

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

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
14 août 2008 (14.08.2008)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 2008/096081 A2

- (51) Classification internationale des brevets :  
A61K 31/428 (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2007/002186
- (22) Date de dépôt international :  
28 décembre 2007 (28.12.2007)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :  
FR 07 000 18 3 janvier 2007 (03.01.2007) FR
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :  
ASSOCIATION POUR LE DEVELOPPEMENT  
DE LA BIOTHERAPIE EXPERIMENTALE ET  
APPLIQUEE (A.D.B.E.A) [FR/FR]; 45, rue des  
Saints-Pères, F-75006 Paris (FR).
- (72) Inventeur; et
- (75) Inventeur/Déposant (pour US seulement) : ACHOUR,  
Ammar [FR/FR]; 14 bis, rue de Mayenne, F-94000 Creteil  
(FR).
- (74) Mandataires : PEAUCELLE, Chantal etc.; Cabinet Ar-  
mengaud Ainé, 3, avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR).
- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de  
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO,  
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,  
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG,  
ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL,  
IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW,  
MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL,  
PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY,  
TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,  
ZM, ZW.
- (84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de  
protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL,  
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,  
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publiée :  
— sans rapport de recherche internationale, sera republiée  
dès réception de ce rapport  
— avec la partie réservée au listage des séquences de la des-  
cription publiée séparément sous forme électronique et dis-  
ponible sur demande auprès du Bureau international



WO 2008/096081 A2

(54) Title: USE OF RILUZOLE AND DERIVATIVES THEREOF FOR PRODUCING NEW DRUGS

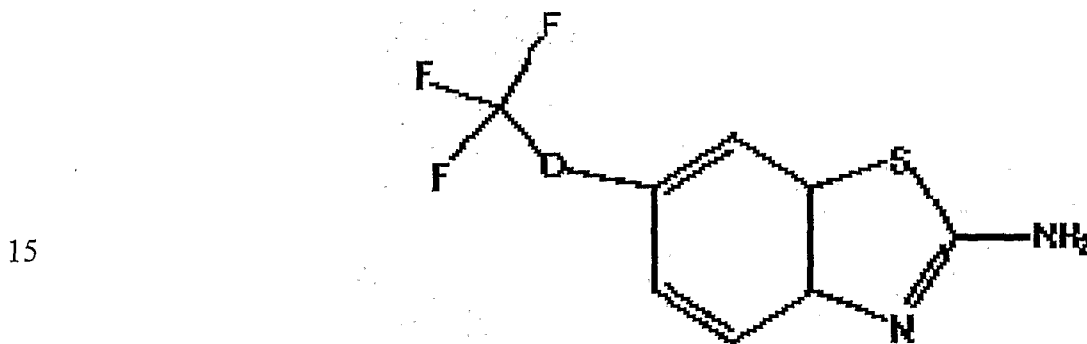
(54) Titre : UTILISATION DU RILUZOLE ET DE SES DÉRIVÉS POUR FABRIQUER DE NOUVEAUX MÉDICAMENTS

(57) Abstract: The present invention relates to the use of riluzole or pharmaceutically acceptable salts of riluzole in the production of drugs for restoring and amplifying the immune function in the treatment of infectious diseases and cancers.

(57) Abrégé : La présente invention a pour objet l'utilisation du riluzole ou de sels pharmaceutiquement acceptables du riluzole, pour la fabrication de médicaments pour rétablir et amplifier la fonction immunitaire pour le traitement de maladies infectieuses et de cancers.

## Utilisation du riluzole et de ses dérivés pour fabriquer de nouveaux médicaments

5 La présente invention a pour objet l'utilisation du riluzole et de ses dérivés, pour fabriquer de nouveaux médicaments permettant de rétablir et réguler des fonctions immunes perturbées chez des patients atteints de pathologies associées à de tels dysfonctionnements, comme les pathologies infectieuses ou les cancers. Le riluzole ou 6-(Trifluorométhoxy)-2-aminobenzothiazole répond à la  
10 formule (A)



Des activités thérapeutiques ont déjà été rapportées pour le riluzole et des sels de ce composé, par exemple des activités comme anticonvulsivants, anxyolytiques et hypnotiques (brevet EP 050551).

20 La demande WO 94/20103 décrit également leur utilisation pour le traitement du neurosida, des troubles démentiels, des troubles cognitifs, des neuropathies, de la myopathie, des troubles oculaires et de tous les symptômes neurologiques liés au virus HIV-1.

25 Les travaux des inventeurs sur ces composés ont permis de mettre en évidence que, de manière surprenante, le riluzole, ainsi que des dérivés de ce produit, étaient capables de rétablir la fonction immunitaire chez des patients souffrant de pathologies associées à des dérégulations de cette fonction. Comme le montrent les exemples donnés dans la demande, ces composés (ce terme, tel qu'utilisé dans la description et les revendications englobe le riluzole et ses dérivés)  
30 sont capables d'induire la prolifération de lymphocytes et/ ou d'assurer leur survie chez les patients atteints de telles pathologies et d'inhiber l'apoptose cellulaire induite par des infections.

Le riluzole est aussi capable d'induire l'expression de l'interféron  $\alpha/\beta$  et de l'interleukine 15, pour traiter un dysfonctionnement lié à une pathologie d'origine exogène ou endogène.

5 Il s'agit plus particulièrement d'une pathologie associée à une agression d'origine iatrogène, induite par l'action d'immunosuppresseurs tel que la cyclosporine ou par l'action des corticoïdes.

10 L'invention a donc pour but de fournir une nouvelle utilisation du riluzole ou de ses sels pharmaceutiquement acceptables pour la fabrication de médicaments pour rétablir la fonction immunitaire pour le traitement de maladies infectieuses ou de cancers.

15 Comme sels pharmaceutiquement acceptables, on citera les sels avec les acides minéraux tels que chlorhydrate, sulfate, nitrate, phosphate ou organiques tels que acétate, propionate, succinate, citrate, oxalate, benzoate, fumarate, maléate, méthanesulfonate, iséthionate, théophylline-acétate, salicylate, phénolphtalinate, méthylène-bis- $\beta$ -oxynaphtoate ou des dérivés de substitution de ces acides.

Les médicaments fabriqués conformément à l'invention peuvent être utilisés *in vivo*, ou *ex vivo*, ou encore, dans le cadre d'essais, *in vitro*.

20 Ils se présentent le plus généralement sous des formes pour l'administration par voie orale, parentérale, par exemple intraveineuse, ou topique, ou encore rectale, notamment sous forme de suppositoires.

25 Comme compositions solides pour une administration par voie orale, ces médicaments peuvent être utilisés sous forme de comprimés, pilules, poudres (capsules de gélatine, cachets) ou granulés. Dans ces compositions, le principe actif selon l'invention est mélangé à un ou plusieurs diluants inertes tels que amidon, cellulose, saccharose, lactose ou silice, sous courant d'argon. Ces compositions peuvent également comprendre des substances autres que les diluants, par exemple un ou plusieurs lubrifiants tels que le stéarate de magnésium ou le talc, un colorant, un enrobage (dragées) ou un vernis.

30 Des compositions sous forme liquide comprennent des solutions, des suspensions, des émulsions, des sirops et des élixirs pharmaceutiquement acceptables contenant des diluants inertes tels que l'eau, l'éthanol, le glycérol, les huiles végétales ou l'huile de paraffine. Ces compositions peuvent comprendre des

substances autres que les diluants, par exemple des produits mouillants, édulcorants, épaississants, aromatisants ou stabilisants.

Ces compositions utilisées sous forme de gouttes ou de nébulisats.

Les compositions stériles pour administration parentérale, peuvent être de  
5 préférence des solutions aqueuses ou non aqueuses, des suspensions ou des émulsions. Comme solvant ou véhicule, on citera l'eau, le propyléneglycol, un polyéthylène-glycol, des huiles végétales, en particulier l'huile d'olive, des esters organiques injectables, par exemple l'oléate d'éthyle ou d'autres solvants organiques convenables. Ces compositions peuvent également contenir des adjuvants, en  
10 particulier des agents mouillants, isotonisants, émulsifiants, dispersants et stabilisants. La stérilisation peut se faire de plusieurs façons, par exemple par filtration aseptisante, en incorporant à la composition des agents stérilisants, par irradiation ou par chauffage. Elles peuvent également être préparées sous forme de compositions solides stériles qui peuvent être dissoutes au moment de l'emploi dans  
15 de l'eau stérile ou tout autre milieu stérile injectable.

Pour l'administration par voie topique, les médicaments seront avantageusement sous forme de pommades, crèmes, gels ou de patchs.

Les médicaments ci-dessus renferment avantageusement, en tant que principe actif, de 25 à 100 mg de riluzole ou d'un sel pharmaceutiquement  
20 acceptable de ce dérivé, ces composés étant utilisés seuls ou en association, dans un traitement donné avec d'autres médicaments.

L'utilisation du riluzole ou de ses sels, comme défini plus haut, permet de disposer de médicaments de grande valeur pour le traitement des affections résultant ou à l'origine des dysfonctionnements entraînant la mort cellulaire ou  
25 associées à de tels dérèglements, ainsi que pour toute situation pathologique provoquée par des médicaments, des cancers ou des radiations, ou physiologiques, tel que le grand âge et, de manière générale, toutes les situations dans lesquelles la survie et le fonctionnement des cellules immunitaires sont altérées ou nécessitent d'être rétablis.

30 On citera notamment le traitement

- de pathologie liées à une agression virale, notamment le traitement des infections virales ou rétrovirales et de leurs symptômes virologiques et immunitaires, induits, par exemple, par le VIH de type 1 ou 2, y compris les infections opportunistes et concernant le fonctionnement des lymphocytes et la régulation du

système immunitaire, ou encore par les virus des hépatites A, B, C, ou par les herpès, ou HTLV I ou II,

- d'agression parasitaire, telle que la leishmaniose, la malaria ou la bilharziose,
- de l'ischémie/reperfusion et de la production de radicaux libres,

5 - d'agression d'origine iatrogène, par exemple induite par l'action d'immunodépresseurs tels que la cyclosporine ou par l'action des corticoïdes.

- d'agression d'origine tumorale, telle que qu'une tumeur hématologique comme le myélome, ou tissulaire.

10 - des pathologies liées à une agression qui est une maladie auto-immune, comme le diabète ou les thyroïdites.

Les médicaments de l'invention présentent aussi un grand intérêt dans le cas des greffes allogéniques de foie.

De manière avantageuse, les médicaments fabriqués conformément à l'invention sont capables d'induire la production des interférons  $\alpha/\beta$  et de l'IL-15.

15 Les doses utilisées dans ces traitements dépendent de l'effet recherché, de la durée du traitement et de la voie d'administration utilisée. Elles seront généralement comprises entre 50 et 200 mg par jour *par voie orale* pour un adulte avec des doses unitaires allant de 25 à 100 mg de substance active.

20 D'une façon générale, la posologie sera déterminée en fonction de l'âge, du poids et de tous les autres facteurs propres au sujet à traiter.

Les formes galéniques de cette composition comprennent en pratique par dose unitaire ou multiple de doses unitaires une quantité de substance active ou de mélange de substances actives correspondant à une concentration en substance active ou mélange de substances actives d'environ 1 à 100 nM pour un test *in vitro*.

25 L'homme du métier ajustera ces quantités au cas par cas et/ou selon les affections ou états physiologiques pour lesquels on désire une augmentation ou tendance à la restauration de la prolifération et du fonctionnement cellulaires.

30 Ces doses peuvent, selon la voie d'administration employée, l'état du patient et la substance active utilisée, varier dans le temps et être administrées suivant une posologie comprenant une administration en une seule ou plusieurs fois par jour, par semaine ou par mois. Ainsi une dose quotidienne telle que mentionnée ci-dessus peut être elle-même remplacée par une quelconque autre chronologie et/ou dose d'administration de la substance active (administration hebdomadaire ou mensuelle, notamment) dans la mesure où la galénique du principe actif ainsi administré procure

un effet pharmacologique sensiblement similaire à celui obtenu avec une administration quotidienne.

Les compositions actives peuvent être administrées conjointement avec un support ou vecteur ou un diluant physiologiquement acceptable pour former ainsi une composition pharmacologique complète prête à l'emploi.

Dans le cas de l'infection par VIH, des travaux ont rapporté que des lymphocytes T CD4+ infectés sont capables de remettre en marche une machinerie virale qui n'était qu'en sommeil. La présence du provirus dans les lymphocytes mémoires CD4+ a ainsi été décelée. Ces cellules, après avoir répliqué activement le virus, sont retrouvées à l'état de latence. La même observation a été faite chez des patients traités par la trithérapie et sans virus plasmatique décelable depuis deux à trente mois. Quelle que soit la durée de leur traitement, tous présentent des virus ré-activables dans leurs lymphocytes quiescents. Ces virus sont en effet restés quiescents, témoins de l'existence de réservoirs de virus par persistance de provirus dans des populations de lymphocytes infectés, mais sans aucune activité répliquative.

Ce réservoir se constitue très tôt au cours de l'infection, vraisemblablement à la phase initiale de la primo-infection, et sa taille reste stable au cours de l'infection. On sait, maintenant que le traitement précoce de la primo-infection ne prévient pas la constitution du réservoir, mais réduit peut être sa taille. La taille du réservoir restant globalement stable, il se trouve vraisemblablement réalimenté en permanence par un faible taux de réplication virale. Il a été montré qu'une réplication virale active se poursuit dans les cellules réservoirs dans le temps. L'activation chronique ainsi que la mort cellulaire des lymphocytes sont donc deux composantes essentielles du SIDA. En effet, l'activation des cellules T est un facteur aggravant dans la progression de la maladie favorisant ainsi la réplication virale. Ainsi, l'action combinée d'une mortalité excessive des cellules T hyperstimulées, mais non infectées et d'une régénération déficiente en lymphocytes CD4 semble pouvoir expliquer le déficit quantitatif en lymphocytes T CD4+.

On mesurera alors l'intérêt des médicaments fabriqués conformément à l'invention, qui constituent une nouvelle voie de traitement.

L'activité du riluzole dans le SIDA a été mis en évidence dans le test de la mesure de la survie cellulaire, de l'apoptose, du typage des lymphocytes et de la production virale des lymphocytes de patients SIDA cultivés *in vitro*.

Comme indiqué plus haut, les médicaments définis ci-dessus sont utilisés seuls ou en association avec d'autres principes actifs pour un traitement donné.

Pour le traitement d'une pathologie liée à une agression virale (ou rétrovirale) on utilisera avantageusement une association avec un ou plusieurs composés à propriétés anti-virales. Dans le cas du traitement du SIDA, Il peut s'agir par exemple de composés à propriétés antivirales, comme le DDI, le DDC, les antiprotéases, le 3TC et l'AZT, ou encore l'interféron  $\alpha$ , l'interféron  $\alpha$  PEG, la ribavirine.

Les médicaments de l'invention seront avantageusement utilisés en alternance avec les antiviraux afin de permettre une pause due à leur toxicité, ou en bien leur présence afin d'éradiquer l'infection.

Pour le traitement d'une pathologie liée à une agression virale caractéristique de l'Herpès, on associera avec avantage, au traitement par les médicaments de l'invention, un composé antiviral comme par exemple l'acyclovir.

Pour le traitement des cancers, on mettra avantageusement à profit l'induction de l'expression de l'interféron  $\alpha/\beta$  à capacité immunomodulatrice et la capacité à inhiber la prolifération des cellules tumorales.

L'invention est décrite plus en détail dans les exemples qui suivent, donnés à titre illustratif, sans en limiter sa portée. Dans ces exemples, il est fait référence aux figures 1 à 9, qui représentent, respectivement, l'effet du riluzole

- Les figures 1A à 1C et les figures 2A à 2C, sur les lymphocytes de patients atteint du SIDA ;
- Les figures 3A à 3C, sur les lymphocytes d'un patient atteint du SIDA ;
- Les figures 4A et 4B, sur les lymphocytes d'un individu sain séronégatif ;
- Les figures 5A à 5C, sur l'apoptose totale exprimée par l'ensemble des lymphocytes, des lymphocytes CD8 et des lymphocytes CD4 ;
- La figure 6, sur l'expression de l'antigène Ki-67 ;
- La figure 7, sur l'apoptose induite par l'anticorps anti-FAS ;
- La figure 8, sur l'expression des gènes de cytokines ; et
- La figure 9, sur la prolifération des cellules tumorales.

Sauf mention contraire, les posologies du principe actif sont rapportées au volume en litres du plasma sanguin du patient.

Exemple A

On prépare, selon la technique habituelle, des comprimés dosés à 50 mg de produit actif ayant la composition suivante :

- Riluzole.....50 mg
- 5 - Mannitol.....64 mg
- Cellulose microcristalline.....50 mg
- Polyvidone, excipient .....12 mg
- Carboxyméthylamidon sodique.....16 mg
- Talc.....4 mg
- 10 - Stéarate de magnésium.....2 mg
- Silice colloïdale anhydre.....2 mg
- Mélange de méthylhydroxypropylcellulose,
- Polyéthylèneglycol 6000, dioxyde de titane (72-3,5-24,5)
- q.s.p. 1 comprimé pelliculé terminé à 245 mg

15 Exemple B

On prépare, selon la technique habituelle, des gélules dosées à 50 mg de produit actif ayant la composition suivante :

- Riluzole.....50 mg
- Cellulose.....18 mg
- 20 - Lactose.....55 mg
- Silice colloïdale.....1 mg
- Carboxyméthylamidon sodique.....10 mg
- Talc.....10 mg
- Stéarate de magnésium.....1 mg

25 Exemple C

On prépare une solution injectable contenant 10 mg de produit actif ayant la composition suivante :

- Riluzole.....10 mg
- Acide benzoïque.....80 mg
- 30 - Alcool benzylique.....0.06 cm<sup>3</sup>
- Benzoate de sodium.....80 mg
- Ethanol à 95%.....0.4 cm<sup>3</sup>
- Hydroxyde de sodium.....24 mg
- Propylène glycol.....1.6 cm<sup>3</sup>

- Eau.....q.s.p. 4 cm<sup>3</sup>

## METHODES

Purification et culture des cellules mononucléaires du sang périphérique  
5 (désignées ci-après par PBMC pour Peripheral Blood Mononuclear Cells)

Les cultures de lymphocytes sont préparées selon la méthode décrite par Achour et al., *Antimicrob. Agents. Chemother*42, 2482-2491 (1998).

Les PBMC ont été isolées à partir de sang complet frais, traité au citrate, de donneurs respectivement sains et infectés par le VIH-1, par centrifugation à gradient  
10 de densité au moyen d'un dispositif dénommé Ficoll-Hypaque (Eurobio, Les Ullis, France). Les cellules récoltées ont été remises en suspension à raison de 10<sup>6</sup>/ml dans un milieu de culture RPMI 1640 contenant 10% de sérum humain AB décomplémenté, des acides aminés non-essentiels, 10 U/ml de pénicilline (Sigma), 100 µg/ml de streptomycine (Sigma), 2mM de L-glutamine (Sigma), 1mM de  
15 pyruvate de sodium (Sigma), 10mM de tampon HEPES, plus 20 UI/ml d'interleukine 2 (Boehringer Mannheim, Allemagne); ce milieu constitue le milieu de culture complet, soit en abrégé MC. Les cellules ont ensuite étéensemencées à raison de 4x10<sup>6</sup>/puits dans des plaques de culture de 6 puits (Nunc, Roskilde, Danemark) et ont été stimulées avec 100ng/ml d'anticorps monoclonal anti-CD3 (Pharmingen, Los  
20 Angeles, CA, USA), plus 100 ng/ml d'anticorps monoclonal anti-CD28 (Pharmingen, Los Angeles, CA, USA) en l'absence ou en présence de différentes concentrations de riluzole (10<sup>-4</sup>/10<sup>-10</sup>M). Les cultures ont été maintenues à 37°C dans de l'air humidifié renfermant du CO<sub>2</sub>. Les milieux de culture ont été changés tous les 4-5 jours, les cultures étant maintenues à une densité constante de cellules viables de  
25 1x10<sup>6</sup> cellules/ml. A chaque passage, des comptages de cellules viables ont été effectués par coloration au bleu trypan, et les surnageants ont été récoltés pour conservation à -20°C.

### Test d'apoptose

30 Les cellules apoptotiques ont été mesurées au moyen d'iodure de propidium et d'annexine V marquée au FITC, qui est une protéine de liaison aux phospholipides se fixant préférentiellement à la phosphatidylsérine exposée à la surface des cellules dans la phase initiale de l'apoptose, au moyen d'un kit disponible dans le commerce (Immunotech, Marseille, France). Les cellules qui étaient négatives à l'iodure de

propidium et positives à l'annexine V ont été identifiées comme étant des cellules apoptotiques, tandis que celles qui étaient positives aussi bien à l'iodure de propidium qu'à l'annexine V ont été considérées comme étant des cellules pré-nécrotiques. On a mesuré aussi l'apoptose provoquée par l'anticorps monoclonal anti-FAS (CD95/APO-1) (Immunotech, Marseille, France) dans la mesure où il est bien connu que l'apoptose Fas/Fas ligand est amplifiée dans la maladie du SIDA).

#### Cytométrie de flux

Des comptages de cellules T de phénotypes CD4+ et de CD8+, du marqueur d'activation Ki-67 ainsi que de l'annexine V ont été effectués par analyse par cytométrie de flux (FACScan, Becton Dickenson, San José, CA, USA). On a utilisé une série d'anticorps monoclonaux dirigés contre les marqueurs de surface suivants de cellules T : CD4-PerCP, CD8-PE (Becton Dickinson, France), Ki-67-FITC (Pharmingen, Los Angeles, CA, USA), Annexine-FITC (Immunotech, Marseille, France).

#### Test de quantification virale

La production virale a été déterminée par mesure de l'ARN du VIH dans les surnageants exempts de cellules par un test d'amplification avec chevauchement induit par des amorces multiples avec un seuil de détection de 10 équivalents copies/ml (Lu et al. Nat. Med., 1999). Les amorces utilisées sont les suivantes ; F1/R1 (F1, nucléotides sens 1,359-1,387 de VIH-1 séquence de HXB2 accession GenBank N°K03455,

SEQ ID N°1 : 5'-GTGGGGGGACATCAA-GCAGCCATGCAAAT-3'

nucléotides antisens 1,630-1,659 de HXB2,

SEQ ID N°2 : 5'CCTTTGGTCCTTGTCTTATGTCCAG-AATGC-3')

L'ARN a été extrait à partir de 100µl des surnageants de culture en employant une solution commerciale d'isolement d'ARN (RNAzol ; WAK-Chemie Medical, Bad Hamburg, Allemagne), puis amplifié par RT-PCR à l'aide d'amorces du gag du VIH-1 (Lu et al. Nat. Med., 1999). Les produits amplifiés ont ensuite été détectés en employant une technique en phase solide.

En bref, 10µl des produits amplifiés ont été détectés, dénaturés pendant 15 minutes (EDTA 0.4 M/NaOH, 2 mM), puis capturés sur une microplaque revêtue de streptavidine contenant une sonde spécifique biotynylée et le tampon d'hybridation.

L'hybridation à 37°C pendant 30 minutes a été suivie du lavage avec le tampon de lavage (PBS/0.3% Tween 20). L'hybride ADN-ADN formé a été détecté par addition d'un anticorps monoclonal de souris anti-ADN double brin, puis d'un second anticorps dirigé contre le premier, obtenu chez la chèvre et marqué à la phosphatase alcaline. Après ajout du substrat (p-Nitrophényl phosphate, pNPP), la densité optique a été mesurée à 405/450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (Dynatech MRX). La densité optique des échantillons est directement corrélée au nombre de séquences VIH-1 spécifiquement amplifiés dans l'échantillon. La charge virale est ainsi calculée au moyen de la courbe de calibrage standard qui suit un mode de régression log-log.

L'ADN proviral a été déterminé par un test Muprovama modifié. A cet effet,  $2 \times 10^5$  cellules ont été utilisées pour purification d'ADN cellulaire avec un kit de commerce (QIAmp® DNA minikit, Quiagen GmbH, Hilden, Allemagne). Quatre dilutions standard (10, 100, 1000 et 10.000 copies) dans un équivalent de  $10^5$  cellules d'ADN de PBMC de donneur négatif vis-à-vis du VIH, d'ADN de VIH-1 du plasmide (pBH10-R3) ont été utilisés comme standard externe dans chaque expérience. Un équivalent de  $10^5$  cellules d'ADN échantillon purifié et 4 ADN standards ont été utilisés pour une amplification spécifique du VIH par le test Muprovama, tandis qu'un équivalent de  $10^2$  cellules de chaque ADN échantillon purifié ou d'ADN standard avaient été purifié en parallèle pour le calibrage de l'ADN génomique avec une paire d'amorces de la séquence génomique de la  $\beta$ -actine, (numéro d'accès à la base de gènes Genbank M10277 : 2.280-2.301, sens et 2.606-2.538, antisens). Après amplification,  $10 \mu\text{l}$  de produit de réaction de VIH ou de  $\beta$ -actine de chaque échantillon ont été répartis dans les 96 puits d'une plaque de microtitrage revêtue de streptavidine pré-incubée avec une sonde marquée à la biotine spécifique pour le VIH-1 ou pour la  $\beta$ -actine. Un test Elisa couplé à une hybridation a été réalisé. Le signal optique de chaque puits d'hybride de VIH a été corrigé automatiquement de la différence entre le signal du puits d'hybride de la  $\beta$ -actine correspondant et la moyenne des signaux de  $\beta$ -actine de l'ADN standard avec un logiciel (Dynex, Chantilly, USA). La charge d'ADN proviral a été calculée au moyen de la courbe de calibrage standard (modèle de régression log-log dans l'intervalle de 1 à  $10^5$  copies d'ADN de VIH-1 pour  $10^6$  cellules) générée à partir de signaux de quatre dilutions du standard externe d'ADN de VIH-1.

Détection des cytokines par PCR en temps réel

Par PCR en temps réel, 2 µg d'ARN totaux sont d'abord rétro-transcrits à l'aide d'un kit (*Hight capacity cDNA Archive kit PN : 4322171, Applied Biosystems, Foster City, CA*) utilisant les amorces au hasard et la MultiScribe RT enzyme (5U/µL) pendant 2 heures à 37°C. La méthode de marquage avec SYBR Green, une molécule fluorescente qui s'intercale dans le petit sillon de la double hélice a été utilisée. La réaction est réalisée grâce à un thermocycler (*ABI prism 7900 HT, Applied Biosystems, Foster City, CA*). Chaque point étudié était composé de 5 µL de SYBR Green PCR Master Mix (*PN : 4344463 ; Applied Biosystems, Foster City, CA*), 0,3 µL d'amorce sens et anti-sens à la concentration de 10 µM (Proligo), 3,4 µL d'eau dépourvue de Rnase et 1 µL d'ADNc. Après une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 min, l'amplification est effectuée après 40 cycles à 95°C pendant 15 s, 60°C pendant 30 s et 72°C pendant 30 s. En fin de PCR, une étape de dissociation correspondant au pic d'amplification, ayant lieu en un cycle de 95°C pendant 15 s, 60°C pendant 15 s, et 95°C pendant 15 s, vérifie la validité des amorces. Les amorces de tous les gènes étudiés ont été choisies suivant les conditions d'amplification du logiciel *Oligo Explorer 1.1*. Les échantillons ont été étudiés en double réplique en présence d'un témoin négatif composé de Master Mix et les amorces, mais sans l'ADNc. La glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase (GAPDH) a été utilisée comme gène contrôle endogène.

L'effet des traitements sur les taux d'ARNm d'intérêt est étudié en utilisant la méthode de comparaison des CT (Peinnequin et al., 2004) ou nombre de cycles nécessaires pour atteindre une valeur seuil de fluorescence (*logiciel SDS 2.1, AB prism*).

Les séquences des amorces utilisées sont les suivantes (Proligo LLC, Boulder, CO, USA) (forward-reverse):

SEQ ID N°3 et SEQ ID N°15 :

GAPDH (5'-AACAGCCTCAAGATCAGCAA-3')-(5'-CAGTCTGGGTGGCAGTGAT-3')

30 SEQ ID N°4 et SEQ ID N°16 :

TLR-2 (5'-CTCTCGGTGTCGGAATGTC-3')-(5'-AGGGGGGATTGAAGTTCTC-3')

SEQ ID N°5 et SEQ ID N°17:

TLR-3 (5'-ACGAGACCCATACCAACATCC-3')-(5'-TTCCCAGACCCAATCCTTATC-3')

SEQ ID N°6 et SEQ ID N°18 :

TLR-7 (5'-GACCTCAGCCACAACCAAC-3')-(5'-TAACCCACCAGACAAACCAC-3')

SEQ ID N°7 et SEQ ID N°19 :

TLR-9 (5'-CTACAACCGCATCGTCAAAC-3')-(5'-CATTTCAGCCAGGAGAGAGAAC-3')

SEQ ID N°8 et SEQ ID N°20:

5 IFN- $\alpha$  (5'-ACTTTGGATTTCCCCAGGA-3')-(5'-CAGGCACAAGGGCTGTATT-3')

SEQ ID N°9 et SEQ ID N°21:

IFN- $\beta$ (5'-ATCTAGCACTGGCTGGAATGAG-3')-(5'-TTCGGAGGTAACCTGTAAGTCTG-3')

SEQ ID N°10 et SEQ ID N°22 :

IFN- $\gamma$  (5'-GGGTTCTCTTGGCTGTTACTG-3')-(5'-GCATCTGACTCCTTTTTTCGC-3')

10 SEQ ID N°11 et SEQ ID N°23 :

IL-10(5'-GCTGGAGGACTTTAAGGGTTACCT-3')-(5'CTTGATGTCTGGGTCTTGGTTCT-3')

SEQ ID N°12 et SEQ ID N°24 :

IL-12P40 (5'-TGGAGTGCCAGGAGGACAGT-3')-(5'-TCTTGGGTGGGTCAGGTTTG-3')

SEQ ID N°13 et SEQ ID N°25 :

15 IL-15(5'-CCATCCAGTGCTACTTGTGTTTAC-3')-(5'CCAGTTGGCTTCTGTTTTAGGAA-3')

SEQ ID N°14 et SEQ ID N°26 :

IL-18 (5'-GACGCATGCCCTCAATCC-3')-(5'-CTAGAGCGCAATGGTGCAATC-3')

#### Mesure de l'activité fonctionnelle de l'interféron

20 Le test fonctionnel est évalué par sa capacité à inhiber le pouvoir cytolytique du virus de la stomatite vésiculeuse (VSV) vis à vis des cellules MDBK.

#### Mesure de la production de l'Interleukine-15 .

25 La production de l'IL-15 dans le surnageant des cellules conditionnées par le riluzole est estimée par le test immuno-enzymatique ELISA (R&D, Quantikine, U.K).

#### Mesure de l'inhibition de la prolifération des cellules tumorales.

30 La lignée TG 180 (Tumeur du sarcome de Crocker) est cultivée en présence de différentes concentrations de Riluzole. Au bout de 5 jours la prolifération des cellules est estimée par l'incorporation de thymidine tritiée ( $^3\text{H}$ ).D'autres lignées tumorales ont été utilisées à savoir la lignée H9 (lymphomeT), la lignée NB4 (lignée dérivée d'une leucémie aiguë promyélocytaire) et la lignée Jurkat (lignée de cellules T lymphoblastiques issues de lymphome T).

## RESULTATS

### Survie accrue des cellules T sous l'effet du riluzole :

Le pourcentage de la survie cellulaire au jour du passage des cultures est estimé de la façon suivante :

5

$$\frac{\text{Nombre de cellules viables du jour} - \text{Nombre de cellules du jour 0}}{\text{Nombre de cellules du jour 0}} \times 100\%$$

10 L'effet du riluzole a d'abord été étudié sur les lymphocytes de 2 patients atteints du SIDA.

Le patient PE n'avait suivi aucune thérapie et possédait les paramètres suivants (T4:467/mm<sup>3</sup>, T8:1662/mm<sup>3</sup>, charge virale:60824 copies/ml de plasma). La survie des cellules, au jour 13 de la culture, a été augmentée de 216% par rapport aux cellules contrôles à la dose de 10<sup>-6</sup>M, et de 378% à la dose de 10<sup>-7</sup>M (Figure 15 1A).

Le patient PR suivait une trithérapie et possédait les paramètres suivants (T4:880/mm<sup>3</sup>, T8:1280/mm<sup>3</sup>, charge virale:250 copies/ml de plasma). La survie des cellules, au jour 13 de la culture, a été augmentée de 169% par rapport aux cellules contrôles à la dose de 10<sup>-6</sup>M, et de 202% à la dose de 10<sup>-7</sup>M (Figure 2A).

20 L'effet dose du riluzole a ensuite été étudiée sur les lymphocytes d'un patient SIDA AR ne suivant aucune thérapie et possédant les paramètres suivants (CD4 :291/mm<sup>3</sup> (17%), CD8 : 872/mm<sup>3</sup> (51%), Virus:43576 copies/ml de plasma). La survie des cellules, au jour 13 de la culture, a été augmentée de 670% par rapport aux cellules contrôles à la dose de 10<sup>-8</sup>M, de 407% à la dose de 10<sup>-7</sup>M et de 230% à la dose de 10<sup>-6</sup>M (Figure 3A). Comme contrôle, l'effet dose du riluzole a aussi été étudié sur les lymphocytes d'un individu sain séronégatif. La survie des cellules, au jour 13 de la culture, a été augmentée de 271% par rapport aux cellules témoins à la dose de 10<sup>-8</sup>M, de 228% à la dose de 10<sup>-7</sup>M et de 157% à la dose de 10<sup>-6</sup>M (Figure 4A).

30

### Effet du riluzole sur la mort cellulaire des lymphocytes en culture :

Par ailleurs on peut constater dans les figures 1B, 2B, 3B, ci-après, que par exemple dans le cas des cellules traitées par le riluzole, le pourcentage des cellules mortes dans la culture se maintient aux alentours de 2 à 10%, alors qu'il varie de 10

à 25%, dès le 3<sup>ème</sup> jour de la culture. Comme témoins, les lymphocytes d'un individu sain cultivés en présence ou en l'absence de riluzole ne manifestent pas un effet spécifique sur la mortalité (Figure 4B).

5 La présence du riluzole dans le milieu de culture protège donc les cellules mononucléaires de la mort cellulaire induite par le VIH-1 et permet une prolifération des lymphocytes.

#### Régulation négative de l'apoptose et de l'expression de Ki-67 des lymphocytes par le riluzole

10 L'apoptose des cellules T et l'expression de ki-67 (qui est un marqueur de la prolifération des cellules T) ont été également régulées après 13 jours en présence de riluzole. En effet, dans la fenêtre de concentration de la drogue ( $10^{-7}$ - $10^{-8}$  M) le riluzole inhibe de 66% de l'apoptose totale exprimée par l'ensemble des lymphocytes, de 70% de l'apoptose des lymphocytes CD8 et de 80% des  
15 lymphocytes CD4 (Figure 5A, 5B, 5C), alors que l'apoptose qui est exprimée faiblement par les lymphocytes d'un donneur sain n'est pas changée par le traitement au riluzole (Figure 4C).

L'étude de l'expression de l'antigène Ki-67 (qui est un marqueur des cellules T compétent vis-à-vis de la prolifération) montre qu'il est régulé négativement. Cet effet  
20 se caractérise par une inhibition de l'ordre de 33% par l'ensemble des lymphocytes, de 37% par les lymphocytes CD8 et de 50% par les lymphocytes CD4 (Figure 6A, 6B, 6C). Ces résultats reflètent la récupération des cellules T après l'achèvement de leur cycle de prolifération cellulaire.

#### 25 Régulation négative de l'apoptose FAS/FAS ligand par le riluzole :

Comme indiqué ci-dessus, il est bien établi que les lymphocytes de patients infectés par le VIH-1 sont sensibles à l'apoptose induite par l'expression de FAS (CD95/APO-1) et de son agoniste l'anticorps anti-FAS. Aussi, on a entrepris de faire agir cet anticorps sur les lymphocytes du patient AR en l'absence ou en présence de  
30 riluzole et de mesurer l'apoptose par l'expression de l'annexine V. Les résultats de la Figure 7 indiquent que l'apoptose des cellules témoins couplées à l'anticorps atteint le seuil de 50% d'expression, alors que les cellules conditionnées par le riluzole à la dose de  $10^{-8}$ M ne l'expriment qu'à 15% (62% d'inhibition). Ce

pourcentage d'inhibition est comparable pour les cellules cultivées sans anticorps anti-FAS.

#### Effet du riluzole sur la réplication du VIH-1 :

5 Ayant ainsi observé le rétablissement de l'activité proliférative des cellules T de patients infectés traités ou non par les antiviraux (trithérapie; antipolymérase plus antiprotéase) et l'inhibition de l'apoptose et de la mort cellulaire, l'expression du virus dans les cultures a été examinée.

10 Les concentrations d'ARN de VIH-1 dans les surnageants recueillis à partir des cultures de cellules T de patients étaient différentes en présence ou en l'absence du composé. L'ARN du VIH-1 dans les surnageant des cultures, provenant du patient PE non traité et possédant une forte charge virale, conditionnées par le riluzole ( $10^{-7}M$ ) était augmenté au jour 13 de la culture de 100%. La charge virale étant forte dès le départ, et le pic de la sortie du virus pour le contrôle a lieu au jour 6. Aux jours  
15 3 et 6 de la culture, la mesure du virus est pratiquement la même, cependant aux jours 10 et 13, alors que la courbe des témoins amorce une décroissance, celle des cultures conditionnées ( $10^{-7}M$ ) reste 2 fois plus élevée (Figure 1C). Par contre, pour les cellules provenant du patient PR soumis à la trithérapie et ayant une charge virale à la limite du détectable, dès le 3<sup>ème</sup> jour de culture, une très forte sortie de  
20 virus est observée sur les cellules conditionnées par le riluzole ( $10^{-7}M$ ) par rapport au contrôle (1.1  $\log_{10}$  de plus) (Figure 2C). Le pic de sortie du virus a lieu au jour 10 de la culture du contrôle due à l'historique des lymphocytes. Au jour 13 de la culture, alors que l'expression virale des cellules contrôle stagne, celle des cellules traitées culmine à un seuil élevé (0.7  $\log_{10}$  de plus).

25 L'effet dose du riluzole a ensuite été étudié sur l'expression du RNA viral des lymphocytes du patient SIDA AR ne suivant aucune thérapie et possédant une charge virale plasmatique de 43576 copies/ml. Le pic de la sortie du virus a lieu au jour 10 de la culture. Comparativement, les cellules conditionnées par le riluzole dès le 6<sup>ème</sup> jour de la culture exprimaient 0.8  $\log_{10}$  de plus de RNA viral que le contrôle  
30 aux doses de  $10^{-6}M$ ,  $10^{-7}M$  et  $10^{-8}M$ . Cette production continuait d'augmenter au jour 13 (jusqu'à 0.7  $\log_{10}$  de plus) (Figure 3C).

Effet du riluzole sur le virus intégré (ADN proviral):

Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 1 suivant :

Tableau 1

5 Effet du riluzole (0.1 $\mu$ M) sur l'ADN proviral de lymphocytes de patients VIH-1 non traités et traités cultivées en l'absence ou en présence du riluzole.

	<u>Jour 3 de culture</u>		<u>Jour 6 de culture</u>	
	(-)	(+)	(-)	(+)
10 #TT(-), V:68.000*	6,8 $\pm$ 0,1	<b>3,7 <math>\pm</math> 0,2**</b>	5.7 $\pm$ 0,3	<b>0,7<math>\pm</math>0,1**</b>
#TT(+), V :250*	4,5 $\pm$ 0,3	<b>3 <math>\pm</math> 0,2**</b>	3,8 $\pm$ 0,2	<b>0,2<math>\pm</math>0,1**</b>
#TT(+), V :44.000*	5,3 $\pm$ 0,2	<b>2 <math>\pm</math> 0,3**</b>	4,8 $\pm$ 0,3	<b>0,3<math>\pm</math>0,1**</b>

15 # TT(-): Patient sans Trithérapie, TT(+): Patient sous Trithérapie

\* Nombre de copies par ml de sang.

Log d'ADN de VIH proviral (copies [cp] /10<sup>6</sup> cellules).

Données exprimées sous la forme de moyenne + E.T (écart type) des .T (écart type) des mesures.

\*\* Valeur P (Wilcoxon) <0,01 par comparaison avec le milieu de culture seul.

20

Les données du tableau 1 démontrent que le riluzole est capable de diminuer de façon spécifique l'expression du virus intégré ( $p < 0.01$ ) des cellules provenant de patients SIDA.

25 Ces résultats montrent que le riluzole, tout en inhibant l'apoptose viro-induite favorisant ainsi la prolifération des lymphocytes, est en même temps capable d'agir sur les cellules « réservoir » et de les pousser à sortir le virus faiblement répliatif.

Effet du riluzole sur l'expression des gènes de cytokines :

30 Pour associer les effets décrits du riluzole à l'expression des cytokines, les inventeurs ont mesuré par PCR en temps réel l'expression des gènes de cytokines. Les résultats obtenus ont montré que le riluzole est capable d'induire l'expression des gènes de l'IL-15, de l'interféron  $\alpha$  et de l'interféron  $\beta$ , et du Toll récepteur 3 (Figure 8).

Effet du riluzole sur la production de l'interféron et de l'IL-15:

L'activation des gènes de l'interféron et de l'IL-15 est associée à la production de ces deux cytokines dans le surnageant des cellules traitées par le riluzole. L'activité fonctionnelle de l'interféron est déterminée par sa capacité à inhiber le pouvoir cytolytique du V.S.V. La production de l'IL-15 est quant à elle estimée par un test commercial Elisa. Ainsi des cellules traitées par  $10^{-8}$  M de riluzole sont capables de 6 pg/ml d'IL-15. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau 2 suivant :

Tableau 2

Effet du riluzole ( $10^{-8}$  M) sur la production de l'IL-15 et de l'interféron  $\alpha/\beta$

Interleukine 15		Interféron $\alpha/\beta$	
(-) Riluzole	(+) Riluzole	(-) Riluzole	(+) Riluzole
1*	15*	20**	32.000**

\* La mesure de la production de l'IL-15 est estimée par la technique Elisa (Kit R&D, U.K) les valeurs correspondent à des picogrammes par (pg/ml) par ml de culture.

\*\* Les valeurs de l'interféron correspondent au nombre d'unités internationales par ml de culture.

Lorsque les cellules sont conditionnées par le riluzole à la concentration de  $10^{-8}$  M elles deviennent capables de produire de l'Interféron  $\alpha/\beta$  capable d'inhiber le pouvoir cytolytique du V.S.V. La quantité ainsi produite est estimée à 32.000 Unités Internationales (Tableau 2).

Effet du riluzole sur la prolifération des cellules tumorales :

Lorsque les cellules tumorales de la lignée ATG 180 (Sarcome de Brocker) sont mises en culture avec différentes concentrations de riluzole ( $10^{-4}$ - $10^{-8}$  M) une inhibition de la prolifération des cellules est observée comparativement aux contrôles. A  $10^{-4}$  M une inhibition de 86% de la prolifération est observée, elle est de 40% à  $10^{-5}$  M et de 30% à  $10^{-6}$  M (Figure 9a). Lorsqu'on utilise d'autres cellules tumorales comme la lignée Jurkat (Figure 9b), la lignée NB4 (Figure 9c) et la lignée

H9 (Figure 9d) une inhibition de la prolifération de ces cellules tumorales est aussi observée.

Inhibition de l'ARN viral par addition de riluzole à un composé antiviral comme l'AZT.

5 Les cellules provenant des patients PE, PR et AR (voir Figures 1-3) sont cultivées à partir du jour 12 en présence du riluzole et en présence d'AZT.

Après 6 jours de culture, on mesure la présence de virus par la mesure de l'ARN viral, le virus intégré dans la cellule sous forme d'ADN proviral, le taux de survie cellulaire et la viabilité cellulaire.

10 Les résultats sont donnés dans le tableau 3 ci-dessous (dans ce tableau Ril=riluzole).

On observe une inhibition de l'ARN viral par l'AZT aux doses de 10 µg/ml et de 1 mg/ml cumulées aux concentrations de riluzole allant de  $10^{-5}$  à  $10^{-8}$  M.

15 Comme le montrent les résultats du tableau, l'AZT à 10 µg/ml, qui exerce un effet anti-viral, présente également un effet suppresseur (anti-prolifératif) sur les cellules témoins.

L'utilisation conjointe de riluzole et d'AZT permet de maintenir la prolifération et met en évidence l'effet restaurateur du riluzole par rapport à l'activité d'une drogue connue pour son effet anti-prolifératif à la dose de 10 µg/ml.

20 Lorsque l'AZT est utilisée à 1 µg/ml l'effet antiviral est partiel, voire équivalent sur les cellules témoins.

En revanche, l'addition concomitante du riluzole aux concentrations indiquées permet de maintenir à la fois une inhibition de l'ARN viral et le maintien de la prolifération cellulaire. Il est en plus à remarquer que le riluzole ( $10^{-6}$ - $10^{-9}$ M) permet de  
25 diminuer de manière significative le taux de virus intégré (ADN proviral) et du virus libéré (ARN) viral à un taux où l'AZT (1µg/ml) ne présente pas d'inhibition virale tout en conservant ses propriétés de restauration de la survie cellulaire.

Tableau 3

Conditionnement	(1) ARN viral Nombre de copies/ml	(2) ADN proviral Nombre de copies/10 <sup>6</sup> cellules	(3) Taux de Survie Cellulaire (X 100%)	(4) Viabilité % de Cellules mortes
<u>Individu PE</u>				
- AZT	25.000	5.3	5	35
+ AZT 10µg/ml	<100	5	3	20
// + Ril 10 <sup>-6</sup>	<100	0.1	12	7
M	<100	0.1	15	6
// + Ril 10 <sup>-7</sup>				
M				
+AZT 1µg/ml	12.000	6.5	3	29
// + Ril 10 <sup>-6</sup> M	<100	0.1	14	8
// + Ril 10 <sup>-7</sup> M	<100	0.2	18	16
<u>Individu PR</u>				
- AZT	10.000	4.5	15	25
+ AZT 10µg/ml	<100	4.8	13	20
// + Ril 10 <sup>-6</sup> M	<100	0.2	45	7
// + Ril 10 <sup>-7</sup>	<100	0.1	50	6
+AZT 1µg/ml	7.000	4.9	12	19
// + Ril 10 <sup>-6</sup> M	<100	0.2	53	8
// + Ril 10 <sup>-7</sup> M	<100	0.1	48	9
<u>Individu AR</u>				
- AZT	60.000	5	7	20
+ AZT 10µg/ml	<100	5.4	4	25
// + Ril 10 <sup>-6</sup> M	<100	0.1	15	11
// + Ril 10 <sup>-7</sup> M	<100	0.08	19	9
// + Ril 10 <sup>-8</sup> M	<100	0.15	27	10
// + Ril 10 <sup>-9</sup> M	<100	0.2	12	9
// + Ril 10 <sup>-10</sup> M	<100	3	6	16
+ AZT 1µg/ml	35.000	6.1	5	28
// + Ril 10 <sup>-6</sup> M	<100	0.1	17	10
// + Ril 10 <sup>-7</sup> M	<100	0.1	20	9
// + Ril 10 <sup>-8</sup> M	<100	0.15	30	8
// + Ril 10 <sup>-9</sup> M	17.000	0.4	16	10
// + Ril 10 <sup>-10</sup> M	23.000	4	8	19

- 5 (1) Nombre de copies d'ARN viral par ml de milieu de culture par test de quantification virale RT PCR.  
 (2) Log d'ADN de VIH proviral (copies [cp] /10<sup>6</sup> cellules).  
 (3) La survie cellulaire est estimée par le taux (nombre de cellules jour 18 – nombre des cellules jour 12) X 100 / nombre de cellules jour 12.  
 (4) La viabilité cellulaire est estimée par numérotation avec le bleu trypan.

## REVENDICATIONS

5           1 - Utilisation du riluzole ou de sels pharmaceutiquement acceptables du riluzole, pour la fabrication de médicaments pour amplifier et rétablir la fonction immunitaire pour le traitement de maladies, infectieuses et de cancers.

10           2- Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que les dits médicaments se présentent sous des formes pour l'administration par voie orale, parentérale, par exemple intraveineuse, ou topique, ou encore rectale, notamment sous forme de suppositoires.

15           3- Utilisation selon la revendication 1 ou 2, pour l'induction de l'interféron  $\alpha/\beta$  et de l'interleukine 15 pour traiter un dysfonctionnement lié à une pathologie d'origine exogène ou endogène.

20           4- Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que la pathologie est associée à une agression d'origine iatrogène, induite par l'action d'immunosuppresseurs tel que la cyclosporine ou par l'action des corticoïdes.

            5- Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, pour le traitement d'une pathologie liée à une agression virale.

25           6- Utilisation selon la revendication 5, pour le traitement des infections liées à une agression d'origine rétrovirale due aux VIH de type 1 ou II et aux HTLV I et II, ou par les herpès.

30           7- Utilisation selon la revendication 5, caractérisée en ce que la pathologie est liée à une agression d'origine virale due aux virus des Hépatites.

            8- Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisée par l'association avec un ou plusieurs composés à propriétés anti-virales.

9- Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que le composé antiviral est choisi parmi le DDI, le DDC, les antiprotéases, le 3TC et l'AZT.

5 10- Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, pour le traitement d'une pathologie liée à une agression parasitaire telle que la leishmaniose, la malaria ou bilharziose.

10 11- Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, pour le traitement d'une pathologie associée à une agression d'origine tumorale, telle qu'une tumeur immunologique comme le myélome et les leucémies, ou tissulaire.

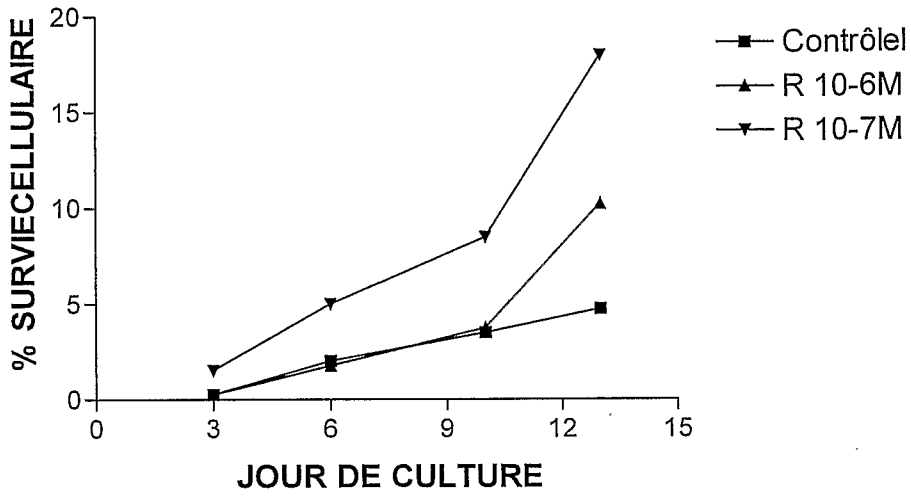
12 - Utilisation selon la revendication 2, pour le traitement d'une pathologie associée à une agression auto-immune.

15 13 - Utilisation selon l'une quelconque des revendications 11 à 12, caractérisée en ce que lesdits médicaments sont administrés à raison de 50 à 200 mg/jour d'au moins un composé de formule (I), en tant que principe actif, à des doses unitaires de 25 à 100 mg.

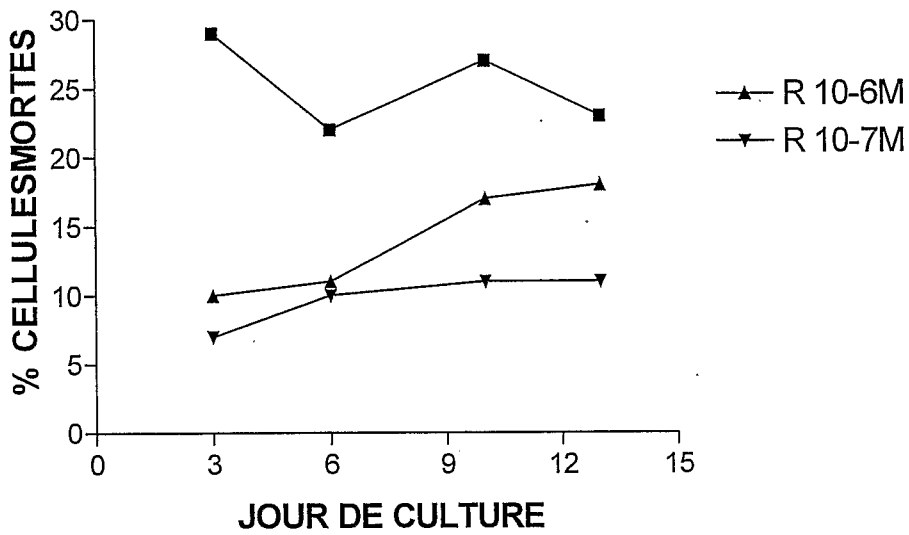
Figure 1

A

PE T4:467, T8:1662, V:60824  
TT:-



B



C

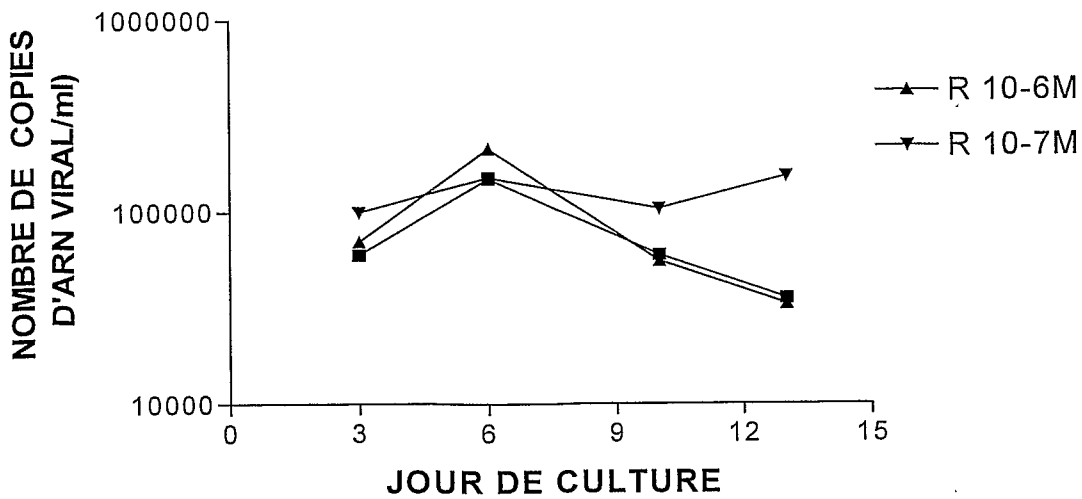


Figure 2

PR T4:880, T8:1280, V:250  
TT:+

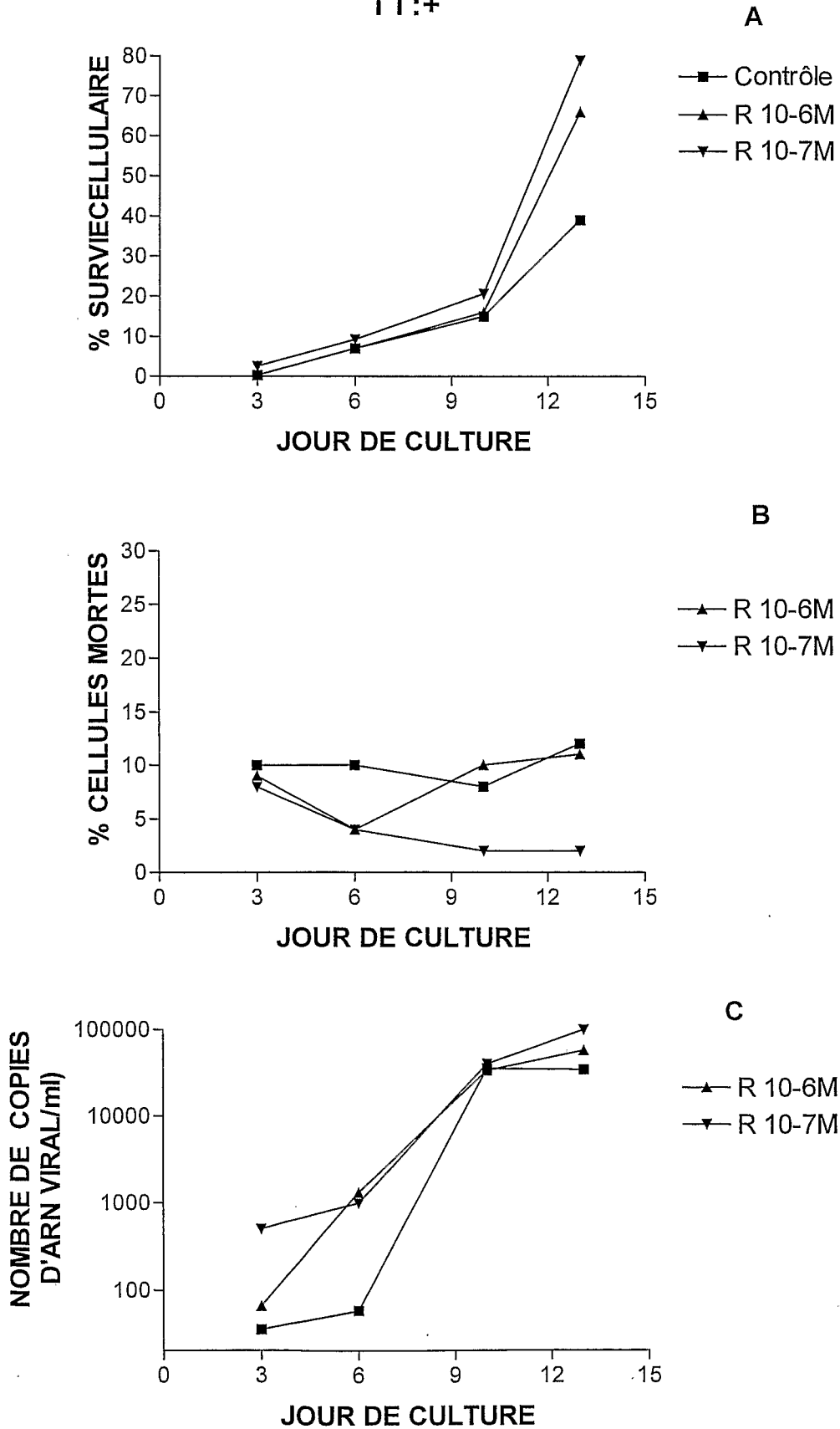


Figure 3

AR T4:291, T8:1280872,  
V:43576, TT;+

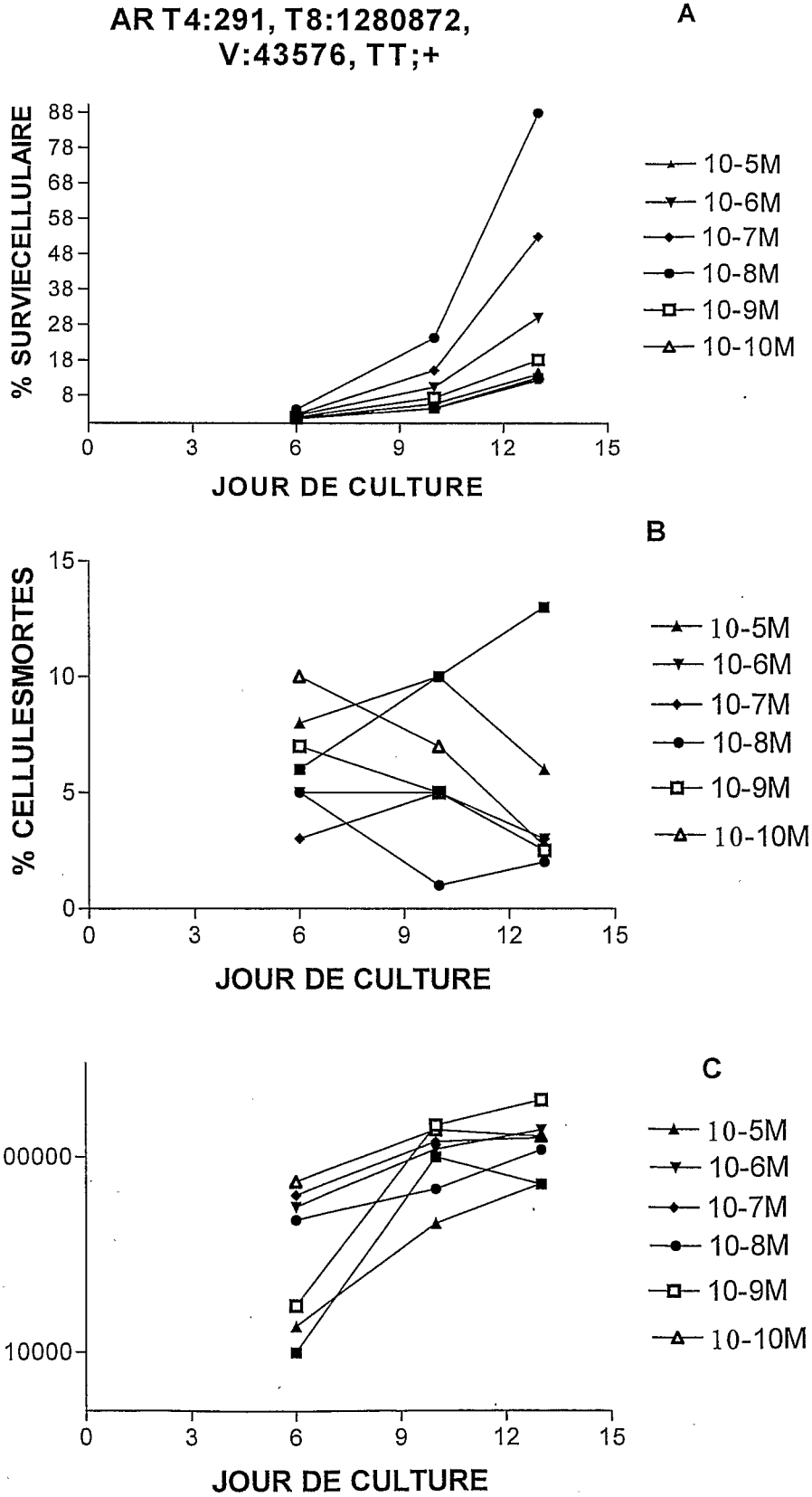
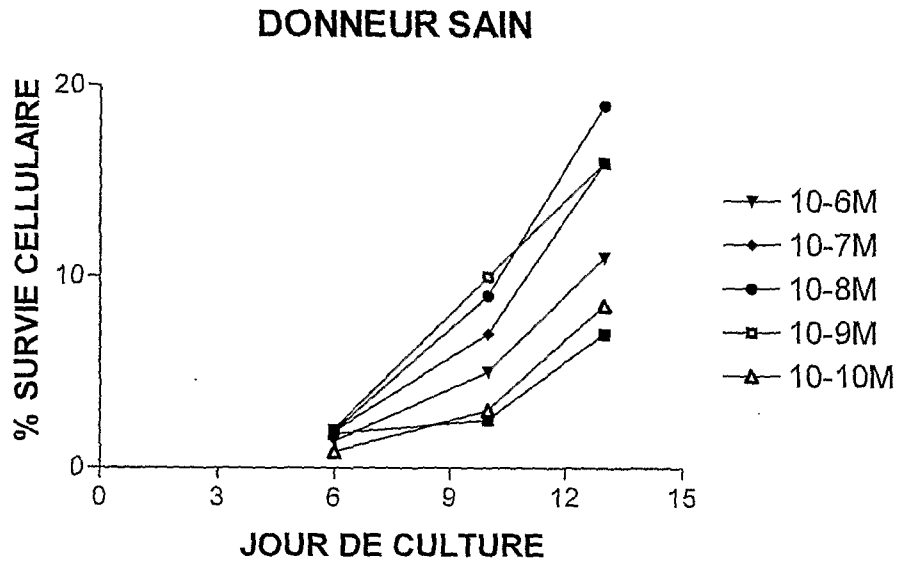


Figure 4

A



B

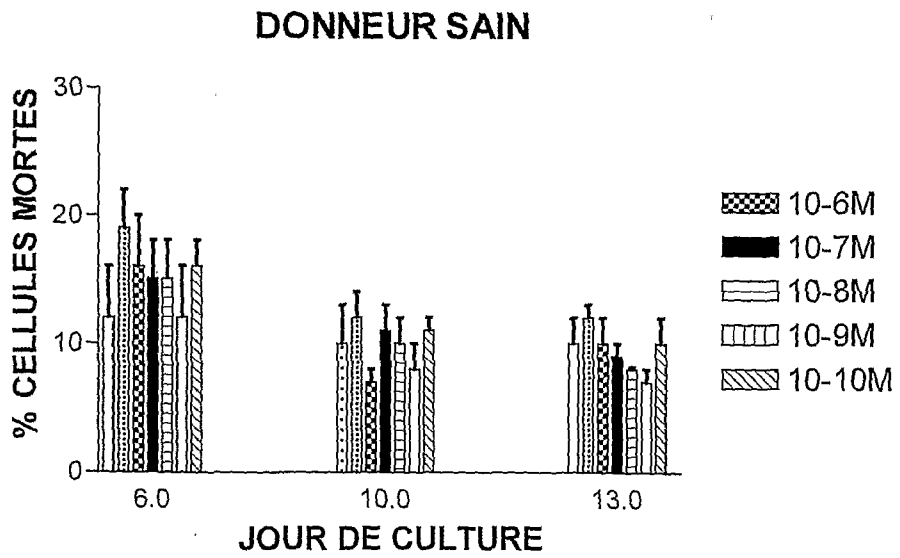


Figure 5

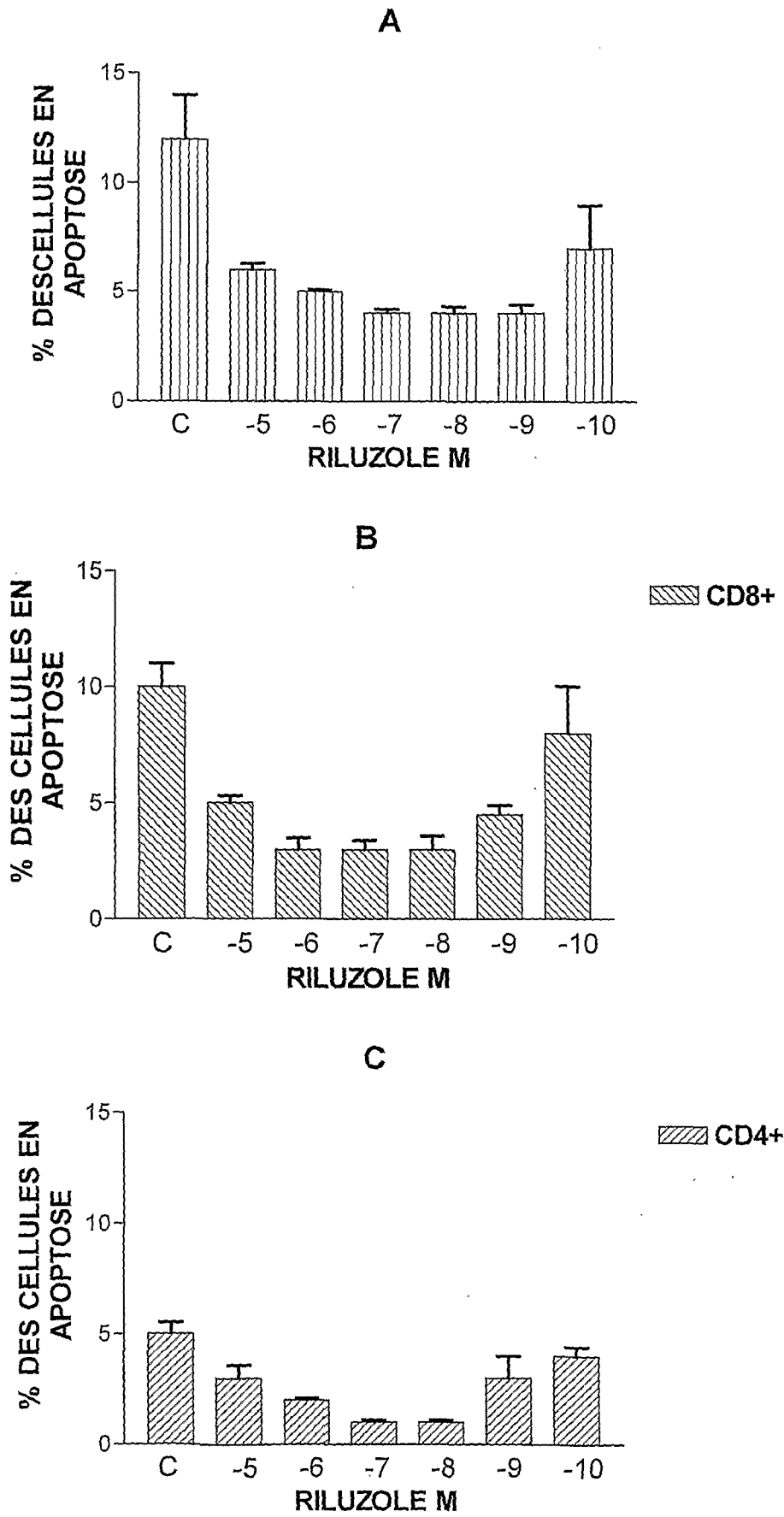


Figure 6

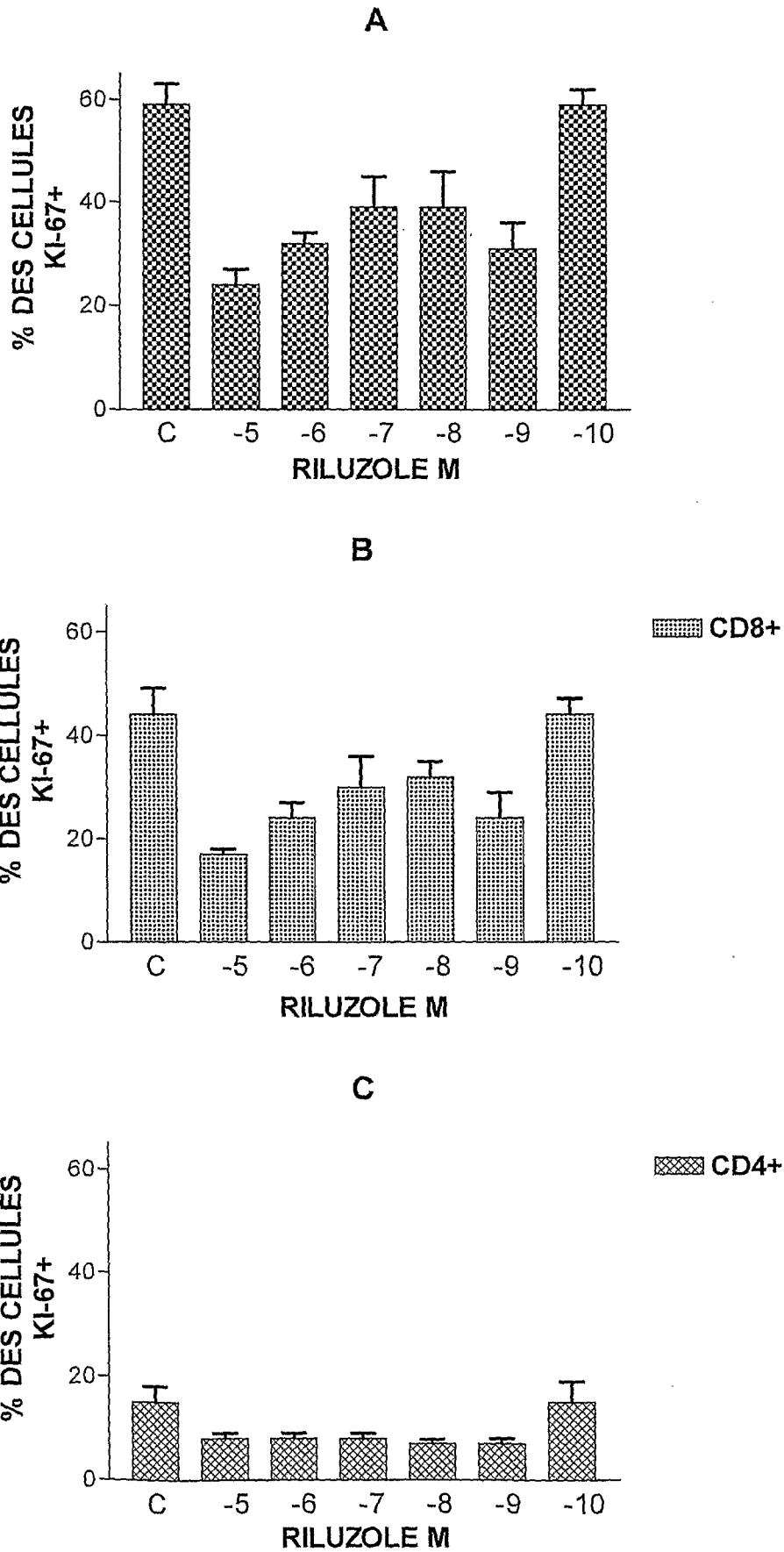


Figure 7

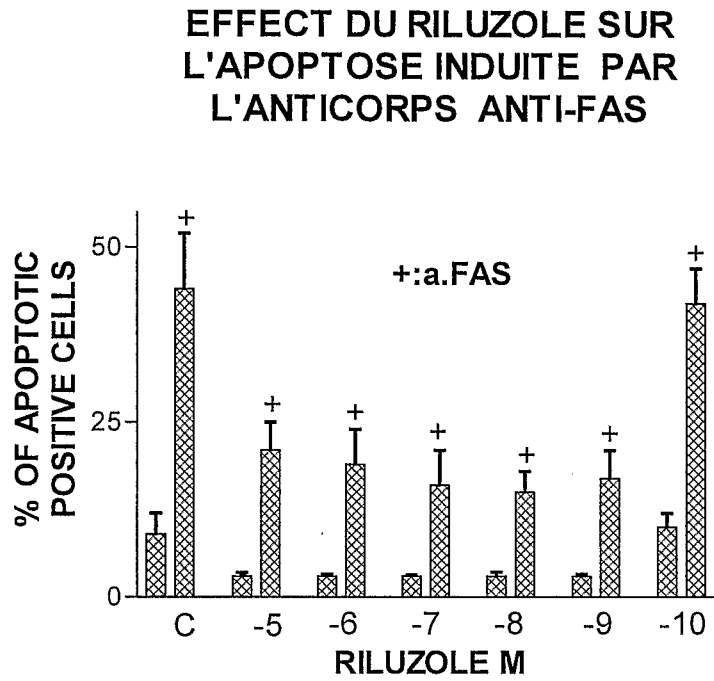


Figure 8



**Figure 9**

