pelicule, lichide, semi-solide, geluri, aerosoli, emulsii, elixire etc.. Aceste compoziții farmaceutice și procesele de preparare a acestora sunt bine cunoscute în domeniu.

60 Intr-un alt aspect, compoziția farmaceutică din prezenta invenție conține 1 până la 90%, 5

până la 75% și 10 până la 60% din greutate compuși din prezenta invenție sau sarea acceptabilă farmaceutic a acestora. Cantitatea de compuși activi sau sarea acceptabilă farmaceutic a acestora în compozițiile farmaceutice poate varia de la circa 0.1 mg la circa 100 mg sau de la circa 0.1 mg la circa 60 mg sau de la circa 0.1 mg la circa 30 mg sau în orice interval mai larg cuprins între 0.1 mg și 100 mg.

Intr-un alt aspect, compoziția farmaceutică din combinația din prezenta invenție poate fi o formă convențională, cum ar fi forme cu eliberare imediată, forme cu eliberare modificată, cum ar fi forme cu eliberare prelungită, forme cu eliberare întârziată și forme cu eliberare de durată, sau sisteme de administrare noi, cum ar fi forme cu descompunere orală și plasturi transdermici.

Doza compușilor activi poate varia în funcție de factori cum ar fi vârsta și greutatea pacientului, natura, calea de administrare și gravitatea bolii tratate, precum și alți factori. Prin urmare, orice referire la cantitatea eficientă farmacologică a compușilor 1, 2 și 3 se referă la factorii menționați mai sus.

Intr-un alt aspect, agonistul invers al receptorului histaminic 3 poate fi co-administrat cu inhibitorul acetilcolinesterazei la o doză zilnică de 0.1 mg până la 100 mg; cum ar fi 0.1, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 3, 5, 6, 10, 20, 25, 30, 50, 75 și 100 mg, de preferință la o doză zilnică de 0.1, 3, 5, 6, 10, 20, 25, 30 sau 50 mg și cel mai preferabil la o doză zilnică de 0.5, 3, 5, 10 sau 20 mg.

Intr-un alt aspect, inhibitorul acetilcolinesterazei poate fi co-administrat cu agonistul invers al receptorului histaminic 3 la o doză zilnică de 1 mg până la 30 mg; cum ar fi 1, 1.5, 2, 3, 4, 4.5, 5, 6, 8, 9.5, 10, 12, 13, 13.3, 15, 16, 23, 24, 25 sau 30 mg, de preferință la o doză zilnică de 1, 1.5, 2, 3, 4, 4.5, 5, 6, 8, 9.5, 10, 12, 13, 13.3, 16, 23, 24, sau 25 mg și cel mai preferabil la o doză zilnică de 1.5, 3, 4, 4.5, 5, 6, 8, 9.5, 10, 12, 13.3, 16, 23 sau 24 mg.

Intr-un alt aspect, inhibitorul acetilcolinesterazei, donepezil, poate fi co-administrat cu agonistul invers al receptorului histaminic 3 la o doză zilnică de 2 mg până la 30 mg; cum ar fi 2, 5, 10, 15, 23, 25 sau 30 mg, de preferință la o doză zilnică de 2, 5, 10, 23 sau 25 mg și cel mai preferabil la o doză zilnică de 5, 10 sau 23 mg.

Intr-un alt aspect, inhibitorul acetilcolinesterazei, rivastigmina, poate fi co-administrat cu agonistul invers al receptorului histaminic 3 la o doză zilnică de 0.5 mg până la 15 mg; cum ar fi 0.5, 1, 1.5, 3, 4.5, 5, 6, 9.5, 10, 13.3, 15 mg, de preferință la o doză zilnică de 1, 1.5, 3, 4.5, 5, 6, 9.5 sau 13.3 mg și cel mai preferabil la o doză zilnică de 1.5, 3, 4.5, 6, 9.5 și 13.3 mg.

Intr-un alt aspect, inhibitorul acetilcolinesterazei, galantamina, poate fi co-administrat cu agonistul invers al receptorului histaminic 3 la o doză zilnică de 1 mg până la 30 mg; cum ar fi 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24 și 30 mg, de preferință la o doză zilnică de 2, 4, 6, 8, 12, 16 și 24 mg și cel mai preferabil la o doză zilnică de 4, 8, 12, 16 și 24 mg.

Intr-un alt aspect, tratamentul cuprinde administrarea la pacient a 0.1 mg până la 100 mg de N-[4-(1-Ciclobutylpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia, pe zi.

Intr-un alt aspect, tratamentul cuprinde administrarea la pacient a 0.1 mg până la 60 mg de N-[4-(1-Ciclobutylpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia, pe zi.

Intr-un alt aspect, tratamentul cuprinde administrarea la pacient a 0.1 mg până la 30 mg de N-[4-(1-Ciclobutylpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia, pe zi.

Intr-un alt aspect, tratamentul cuprinde administrarea la pacient a 1 mg până la 25 mg de donepezil sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pe zi.

Intr-un alt aspect, tratamentul cuprinde administrarea la pacient a 5 mg până la 25 mg de donepezil sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pe zi.

Intr-un alt aspect, tratamentul cuprinde administrarea la pacient a 5, 10 sau 23 mg de donepezil sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pe zi.

Intr-un alt aspect, tratamentul cuprinde administrarea compușilor activi la pacient o dată până la de trei ori pe zi, o dată până la de trei ori pe săptămână sau o dată până la de trei ori pe lună. De preferință, tratamentul cuprinde administrarea compusului la un pacient o dată pe zi, de două ori pe zi sau de trei ori pe zi. Mai preferabil, tratamentul cuprinde administrarea compusului la un pacient o dată pe zi.

Exemple

Exemplele indicate mai jos sunt prezentate exclusiv ilustrativ și prin urmare nu vor fi interpretate ca limitand domeniul de aplicare al invenției.

Abrevieri:

	ANOVA:	analiza varianței
	AP:	anterior posterior
	aCSF:	lichid cefalorahidian
5	CaCl ₂ · 2H ₂ O:	clorură de calciu dihidrat
	DV:	dorsal ventral
	DTT:	ditiotreitol
	EC ₅₀ :	concentrație eficientă semi-maximă
	EDTA:	acid etilendiaminotetraacetic
10	EEG:	electroencefalogramă
	GDP:	guanozin difosfat
	GPCR:	receptor cuplat cu proteina G
	HCl:	acid clorhidric
	h:	oră(e)
15	HEPES:	acid 4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-etansulfonic
	<i>i.p.</i> :	intraperitoneal
	<i>i.v.</i> :	intravenos
	KCl:	clorură de potasiu
	K _b :	constanta de legare
20	K _i :	constanta inhibitorie
	LC-MS/MS:	cromatografie lichidă-spectrometrie de masă/spectrometrie de masă
	mg:	miligram
	MgCl ₂ :	clorură de magneziu
25	min:	minut(e)
	ML:	median lateral
	mM:	milimolar
	nmol/L:	nanomoli per litru
	NaCl:	clorură de sodiu
30	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O:	sodiu dihidrogen fosfat dihidrat
	Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O:	sodiu monohidrogen fosfat heptahidrat
	NPO:	nucleus pontis oralis
	nM:	nanomolar
	<i>p.o.</i> :	per oral
35	<i>s.c.</i> :	subcutanat
	S.E.M.:	eroare standard a mediei
	μM:	micromolar
	θ:	theta

Exemplul 1:**40 Determinarea valorii K_i la receptorul histaminic-3 uman și de șobolan**

Compușii testați au fost evaluați conform următoarelor proceduri pentru a determina valoarea K_i la receptor histaminic-3 uman și de șobolan.

Materiale și metode:

45 Sursă receptori: cortex frontal cerebral de șobolan sau cADN uman recombinant exprimat în celule CHO

Radioligand: [3H] R-α-metilhistamina

Concentrație finală ligand: [3.0 nM]

Determinant nespecific: R-α-metilhistamina (100 μM)

50 Compus de referință: R-α-metilhistamina

Control pozitiv: R-α-metilhistamina

Condiții de incubare:

55 Concentrații în creștere ale compușilor testați sau standard s-au incubat cu receptori membranari și radioligand în 5 mM MgCl₂ și 50 mM TRIS-HCl (pH 7.4) 60 de minute la temperatura camerei. Reacția s-a încheiat prin filtrare rapidă în vid pe filtre din fibră de sticlă. S-a determinat radioactivitatea captată pe filtre și s-a comparat cu valorile de control pentru a determina orice interacțiuni ale compușilor testați cu situsul de legare a receptorului uman sau de șobolan clonat.

Rezultate:

60

Nr.	Exemplu	K _i receptor histaminic-3 uman (nM)	K _i receptor histaminic-3 de șobolan (nM)
1	Compus 1	8.7	9.8
2	Compus 2	19.9	ND
3	Compus 3	8.3	ND
ND-Neefectuat			

Referință:

Br J Pharmacol., 2008, 154(6): 1166-1181.

5

Exemplul 2:**Determinarea valorilor IC₅₀ la receptorul histaminic-3**

10 Compușii testați au fost evaluați conform următoarelor proceduri pentru a determina valorile IC₅₀.

Materiale și metode:

Sursă receptor:	Uman recombinant (celule CHO-K1)
Radioligand:	[³⁵ S]-GTPγS
Concentrație finală ligand:	[0.3 nM]
Compus de referință:	Tioperamida
Control pozitiv:	Tioperamida

Condiții de incubare:

15 Concentrațiile în creștere ale compușilor testați și/sau vehicul sunt pre-incubate cu membrane (0.09 mg/mL) și 10 μM GDP în tampon HEPES modificat pH 7.4 (20 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM EDTA) 20 de minute, după care se adaugă sfere SPA alte 60 de minute la 30°C. Reacția este inițiată de 0.3 nM [³⁵S]GTPγS pe o perioadă de incubare suplimentară de 30 de minute. Creșterea indusă de compusul testat a legării [³⁵S]GTPγS cu 50% sau mai mult (≥50%) față de răspunsul 3 μM R(-)-a-metilhistaminei indică activitate posibilă de agonist al receptorului histaminic-3. Inhibarea indusă de compusul testat a creșterii induse de 0.03 μM R(-)-a-metilhistamina a legării [³⁵S]GTPγS cu 50% sau mai mult (≥50%) indică activitate de antagonist al receptorului. Aceste teste au fost efectuate și datele au fost analizate la Eurofins Panlabs Taiwan Ltd, Taiwan, folosind tehnici standard de legare a radioliganzilor descrise mai sus.

25

Rezultate:

Compusul 1 prezintă proprietăți de tip agonist invers în testul GTPγS pe receptor histaminic-3 recombinant uman cu valoare IC₅₀ de 20 nM.

Referință:

30 J. Neurochem., 1998, 71(2): 808-816.

Exemplul 3:**Modelul de recunoaștere a obiectelor**

35 Proprietățile de îmbunătățire ale cogniției ale compușilor din prezenta invenție au fost estimate folosind acest model.

Ca animale experimentale s-au folosit șobolani Wistar masculi (în vârstă de 8-10 săptămâni). În fiecare cușcă au fost incluse patru animale. Animalele au avut un regim alimentar cu privare de 20% începând cu o zi înaintea experimentului. Apa a fost disponibilă la discreție pe durata experimentului. Animalele au fost ținute la un ciclu lumină/întuneric de 12 ore într-o cameră cu temperatură și umiditate controlate. Experimentul s-a efectuat într-un câmp deschis realizat din acrilic. Șobolanii au fost obișnuiți cu arene individuale (câmp deschis) în absența oricăror obiecte în ziua 1.

40

Șobolanii au primit vehicul, donepezil sau compus testat și AChEI (donepezil, galantamină sau rivastigmină) înaintea testelor de familiarizare (T₁) și alegere (T₂). În faza de

familiarizare (T_1), șobolanii au fost amplasați individual în arenă timp de 3 minute, în care au fost poziționate două obiecte identice (a_1 și a_2) la 10 cm de la perete. La 24 de ore după T_1 s-a efectuat proba de memorie pe termen lung. Aceiași șobolani au fost amplasați în aceeași arenă precum în testul T_1 . În timpul fazei de alegere (T_2), șobolanii au fost lăsați să exploreze arena timp de 3 minute în prezența unei copii a obiectului familiar (a_3) și a unui obiect nou (b). În timpul testului T_1 și T_2 , explorările fiecărui obiect (definite ca adulmecare, lins, ros sau mișcarea mustăților cu nasul orientat către obiect la o distanță mai mică de 1 cm) au fost înregistrate cu un cronometru.

T_1 este timpul total de explorare a obiectelor familiare ($a_1 + a_2$).

T_2 este timpul total de explorare a obiectului familiar și a obiectului nou ($a_3 + b$).

Testul de recunoaștere a obiectelor a fost efectuat conform descrierii din Behavioural Brain Research, 1988, 31, 47-59.

Rezultate:

Animalele tratate cu vehicul sau compus testat sau AChEI au petrecut un timp aproape egal explorând obiectele noi și cele familiare. Grupurile tratate cu combinația de compus testat și AChEI (donepezil, galantamină sau rivastigmină) au petrecut semnificativ mai mult timp explorând obiectul nou și au deosebit obiectul nou de cel familiar. Acest efect procognitiv sugerează un efect potențiator al compusului testat față de efectul procognitiv al AChEI (donepezil, galantamină sau rivastigmină) individual. Rezultatele acestui studiu sunt indicate în figura 1a, 1b, 1c și 2.

Exemplul 4:

Evaluarea modului de acțiune a acetilcolinei în cortexul median prefrontal al șobolanilor Wistar masculi

Șobolanii Wistar masculi (greutate corporală de 240 - 300 g) au primit stereotaxic un implant cu o canulă de microdializă în cortexul median prefrontal (mPFC; AP: +3.2 mm, ML: -0.5 mm, DV: -3.0 mm) sub anestezie cu izofluran. S-au luat coordonatele conform atlasului pentru creierul șobolanilor (Paxinos & Watson 2004) cu puncte de referință luate de la bregmă și vertical de la craniu. Șobolanii au fost lăsați să se recupereze individual patru zile într-un recipient din plexiglas cu fund rotund, cu acces liber la hrană și apă.

După recuperarea de 4 zile, șobolanii Wistar masculi au fost conectați la un centru rotativ dual cu două canale acoperite cu cuarț (Instech, UK) pe un balansier, care a permis mișcarea nerestricționată a animalului. Cu 16 ore înaintea debutului studiului, s-a introdus o sondă de microdializă pre-echilibrată (membrană de dializă de 2 mm) în mPFC prin canula de ghidare. În ziua studiului s-a efectuat o perfuzie cu lichid cefalorahidian artificial (aCSF; NaCl 147 mM, KCl 2.7 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2H₂O 1.2 mM, pH 7.4) la un debit de 1.5 μL/min și s-a menținut o perioadă de stabilizare de 2 ore. S-au colectat cinci probe bazale la intervale de 20 min înainte de administrarea compusului testat (3 sau 10 mg/kg, *p.o.*) sau vehiculului. S-a administrat donepezil (1 mg/kg, *s.c.*) sau rivastigmină (0.5 mg/kg, *s.c.*) la 30 min după administrarea compusului testat. Probele de dializat s-au colectat o perioadă suplimentară de 4 h post-tratament și s-au depozitat la sub -50°C înaintea analizei.

Cuantificarea acetilcolinei

Concentrațiile acetilcolinei în dializat s-au cuantificat folosind metoda pe bază de LC-MS/MS.

Analiza statistică:

Toate datele de microdializă pentru acetilcolină s-au reprezentat ca modificare procentuală față de concentrațiile bazale medii de dializat, 100% fiind definit ca medie a cinci valori pre-doză. Modificarea procentuală a nivelurilor de acetilcolină după tratamentul combinat s-a comparat cu donepezil sau rivastigmină prin analiza bifactorială a varianței (timp și tratament), urmată de post-test Bonferroni. S-au calculat valorile zonei de sub curbă (AUC) pentru modificarea procentuală a nivelurilor de acetilcolină și semnificația statistică între valoarea AUC medie după tratamentul combinat s-a comparat cu valorile AUC după tratamentul individual cu donepezil sau rivastigmină folosind testul "t" neîmperecheat. Semnificația statistică a fost considerată la o valoare *p* mai mică decât 0.05. Amplasarea incorectă a sondei a fost considerată criteriu de respingere a datelor de la animal.

Referință:

1. Paxinos G. & Watson C. (2004) Rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, New York.

Rezultate:

Compus 1

Tratamentul cu donepezil a produs creșterea nivelurilor de acetilcolină corticală de referință și a ajuns la maxim $933 \pm 74\%$ din nivelurile bazale. Compusul 1 în combinație cu donepezil a produs creștere semnificativă a nivelurilor de acetilcolină și nivelurile de vârf au ajuns până la $1676 \pm 150\%$ din nivelurile pre-doză (**Figura 3(a)**). Valorile medii ale zonei de sub curbă (AUC) calculate după tratamentul combinat cu Compus 1 și donepezil au fost semnificativ mai mari în comparație cu donepezil individual (**Figura 3(b)**).

Tratamentul cu rivastigmină a produs creșterea nivelurilor de acetilcolină corticală de referință și a ajuns la maxim $612 \pm 104\%$ din nivelurile bazale. Compusul 1 în combinație cu rivastigmină a produs creștere semnificativă a nivelurilor de acetilcolină și nivelurile de vârf au ajuns până la $1276 \pm 213\%$ din nivelurile pre-doză (**Figura 4(a)**). Valorile medii ale zonei de sub curbă (AUC) calculate după tratamentul combinat cu Compusul 1 și rivastigmină au fost mai mari comparativ cu rivastigmină individual (**Figura 4(b)**).

Compus 2

Tratamentul cu donepezil a produs creșterea nivelurilor de acetilcolină corticală de referință și a ajuns la maxim $1459 \pm 146\%$ din nivelurile bazale. Compusul 2 în combinație cu donepezil a produs creștere semnificativă a nivelurilor de acetilcolină și nivelurile de vârf au ajuns până la $3057 \pm 468\%$ din nivelurile pre-doză (**Figura 5(a)**). Valorile medii ale zonei de sub curbă (AUC) calculate după tratamentul combinat cu Compus 2 și Donepezil au fost semnificativ mai mari în comparație cu Donepezil individual (**Figura 5b**).

Compus 3

Tratamentul cu donepezil a produs creșterea nivelurilor de acetilcolină corticală de referință și a ajuns la maxim $1170 \pm 161\%$ din nivelurile bazale. Compusul 3 în combinație cu donepezil a produs creștere semnificativă a nivelurilor de acetilcolină și nivelurile de vârf au ajuns până la $1874 \pm 184\%$ din nivelurile pre-doză (**Figura 6(a)**). Valorile medii ale zonei de sub curbă (AUC) calculate după tratamentul combinat cu Compus 3 și donepezil au fost semnificativ mai mari în comparație cu donepezil individual (**Figura 6(b)**).

Exemplul 5:

Evaluarea modulării theta în hipocampus dorsal al șobolanilor Wistar masculi anesteziati

Șobolanii Wistar masculi (240-320 g) au fost anesteziati prin administrarea intraperitoneală a uretanului (1.2 până la 1.5 g/kg) pentru introducerea unui cateter în vena femurală stânga. Animalul a fost așezat într-un cadru stereotaxic pentru implantul unui electrod (oțel inoxidabil, Plastics One) în hipocampus dorsal (AP, -3.8 mm; ML, +2.2 mm; DV, -2.5 mm; Paxinos & Watson, 2004). S-a implantat un electrod stimulant bipolar (fire de oțel inoxidabil nerăsucite, separate de 0.75-1.0 mm la varfuri, Plastics One) în nucleul pontis oralis (NPO; AP, -7.8 mm; ML, 1.8 mm; DV, -6.0 mm; Paxinos & Watson, 2004). În plus, s-a implantat un electrod în cerebel, având rol de referință. Ritmul θ al hipocampusului a fost evocat printr-o serie de stimulări electrice de 6-s (20-160 μ A, durată impuls 0.3-ms, 250 Hz) furnizate la NPO la o viteză de 0.01 serii/s cu un stimulator Grass S88 și unitate de izolare a stimulilor PSIU6 (Grass Medical Instruments, Quincy, MA). EEG s-a înregistrat la o viteză de 1000Hz folosind software Ponemah (versiune 5.2) și s-a memorat pentru analiză off-line folosind NeuroScore (versiune 3.0). Nivelul de referință al amplitudinii a fost atins folosind curentul necesar pentru a provoca ritmul θ la 50% din amplitudinea maximă în condiții de control. După perioada de stabilizare de 1 h, s-a efectuat înregistrarea de referință 30 min, urmată de tratament cu vehicul sau compus 1 (1 mg/kg, *i.v.*). Donepezil (0.3 mg/kg, *i.v.*) s-a administrat 30 min după tratamentul cu compus 1 și înregistrarea a continuat încă 1 h.

Analiza statistică:

S-a calculat puterea în frecvența ritmului θ în perioada de stimulare în timpul perioadei de referință de 30 min și s-au calculat modificările procentuale ale acestor măsurători post tratament. Modificarea procentuală a puterii theta relative după tratamentul combinat s-a comparat cu donepezil folosind analiza bifactorială a varianței (timp și tratament), urmată de post-test Bonferroni. Semnificația statistică a fost considerată la o valoare *p* mai mică decât 0.05.

Referință:

1. Paxinos G. & Watson C. (2004) Rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, New York

Rezultate:

Tratamentul cu donepezil a produs creșterea puterii theta în hipocampus. Compusul 1 în combinație cu donepezil a produs creștere semnificativă a nivelurilor de putere theta și nivelurile de vârf au ajuns până la $163 \pm 15\%$ din nivelurile pre-doză (**Figura 7(a)**). Valorile medii ale zonei

de sub curbă (AUC) calculate după tratament cu compus 1 și donepezil au fost semnificativ mai mari în comparație cu donepezil (**Figura 7(b)**).

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- KHAN NADIA ET AL: "The dual-acting H3 receptor antagonist and AChE inhibitor UW-MD-71 dose-dependently enhances memory retrieval and reverses dizocilpine-induced memory impairment in rats", BEHAVIOURAL BRAIN RESEARCH, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 297, 20 October 2015 (2015-10-20), pages 155-164, XP029331734, ISSN: 0166-4328, DOI: 10.1016/J.BBR.2015.10.022
- WO-A1-2014/136075
- US-A1- 2014 135 304

(57) Revendicări:

1. O combinație conținând un agonist invers al receptorului histaminic 3 și un inhibitor al acetilcolinesterazei; unde agonistul invers al receptorului histaminic 3 este selectat din grupul constând din:

N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida;
N-[4-(1-Ciclopropilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida; și
N-[4-(1-Izopropilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida;
sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora.

2. Combinația conform revendicării 1, unde inhibitorul acetilcolinesterazei este selectat din grupul constând din donepezil, rivastigmină și galantamină sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora.

3. Combinația conform revendicării 1, unde agonistul invers al receptorului histaminic 3 este N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia.

4. Combinația conform revendicării 1 sau 3, unde sarea acceptabilă farmaceutic a agonistului invers al receptorului histaminic 3 este selectată dintre

N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida diclorhidrat;
N-[4-(1-Ciclopropilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida tartrat; și
N-[4-(1-Izopropilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida tartrat.

5. Combinația conform revendicării 1, 3 sau 4, unde agonistul invers al receptorului histaminic 3 este N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida diclorhidrat.

6. Combinația conform revendicării 1 sau 2, unde inhibitorul acetilcolinesterazei este donepezil sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia sau unde inhibitorul acetilcolinesterazei este donepezil clorhidrat.

7. O combinație conținând N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida diclorhidrat și donepezil clorhidrat.

8. Combinația conform oricăreia dintre revendicările de la 1 la 7 pentru utilizare în tratamentul tulburărilor cognitive la un pacient.

9. Combinația pentru utilizare conform revendicării 8, unde boala cognitivă este selectată dintre boala Alzheimer, schizofrenia, boala Parkinson, demența cu corpi Lewy, demența vasculară, demența frontotemporală, sindromul Down și sindromul Tourette.

10. Un compus, N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il) acetamida, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia pentru utilizare în combinație cu inhibitorul acetilcolinesterazei pentru tratarea bolii Alzheimer la un pacient.

11. Compusul pentru utilizare conform revendicării 10 ca un tratament adjuvant al unui pacient care urmează tratament stabil cu un inhibitor al acetilcolinesterazei.

12. Compusul pentru utilizare conform revendicării 10 sau 11, unde inhibitorul acetilcolinesterazei este selectat dintre donepezil, rivastigmină și galantamină sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora.

13. Compusul pentru utilizare conform revendicării 10 sau 11,

(a) unde tratamentul cuprinde administrarea la pacient a 0.1 mg până la 100 mg de N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamidă sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia pe zi sau

(b) unde tratamentul cuprinde administrarea la pacient a 0.1 mg până la 60 mg de N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamidă sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia pe zi sau

(c) unde tratamentul cuprinde administrarea la pacient a 0.1 mg până la 30 mg de N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamidă sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia pe zi; sau

(d) unde tratamentul cuprinde administrarea la pacient a 1 mg până la 30 mg de donepezil sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia pe zi.

14. O compoziție farmaceutică ce conține combinația conform oricăreia din revendicările de la 1 la 7 și excipienți acceptabili farmaceutic sau o combinație a acestora.

15. Compoziția farmaceutică conform revendicării 14, pentru utilizare în tratamentul tulburărilor cognitive selectate dintre boala Alzheimer, schizofrenie, boala Parkinson, demența cu corpi Lewy, demența vasculară și demența frontotemporală.

16. Compoziția farmaceutică conform revendicării 14 sau 15,

(a) unde N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia este prezentă într-o cantitate de 0.1 mg până la 100 mg sau

(b) unde N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia este prezentă într-o cantitate de 0.1 mg până la 60 mg sau

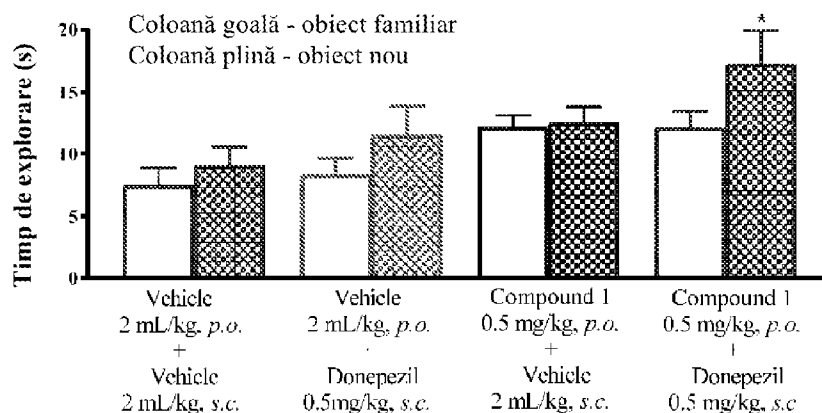
(c) unde N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamida sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia este prezentă într-o cantitate de 0.1 mg până la 30 mg; sau

(d) unde donepezil sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia este prezent într-o cantitate de 2 mg până la 30 mg.

17. Compusul pentru utilizare conform revendicării 10, unde tratamentul cuprinde administrarea N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamidei sau a unei sări acceptabile farmaceutic a acesteia la pacient pe cale orală, nazală, locală, dermică sau parenterală.

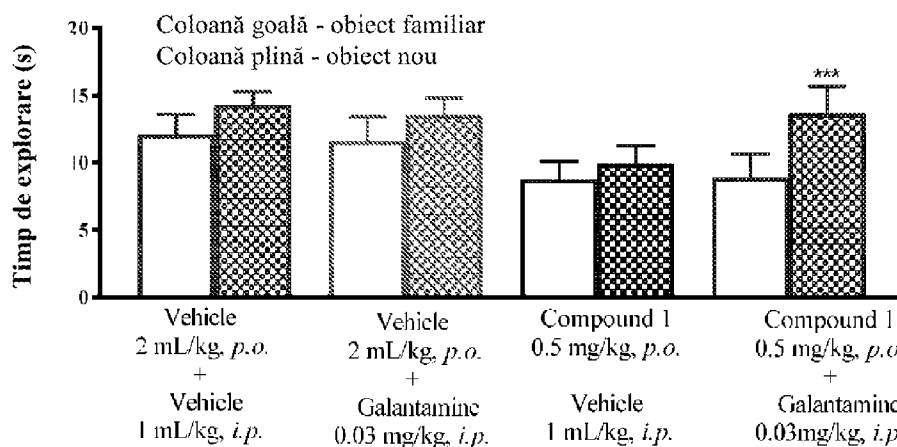
18. Compusul pentru utilizare conform revendicării 10, unde tratamentul cuprinde administrarea N-[4-(1-Ciclobutilpiperidin-4-iloxi)fenil]-2-(morfolin-4-il)acetamidei sau a unei sări acceptabile farmaceutic a acesteia la pacient o dată până la de trei ori pe zi, o dată până la de trei ori pe săptămână sau o dată până la de trei ori pe lună.

Figure 1a:



Datele reprezintă medie $\pm$ SEM din timpul de explorare (* $p < 0,05$ vs. obiect familiar, test t student împerecheat), $n = 8-10$

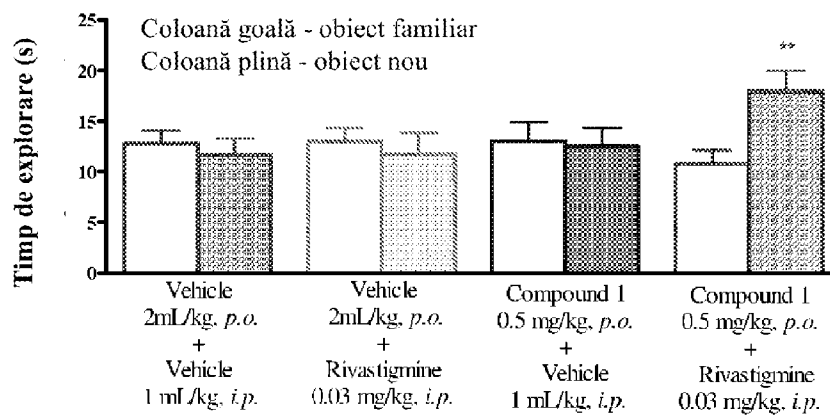
Figure 1b:



Datele reprezintă medie $\pm$ SEM din timpul de explorare (***) $p < 0,001$ vs. obiect familiar, test t student împerecheat), $n = 7-10$

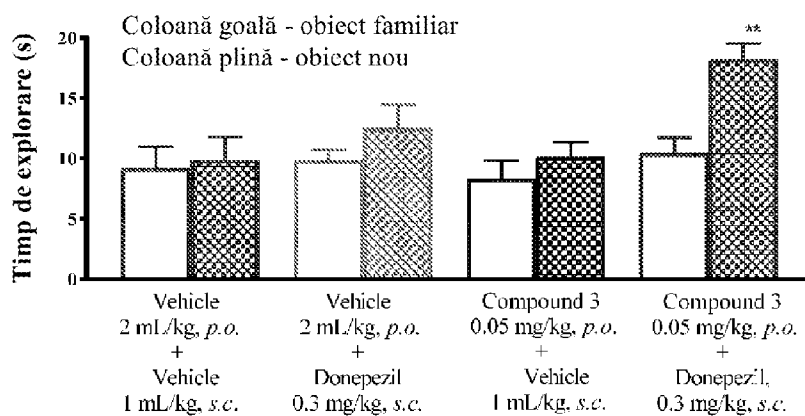
Fig. 1

Figure 1c:



Datele reprezintă medie $\pm$ SEM din timpul de explorare (** $p < 0,01$ vs. obiect familiar, test t student împerecheat), $n = 9-12$

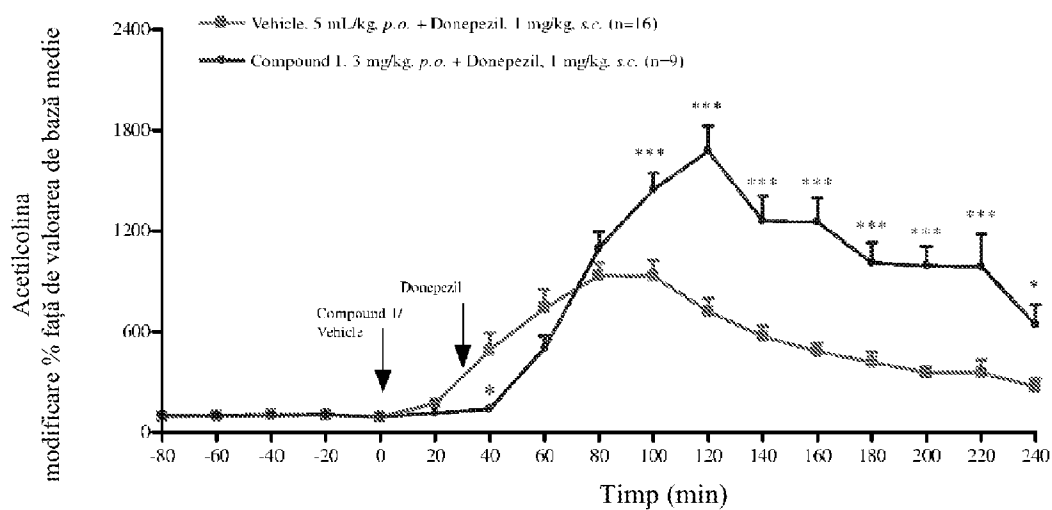
Figure 2:



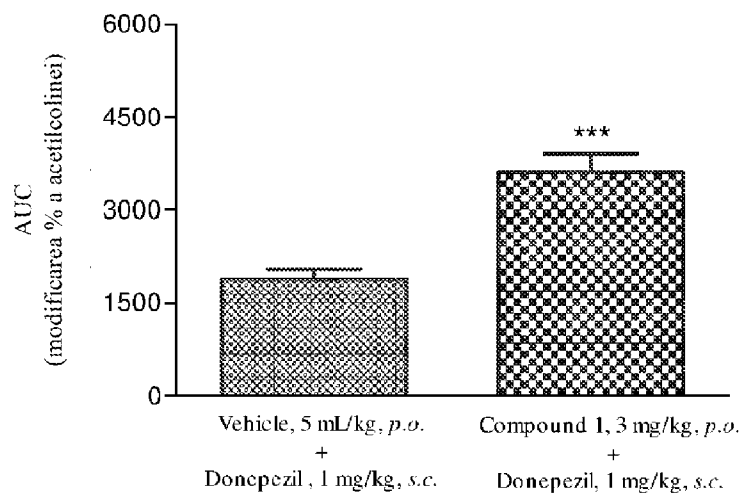
Datele reprezintă medie $\pm$ SEM din timpul de explorare (** $p < 0,01$ vs. obiect familiar, test t student împerecheat), $n = 9-11$

Fig. 2

Figure 3



(b)



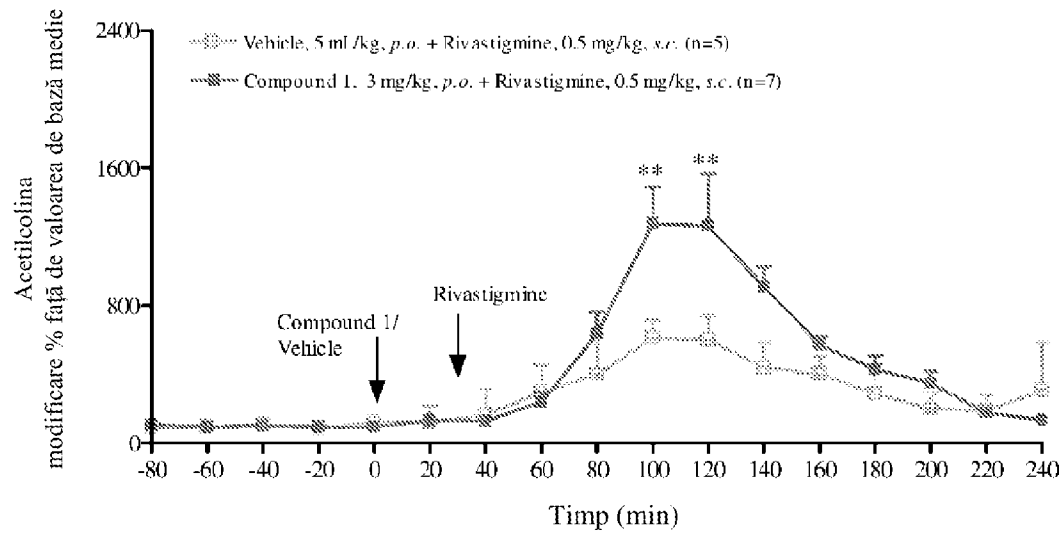
(a) Date exprimate ca medie $\pm$ SEM, * $p < 0,05$ și *** $p < 0,001$ vs. Donepezil individual (post test Bonferroni)

(b) Zona de sub curbă (AUC) $\pm$ SEM, *** $p < 0,001$ vs. Donepezil individual (test t neîmperecheat)

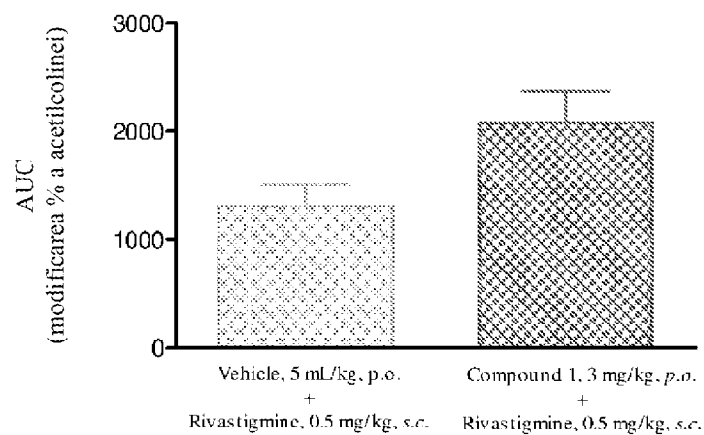
Fig. 3

Figure 4

(a)



(b)

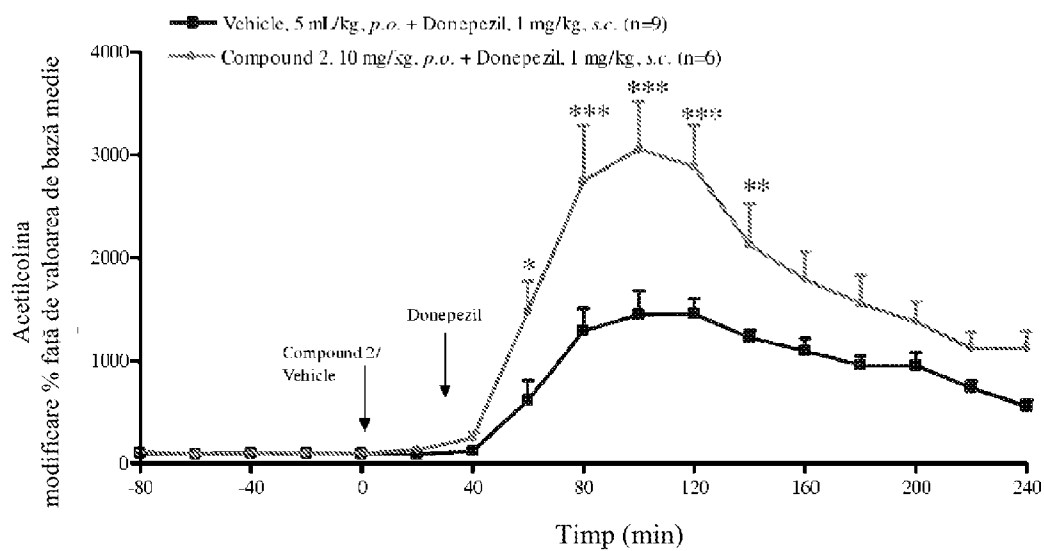


(a) Date exprimate ca medie $\pm$ SEM, ** $p < 0,01$ vs. rivastigmină ndividual (post test Bonferroni)

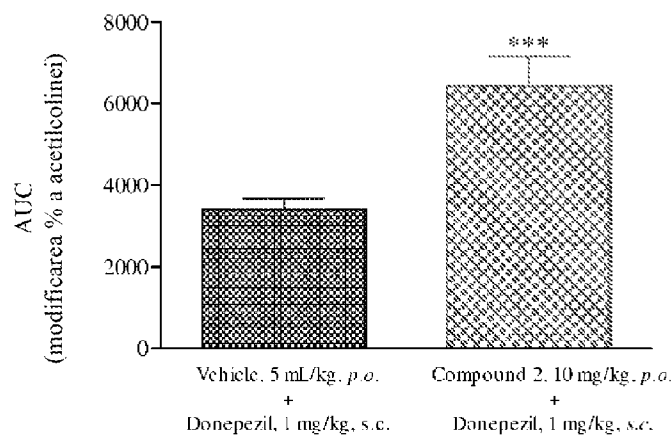
(b) Zona de sub curbă (AUC) $\pm$ SEM.

Fig. 4

Figure 5: (a)



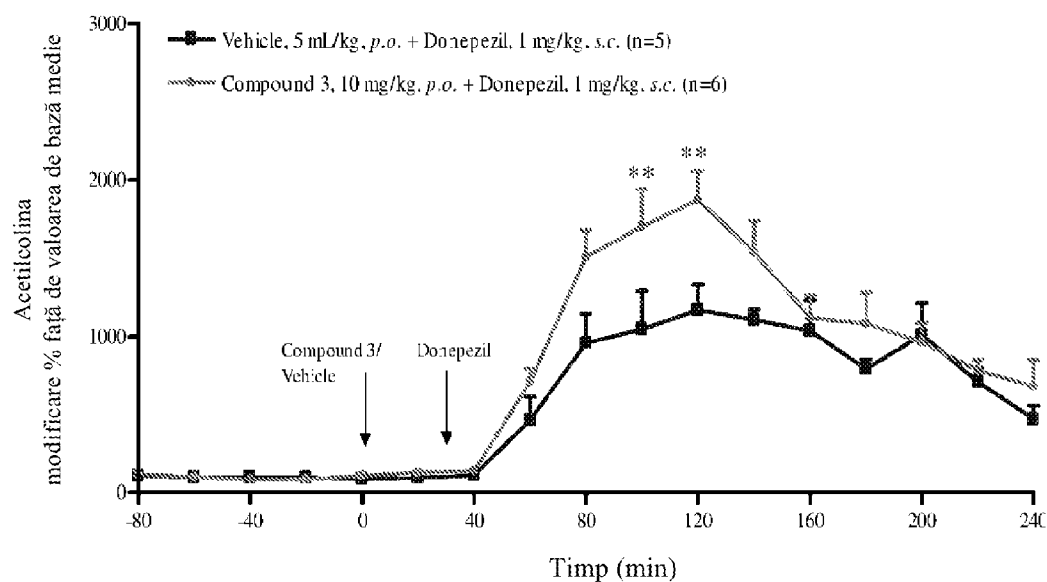
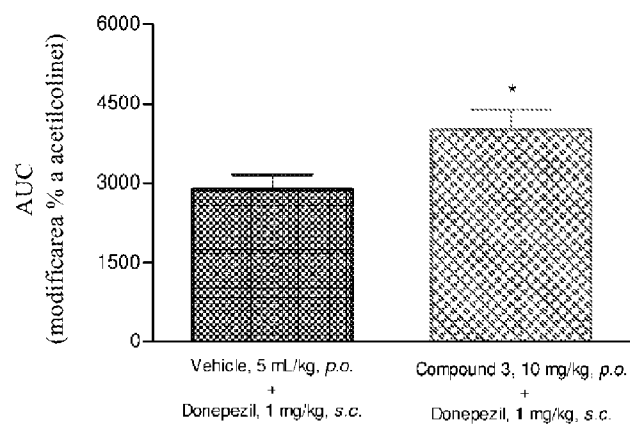
(b)



(a) Date exprimate ca medie $\pm$ SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ și *** $p < 0,001$ vs. Donepezil individual (post test Bonferroni)

(b) Zona de sub curbă (AUC) $\pm$ SEM, *** $p < 0,001$ vs. Donepezil individual (test t neîmperecheat).

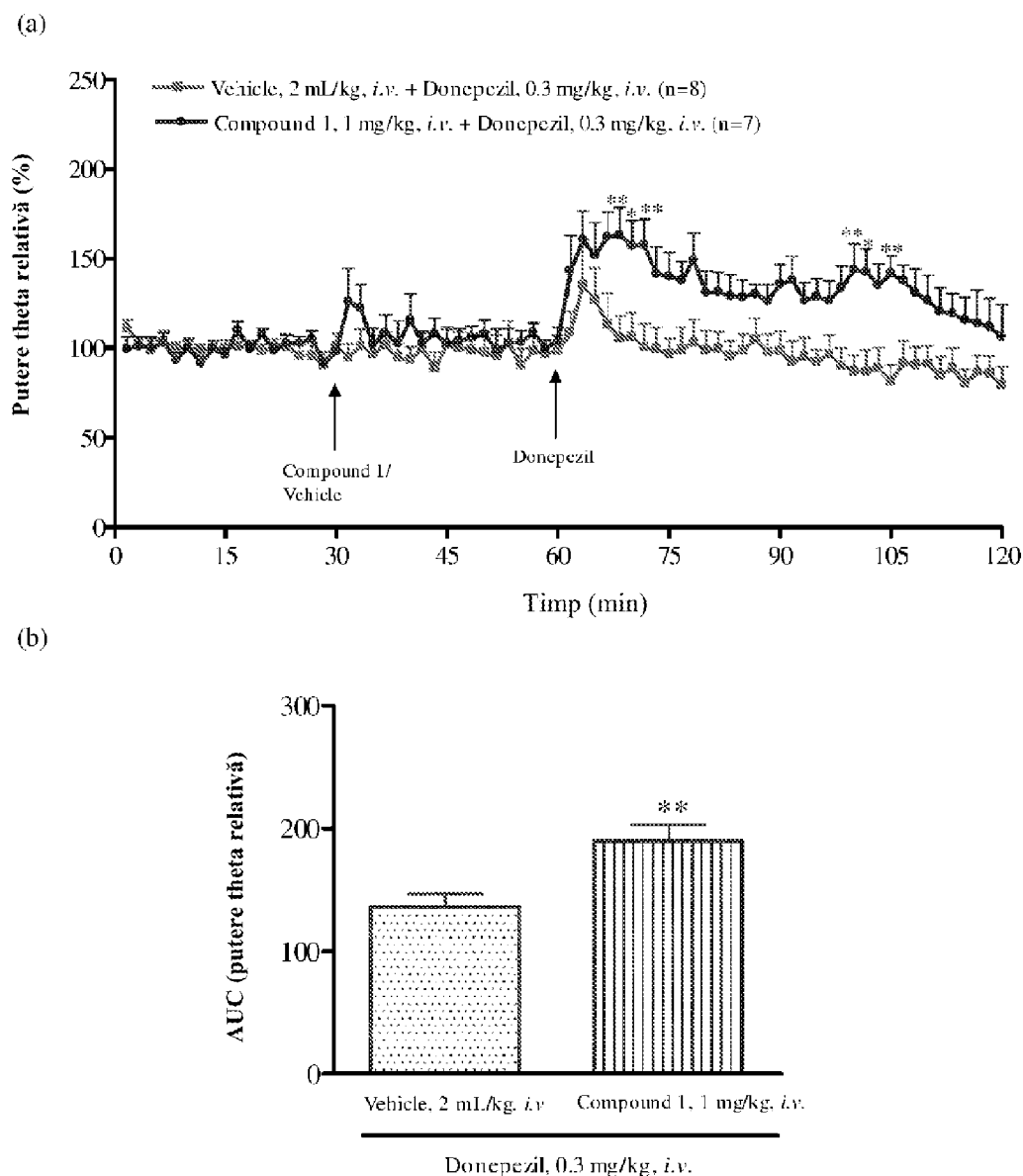
Fig. 5

Figure 6: (a)**(b)**

(a) Date exprimate ca medie $\pm$ SEM, ** $p < 0,01$ vs. Donepezil individual (post test Bonferroni)

(b) Zona de sub curbă (AUC) $\pm$ SEM, * $p < 0,05$ vs. Donepezil individual (test t neîmperecheat).

Fig. 6

Figure 7

(a) Date exprimate ca medie $\pm$ SEM, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ vs. Donepezil individual (post test Bonferroni)

(b) Zona de sub curbă (AUC) $\pm$ SEM, ** $p < 0,01$ vs. Donepezil individual (test t neîmperecheat).

Fig. 7