

ROYAUME DU MAROC

OFFICE MAROCAIN DE LA PROPRIETE (19)
INDUSTRIELLE ET COMMERCIALE



المملكة المغربية

المكتب المغربي
للملكية الصناعية والتجارية

(12) BREVET D'INVENTION

(11) N° de publication : **MA 28032 A1** (51) Cl. internationale : **A61P 31/14; A61K 38/13**

(43) Date de publication :
03.07.2006

(21) N° Dépôt :
28865

(22) Date de Dépôt :
10.03.2006

(30) Données de Priorité :
03.09.2003 GB 0320638.0

(86) Données relatives à la demande internationale selon le PCT:
PCT/EP2004/009804 02.09.2004

(71) Demandeur(s) :
NOVARTIS AG., LICHTSTRASSE 35, CH-4056 Bale (CH)

(72) Inventeur(s) :
HIJIKATA, MAKOTO ; SHIMOTOHNO, KUNITADA ; WATASHI, KOICHI

(74) Mandataire :
SABA & CO

(54) Titre : **UTILISATION DE CYCLOSPORINES MODIFIEES POUR LE TRAITEMENT DE TROUBLES LIES AU VHC**

(57) Abrégé : Cette invention concerne ses cyclosporines sans activité immunosuppressive se liant à la cyclophiline (voir formules I, la ou II) comme définies dans le descriptif, qui possèdent des propriétés puissantes dans la prévention ou le traitement des infections par le virus de l'hépatite C.

ABREGE

Cette invention concerne ses cyclosporines sans activité immunosuppressive se liant à la cyclophiline (voir formules I, Ia ou II) comme définies dans le descriptif, qui possèdent des propriétés puissantes dans la prévention ou le traitement des infections par le virus de l'hépatite C.

28/28861
2803
28032
03 JUL 2006

**UTILISATION DE CYCLOSPORINES MODIFIEES POUR LE
TRAITEMENT DE TROUBLES LIES AU VHC**

5

La présente invention se rapporte à une nouvelle utilisation des cyclosporines non immunosuppressives.

Les cyclosporines comprennent une classe d'undécapetides poly-N-méthylés, cycliques et structurellement distinctifs qui possèdent généralement
10 une activité pharmacologique, tout particulièrement immunosuppressive, ou anti-inflammatoire. La première des cyclosporines à avoir été isolée est la Ciclosporine ou Cyclosporine métabolite fongique naturelle également connue sous le nom de cyclosporine A.

Il est bien connu que la cyclosporine A agit suite à son interférence
15 avec le processus d'activation des cellules T en bloquant l'initiation de la transcription de l'IL-2. Il a été découvert que la cyclosporine A forme un complexe avec une protéine cytosolique 17kD appelée cyclophiline, qui apparaît dans de nombreux types de cellules et qui s'est avérée être identique à la peptidyl-prolyl cis-trans isomérase, une enzyme impliquée dans le
20 repliement des protéines.

Toutefois, il a été découvert que la liaison à la cyclosporine est un critère nécessaire mais toutefois pas suffisant pour l'activité immunosuppressive. Le complexe cyclosporine A / cyclophiline peut également s'associer à la protéine cellulaire connue sous le nom de
25 calcineurine (CN) qui appartient à la super famille des phosphatases. Cette liaison supprime son activité de phosphatase faisant ainsi taire le facteur de transcription NF-AT. L'inhibition de la voie CN/NF-AT est un mécanisme essentiel pour que la cyclosporine A puisse provoquer l'immunosuppression.

Les cyclosporines qui se lient fortement à la cyclophiline mais qui
30 ne sont pas immunosuppressives ont été identifiées. Une cyclosporine est considérée comme étant non suppressive lorsque son activité lors de la Réaction Lymphocytaire Mixte (RLM) n'est pas supérieure de plus de 5%, de



préférence de plus de 2%, à celle de la cyclosporine A. La Réaction Lymphocytaire Mixte est décrite par T. Meo dans « *Immunological Methods* », L. Lefkovits et B. Peris, Eds., Academic Press, N.Y. pp. 227 - 239 (1979). Des cellules de la rate ($0,5 \times 10^6$) provenant de souris Balb/c (femelles, 8-10 semaines) sont incubées pendant 5 jours avec $0,5 \times 10^6$ de cellules de la rate irradiées (2 000 rads) ou traitées avec de la mitomycine C provenant de souris CBA (femelles, 8-10 semaines). Les cellules allogéniques irradiées induisent une réponse proliférative dans les cellules de la rate de souris Balb c qui peut être mesurée suite à l'incorporation d'un précurseur marqué dans l'ADN. Etant donné que les cellules de stimulation sont irradiées (ou traitées avec de la mitomycine C), elles ne répondent pas aux cellules Balb/c par la prolifération mais retiennent leur antigénicité. La valeur IC50 trouvée pour le composé à tester lors de la RLM est comparée avec celle trouvée pour la cyclosporine A lors d'une expérience parallèle. De plus, les cyclosporines non-immunosuppressives ne possèdent pas la capacité d'inhiber la CN ainsi que la voie NF-AT.

EP 0 484 281 A1 décrit l'utilisation de cyclosporines non-immunosuppressives dans le traitement du SIDA ou des troubles associés au SIDA.

Il a maintenant été découvert de façon surprenante que les cyclosporines non immunosuppressives possèdent un effet inhibiteur sur le virus de l'Hépatite C (VHC).

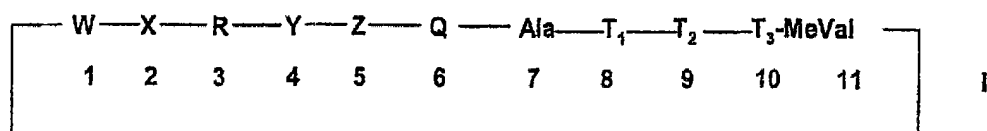
L'infection persistante au VHC, qui a été identifiée comme étant le principal agent à l'origine de l'hépatite non A, de l'hépatite non B, est considérée comme étant étroitement liée aux maladies hépatiques telles que l'hépatite chronique, la cirrhose du foie ou le carcinome hépatocellulaire. Le développement de ces maladies hépatiques représente un important problème de santé publique. Une thérapie anti-VHC efficace se limite à une thérapie à base d'interféron ou d'une combinaison d'interférons et de ribavirin. Toutefois, étant donné que le virus n'est pas éliminé chez près de la moitié des patients traités avec ces agents connus, on ressent encore fortement le besoin de disposer d'autres agents anti-VHC.

De même, la présente invention prévoit l'utilisation d'une cyclosporine non immunosuppressive se liant à la cyclophiline pour la prévention ou le traitement des infections par hépatite C ou des troubles induits par le VHC.

5 Les infections par hépatite C ou des troubles induits par le VHC comprennent, p.ex., l'hépatite chronique, la cirrhose du foie ou le cancer du foie, p.ex. carcinome hépatocellulaire. Les cyclosporines non immunosuppressives se liant à la cyclophiline peuvent également être employées, par exemple, en vue d'un traitement prophylactique de nouveaux-
 10 nés nés de mères souffrant du VHC ou de travailleurs de la santé exposés au virus, ou de receveurs de greffes, p.ex. receveurs d'organes ou de tissus, p.ex. greffe du foie, de façon à éliminer toute éventuelle récurrence d'une infection VHC suite à la transplantation.

Une cyclosporine est considérée comme se liant à une cyclophiline si
 15 elle se lie à une cyclophiline recombinante humaine au moins un cinquième de fois aussi bien que la cyclosporine A lors de l'analyse compétitive ELISA décrite par Quesniaux dans *Eur. J. Immunol.* 1987 **17** 1359-1365. Lors de ce test, la cyclosporine à tester est ajoutée durant l'incubation de la cyclophiline avec la cyclosporine A enrobée de BSA et, on calcule la concentration
 20 nécessaire de façon à produire une inhibition de 50% de la réaction de contrôle sans concurrent (IC₅₀). Les résultats sont exprimés en tant que Taux de Liaison (TL), qui est le log en base 10 au niveau du taux de la valeur IC₅₀ du composé à tester et de la valeur IC₅₀ lors d'un test simultané de la cyclosporine A elle-même. Ainsi, un TL de 1,0 indique que le composé à tester lie la cyclophiline
 25 humaine un facteur sur dix moins bien que la cyclosporine A et, une valeur négative indique que la liaison est plus forte que celle effectuée par la cyclosporine A. Les cyclosporines actives à l'encontre du VHC possèdent un TL inférieur à 0,7, de préférence, égal ou inférieur à zéro.

Des exemples de cyclosporines non immunosuppressives se liant à la
 30 cyclophiline comprennent, par exemple, des composés de formule I



dans laquelle,

W est MeBmt, dihydro-MeBmt, 8'-hydroxy-MeBmt ou O-acétyl-MeBmt¹ ;

X est α Abu, Val, Thr, Nva ou 0-méthyl thréonine (Me0Thr) ;

R est Pro, Sar, (D)-MeSer, (D)-MeAla, ou (D)-MeSer(Oacétyle);

- 5 Y est MeLeu, thioMeLeu, γ -hydroxy-MeLeu, Melle, MeVal, MeThr, MeAla, Mealle ou MeaThr ; N-éthylVal, N-éthyllle, N-éthylThr, N-éthylPhe, N-éthylTyr ou N-éthylThr(Oacétyle) ;

Z est Val, Leu, MeVal ou MeLeu ;

Q est MeLeu, γ -hydroxy-MeLeu, MeAla ou Pro ;

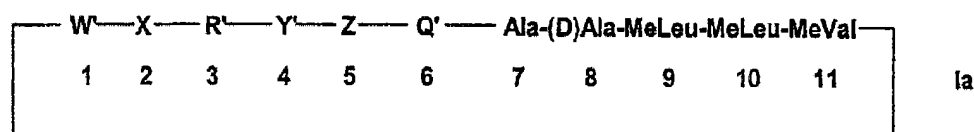
- 10 T₁ est (D)Ala ou Lys ;

T₂ est MeLeu ou γ -hydroxy-MeLeu ; et

T₃ est MeLeu ou MeAla ;

Les composés préférés de formule I sont, p.ex. des composés de

- 15 formule Ia



dans laquelle,

W' est MeBmt, dihydro-MeBmt, 8'-hydroxy-MeBmt ;

X est α Abu, Val, Thr, Nva ou 0-méthyl thréonine (Me0Thr) ;

- 20 R' est Sar, (D)-MeSer, (D)-MeAla, ou (D)-MeSer(Oacétyle);

Y' est MeLeu, γ -hydroxy-MeLeu, Melle, MeVal, MeThr, MeAla, Mealle ou MeaThr ; N-éthylVal, N-éthyllle, N-éthylThr, N-éthylPhe, N-éthylTyr ou N-éthylThr(Oacétyle) ;

Z est Val, Leu, MeVal ou MeLeu ; et

- 25 Q' est MeLeu, γ -hydroxy-MeLeu ou MeAla.

Les groupes W', X, Y', Z, Q' et R' possèdent, indépendamment les uns des autres, possèdent les significations suivantes :

W' est de préférence W'' dans lequel W'' est MeBmt ou dihydro-MeBmt ;

- 30 X est de préférence X' dans lequel X' est α Abu ou Nva, plus particulièrement X'' dans lequel X'' est α Abu ;



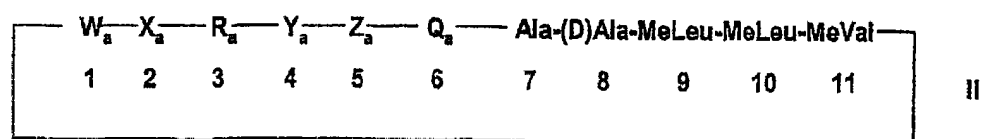
- R' est de préférence R'' dans lequel R'' est Sar ;
 Y' est de préférence Y'' dans lequel Y'' est γ -hydroxy-MeLeu, MeVal, MeThr,
 Melle, N-éthylIle ou N-éthylVal ;
 Z est de préférence Z' dans lequel Z' est Val ou MeVal ; et
 5 Q' est de préférence Q'' dans lequel Q'' est MeLeu.

Un groupe préféré de Composés de formule Ia comprend ceux dans lesquels W' est W'', X est X', Y' est Y'', Z est Z', Q' est Q'' et R' est R''.

- 10 Des exemples de composés de formule Ia préférés sont, p.ex.
- a) [dihydro-MeBmt]¹-[γ -hydroxy-MeLeu]⁴-Ciclosporine ; TL* = 0,1 ; IR < 1%
 - b) [MeVal]⁴-Ciclosporine ; TL = 0,1 ; TI < 1%
 - c) [Melle]⁴-Ciclosporine ; TL = -0,2 ; TI < 1%
 - 15 d) [MeThr]⁴-Ciclosporine ;
 - e) [γ -hydroxy-MeLeu]⁴-Ciclosporine ; TL = 0,4 ; TI < 1%
 - f) [Ethyl-Ile]⁴-Ciclosporine ; TL = 0,1 ; TI < 2%
 - g) [Ethyl-Val]⁴-Ciclosporine ; TL = 0 ; TI < 2%
 - h) [Nva]²-[γ -hydroxy-MeLeu]⁴-Ciclosporine ;
 - 20 i) [γ -hydroxy-MeLeu]⁴-[γ -hydroxy-MeLeu]⁴-Ciclosporine ;
 - j) [MeVal]⁵-Ciclosporine ; TL = 0,4 ; TI = 5,3%
 - k) [MeOThr]²-[(D)MeAla]³-[MeVal]⁵-Ciclosporine ;
 - j) [8'-hydroxy-MeBmt]¹-Ciclosporine ; TL = 0,35 ; TI = 1,8%
 - k) [MeAla]⁶-Ciclosporine ; TL = -0,4 ; TI = 3,2
 - 25 l) [γ -hydroxy-MeLeu]⁹-Ciclosporine ; TL = 0,15 ; TI = 2,9

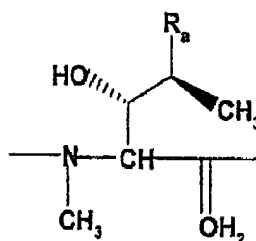
TI = taux d'immunosuppression, exprimé en pourcent de l'activité relative par rapport à la Cyclosporine A.

- D'autres exemples de cyclosporines non immunosuppressives
 30 comprennent les composés décrits dans les documents WO 98/28330, WO 98/28329 et WO 98/28328, leurs contenus sont incorporés à la présente sous forme de références, p.ex. les composés de formule II



dans laquelle,

W_a est



5 dans laquelle R_a est un résidu de formule Ic ou Id



dans laquelle,

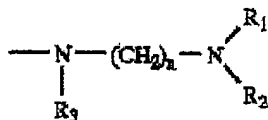
10 R_4 est C_{1-4} alkylthio, amino C_{1-4} alkylthio, C_{1-4} alkylamino C_{1-4} alkylthio, di C_{1-4} alkylamino- C_{1-4} alkylthio, pyrimidinylthio, thiazolylthio, N- C_{1-4} alkylimidazolylthio, hydroxy C_{1-4} alkylphénylthio, hydroxy C_{1-4} alkylphénoxy, nitrophénylamino ou 2-oxopyrimidin-1-yle, et R'_4 est C_{1-4} alkyle,

X_a est Abu ;

15 R_a est $-NMe-CH(R_b)-CO-$ dans laquelle R_b est H ou $-S-Alk-R_0$ dans laquelle $Alk-R_0$ est méthyle ; ou Alk est C_{2-6} alkylène ou C_{3-6} cycloalkylène linéaire ou ramifié et R_0 est H ; OH ; COOH ; C_{2-5} alcoycarbonyle ; NR_1R_2 dans lequel chacun des R_1 et R_2 , indépendamment l'un de l'autre, est sélectionné à partir de H, C_{1-4} alkyle, C_{2-4} alkényle, 20 C_{3-6} cycloalkyle et phényle, chacun étant éventuellement substitué par halogène, C_{1-4} alcoxy, C_{2-5} alcoycarbonyle, amino, C_{1-4} alkylamino et/ou di C_{1-4} alkyl-amino, et benzyle et un radical hétérocyclique, lesdits benzyle et radical hétérocyclique étant saturés ou insaturés et contenant 5 ou 6 membres cycliques et de 1 à 3 hétéroatomes, ou R_1 et R_2 forment, 25 de pair avec l'atome d'azote auquel ils sont attachés, un hétérocycle à 4 ou 6 ramifications pouvant contenir un autre hétéroatome sélectionné à partir d'azote, oxygène et soufre et qui est éventuellement substitué par

C₁₋₄alkyle, phényle ou benzyle ; ou chacun des R₁ et R₂, indépendamment l'un de l'autre, est un radical de formule Ib

(Ib)



dans laquelle,

- 5 R₁ et R₂ sont tels que définis ci-dessus, R₃ est H ou C₁₋₄alkyle et n est un entier relatif compris dans la gamme allant de 2 à 4 ;
 Y_a est MeLeu ou γ-hydroxy-MeLeu ;
 Z_a est Val ; et
 Q_a est MeLeu,
 10 à condition que R_b ne soit pas H lorsque Y_a est MeLeu, ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables.

Dans la formule II, lorsque R₁ et/ou R₂ est un résidu hétérocyclique, il peut être pyridyle, tétrahydropyridyle, pipéridyle, imidazolyle, oxazolyle ou thiazolyle. Lorsque R₁ et R₂ forment un résidu hétérocyclique avec l'atome d'azote auquel ils sont attachés, le résidu hétérocyclique peut être, par exemple, choisi à partir d'azétidinyle, pipéridyle, pipérazinyle, N-méthylpipérazinyle, N-phénylpipérazinyle, N-benzylpipérazinyle, pyridyle, imidazolyle, morpholino, thiomorpholino, tétrahydropyridyle, méthyltétrahydropyridyle (par exemple 4-méthyl-tétrahydropyridyle) ou phényltétrahydropyridyle (par exemple 4-phényltétrahydropyridyle).


Les composés de formule I, Ia ou II peuvent être obtenus d'une multitude de procédés qui peuvent être classés comme suit :

- 25 1) Fermentation
 2) Biotransformation
 3) Dérivatisation
 4) Synthèse partielle
 5) Synthèse totale
 30 tel que décrit, p.ex. dans EP 0 484 281 A1, WO 00/01715, WO 98/28330,



WO 98/28329 ou WO 98/28328, leur contenu étant incorporé à la présente sous forme de références.

Dans une série d'exemples de réalisation spécifiques ou alternatifs, la présente invention prévoit également :

- 5 1.1 Une méthode pour la prévention ou le traitement des infections par Hépatite C ou des troubles induits par le VHC chez un sujet le nécessitant ; ladite méthode consistant à administrer audit sujet une quantité thérapeutiquement efficace d'une cyclosporine non immunosuppressive se liant à la cyclophiline, p.ex. un composé de
10 formule I, Ia ou II.
- Selon la présente invention, la cyclosporine non immunosuppressive se liant à la cyclophiline peut être administrée selon une quantité efficace permettant d'alléger ou d'éliminer un ou plusieurs des signes ou symptômes de l'hépatite C, par exemple, de diminuer les taux de VHC-
15 ARN mesurés dans l'échantillon de sérum prélevé sur le sujet.
- 1.2 Une méthode pour l'inhibition de la réplication du VHC dans un milieu ; ladite méthode consistant à appliquer à ce milieu une quantité efficace d'une cyclosporine non immunosuppressive se liant à la cyclophiline, p.ex. un composé de formule I, Ia ou II.
- 20 1.3 Une méthode pour l'inhibition de la réplication du VHC chez un patient le nécessitant ; ladite méthode consistant à administrer audit sujet une quantité thérapeutiquement efficace d'une cyclosporine non immunosuppressive se liant à la cyclophiline, p.ex. un composé de formule I, Ia ou II.
- 25 1.4 Une méthode pour la prévention de la récurrence d'une infection au VHC chez un receveur de greffe le nécessitant ; ladite méthode consistant à administrer audit receveur une quantité thérapeutiquement efficace d'une cyclosporine non immunosuppressive se liant à la cyclophiline, p.ex. un composé de formule I, Ia ou II.
- 30 2. L'utilisation d'une cyclosporine non immunosuppressive se liant à la cyclophiline, p.ex. un composé de formule I, Ia ou II, dans la préparation d'une composition pharmaceutique utilisable dans le cadre
- 

d'une des méthodes décrites ci-dessus.

3. Une composition pharmaceutique utilisable dans le cadre d'une des méthodes décrites ci-dessus comprenant une cyclosporine non immunosuppressive se liant à la cyclophiline, p.ex. un composé de formule I, Ia ou II, de pair avec un ou plusieurs de ses diluants ou véhicules pharmaceutiquement acceptables.

L'utilité des cyclosporines non immunosuppressives se liant à la cyclophiline (ci-après reprises sous le terme de «cyclosporines selon l'invention») pour le traitement des maladies et conditions citées par la présente peut être démontrée à l'aide de tests standards réalisés en clinique ou sur des animaux, p.ex. conformément aux méthodes décrites ci-après.

A. In vitro

Culture de cellules :

Des cellules Huh-7 et MH-14, des cellules réplicon du VHC, sont cultivées dans un milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM) avec 10% de sérum fœtal de bœuf (FBS). Des cellules PH5CH8 sont cultivées dans un mélange 1:1 de DMEM et d'un milieu F12 dans lequel on a rajouté 100 ng/ml de facteur de croissance de l'épiderme, 10 μ /ml d'insuline, 0,36 μ g/ml d'hydrocortisone, 5 μ g/ml de transferrine, 5 μ g/ml d'acide linoléique, 20 ng/ml de sélénium, 4 μ g/ml de glucagon, 10 ng/ml de prolactine, 10 μ g/ml de gentamicine, 200 μ g/ml de kanamycine, et du FBS à 2%.

Analyse par immunotransfert :

L'analyse par immunotransfert est réalisée tel que décrit par K. Watashi et al., *Virology* 2001, 286, 391-402. Les anticorps primaires employés lors de cette expérience sont les anticorps anti-NS5A, anti-NS5B, et anti- β -actin (Sigma).

Analyse par immunofluorescence indirecte :

L'analyse par immunofluorescence indirecte est réalisée tel que décrit par K. Watashi, supra. Les anticorps primaires employés lors de cette expérience sont les anticorps anti-NS5A et anti-PDI (StressGen).

Analyse par amplification en chaîne par polymérase (ACP) et à transcription inversée (TI) :

La totalité de l'ARN des cellules cultivées est isolé à l'aide d'un
 5 dispositif Sepasol-RNA I Super (nacalai tesque) tel que recommandé par le
 fabricant. L'analyse ACP-TI est réalisée à l'aide d'un kit ACP de l'ARN
 (Takara) conformément aux instructions du fabricant. Les amorces employées
 pour la détection de l'ARNm pour la ligase des 2', 5'-oligoadénylates et la
 protéine kinase dépendante de l'ARN à double brins sont 5'-
 10 CCGTGAAGTTTGAGGTCCAG-3', 5'-GACTAATTCCAAGACCGTCCG-
 3' et 5'-TGGCCGCTAAACTTGCATATC-3', 5'-
 GCGAGTGTGCTGGTCACTAAAG-3', respectivement.

Analyse Northern blot :

L'analyse Northern blot est réalisée tel que décrit par H. Kishine et
 15 al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2002, 47, 119-125. L'essai
 complémentaire à la séquence NS5B employé lors de cette expérience est
 décrit par H. Kishine, supra.

Analyse ACP-TI en temps réel :

Le 5'UTR de l'ARN du génome du VHC est quantifié à l'aide du
 20 détecteur de séquence ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems) tel que décrit
 par T. Takeuchi et al., *Gastroenterology*, 1999, 116, 636-642. Les amorces
 avant et inverses employées lors de cette expérience sont 5'-
 CGGGAGAGCCATAGTGG-3' et 5'-AGTACCACAAGGCCTTTCG-3',
 respectivement. L'essai fluorogénique est 5'-
 25 CTGCGGAACCGGTGAGTACAC-3'. En tant que témoin interne, l'ARN
 ribosomal est également quantifié à l'aide d'un dispositif TaqMan Ribosomal
 RNA Control Reagents (Applied Biosystems).

Expérience d'infection au VHC réalisée in vitro :

L'expérience d'infection au VHC réalisée in vitro est
 30 essentiellement réalisée tel que décrit par N. Kato et al., *Jpn. J. Cancer Res.*
 1996, 87, 787-792 et M. Ikada et al., *Virus Res.*, 1998, 56, 157-167. Des
 cellules PH5CH8 (1×10^5) sont infectées avec le plasma 1 B-2 (équivalent à 10^4

à 10^5 copies de l'ARN du VHC), qui est préparé à partir d'un donneur de sang positif pour le VHC. 24 h après l'inoculation, les cellules sont lavées trois fois avec une solution saline tamponnée par phosphate (PBS) et maintenues dans un milieu frais.

5 Transfection et analyse :

La transfection dans des cellules MH-14 et H9 est réalisée à l'aide d'un réactif de transfection FuGENE 6 (Roche) et Lipofectamine 2000 (Invitrogen), respectivement, conformément aux instructions du fabricant. L'analyse est réalisée tel que décrit par K. Watashi, supra. Les plasmides
10 employés pour cette étude sont pNFAT-Luc, pAPI1-Luc, pNFkB-Luc (PathDetect Reporter System ; Stratagene), et pRL-TK (Dual-luciferase reporter assay system ; Promega).

Les effets de diverses cyclosporines selon l'invention sur la répllication du génome du VHC à l'aide de cellules MH-14, dans lesquelles le
15 réplicon sous-génomique VHC tel que représenté à la Fig. 1A est automatiquement répliqué. Le traitement avec la cyclosporine selon l'invention, p.ex. [Melle]⁴-cyclosporine, p.ex. selon un taux de 1 µg/ml, ainsi que les 100 U/ml de IFNα qui sont employés en tant que contrôle positif pendant 7 jours font diminuer la quantité de protéines NS5A et NS5B du VHC
20 à des taux qui sont indétectables à l'aide d'une analyse par immunotransfert. L'analyse par immunofluorescence indirecte indique que la production de protéines NS5A est réduite au sein de toutes les cellules traitées avec 1 µg/ml de cyclosporine selon l'invention, alors que le taux de protéine disulfure isomérase (PDI), qui est un marqueur du réticulum endoplasmique, en tant que
25 témoin interne, n'est pas altéré dans ces conditions. Dans cette analyse, les cyclosporines selon l'invention diminuent l'expression de la protéine du VHC dans les cellules réplicons du VHC.

L'ARN réplicon est analysé dans des cellules MH-14 traitées avec ou sans cyclosporine selon l'invention ou IFNα pendant 7 jours à l'aide de
30 l'analyse northern blot. Le traitement avec, p.ex. 1 µg/ml de cyclosporine selon l'invention, e.g. [Melle]⁴-cyclosporine, diminue la quantité d'ARN réplicons à un niveau indétectable. Le traitement avec 100 U/ml de IFNα produit un effet

similaire. De plus, le titre est graduellement diminué et le taux d'ARN du VHC est réduit à environ 1/400 du premier jour au 7^{ème} jour. Dans le cas d'un co-traitement avec IFN α , une réduction supplémentaire est constatée lors de analyse (3^{ème}, 5^{ème} et 7^{ème} jour) comparativement à un traitement unique
 5 réalisé soit à l'aide de cyclosporine soit à l'aide d'IFN α : les taux d'ARN répliquons dans les cellules MH-14 traitées à la fois avec de la cyclosporine ou de l'IFN α pendant 7 jours diminuent beaucoup plus fortement dans le cas de cellules traitées uniquement avec l'IFN α .

De plus, les cellules PH5CH8 (lignée cellulaire hépatocyte non-
 10 néoplasique) sont traitées avec un plasma positif au VHC et, par la suite, le titre du génome de l'ARN du VHC est quantifié, à différents moments faisant suite à l'inoculation, à l'aide de l'analyse RT-ACP en temps réel. Alors qu'au 5^{ème} jour suite à l'inoculation, le titre du génome de l'ARN du VHC dans les cellules augmente de près de 10 fois comparativement à celui du 1^{er} jour,
 15 aucune augmentation importante du titre du génome de l'ARN du VHC à ces moments n'a été pas observée dans les cellules traitées de façon continue avec une cyclosporine selon l'invention, p.ex. [Melle]⁴-cyclosporine, ou IFN α . Les cyclosporines selon l'invention inhibent la réplication des hépatocytes infectés par le VHC.

20 Les résultats sont repris aux Fig.2E, 2F et 2G : analyse par immunotransfert (2E), analyse par immunofluorescence indirecte (2F) et analyse RT-ACP en temps réel (2G) est réalisées à l'aide de cellules MH-14 avec une [Melle]⁴-Cyclosporine (■) ou une cyclosporine ne se liant pas à la cyclophiline (●), p.ex. 6-[acide[R-(E)]-6,7-Didéhydro-N,4-diméthyl-3-oxo-L-
 25 2-amino octanoïque]-7-L-valine-cyclosporine A. Contrôle dans 2E et 2F (1^{ère} rangée), pas de traitement ; CysA dans 2E, 1 μ g/ml ; [Melle]⁴-Cyclosporine dans 2E (■) et 2F (■), 1 μ g/ml ; la cyclosporine ne se liant pas à la cyclophiline dans 2E (●)et 2F (●), 1 μ g/ml.

30 B. Test clinique :

Un total de 15 patients souffrant d'infections par hépatite C chroniques sont sélectionnés pour une étude de 2 semaines. Chaque patient

reçoit une cyclosporine selon l'invention, p.ex. [Melle]⁴-Ciclosporine, selon des doses allant de 7 à 15 mg/kg p.o. Les taux dans le sérum des antigènes de l'hépatite C sont déterminés aux jours 0 et 14 pour chacun des patients.

Une personne souffrant d'une infection par hépatite C, tout particulièrement d'une infection au VHC chronique, peut présenter un ou plusieurs des symptômes suivants : (a) ALT élevée, (b) test positif des anticorps anti-VHC, (c) présence du VHC tel que démontré par un test positif pour VHC-ARN, (d) marques cliniques d'une maladie hépatique chronique, (e) lésion hépatocellulaire. Ces critères à eux seuls ne peuvent pas être employés pour diagnostiquer une hépatite C mais peuvent être employés pour évaluer la réponse d'un patient à un traitement médicamenteux.

Des taux élevés d'alanine aminotransférase (ALT) et d'aspartate aminotransférase (AST), dans le sérum, sont connus pour apparaître dans les cas d'hépatite C non contrôlée et une réponse complète au traitement est généralement définie comme étant la normalisation de ces enzymes du sérum, tout particulièrement l'ALT (Davis et al., 1989, *New Eng. J. Med.* 321:1501-1506). L'ALT est une enzyme qui est libérée lorsque les cellules hépatiques sont détruites et est un des symptômes d'une infection par VHC.

De façon à suivre le cours de la réplication du VHC chez des sujets répondant au traitement médicamenteux, l'ARN du VHC peut être mesuré dans des échantillons de sérum à l'aide, par exemple, d'une amplification en chaîne par polymérase imbriquée qui emploie deux ensembles d'amorces provenant des régions géniques non structurales N53 et N54 du génome du VHC. Farci et al., 1991, *New Eng. J. Med.* 325:98-104. Ulrich et al., 1990, *J. Clin. Invest.*, 86:1609-1614.

L'examen histologique des échantillons, provenant de biopsies du foie, peut être employé en tant que second critère d'évaluation. Voir, p.ex. Knodell et al., 1981, *Hepatology* 1:431-435, dont l'Index de l'Activité Histologique (inflammation portale, nécrose parcellaire, nécrose en pont, nécrose lobulaire et fibrose) procure une méthode de classification de l'activité de la maladie.

Les dosages journaliers nécessaires à la mise en pratique de la

présente invention varieront, par exemple, en fonction, de la cyclosporine non immunosuppressive se liant à la cyclophiline employée, de l'hôte, du mode d'administration, de la gravité de la condition à traiter. Un dosage journalier préféré est compris dans la gamme allant de 1 à 50 mg/kg par jour sous forme
5 d'un dosage unique ou sous une forme divisée. Les dosages journaliers adéquats convenant aux patients sont compris dans la gamme allant, p.ex. de 1 à 20 mg/kg p.o. ou i.v. Les formes de dosages convenant pour une administration par voie orale comprennent d'environ 0,25 à 10 mg/kg d'ingrédient actif, p.ex. [Melle]⁴-ciclosporine, de pair avec un ou plusieurs de
10 ses diluants ou véhicules pharmaceutiquement acceptables.

Les cyclosporines selon l'invention peuvent être administrées par l'intermédiaire de n'importe quelle voie d'administration conventionnelle, p.ex. par voie orale, par exemple, sous forme de solutions à boire, de comprimés ou de capsules ou, par voie parentérale, par exemple, sous forme de
15 solutions ou suspensions pour injection. Les compositions pharmaceutiques préférées peuvent être, p.ex. celles qui sont basées sur des microémulsions telles que celles décrites dans UK 2 222 770 A.

Les cyclosporines selon l'invention peuvent être administrées en tant qu'ingrédient actif unique ou de pair avec d'autres produits, p.ex. un
20 médicament qui possède des activités anti-VHC, p.ex. un interféron, p.ex. interféron- α -2a ou interféron- α -2b, p.ex. Intron^RA, Roferon^R, Avonex^R, Rebif^R ou Betaferon^R, or un interféron conjugué à de un polymère hydrosoluble ou à de l'albumine humaine, p.ex. albuféron, un agent anti-viral, p.ex. ribavirin, lamivudine, NV08 ou NM283, un inhibiteur de facteurs codant pour le VHC tel
25 que la protéase NS3/4A, l'hélicase ou la polymérase ARN ou un promédicament d'un tel inhibiteur, un agent anti-fibrotique, p.ex. un dérivé de N-phényl-2-pyrimidine-amine, p.ex. imatinib, un agent immunomodulateur, p.ex. l'acide mycophénolique, un de ses sels ou promédicaments, p.ex. mycophénolate de sodium ou mycophénolate de mofétil, ou un agoniste du
30 récepteur SIP, p.ex. FTY720 ou un de ses analogues éventuellement phosphorylés, p.ex. tel que décrit dans EP 627 406 A1, EP 778 263 A1, EP 1 002 792 A1, WO 02/18395, WO 02/76995, WO 02/06268, JP 2002316985,



WO 03/29184, WO 03/29205, WO 03/62252 et WO 03/62248.

Les conjugués d'interféron à un polymère hydrosoluble doivent être compris comme comprenant tout particulièrement les homopolymères d'oxyde de polyalkylène tels que les polyéthylèneglycol (PEG) ou les propylèneglycol, les polyols polyoxyéthylénés, leurs copolymères ainsi que leurs copolymères à blocs. En tant qu'alternative au polymères basés sur des oxyde de polyalkylène, il est possible d'employer des matériaux non-antigéniques tels que le dextran, les pyrrolidones de polyvinyle, les polyacrylamides, les alcools polyvinyliques, les polymères basés sur des carbohydrates et analogues. Ces conjugués interféron-polymère sont décrits dans les Brevets US Nos. 4 766 106, 4 917 888, la Demande de Brevet Européen No. 0 236 987, la Demande de Brevet Européen No. 0 510 356 et la Demande de Brevet International No. WO 95/13090. Etant donné que la modification polymérique réduit fortement les réponses antigéniques, l'interféron étranger ne doit pas être entièrement autologue. L'interféron employé pour préparer les conjugués de polymères peut être préparé à partir d'un extrait provenant d'un mammifère, tel qu'un interféron provenant d'un être humain, d'un ruminant ou d'un bovin, ou produite de façon recombinante. La préférence est donnée aux conjugués d'interféron – polyéthylèneglycol, également connus sous le nom d'interférons pégylés.

La préférence est tout particulièrement donnée aux conjugués d'interféron qui sont des alfa-interférons pégylés, par exemple, interféron- α -2a pégylé, interféron- α -2b pégylé ; à un interféron consensus pégylé ou à un interféron- α purifié pégylé. L'interféron- α -2a pégylé est décrit, p.ex. dans la Demande de Brevet Européen 593 868 et est commercialement disponibles, p.ex. sous le nom de marque PEGASYS[®] (Hoffmann-La Roche). L'interféron- α -2b pégylé est décrit, p.ex. dans la Demande de Brevet Européen 975 369 et est commercialement disponibles, p.ex. sous le nom de marque PEG-INTRON A[®] (Schering Plough). L'interféron consensus pégylé est décrit dans WO 96/11953. Les α -interférons pégylés préférés sont les interféron- α -2a pégylés et les interféron- α -2b pégylés. La préférence est également données à l'interféron consensus pégylé.

En ce qui concerne le co-agent, les dosages journaliers employés dépendront, bien sûr, du composé employé, de l'hôte, du mode d'administration et de la gravité de la maladie à traiter. Par exemple, la lamivudine peut être administrée selon un dosage journalier de 100 mg.

5 L'interféron pégylé peut être administré par voie parentérale une à trois fois par semaine, de préférence une fois par semaine, selon un dosage hebdomadaire total de 2 à 10 millions IU, plus particulièrement de 5 à 10 millions IU, de préférence, de 8 à 10 millions IU.

Conformément à l'état actuel des choses, la présente invention

10 prévoit, dans un autre de ses aspects :

4. Une composition pharmaceutique comprenant a) un premier agent qui est une cyclosporine non immunosuppressive se liant à la cyclophiline, p.ex. un composé de formule I, Ia ou II, et b) un co-agent, p.ex. un second produit tel que défini ci-dessus, p.ex. utilisable dans n'importe

15 laquelle des méthodes définies ci-dessus.

5. Une méthode telle que définie ci-dessus consistant à co-administrer, p.ex. de façon concomittante ou séquencée, une quantité thérapeutiquement efficace d'une cyclosporine non immunosuppressive se liant à la cyclophiline, p.ex. un composé de formule I, Ia ou II, et un


20 co-agent, p.ex. un second produit tel que défini ci-dessus.

Les termes « co-administration », « administration combinée » ou analogues, tels qu'employés par la présente doivent être compris comme incluant l'administration des agents thérapeutiques sélectionnés à un seul

25 patient, et doivent être compris comme incluant des régimes de traitement au cours desquels les agents ne sont pas nécessairement administrés par l'intermédiaire de la même voie d'administration ou en même temps.

L'administration d'une combinaison pharmaceutique selon l'invention résulte en un effet bénéfique, p.ex. un effet thérapeutique

30 synergique, comparativement à une monothérapie appliquant seulement un de ses ingrédients pharmaceutiquement actifs. Une combinaison synergique préférée consiste en une combinaison d'une cyclosporine non



immunosuppressive se liant à la cyclophiline avec un interféron, éventuellement conjuguée à un polymère.

5 Une autre combinaison préférée de l'invention consiste en une combinaison d'une cyclosporine non immunosuppressive se liant à la cyclophiline avec un acide mycophénolique ou un de ses sels ou produits, ou avec un agoniste du récepteur SIP, p.ex. FTY720.

[Melle]⁴-ciclosporine ou [MeVal]⁴-ciclosporine est une cyclosporine non immunosuppressive se liant à la cyclophiline utilisable dans le cadre de l'invention.



Y est MeLeu, thioMeLeu, γ -hydroxy-MeLeu, Melle, MeVal, MeThr, MeAla, Mealle ou MeaThr ; N-éthylVal, N-éthylIle, N-éthylThr, N-éthylPhe, N-éthylTyr ou N-éthylThr(Oacétyle) ;

Z est Val, Leu, MeVal ou MeLeu ;

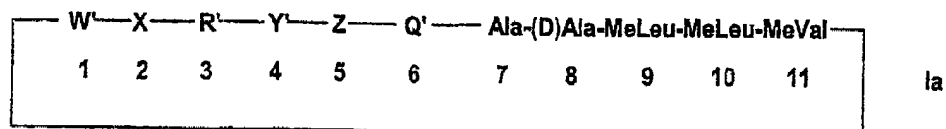
5 Q est MeLeu, γ -hydroxy-MeLeu, MeAla ou Pro ;

T₁ est (D)Ala ou Lys ;

T₂ est MeLeu ou γ -hydroxy-MeLeu ; et

T₃ est MeLeu ou MeAla ;

10 un composé de formule Ia



dans laquelle,

15 W' est MeBmt, dihydro-MeBmt, 8'-hydroxy-MeBmt ;

X est α Abu, Val, Thr, Nva ou 0-méthyl thréonine (MeOThr) ;

R' est Sar, (D)-MeSer, (D)-MeAla, ou (D)-MeSer(Oacétyle) ;

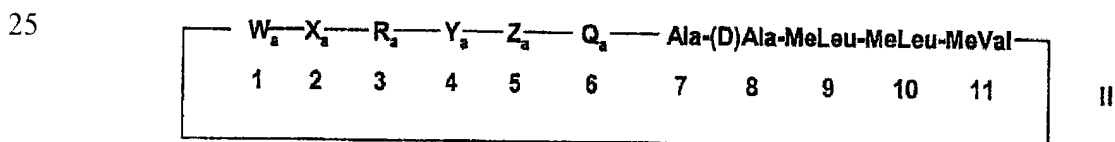
Y' est MeLeu, γ -hydroxy-MeLeu, Melle, MeVal, MeThr, MeAla, Mealle ou MeaThr ; N-éthylVal, N-éthylIle, N-éthylThr, N-

20 éthylPhe, N-éthylTyr ou N-éthylThr(Oacétyle) ;

Z est Val, Leu, MeVal ou MeLeu ; et

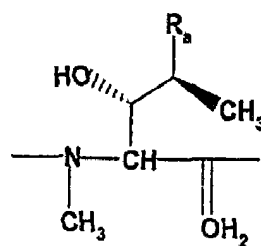
Q' est MeLeu, γ -hydroxy-MeLeu ou MeAla ;

ou un composé de formule II

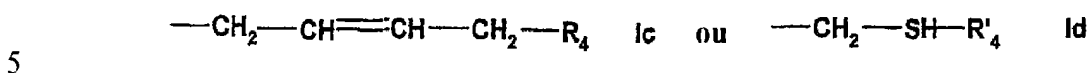


dans laquelle,

W_a est



dans laquelle R_a est un résidu de formule Ic ou Id



dans laquelle, R_4 est C_{1-4} alkylthio, amino C_{1-4} alkylthio, C_{1-4} alkylamino C_{1-4} alkylthio, di C_{1-4} alkylamino- C_{1-4} alkylthio, pyrimidinylthio, thiazolylthio, N- C_{1-4} alkylimidazolylthio, hydroxy C_{1-4} alkylphénylthio, hydroxy C_{1-4} alkylphénoxy, nitrophénylamino ou 2-oxopyrimidin-1-yle, et R'_4 est C_{1-4} alkyle,

10

X_a est Abu ;

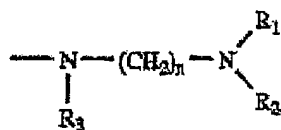
R_a est -NMe-CH(R_b)-CO- dans laquelle R_b est H ou -S-Alk- R_0 dans laquelle Alk- R_0 est méthyle ; ou Alk est C_{2-6} alkylène ou C_{3-6} cycloalkylène linéaire ou ramifié et R_0 est H ; OH ; COOH ; C_{2-5} alcoxy-carbonyle ; NR_1R_2 dans lequel chacun des R_1 et R_2 , indépendamment l'un de l'autre, est sélectionné à partir de H, C_{1-4} alkyle, C_{2-4} alkényle, C_{3-6} cycloalkyle et phényle, chacun étant éventuellement substitué par halogène, C_{1-4} alcoxy, C_{2-5} alcoxycarbonyle, amino, C_{1-4} alkylamino et/ou di C_{1-4} alkyl-amino, et benzyle et un radical hétérocyclique, lesdits benzyle et radical hétérocyclique étant saturés ou insaturés et contenant 5 ou 6 membres cycliques et de 1 à 3 hétéroatomes, ou R_1 et R_2 forment, de pair avec l'atome d'azote auquel ils sont attachés, un hétérocycle à 4 ou 6 ramifications pouvant contenir un autre hétéroatome sélectionné à partir d'azote, oxygène et soufre et qui est éventuellement substitué par C_{1-4} alkyle, phényle ou benzyle ; ou chacun des R_1 et R_2 , indépendamment l'un de l'autre, est un radical de formule Ib

15

20

25

(Ib)



5 dans laquelle, R₁ et R₂ sont tels que définis ci-dessus, R₃ est H ou C₁₋₄alkyle et n est un entier relatif compris dans la gamme allant de 2 à 4 ;

Y_a est MeLeu ou γ-hydroxy-MeLeu ;

Z_a est Val ; et

Q_a est MeLeu,

10 à condition que R_b ne soit pas H lorsque Y_a est MeLeu, ou un de ses sels pharmaceutiquement acceptables.

15 5. Composition pharmaceutique destinée à la prévention ou au traitement des infections par Hépatite C ou des troubles induits par le VHC comprenant une cyclosporine selon la revendication 1 de pair avec un ou plusieurs de ses diluants ou véhicules pharmaceutiquement acceptables.

20 6. Composition pharmaceutique comprenant a) un premier agent qui est une cyclosporine selon la revendication 1 et b) un co-agent possédant des propriétés anti-VHC.

25 7. Composition pharmaceutique utilisable pour la prévention ou le traitement des infections par Hépatite C ou des troubles induits par le VHC comprenant a) un premier agent qui est une cyclosporine selon la revendication 1 et b) un co-agent sélectionné à partir d'un agent possédant des propriétés anti-VHC, un agent anti-fibrotique, un agent immunomodulateur ou un agoniste récepteur de SIP.

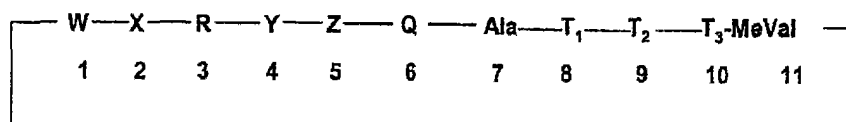
30 8. Méthode pour la prévention ou le traitement des infections par Hépatite C ou des troubles induits par le VHC chez un sujet le nécessitant ; ladite

méthode consistant à administrer audit sujet une quantité thérapeutiquement efficace d'une cyclosporine selon la revendication 1.

- 5 9. Méthode pour l'inhibition de la réplication du VHC dans un milieu ; ladite méthode consistant à appliquer à ce milieu une quantité efficace de cyclosporine selon la revendication 1.
- 10 10. Méthode pour l'inhibition de la réplication du VHC chez un patient le nécessitant ; ladite méthode consistant à administrer audit sujet une quantité thérapeutiquement efficace d'une cyclosporine selon la revendication 1.
- 15 11. Méthode pour la prévention de la récurrence d'une infection au VHC chez un receveur de greffe le nécessitant ; ladite méthode consistant à administrer audit receveur une quantité thérapeutiquement efficace d'une cyclosporine selon la revendication 1.
- 20 12. Méthode selon l'une quelconque des revendications 8 à 11 consistant à co-administrer de façon simultanée ou séquencée, une quantité thérapeutiquement efficace d'une cyclosporine telle que définie à la revendication 1 ainsi que d'un co-agent sélectionné à partir d'un agent possédant des propriétés anti-VHC, d'un agent anti-fibrotique, d'un agent immunomodulateur ou d'un agoniste récepteur de SIP.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'une cyclosporine dans la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à la prévention ou au traitement des infections par Hépatite C ou des troubles induits par le VHC, caractérisée en ce que le cyclosporine (i) se lie à la cyclophiline recombinante humaine selon un taux de liaison (TL) inférieur à 0,7, le TL étant le log en base 10 au niveau du taux de la valeur IC₅₀ de la cyclosporine par rapport à la valeur IC₅₀ trouvée lors d'un test simultané de la cyclosporine A tel que mesuré par le test compétitif ELISA ; et (ii) fait preuve d'une activité lors de la Réaction Lymphocytaire Mixte qui n'est pas supérieure de plus de 5% par rapport à celle de la cyclosporine A.
2. Utilisation d'une cyclosporine selon la revendication 1 dans la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à inhiber la réplication du VHC.
3. Utilisation d'une cyclosporine selon la revendication 1 dans la préparation d'une composition pharmaceutique destinée à prévenir la récurrence de l'infection au VHC chez un receveur de greffe.
4. Utilisation selon la revendication 1, 2 ou 3 caractérisée en ce que la cyclosporine est un composé de formule I



25

dans laquelle,

W est MeBmt, dihydro-MeBmt, 8'-hydroxy-MeBmt ou O-acétyl-MeBmt¹ ;

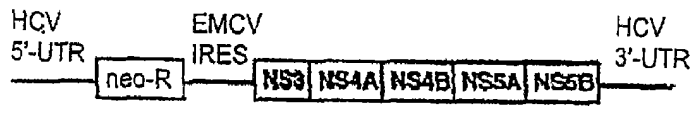
30

X est αAbu, Val, Thr, Nva ou 0-méthyl thréonine (Me0Thr) ;

R est Pro, Sar, (D)-MeSer, (D)-MeAla, ou (D)-MeSer(Oacétyle);

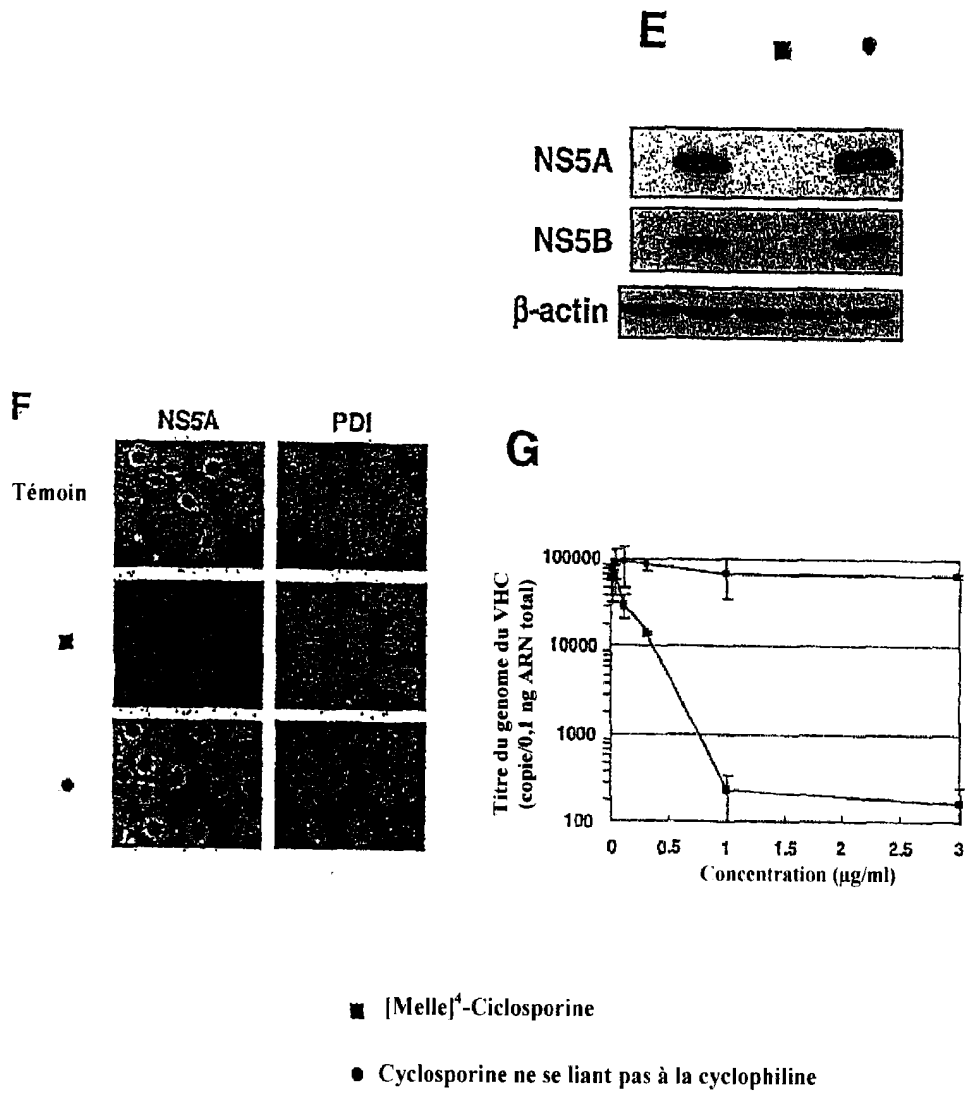
25/28865

FIGURE 1/2



A

FIGURE 2/2



B