



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0414062-1 B1



(22) Data do Depósito: 02/09/2004

(45) Data de Concessão: 25/06/2019

(54) Título: USO DE CICLOSPORINAS MODIFICADAS PARA O TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS POR HCV

(51) Int.Cl.: A61K 38/13; A61P 31/14.

(30) Prioridade Unionista: 03/09/2003 GB 03 20638.0.

(73) Titular(es): NOVARTIS AG.

(72) Inventor(es): MAKOTO HIJIKATA; KUNITADA SHIMOTOHNO; KOICHI WATASHI.

(86) Pedido PCT: PCT EP2004009804 de 02/09/2004

(87) Publicação PCT: WO 2005/021028 de 10/03/2005

(85) Data do Início da Fase Nacional: 02/03/2006

(57) Resumo: "USO DE CICLOSPORINAS MODIFICADAS PARA O TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS POR HCV". A presente invenção refere-se a ciclosporinas de ligação à ciclofilina não-imunossupressoras, por exemplo, de fórmula (I, Ia ou II), conforme aqui definida, com propriedades úteis na prevenção ou tratamento de infecções de hepatite C.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"USO DE CICLOSPORINAS MODIFICADAS PARA O TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS POR HCV".**

A presente invenção refere-se a um novo uso para ciclosporinas
5 não-imunossupressoras.

As ciclosporinas compreendem uma classe de undecapeptídeos poli-N-metilados, cíclicos e estruturalmente distintos, comumente possuindo atividade farmacológica, em particular imunossupressora, ou antiinflamatória. A primeira das ciclosporinas a ser isolada foi o metabolito fúngico de ocorrência natural ciclosporin ou ciclosporina, também conhecida como ciclosporina A.
10

Está bem-estabelecido que a ciclosporina A age por interferência com o processo de ativação das células T, mediante bloqueio do início de transcrição de IL-2. Demonstrou-se que a ciclosporina A forma um complexo com uma proteína citosólica de 17 kD chamada de ciclofilina, que ocorre em muitos tipos de células e que foi demonstrada como sendo idêntica à peptidil-prolil cis-trans isomerase, uma enzima envolvida no dobramento de proteínas.
15

Entretanto, verificou-se que a ligação à ciclofilina é um critério necessário, mas não suficiente, para a atividade imunossupressora. O complexo ciclosporina A/ciclofilina também pode se associar à proteína celular chamada de calcineurina (CN), que pertence à superfamília fosfatase. Essa ligação anula sua atividade fosfatase, resultando no silenciamento do fator de transcrição NF-AT. A inibição da via CN/NF-AT é o mecanismo essencial para a imunossupressão mediada por ciclosporina A.
20 25

Foram identificadas ciclosporinas que se ligam fortemente à ciclofilina, mas que não são imunossupressoras. Uma ciclosporina é considerada como sendo não-imunossupressora, quando tem uma atividade na Reação de Linfócitos Mistos (MLR) de no máximo 5%, de preferência no máximo 2%, daquela da ciclosporina A. A Reação de Linfócitos Mistos é descrita por T. Meo em "Immunological Methods", L. Lefkovits e B. Peris, Eds., Academic Press, N.Y. pp. 227 - 239 (1979). Células esplênicas ($0,5 \times 10^6$) de
30

camundongos Balb/c (fêmeas, 8 - 10 semanas) são co-incubadas durante 5 dias com $0,5 \times 10^6$ células esplênicas irradiadas (2.000 rads) ou tratadas com mitomicina C de camundongos CBA (fêmeas, 8 - 10 semanas). As células alogeneicas irradiadas induzem uma resposta proliferativa nas células
5 esplênicas Balb c, que pode ser medida por incorporação de precursor marcado no DNA. Como as células estimuladoras são irradiadas (ou tratadas com mitomicina C), não respondem às células Balb/c com proliferação, mas retêm sua antigenicidade. A IC_{50} encontrada para o composto de teste na MLR é comparada com a encontrada para ciclosporina A em um experimento
10 paralelo. Além disso, ciclosporinas não-imunossupressoras não têm a capacidade de inibir CN e a via NF-AT a jusante.

A EP 0 484 281 A1 expõe o uso de ciclosporinas não-imunossupressoras no tratamento de AIDS e distúrbios relacionados à AIDS.

Verificou-se, surpreendentemente, que ciclosporinas não-imunossupressoras que se ligam à ciclofilina têm um efeito inibidor sobre o vírus da
15 hepatite C (HCV).

A infecção persistente por HCV, que foi identificado como o principal agente causador de hepatite não-A, não-B, é considerada intimamente relacionada a doenças hepáticas como hepatite crônica, cirrose hepática ou
20 carcinoma hepatocelular. O desenvolvimento dessas doenças hepáticas é um importante problema de saúde pública. A terapia anti-HCV eficaz está restrita à terapia com interferon ou uma combinação de interferon e ribavirin. Entretanto, como o vírus não é eliminado de cerca de metade dos pacientes com HCV tratados com esses agentes conhecidos, ainda há uma grande
25 necessidade de agentes anti-HCV alternativos.

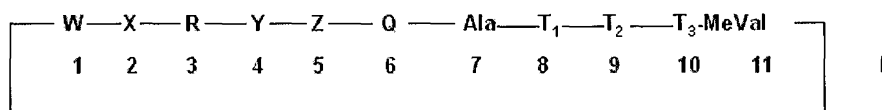
Portanto, a presente invenção apresenta o uso de uma ciclosporina de ligação à ciclofilina não-imunossupressora na prevenção ou tratamento de infecções de hepatite C ou distúrbios induzidos por HCV.

Infecções por hepatite C ou distúrbios induzidos por HCV são, por exemplo, a hepatite crônica, cirrose hepática ou câncer de fígado, por
30 exemplo, carcinoma hepatocelular. As ciclosporinas de ligação à ciclofilina não-imunossupressoras também podem ser usadas, por exemplo, como um

tratamento profilático em recém-nascidos de mães infectadas com HCV ou de trabalhadores da área de saúde expostos ao vírus, ou de receptores de transplantes, por exemplo, receptores de transplantes de órgãos ou de tecidos, por exemplo, transplante de fígado, para eliminar uma possível infecção por HCV recorrente após o transplante.

Uma ciclosporina é considerada como de ligação à ciclofilina se se ligar a ciclofilina recombinante humana pelo menos um quinto das vezes que o fizer a ciclosporina A no teste ELISA competitivo descrito por Quesniaux em *Eur. J. Immunol.* 1987 17 1359 - 1365. Nesse teste, a ciclosporina a ser testada é adicionada durante a incubação da ciclofilina com ciclosporina A revestida com BSA, e se calcula a concentração requerida para proporcionar uma inibição de 50% da reação de controle sem competidor (IC_{50}). Os resultados são expressos como Razão de Ligação (BR), que é o log na base 10 da razão da IC_{50} do composto de teste para a IC_{50} em um teste simultâneo da própria ciclosporina A. Assim, uma BR de 1,0 indica que o composto de teste se liga à ciclofilina humana a um fator de dez menos do que a ciclosporina A, e um valor negativo indica uma ligação mais forte do que a da ciclosporina A. As ciclosporinas ativadas contra HCV têm uma BR menor que 0,7, de preferência igual a ou menor que zero.

Exemplos de ciclosporinas de ligação à ciclofilina não-imunossupressoras incluem, por exemplo, compostos de Fórmula I



em que

- W é MeBmt, dihidro-MeBmt, 8'-hidróxi-MeBmt ou O-acetil-MeBmt¹;
 X é α Abu, Val, Thr, Nva ou O-metil treonina (MeOThr);
 R é Pro, Sar, (D)-MeSer, (D)-MeAla ou (D)-MeSer(Oacetil);
 Y é MeLeu, thioMeLeu, γ -hidróxi-MeLeu, Melle, MeVal, MeThr, MeAla, Mealle ou MeaThr; N-etilVal, N-etille, N-etilThr, N-etilPhe, N-etilTyr ou N-etilThr(Oacetil);
 Z é Val, Leu, MeVal ou MeLeu;

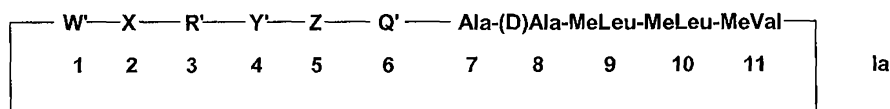
Q é MeLeu, γ -hidróxi-MeLeu, MeAla ou Pro;

T₁ é (D)Ala ou Lys;

T₂ é MeLeu ou γ -hidróxi-MeLeu; e

T₃ é MeLeu ou MeAla.

- 5 Compostos preferidos de fórmula I são, por exemplo, compostos de fórmula Ia



em que

W' é MeBmt, dihidro-MeBmt ou 8'-hidróxi-MeBmt;

X é α Abu, Val, Thr, Nva ou O-metil treonina (MeOThr);

- 10 R' é Sar, (D)-MeSer, (D)-MeAla ou (D)-MeSer(Oacetil);

Y' é MeLeu, γ -hidróxi-MeLeu, Melle, MeVal, MeThr, MeAla, Mealle ou MeaThr; N-etilVal, N-etille, N-etilThr, N-etilPhe, N-etilTyr ou N-etilThr (Oacetil);

Z é Val, Leu, MeVal ou MeLeu; e

- 15 Q' é MeLeu, γ -hidróxi-MeLeu ou MeAla.

Os grupos W', X, Y', Z, Q' e R' têm, independentemente, os seguintes significados preferidos:

W' é, de preferência, W'', em que W'' é MeBmt ou diidro-MeBmt;

- 20 X é, de preferência, X', em que X' é α Abu ou Nva, mais preferível X'', em que X'' é α Abu;

R' é, de preferência, R'', em que R'' é Sar;

Y' é, de preferência, Y'', em que Y'' é γ -hidróxi-MeLeu, MeVal, MeThr, Melle, N-etille ou N-etilVal;

Z é, de preferência, Z', em que Z' é Val ou MeVal; e

- 25 Q' é, de preferência, Q'', em que Q'' é MeLeu.

Um grupo preferido de compostos de fórmula Ia são aqueles em que W' é W'', X é X', Y' é Y'', Z é Z', Q' é Q'', e R' é R''.

Exemplos de compostos preferidos de fórmula Ia são, por exemplo;

IR < 1%

5

10

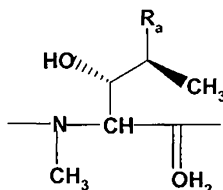
15

n) $[\gamma\text{-hidróxi-MeLeu}]^9\text{-ciclosporina}$; BR = 0,15; IR = 2,9

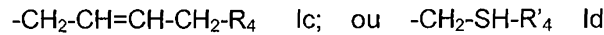
20

W _a	X _a	R _a	Y _a	Z _a	Q _a	Ala-(D)Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

W_a é



em que R_a é um resíduo de fórmula Ic ou Id

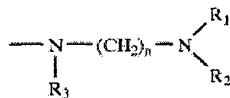


em que R_4 é C_{1-4} alquiltio, amino C_{1-4} alquiltio, C_{1-4} alquilamino C_{1-4} alquiltio, di C_{1-4} alquilamino C_{1-4} alquiltio, pirimidiniltio, tiazoliltio, N- C_{1-4} alquilimidazoliltio, hidróxi C_{1-4} alquilfeniltio, hidróxi C_{1-4} alquilfenóxi, nitrofenilamino ou 2-oxopiridin-1-ila, e R'_4 é C_{1-4} alquila;

X_a é Abu;

R_a é $-\text{NMe}-\text{CH}(\text{R}_b)-\text{CO}-$, em que R_b é H ou $-\text{S}-\text{Alk}-\text{R}_0$, em que $\text{Alk}-\text{R}_0$ é metila; ou Alk é C_{2-6} alquilenos linear ou ramificado ou C_{3-6} cicloalquilenos, e R_0 é H; OH; COOH; C_{2-5} alcóxicarbonila; NR_1R_2 , em que cada de R_1 e R_2 é independentemente selecionado de H, C_{1-4} alquila, C_{2-4} alquenila, C_{3-6} cicloalquila e fenila, cada um opcionalmente substituído por halogênio, C_{1-4} alcóxi, C_{2-5} alcóxicarbonila, amina, C_{1-4} alquilamino e/ou di C_{1-4} alquilamino, e benzila e um radical heterocíclico, a dita benzila e os radicais heterocíclicos sendo saturados ou insaturados e contendo 5 ou 6 elementos de anel e 1 a 3 heteroátomos, ou R_1 e R_2 formam, juntamente com o átomo de nitrogênio ao qual estão ligados, um heterociclo de 4 a 6 elementos, que pode conter outro heteroátomo escolhido de nitrogênio, oxigênio e enxofre, e que é opcionalmente substituído por C_{1-4} alquila, fenila ou benzila; ou cada de R_1 e R_2 é independentemente um radical de fórmula Ib

(Ib)



em que R_1 e R_2 são conforme acima definidos, R_3 é H ou C_{1-4} alquila, e n é um número inteiro que varia de 2 a 4;

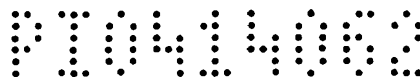
Y_a é MeLeu ou γ -hidróxi-MeLeu;

Z_a é Val; e

Q_a é MeLeu,

contanto que R_b não seja H, quando Y_a é MeLeu, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

Na fórmula II, quando R_1 e/ou R_2 é um resíduo heterocíclico, pode ser piridila, tetrahidropiridila, piperidila, imidazolila, oxazolila ou tiazolila.



Quando R_1 e R_2 formam um resíduo heterocíclico com o átomo de nitrogênio ao qual estão ligados, a título de exemplo, o resíduo heterocíclico pode ser escolhido de azetidinila, piperidila, piperazinila, N-metil-piperazinila, N-fenilpiperazinila, N-benzilpiperazinila, piridila, imidazolila, morfolino, tiomorfolino, 5 tetrahidropiridila, metiltetrahidropiridila (por exemplo, 4-metil-tetrahidropiridila) ou feniltetrahidropiridila (por exemplo, 4-feniltetrahidropiridila).

Os compostos de fórmula I, Ia ou II podem ser obtidos de várias maneiras, que podem ser classificadas como:

- 1) fermentação
- 10 2) biotransformação
- 3) derivatização
- 4) síntese parcial
- 5) síntese total

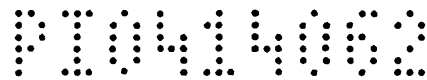
conforme exposto, por exemplo, em EP 0 484 281 A1, WO 00/01715, WO 15 98/28330, WO 98/28329 ou WO 98/28328, cujos conteúdos são aqui incorporados por referência.

Em uma série de modalidades específicas ou alternativas adicionais, a invenção também apresenta:

1.1 Um método para prevenir ou tratar infecções de hepatite C 20 ou distúrbios induzidos por HCV em um indivíduo que necessite disso, compreendendo a administração ao dito indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma ciclosporina de ligação à ciclofilina não-imunossupressora, por exemplo, um composto de fórmula I, Ia ou II. De acordo com a invenção, a ciclosporina de ligação à ciclofilina não-imunossupressora pode 25 ser administrada em uma quantidade eficaz para aliviar ou eliminar um ou mais dos sinais ou sintomas de hepatite C, por exemplo, eficaz para reduzir o RNA de HCV medido em uma amostra de soro do indivíduo.

1.2 Um método para inibir a replicação de HCV em um meio, compreendendo a aplicação a esse meio de uma quantidade eficaz de uma 30 ciclosporina de ligação à ciclofilina não-imunossupressora, por exemplo, um composto de fórmula I, Ia ou II.

1.3 Um método para inibir a replicação de HCV em um paciente



que necessite disso, compreendendo a administração a esse indivíduo de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma ciclosporina de ligação à ciclofilina não-imunossupressora, por exemplo, um composto de fórmula I, Ia ou II.

- 5 1.4 Um método para prevenir a recorrência de infecção por HCV em um receptor de transplante que necessite disso, compreendendo a administração ao dito receptor de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma ciclosporina de ligação à ciclofilina não-imunossupressora, por exemplo, um composto de fórmula I, Ia ou II.

- 10 2. Uso de uma ciclosporina de ligação à ciclofilina não-imunossupressora, por exemplo, um composto de fórmula I, Ia ou II, na preparação de uma composição farmacêutica para uso em qualquer dos métodos acima definidos.

- 15 3. Composição farmacêutica para uso em qualquer um dos métodos acima definidos, compreendendo uma ciclosporina de ligação à ciclofilina não-imunossupressora, por exemplo, um composto de fórmula I, Ia ou II, juntamente com um ou mais diluentes ou veículos farmaceuticamente aceitáveis.

- 20 A utilidade das ciclosporinas de ligação à ciclofilina não-imunossupressoras (daqui por diante, "ciclosporinas da invenção") no tratamento de doenças e condições conforme acima especificado pode ser demonstrada em testes com animais ou clínicos padronizados, por exemplo, de acordo com os métodos descritos a seguir.

A. In vitro

- 25 Cultura celular: células Huh-7 e MH-14, células com réplicon de HCV, são cultivadas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) com soro bovino fetal a 10% (FBS). Células PH5CH8 são cultivadas em uma mistura a 1:1 de DMEM e meio F12 suplementado com 100 ng/mL de fator de crescimento epidérmico, 10 µg/mL de insulina, 0,36 µg/mL de hidrocortisona, 5 µg/mL de transferrina, 5 µg/mL de ácido linoléico, 20 ng/mL de selênio, 4 µg/mL de glucagon, 10 ng/mL de prolactina, 10 µg/mL de gentamicina, 200 µg/mL de canamicina e FBS a 2%.
- 30

Análise de imunotransferência: a análise de imunotransferência é realizada conforme descrito por K. Watashi et al., Virology 2001, 286, 391 - 402. Os anticorpos primários usados neste experimento são anticorpos anti-NS5A, anti-NS5B e anti- β -actina (Sigma).

- 5 Análise de imunofluorescência indireta: a análise de imunofluorescência indireta é realizada conforme descrito por K. Watashi, supra. Os anticorpos primários usados neste experimento são anticorpos anti-NS5A e anti-PDI (StressGen).

- 10 Análise por transcrição reversa (RT)-reação em cadeia de polimerase (PCR)

RNA total de células cultivadas é isolado com Sepasol-RNA I Super (nacalai tesque) conforme recomendado pelo fabricante. A análise de RT-PCR é realizada usando-se um kit de RNA PCR de uma etapa (Takara), de acordo com as direções do fabricante. Os iniciadores usados para detecção de mRNAs para 2',5'-oligoadenilato sintetase e proteína cinase dependente de RNA de fita dupla são 5'-CCGTGAAGTTTGAGGTCCAG-3', 5'-GACTAATTCCAAGACCGTCCG-3' e 5'-TGGCCGCTAACTTGCATATC-3', 5'-GCGAGTGTGCTGGTCACTAAAG-3', respectivamente.

- 20 Análise Northern blot: a análise Northern blot é realizada conforme descrito por H. Kishine et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 2002, 47, 119 - 125. A sonda complementar à sequência NS5B usada neste experimento é descrita por H. Kishine, supra.

- 25 Análise RT-PCR em tempo real: a 5'-UTR do RNA de genoma de HCV é quantificada usando-se o detector de sequência ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems), conforme descrito por T. Takeuchi et al., Gastroenterology, 1999, 116, 636 - 642. Os iniciadores direto e reverso usados neste experimento são 5'-CGGGAGAGCCATAGTGG-3' e 5'-AGTACCACAAGGCCTTTCG-3', respectivamente. A sonda fluorogênica é 5'-CTGCGGAACCGGTGAGTACAC-3'. Como controle interno, RNA ribossômico também é quantificado usando-se
- 30 Reagentes de Controle de RNA Ribossômico TaqMan (Applied Biosystems).

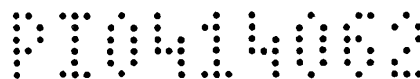
Experimento de infecção por HCV in vitro: o experimento de infecção por HCV in vitro é realizado essencialmente conforme descrito por N.

Kato et al., Jpn. J. Cancer Res. 1996, 87, 787 - 792, e M. Ikada et al., Virus Res., 1998, 56, 157 - 167. Células PH5CH8 (1×10^5) são infectadas com o plasma 1B-2 (equivalente a 10^4 a 10^6 cópias de RNA de HCV), que é preparado com um doador de sangue positivo para HCV. 24 h após a inoculação, as células são lavadas três vezes com salina tamponada com fosfato (PBS) e mantidas com meio fresco.

Ensaio de transfecção e repórter: a transfecção em células MH-14 e H9 é realizada usando-se FuGENE 6 (Roche) e reagente de transfecção Lipofectamine 2000 (Invitrogen), respectivamente, de acordo com o protocolo do fabricante. O ensaio repórter é realizado conforme descrito por K. Watashi, supra. Os plasmídios repórteres usados neste estudo são pNFAT-Luc, pAP1-Luc, pNFkB-Luc (PathDetect Reporter System; Stratagene) e pRL-TK (sistema de ensaio repórter por luciferase dual; Promega).

O efeito de várias ciclosporinas da invenção sobre a replicação do genoma de HCV usando células MH-14, em que o réplicon subgenômico de HCV conforme mostrado na figura 1A é autonomamente replicado. O tratamento com uma ciclosporina da invenção, por exemplo, [Melle]⁴-ciclosporina, por exemplo, a 1 µg/mL, assim como 100 U/mL de IFN α , que é usada como um controle positivo durante 7 dias, diminui a quantidade de proteínas NS5A e NS5B de HCV a níveis não detectáveis por análise de imunotransferência. A análise de imunofluorescência indireta mostrou que a produção de proteína NS5A está reduzida em todas as células tratadas com 1 µg/mL de ciclosporina da invenção, ao passo que o nível de proteína dissulfeto isomerase (PDI), que é um marcador de retículo endoplasmático, como um controle interno, não é alterado sob essa condição. As ciclosporinas da invenção diminuem, nesse ensaio, a expressão de proteína de HCV em células com réplicon de HCV.

O RNA de réplicon é analisado em células MH-14 tratadas com ou sem uma ciclosporina da invenção ou IFN α durante 7 dias por análise de Northern blot. O tratamento com, por exemplo, 1 µg/mL de ciclosporina da invenção, por exemplo, [Melle]⁴-ciclosporina, diminui a quantidade de RNA de réplicon a um nível não detectável. O tratamento com 100 U/mL de IFN α



produz um efeito similar. Além disso, o título é gradualmente diminuído, e o nível de RNA de HCV é reduzido a cerca de 1/400 do original no 7º dia. No caso de um co-tratamento com IFN α , uma redução adicional em qualquer momento examinado (3º, 5º e 7º dia) em comparação com o tratamento único com a ciclosporina ou IFN α : o nível de RNA de replicon em células MH-14 tratadas tanto com a ciclosporina, quanto com IFN α durante 7 dias está significativamente diminuído com relação ao de células tratadas com IFN α apenas.

Além disso, células PH5CH8 (linhagem celular de hepatócito não-neoplásico) são tratadas com plasma positivo para HCV, e, subsequentemente, o título genômico de RNA de HCV em vários momentos após a inoculação é quantificado por análise RT-PCR em tempo real. Embora o título genômico de RNA de HCV no 5º dia após a inoculação nas células esteja aumentado cerca de 10 vezes em comparação com o do 1º dia, um aumento significativo do título genômico de RNA de HCV nesses momentos não foi observado nas células tratadas continuamente com uma ciclosporina da invenção, por exemplo, [Melle]⁴-ciclosporina, ou IFN α . As ciclosporinas da invenção inibem a replicação de hepatócitos em cultura infectados com HCV.

Os resultados são mostrados nas figuras 2E, 2F e 2G: a análise de imunotransferência (2E), análise de imunofluorescência indireta (2F) e análise RT-PCR em tempo real (2G) são realizadas usando-se células MH-14 tratadas com [Melle]⁴-ciclosporina (■) ou uma ciclosporina de não ligação a ciclofilina (●), por exemplo, 6-[ácido [R-(E)]-6,7-didesidro-N,4-dimetil-3-oxo-L-2-aminooctanóico]-7-L-valina-ciclosporina A. Controle em 2E e 2F (1ª fileira), sem tratamento; CysA em 2E, 1 µg/mL; [Melle]⁴-ciclosporina em 2E (■) e 2F (■), 1 µg/mL; a ciclosporina de não-ligação a ciclofilina em 2E (●) e 2F (●), 1 µg/mL.

B. Ensaio Clínico

Um total de 15 pacientes com infecção de hepatite C crônica são alistados em um estudo de 2 semanas. Cada paciente recebe uma ciclosporina da invenção, por exemplo, [Melle]⁴-ciclosporina, a uma dose de 7 a 15 mg/kg por via oral. Os níveis séricos de antígenos de hepatite C são determinados no dia 0 e no dia 14 em cada paciente.

Uma pessoa sofrendo de infecção de hepatite C, em particular infecção crônica por HCV, pode exibir um ou mais dos seguintes sinais ou sintomas: (a) ALT elevada, (b) teste positivo para anticorpos anti-HCV, (c) presença de HCV, conforme demonstrado por um teste positivo para RNA de HCV, (d) estigmas clínicos de doença hepática crônica, (e) lesão hepatocelular. Esses critérios podem ser não apenas usados para diagnosticar hepatite C, mas também podem ser usados para avaliar a resposta do paciente ao tratamento medicamentoso.

Sabe-se que alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) séricas elevadas ocorrem em hepatite C não controlada, e uma resposta completa ao tratamento é em geral definida como a normalização dessas enzimas séricas, particularmente ALT (Davis et al., 1989, *New Eng. J. Med.* 321:1501-1506). A ALT é uma enzima liberada quando as células hepáticas são destruídas e é sintomática de infecção por HCV.

Para seguir o curso da replicação de HCV nos indivíduos em resposta ao tratamento medicamentoso, o RNA de HCV pode ser medido em amostras de soro, por exemplo, por um ensaio de reação em cadeia de polimerase alojada que usa dois conjuntos de iniciadores derivados das regiões de genes não-estruturais N53 e N54 do genoma do HCV. Farci et al., 1991, *New Eng. J. Med.* 325:98-104. Ulrich et al., 1990, *J. Clin. Invest.*, 86:1609-1614.

O exame histológico de amostras de biopsia hepática pode ser usado como um segundo critério para avaliação. Veja, por exemplo, Knodell et al., 1981, *Hepatology* 1:431-435, cujo Índice de Atividade Histológica (inflamação portal, necrose em saca-bocado ou em ponte, lesão lobular e fibrose) representa um método de classificação da atividade da doença.

As dosagens diárias requeridas na prática do método da presente invenção variarão dependendo, por exemplo, da ciclosporina de ligação à ciclofilina não-imunossupressora empregada, do hospedeiro, do modo de administração, da gravidade da condição a ser tratada. Uma faixa de dosagem diária preferida é de cerca de 1 a 50 mg/kg por dia como uma dose única ou em doses divididas. Dosagens diárias adequadas para pacientes es-

tão na ordem de, por exemplo, 1 a 20 mg/kg por via oral ou intravenosa. Formas de dosagem unitária adequadas para administração oral compreendem de cerca de 0,25 a 10 mg/kg de ingrediente ativo, por exemplo, [Melle]⁴-ciclosporina, juntamente com um ou mais diluentes ou veículos farmacêuticamente aceitáveis.

As ciclosporinas da invenção podem ser administradas por qualquer via convencional, em particular entérica, por exemplo, oral, por exemplo, na forma de soluções para beber, comprimidos ou cápsulas, ou parenteral, por exemplo, na forma de soluções ou suspensões injetáveis. Composições farmacêuticas preferidas podem ser, por exemplo, aquelas à base de microemulsões, conforme descrito na UK 2.222.770 A.

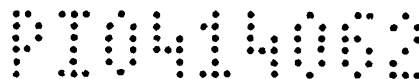
As ciclosporinas da invenção podem ser administradas como o único ingrediente ou juntamente com outros medicamentos, por exemplo, um medicamento que tenha atividades anti-HCV, por exemplo, um interferon, por exemplo, interferon- α -2a ou interferon- α -2b, por exemplo, Intron® A, Roferon®, Avonex®, Rebif® ou Betaferon®, ou um interferon conjugado a um polímero solúvel em água ou a albumina humana, por exemplo, albuferon, um agente antiviral, por exemplo, ribavirin, lamivudina, NV08 ou NM283, um inibidor dos fatores codificados em HCV como a NS3/4A protease, a helicase ou RNA polimerase, ou um pró-medimento desse inibidor, um agente antifibrótico, por exemplo, um derivado de N-fenil-2-pirimidina-amina, por exemplo, imatinib, um agente modulador imune, por exemplo, ácido micofenólico, ou seu sal ou pró-medimento, por exemplo, micofenolato de sódio ou micofenolato mofetil, ou um agonista do receptor S1P, por exemplo, FTY720 ou seu análogo opcionalmente fosforilado, por exemplo, conforme exposto na EP 627406A1, EP 778263A1, EP 1002792A1, WO 02/18395, WO 02/76995, WO 02/06268, JP 2002316985, WO 03/29184, WO 03/29205, WO 03/62252 e WO 03/62248.

Deve-se entender que conjugados de interferon e um polímero solúvel em água incluem particularmente conjugados com homopolímeros de óxido de polialquilenos, como polietileno glicol (PEG) ou polipropileno glicóis, polióis polioxietilenados, seus copolímeros e seus copolímeros de blo-

cos. Como uma alternativa a polímeros à base de óxido de polialquilenos, podem-se usar materiais efetivamente não-antigênicos, como dextrano, polivinil pirrolidonas, poliacrilamidas, álcoois polivinílicos, polímeros à base de carboidratos e outros. Esses conjugados de interferon-polímero são descritos nas patentes norte-americanas nºs 4.766.106, 4.917.888, no pedido de patente européia nº 0 236 987, no pedido de patente européia nº 0 510 356 e na publicação de pedido internacional nº WO 95/13090. Como a modificação polimérica reduz suficientemente as respostas antigênicas, o interferon estranho não precisa ser completamente autólogo. O interferon usado para preparar os conjugados com polímero pode ser preparado de um extrato de mamífero, como interferon humano, de ruminante ou bovino, ou produzido de maneira recombinante. São preferidos os conjugados de interferon com polietileno glicol, também conhecidos como interferons pegilados.

Conjugados particularmente preferidos de interferon são alfa-interferons pegilados, por exemplo, interferon- α -2a pegilado, interferon- α -2b pegilado, interferon de consenso pegilado ou produto de interferon- α purificado pegilado. O interferon- α -2a pegilado é descrito, por exemplo, na patente européia 593.868 e está comercialmente disponível, por exemplo, sob o nome comercial PEGASYS® (Hoffmann-La Roche). O interferon- α -2b pegilado é descrito, por exemplo, na patente européia 975.369 e está comercialmente disponível, por exemplo, sob o nome comercial PEG-INTRON A® (Schering Plough). O interferon de consenso pegilado é descrito em WO 96/11953. Os α -interferons pegilados preferidos são o interferon- α -2a pegilado e interferon- α -2b pegilado. Também se prefere o interferon de consenso pegilado.

As dosagens diárias com relação ao co-agente usado variarão dependendo, por exemplo, do composto empregado, do hospedeiro, do modo de administração e da gravidade da condição a ser tratada. Por exemplo, lamivudina pode ser administrada a uma dosagem diária de 100 mg. O interferon pegilado pode ser administrado por via parenteral uma a três vezes por semana, de preferência uma vez por semana, a uma dose semanal total variando de 2 a 10 milhões de IU, mais preferivelmente de 5 a 10 milhões de IU, mais preferivelmente ainda de 10 milhões de IU.



De acordo com o precedente, a presente invenção apresenta em ainda um aspecto adicional:

4. Uma combinação farmacêutica compreendendo a) um primeiro agente, que é uma ciclosporina de ligação à ciclofilina não-imunossupressora, por exemplo, um composto de fórmula I, Ia ou II, e b) um co-agente, por exemplo, um segundo agente medicamentoso conforme acima definido, por exemplo, para uso em qualquer um dos métodos acima definidos.

5. Um método, conforme acima definido, compreendendo a co-administração, por exemplo, concomitante ou em seqüência, de uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma ciclosporina de ligação à ciclofilina não-imunossupressora, por exemplo, um composto de fórmula I, Ia ou II, e um co-agente, por exemplo, um segundo agente medicamentoso conforme acima definido.

Os termos "co-administração" ou "administração combinada" ou similares, conforme aqui utilizados, pretendem englobar a administração dos agentes terapêuticos selecionados a um único paciente, e pretendem incluir regimes de tratamento em que os agentes não sejam necessariamente administrados pela mesma via de administração ou ao mesmo tempo.

A administração de uma combinação farmacêutica da invenção resulta em um efeito benéfico, por exemplo, um efeito terapêutico sinérgico, em comparação com uma monoterapia que aplique apenas um de seus ingredientes farmacêuticamente ativos. Uma combinação sinérgica preferida é uma combinação de uma ciclosporina de ligação à ciclofilina não-imunossupressora com um interferon, opcionalmente conjugado a um polímero.

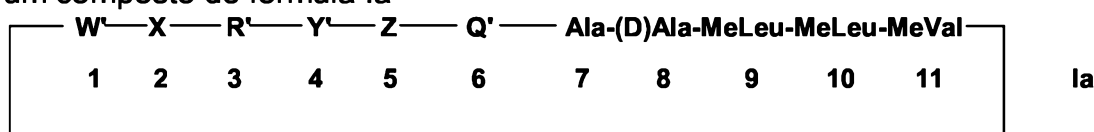
Uma combinação preferida adicional é uma combinação de uma ciclosporina de ligação à ciclofilina não-imunossupressora com ácido micofenólico, ou seu sal ou pró-medimento, ou com um agonista do receptor S1P, por exemplo, FTY720.

A [Melle]⁴-ciclosporina ou [MeVal]⁴-ciclosporina é uma ciclosporina de ligação à ciclofilina não-imunossupressora preferida para uso de acordo com a invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de uma ciclosporina, caracterizado pelo fato de que é na preparação de uma composição farmacêutica para prevenir ou tratar infecções de hepatite C ou distúrbios induzidos por HCV, em que a ciclosporina (i) se liga à ciclofilina recombinante humana com uma razão de ligação (BR) de menos de 0,7, BR sendo o log na base 10 da razão da IC₅₀ da ciclosporina para a IC₅₀ de ciclosporina A, conforme medido em um teste ELISA competitivo; e (ii) tem uma atividade na Reação de Linfócitos Mistos de no máximo 5% daquela da ciclosporina A, em que a ciclosporina é

um composto de fórmula Ia



em que

W' é MeBmt, dihidro-MeBmt ou 8'-hidróxi-MeBmt;

X é α Abu, Val, Thr, Nva ou O-metil treonina (MeOThr);

R' é Sar, (D)-MeSer, (D)-MeAla ou (D)-MeSer(Oacetil);

Y' é MeLeu, γ -hidróxi-MeLeu, MeVal, MeThr, MeAla, Mealle ou MeaThr; N-etilVal, N-etille, N-etilThr, N-etilPhe, N-etilTyr ou N-etilThr (Oacetil);

Z é Val, Leu, MeVal ou MeLeu; e

Q' é MeLeu, γ -hidróxi-MeLeu ou MeAla;

, ou u sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

2. Uso de uma ciclosporina de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é na preparação de uma composição farmacêutica para inibir a replicação de HCV.

3. Uso de uma ciclosporina de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é na preparação de uma composição farmacêutica para prevenir a recorrência de infecção por HCV em um receptor de transplante.

4. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a composição farmacêutica compreende uma ciclosporina como definida na reivindicação 1 juntamente com um ou mais diluentes ou veículos

farmaceuticamente aceitáveis.

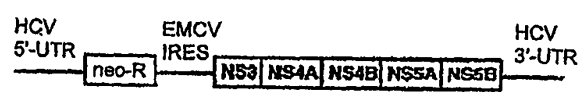
5. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a composição é uma combinação farmacêutica compreendendo a) um primeiro agente que é uma ciclosporina como definida na reivindicação 1, e b)
- 5 um co-agente selecionado de um agente com propriedades anti-HCV, um agente antifibrótico, um agente de modulação imune ou um agonista do receptor S1P.

6. Uso de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o referido co-agente é um co-agente com propriedades anti-HCV.

P10414082

27

1/2



A

FIG 1

2/2

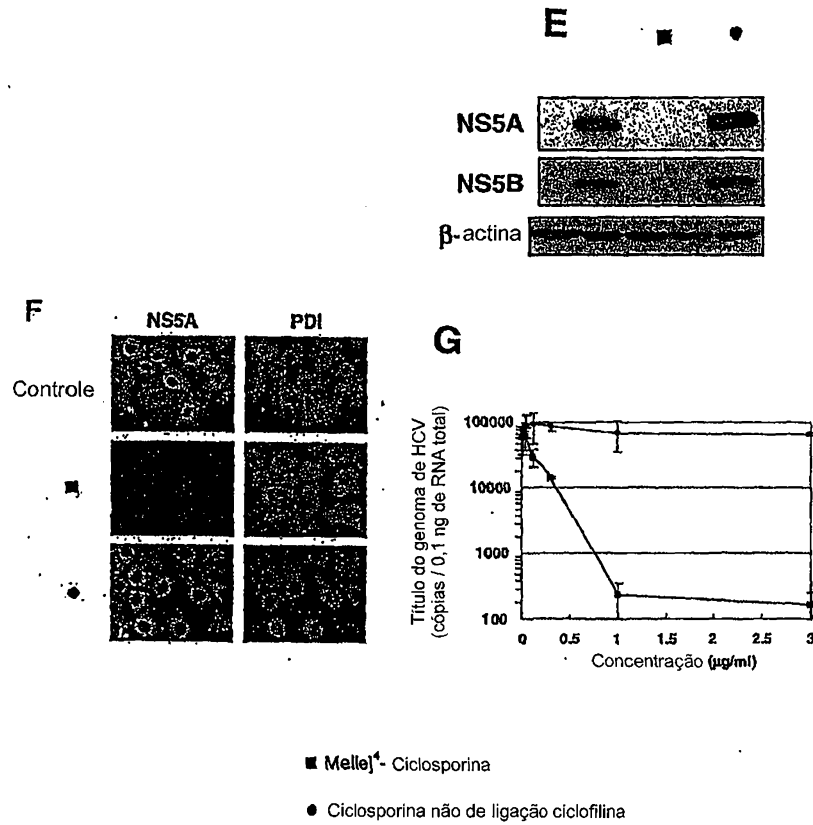


FIG 2