



(72) GOLDMAN, MICHEL, BE  
(72) MARGERY, HELENE, BE  
(72) ROBBERECHT, PATRICK ADELIN OSCAR, BE  
(72) TASSIGNON, JEAN PIERRE ROBERT GHISLAIN, BE  
(72) VANDEVELDE, MICHEL, BE  
(71) PREVISAN AG, CH  
(51) Int.Cl.<sup>6</sup> A61K 31/655  
(30) 1997/11/26 (9700949) BE

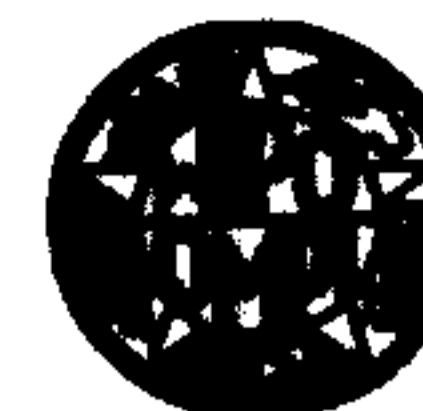
(54) **PROCEDE D'INHIBITION DE LA PRODUCTION CELLULAIRE  
DE CYTOKINES**  
(54) **METHOD FOR INHIBITING CYTOKINE PRODUCTION BY  
CELLS**



(57) Procédé d'inhibition de production de cytokines par des cellules, notamment animales ou humaines, et de leur sécrétion, comprenant une application sur ces cellules d'au moins un des dérivés azoïques répondant à la formule (I), où A représente un carboxyle ou un groupe (a), B représente un carboxyle ou un groupe (b), R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> et R<sup>4</sup> = H, Hal, OH ou un radical d'hydrocarbure, R<sup>1</sup> et R<sup>2</sup> ainsi que R<sup>3</sup> et R<sup>4</sup> pouvant former un noyau hétérocyclique, X<sup>1</sup> et X<sup>2</sup> = O ou NR<sup>5</sup>, où R<sup>5</sup> = H, Hal, un radical d'hydrocarbure ou un groupe nitro.

(57) The invention concerns a method for inhibiting cytokine production by cells, in particular animal or human cells, and their secretion, which consists in applying on said cells at least an azo compound derivatives corresponding to formula (I), in which A represents a carboxyl or a group (a); B represents a carboxyl or a group (b); R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> and R<sup>4</sup> = H, Hal, OH or a hydrocarbon radical, R<sup>1</sup> and R<sup>2</sup> as well as R<sup>3</sup> and R<sup>4</sup> capable of being a heterocyclic ring; X<sup>1</sup> and X<sup>2</sup> = O or NR<sup>5</sup>, where R<sup>5</sup> = H, Hal, a hydrocarbon radical or a nitro group.





PCT

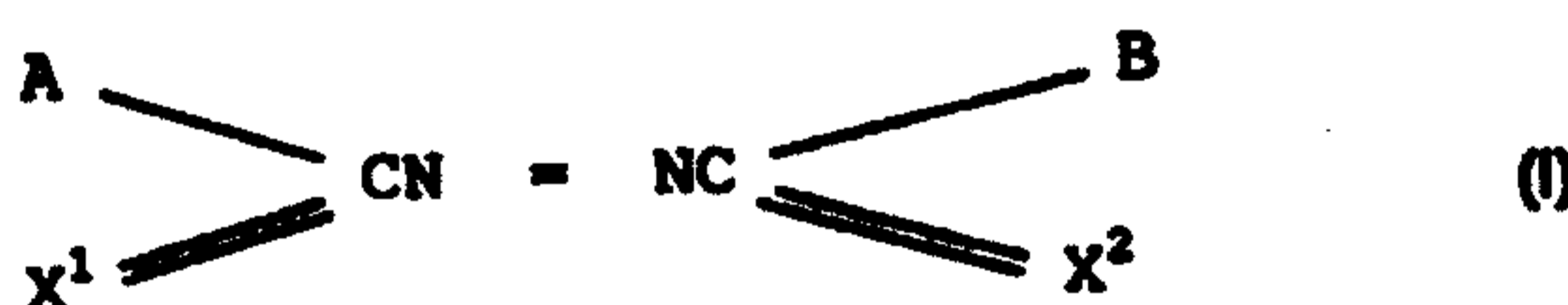
 ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIETE INTELLECTUELLE  
 Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIEE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> : <b>A61K 31/655</b>	<b>A2</b>	(11) Numéro de publication internationale: <b>WO 99/27937</b> (43) Date de publication internationale: 10 juin 1999 (10.06.99)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/BE98/00183 (22) Date de dépôt international: 25 novembre 1998 (25.11.98) (30) Données relatives à la priorité: 9700949                      26 novembre 1997 (26.11.97)    BE (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PREVISAN AG [CH/CH]; Bundesplatz 14, CH-6301 Zug (CH). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): GOLDMAN, Michel [BE/BE]; Avenue Joseph Jongen 17, B-1180 Bruxelles (BE). MARGERY, Hélène [BE/BE]; Avenue des Bouvreuils 14, B-1301 Bièrges (BE). ROBBERECHT, Patrick, Adelin, Oscar [BE/BE]; Avenue de Visé 65, B-1170 Bruxelles (BE). TASSIGNON, Jean, Pierre, Robert, Ghislain [BE/BE]; Av- enue des Ortolans 54, B-1170 Bruxelles (BE). VANDE- VELDE, Michel [BE/BE]; Place du Jardin aux Fleurs 3, B-1000 Bruxelles (BE). (74) Mandataires: CLAEYS, Pierre etc.; Gevers & Vander Haeghen, Rue de Livourne 7, B-1060 Bruxelles (BE).	(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AT (modèle d'utilité), AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, CZ (modèle d'utilité), DE, DE (modèle d'utilité), DK, DK (modèle d'utilité), EE, EE (modèle d'utilité), ES, FI, FI (modèle d'utilité), GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SK (modèle d'utilité), SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès          réception de ce rapport.</i>	

(54) Title: METHOD FOR INHIBITING CYTOKINE PRODUCTION BY CELLS

(54) Titre: PROCEDE D'INHIBITION DE LA PRODUCTION CELLULAIRE DE CYTOKINES



## (57) Abstract

The invention concerns a method for inhibiting cytokine production by cells, in particular animal or human cells, and their secretion, which consists in applying on said cells at least an azo compound derivatives corresponding to formula (I), in which A represents a carboxyl or a group (a); B represents a carboxyl or a group (b); R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> and R<sup>4</sup> = H, Hal, OH or a hydrocarbon radical, R<sup>1</sup> and R<sup>2</sup> as well as R<sup>3</sup> and R<sup>4</sup> capable of being a heterocyclic ring; X<sup>1</sup> and X<sup>2</sup> = O or NR<sup>5</sup>, where R<sup>5</sup> = H, Hal, a hydrocarbon radical or a nitro group.

## (57) Abrégé

Procédé d'inhibition de production de cytokines par des cellules, notamment animales ou humaines, et de leur sécrétion, comprenant une application sur ces cellules d'au moins un des dérivés azoïques répondant à la formule (I), où A représente un carboxyle ou un groupe (a), B représente un carboxyle ou un groupe (b), R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> et R<sup>4</sup> = H, Hal, OH ou un radical d'hydrocarbure, R<sup>1</sup> et R<sup>2</sup> ainsi que R<sup>3</sup> et R<sup>4</sup> pouvant former un noyau hétérocyclique, X<sup>1</sup> et X<sup>2</sup> = O ou NR<sup>5</sup>, où R<sup>5</sup> = H, Hal, un radical d'hydrocarbure ou un groupe nitro.

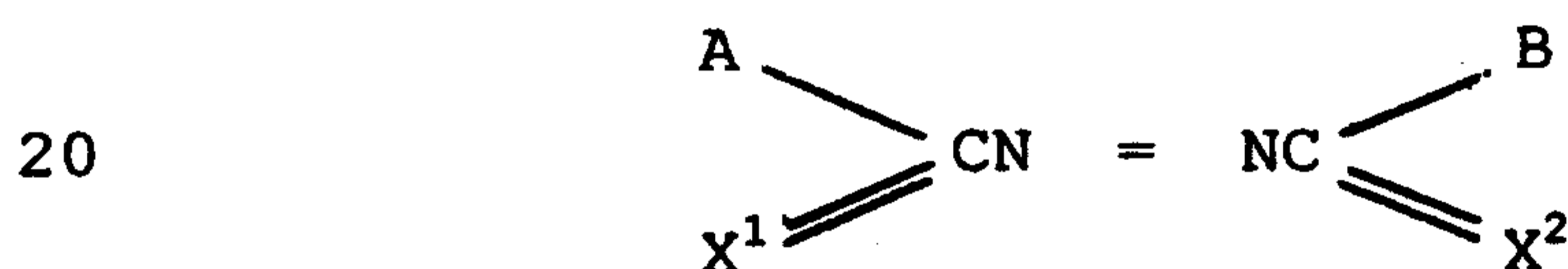
- 1 -

**Procédé d'inhibition de la production cellulaire  
de cytokines**

La présente invention est relative à un procédé d'inhibition in vitro de production de cytokines par des cellules, notamment animales ou humaines, et de leur sécrétion.

La présente invention a pour but de mettre au point un procédé d'inhibition in vitro de production de cytokines par des cellules qui ne mette pas en danger ces cellules. Avantageusement, ce procédé permettra d'inhiber chez ces cellules la production et la sécrétion de substances favorisant l'apparition de phénomènes immunoallergiques.

On résout ce problème suivant l'invention par un procédé tel que décrit au début, comprenant une application sur lesdites cellules d'au moins un des dérivés azoïques répondant à la formule



dans laquelle A représente un groupe carboxyle ou un groupe  $-N \begin{array}{l} \diagup R^1 \\ \diagdown R^2 \end{array}$ , B représente un groupe carboxyle ou un groupe  $-N \begin{array}{l} \diagup R^3 \\ \diagdown R^4 \end{array}$ , R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> et R<sup>4</sup> sont identiques ou différents et représentent chacun indépendamment un atome d'hydrogène ou d'halogène, un radical d'hydrocarbure aliphatique ou aromatique, éventuellement substitué, ou un groupe hydroxy, R<sup>1</sup> et R<sup>2</sup> pouvant être liés ensemble pour former un noyau hétérocyclique avec leur atome d'azote adjacent, et R<sup>3</sup>

- 2 -

et R<sup>4</sup> pouvant être liés ensemble pour former un noyau hétérocyclique avec leur atome d'azote adjacent, X<sup>1</sup> et X<sup>2</sup> sont identiques ou différents et représentent chacun indépendamment un atome d'oxygène ou un groupe NR<sup>5</sup>,  
5 dans lequel R<sup>5</sup> est un atome d'hydrogène ou d'halogène, un radical d'hydrocarbure aliphatique ou aromatique, éventuellement substitué, ou un groupe nitro, et dans lequel, lorsque deux groupes NR<sup>5</sup> sont simultanément présents, chaque R<sup>5</sup> peut être identique à ou différent  
10 de l'autre, ainsi que de leurs sels, esters et isomères.

Plusieurs de ces dérivés azoïques sont des composés connus, en particulier pour leur activité antivirale, notamment contre les virus du groupe rétro-  
15 virus, en particulier le virus du SIDA (voir WO-A-9116054 et WO-A-9107876, ainsi que le US-A-5585367).

En ce qui concerne plus particulièrement le 1,1'-azobisdiméthylformamide, appelé aussi diamide, de nombreux chercheurs se sont penchés sur le phénomène  
20 d'activation du facteur de transcription intracellulaire NF kappa B et ont montré que le diamide bloque le rôle de certaines enzymes dans la cascade d'activation de ce facteur.

D'autres auteurs ont montré qu'à certaines  
25 concentrations le diamide induit une apoptose dans certaines lignées cellulaires.

D'autres auteurs encore ont montré un effet du diamide sur certains récepteurs membranaires.

Aucune de ces études ne montre cependant une  
30 action d'inhibition du diamide sur la production de cytokines par les cellules observées. On peut même noter que C. Mendez et al, dans Oxidants augment endotoxin - induced activation of alveolar macrophages, SHOGK, vol. 6, n° 3, p. 157-163, 1996, observe une  
35 augmentation non significative de la production du

- 3 -

facteur de nécrose tumorale à la dose de 1 millimole, c'est-à-dire un effet inverse à celui observé de manière répétitive sur diverses cytokines suivant la présente invention.

5 Il est par ailleurs connu que les dérivés azoïques suivant l'invention offrent une toxicité propre extrêmement faible en soi vis-à-vis du corps humain ou des cellules saines traitées.

Suivant un mode de réalisation de  
10 l'invention, le procédé comprend une inhibition in vitro de production et de sécrétion d'interleukines par les cellules. Parmi le groupe des interleukines on peut citer notamment les interleukines IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 et IL-15, et on envisage tout  
15 particulièrement l'inhibition d'IL-2 et d'IL-5.

Suivant un autre mode de réalisation de l'invention, le procédé comprend une inhibition de production et de sécrétion d'interféron- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) par les cellules. Suivant encore un autre mode de réalisa-  
20 tion, le procédé comprend une inhibition de production et de sécrétion d'un facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).

Suivant un mode de réalisation avantageux de l'invention, R<sub>1</sub> à R<sub>5</sub> représentent chacun dans la  
25 formule générale donnée ci-dessus un radical d'hydrocarbure aliphatique ou aromatique comportant de 1 à 6 atomes de carbone. Les hétérocycles éventuellement formés dans la formule générale peuvent contenir, outre un atome d'azote, au moins un autre  
30 hétéroatome, par exemple de l'oxygène. L'hétérocycle est par exemple pentagonal à octogonal, de préférence il est hexagonal. Le dérivé azoïque suivant l'invention peut être choisi parmi le groupe comprenant des dérivés d'azobisformamide, tels que de la 1,1'-

- 4 -

azobisformamidine, de la 1,1-azobisnitroformamidine, de la 2,2'-azobisméthylformamidine, de la 1,1'-azobisfluoroformamidine, de la 1-monochloro-azobisformamidine, et de la azobis-[chloroformamidine], des dérivés d'azobisformamide, tels que du 1,1'-azobisformamide et du diméthyl-azobisformamide, de la 1,1'-(azodicarbonyl)-dipipéridine, de la 1,1'-(azodicarbonyl)-dimorpholine, de l'acide azodihydroxamique et ses sels, et de l'acide azodicarboxylique et ses sels.

Avantageusement le procédé comprend une application du dérivé azoïque sur les cellules à une dose n'induisant pas l'apoptose de celles-ci. On peut de préférence envisager une concentration micromolaire d'environ 0,4 à environ 200, de préférence de 2 à 20, avantageusement de 2 à 10.

Sous cet aspect, le 1,1'-azobisdiméthylformamide, appelé aussi diamide, peut présenter dans certains circonstances l'inconvénient de provoquer à certaines concentrations trop élevées une apoptose cellulaire, tout en offrant une demi-vie relativement courte, de seulement quelques minutes.

Suivant une forme de réalisation de l'invention, l'application d'au moins un des dérivés azoïques indiqués est effectuée sur des cellules isolées de macroorganismes ou des cellules de microorganismes, qui par exemple proviennent de cultures cellulaires. Les cellules traitées peuvent aussi être celles d'un organe ou tissu multicellulaire extrait d'un corps humain ou animal, comme par exemple des cellules d'un échantillon de sang ou de lymphe.

Suivant une forme de réalisation de l'invention, l'application d'au moins un des dérivés azoïques indiqués est par exemple effectuée sur des cellules isolées de sang humain productrices de cytokines. Ces

- 5 -

cellules peuvent être extraites de manière globale et dès lors on observera des effets globaux sur les différents types lymphocytaires, des cellules présentatrices d'antigènes ainsi que sur des macrophages en cocultures. Une étape plus poussée de l'investigation pourra consister en la mesure de la production des cytokines par des lignées cellulaires hautement purifiées, par exemple des lymphocytes CD4.

Le traitement des lignées cellulaires concernées peut aussi se faire par l'administration des dérivés azoïques à des organismes vivants en ce compris l'être humain et la mesure des différents groupes de cytokines dans les liquides biologiques extraits du corps humain ou animal, avant, pendant et/ou après traitement, ainsi que par la mesure de la possibilité de production des lymphokines concernées après extraction des cellules contenues dans ces liquides.

On peut aussi envisager un traitement par un dérivé azoïque suivant l'invention de greffons ou de tissus cellulaires avant leur transplantation dans un corps humain ou animal.

On peut aussi prévoir l'utilisation de médicaments à base des dérivés azoïques suivant l'invention pour traiter des patients contre le rejet de greffes.

Les cytokines sont produites dans l'organisme par différents réservoirs cellulaires.

Il est connu par exemple que les lymphocytes se spécialisent pour la production spécifique de cytokines et que, selon le type de cytokines produites, on différencie des lymphocytes CD4 Th1 et Th2.

Des cytokines sont aussi produites par les lymphocytes CD8 (IL-4 et IL-5) mais aussi par les mastocytes et les éosinophiles et au stade d'implantation dans l'utérus par les cellules ectodermiques du tropho-

- 6 -

blaste.

Ces productions de cytokines à partir de ces différents réservoirs cellulaires interviennent dans l'apparition de divers processus inflammatoires et allergiques au sens large, ainsi que dans le phénomène de rejets de greffes. On peut citer entre autres de manière non exhaustive les pathologies suivantes : l'asthme, la dermatite atopique, la rhinite allergique saisonnière, le psoriasis, le pemphigus, la thyroïdite, la myasthénie, la polyarthrite rhumatoïde, la néphropathie à Ig A, la sclérodermie, le lupus érythémateux, le diabète insulino-dépendant, la sclérose en plaque, les maladies inflammatoires du tube digestif, la maladie de Crohn, l'hyperéosinophilie, le syndrome éosinophile, ainsi que toute affection due à une apoptose cellulaire médiatisée par IL-5.

La substance active suivant l'invention peut être appliquée sur les cellules, seule ou en mélange avec d'autres substances suivant l'invention, ou encore en mélange avec d'autres substances ayant un autre effet sur les cellules. On peut prévoir l'application de la ou des substances actives telles quelles ou sous la forme d'une composition comportant au moins un des dérivés azoïques répondant à la formule donnée précédemment et un support ou véhicule approprié.

Certains composés suivant l'invention présentent au moins un atome de C asymétrique et par conséquent tous les isomères, y compris les diastéréoisomères et les isomères rotatifs ou énantiomères, sont englobés comme faisant partie de l'invention. L'invention inclut les isomères D et L sous forme pure ou en mélange, y compris les mélanges racémiques.

Certains composés de type acide par exemple les acides carboxyliques peuvent former des sels par

- 7 -

exemple avec des métaux, ou avec des amines acceptables, ou des esters avec des alcools compatibles.

La présente invention est aussi relative à l'utilisation d'au moins un des dérivés répondant à la formule donnée précédemment, ainsi que de leurs sels ou isomères, pour la fabrication de médicaments à mettre en oeuvre dans le traitement ou la prophylaxie d'affections humaines ou animales résultant d'une production cellulaire pathologique desdites cytokines. On peut spécialement prévoir la fabrication de médicaments pour le traitement et/ou la prévention de maladies auto-immunes, et/ou inflammatoires faisant intervenir les lymphocytes T, de maladies inflammatoires allergiques ou encore du rejet d'allogreffe et/ou de xéno greffe d'organes et de la maladie du greffon contre l'hôte après allogreffe cellulaire. Avantageusement ladite utilisation sera donc prévue pour fabriquer des médicaments destinés à être mis en oeuvre dans le traitement ou la prophylaxie d'affections telles que celles indiquées précédemment.

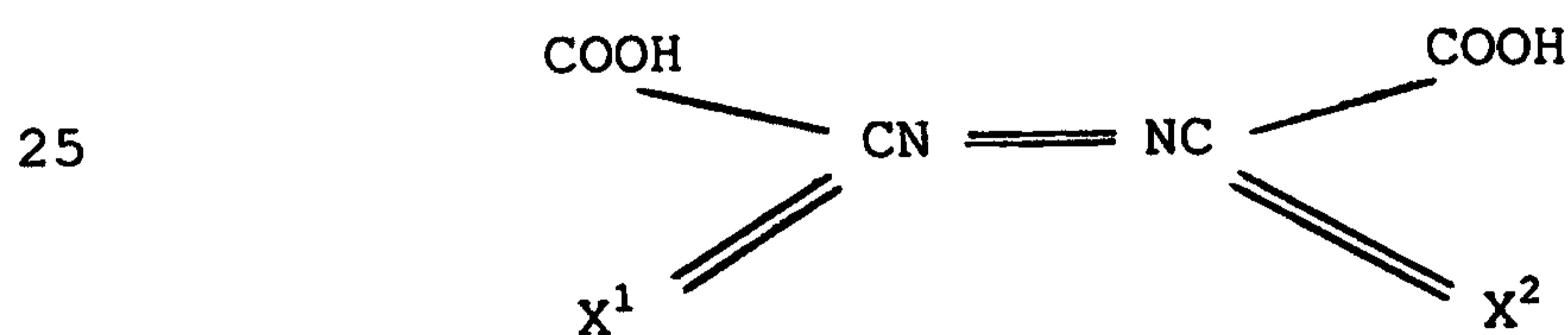
Le médicament ainsi préparé suivant l'invention peut être administré par toute voie appropriée, entre autres par voie orale, sublinguale, rectale ou vaginale, par injection ou perfusion, par voie locale, transcutanée ou transmuqueuse. Le médicament contient une quantité thérapeutiquement efficace du ou des dérivés azoïques indiqués précédemment. Le dosage sera variable d'individu à individu en fonction de leurs propres caractéristiques immunologiques qui sont en partie génétiquement déterminées. Le médicament peut se présenter sous n'importe quelle forme galénique appropriée, par exemple sous la forme de gélules, de pilules, de comprimés, de dragées, de poudres, de formes à injecter, de crèmes, d'onguents, de systèmes

- 8 -

connus de distribution transdermique, de produits à inhaler.

Les formulations et compositions pharmaceutiques peuvent contenir des excipients pharmaceutiquement acceptables usuels, ainsi qu'éventuellement des additifs courants en pharmacie. Ces excipients et additifs comprennent notamment des charges inertes compatibles, des liants, des agents de désintégration, des tampons, des agents conservateurs, des anti-oxydants, des lubrifiants, des agents sapides, des épaississants, des colorants, des émulsionnants, etc...

Etant donné leur première application dans le domaine thérapeutique, un objet de l'invention concerne également des dérivés azoïques répondant à la formule générale donnée précédemment, dans laquelle au moins un des groupes A et B représente un groupe carboxyle, ainsi que leurs sels, esters et isomères pharmaceutiquement acceptables, pour leur application en tant que substances thérapeutiquement actives. On envisage en particulier, comme dérivés de ce genre, des acides azodicarboxyliques de la formule ci-dessous

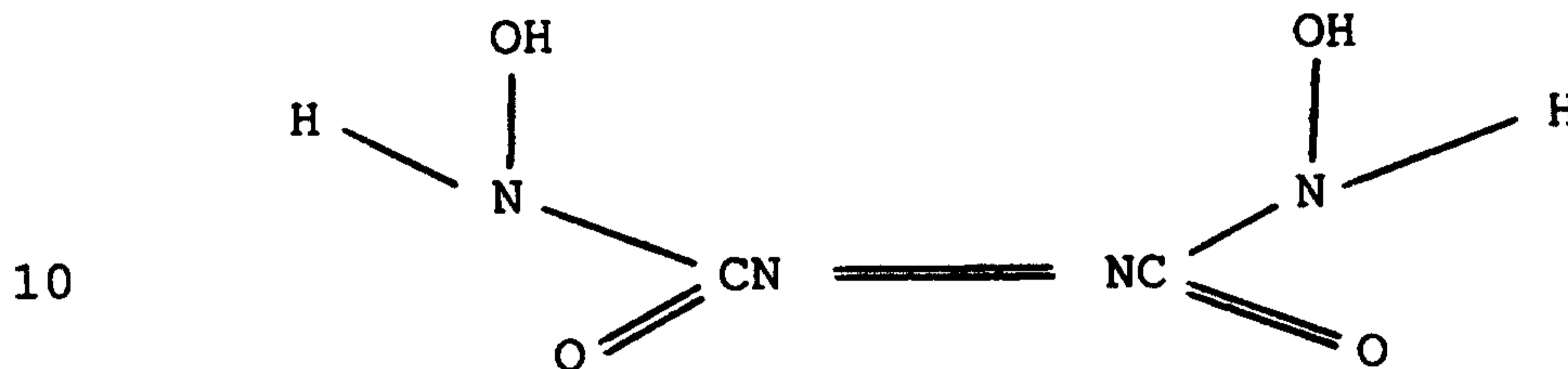


et leurs sels, esters et isomères.

De même, un autre objet de l'invention concerne des dérivés azoïques répondant à la formule générale donnée précédemment, dans laquelle le groupe A représente le groupe  $-\text{N} \begin{array}{l} \text{R}^1 \\ \text{R}^2 \end{array}$ , l'un des radicaux  $\text{R}^1$  et  $\text{R}^2$  représentant un groupe hydroxy et l'autre un atome d'hydrogène, et dans laquelle le groupe B peut représenter simultanément le groupe  $-\text{N} \begin{array}{l} \text{R}^3 \\ \text{R}^4 \end{array}$ , l'un des

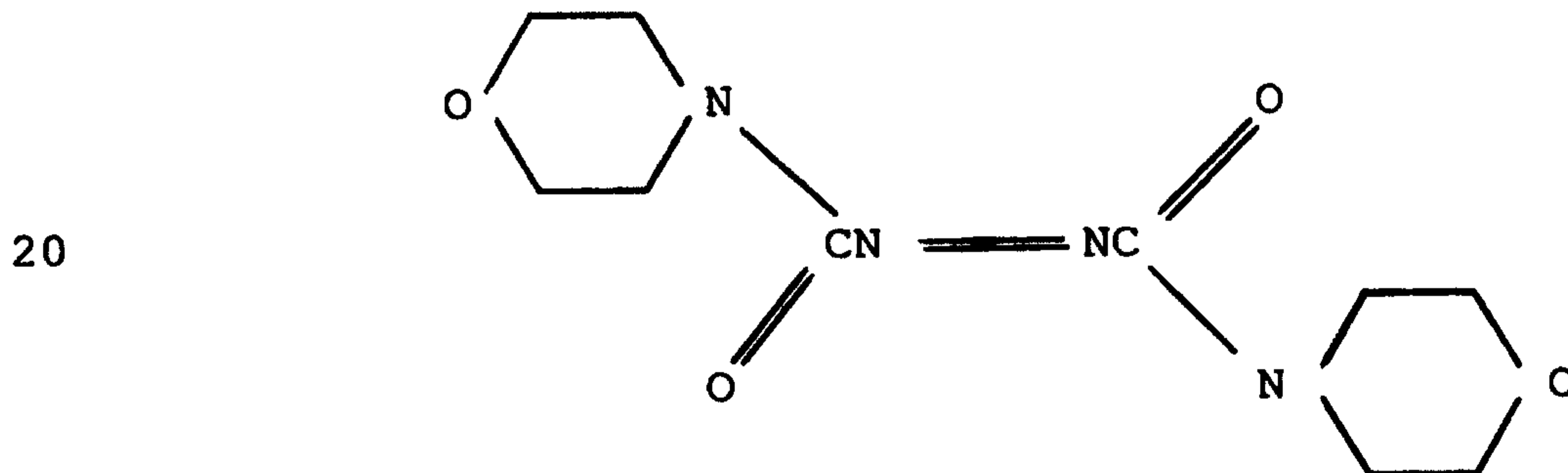
- 9 -

radicaux R<sup>3</sup> et R<sup>4</sup> pouvant représenter un groupe hydroxy et l'autre un atome d'hydrogène, ainsi que leurs sels, esters, et isomères pharmaceutiquement acceptables, pour leur application en tant que substances  
5 thérapeutiquement actives. On envisage en particulier l'acide azodihydroxamique de la formule ci-dessous



et ses sels et isomères.

De même enfin, un autre objet de l'invention  
15 concerne la 1,1'-(azodicarbonyl)-dimorpholine de formule



ainsi que ses sels, esters et isomères, pour leur  
25 application en tant que substances thérapeutiquement actives.

L'invention concerne également des produits contenant au moins un des dérivés azoïques répondant à la formule indiquée précédemment et de leurs isomères  
30 et au moins une cytokine, comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, dans la thérapie ou la prophylaxie d'affections humaines ou animales résultant d'une production cellulaire pathologique d'au moins une  
35 cytokine, différente de ladite au moins une cytokine

- 10 -

contenue dans le produit de combinaison, ou dans la  
thérapie ou la prophylaxie d'affections humaines ayant  
pour effet secondaire une production cellulaire  
pathologique d'au moins une cytokine, différente de  
5 ladite au moins une cytokine contenue dans le produit  
de combinaison.

D'autres formes et modes de réalisation de  
l'invention sont indiqués aux revendications annexées.

10 L'invention va à présent être expliquée de  
manière plus détaillée à l'aide des exemples donnés ci-  
dessous à titre illustratif, et non limitatif.

Les expériences décrites dans ces exemples  
ont été effectuées au Laboratoire d'Immunologie  
Expérimentale de l'Université Libre de Bruxelles, à  
15 l'exception de l'expérience de l'exemple 7, qui a été  
réalisée dans les laboratoires de la firme UCB S.A.

#### Exemple 1

Effet de l'ADA sur la production de IL-5.

20 Des cellules mononucléaires de sang  
périphérique (PMBC) de 5 donneurs humains sains sont  
isolées d'une manière courante à partir de 50 ml de  
leur sang et sont ensuite purifiées par centrifugation  
sur gradient de densité (Lymphoprep). Les cellules  
( $5 \cdot 10^6$  cellules/ml) sont activées par 0,3  $\mu\text{g/ml}$  de  
25 phytohémagglutinine (PHA) et mises en culture pendant  
72 heures, à 37°C, en présence de diverses  
concentrations en ADA (20, 10, 5, 1, 0,2 et 0,04  
 $\mu\text{g/ml}$ ). Le milieu de culture consiste en RPMI 1640  
complété de 10% de sérum de veau foetal et de  
30 glutamine, et il contient du mercaptoéthanol. Les  
solutions d'ADA sont préparées dans du dimé-  
thylsulfoxyde (DMSO), la concentration de travail en  
DMSO pendant les expériences étant de 0,1%. Ces derniè-  
res sont réalisées sur des plaques à 96 puits (200

- 11 -

µl/puits) et après centrifugation des plaques à 1500 tours par minute pendant 10 minutes, les surnageants sont récoltés et analysés pour leur teneur en IL-5 par un dosage immuno-enzymatique ELISA.

5 Les résultats de cette expérience ressortent du tableau 1 donné ci-dessous.

Tableau 1

Teneur en IL-5 en pourcentage de l'essai témoin

Concentration en ADA (µg/ml)	0	0,04	0,2	1	5	10	20
10 Donneur 1	100	83	54	48	44	29	9
Donneur 2	100	50	42	29	2	2	2
Donneur 3	100	58	63	57	23	28	26
Donneur 4	100	46	57	37	31	14	5
15 Donneur 5	100	55	58	49	34	31	7
Moyenne	100	58	55	44	27	21	10

Ces résultats montrent que, comparativement aux cellules non traitées, les PBMC des 5 donneurs testés produisent moins d'IL-5 en présence d'ADA. En  
20 moyenne, la production d'IL-5 est inhibée à 90% pour 20 µg/ml d'ADA, à 80% pour 10 µg/ml et à 45% pour 0,2 µg/ml.

Il faut noter que c'est la première fois qu'un effet de l'ADA est mis en évidence d'une manière  
25 tout à fait surprenante à des concentrations aussi faibles.

Des essais comparables ont été effectués en l'absence de mercaptoéthanol avec des résultats relativement semblables.

30 Exemple 2

Effet de l'ADA sur la production d'interféron-γ.

A partir des mêmes cultures cellulaires que celles utilisées dans l'Exemple 1, on a examiné la

- 12 -

présence d'interféron  $\gamma$  après traitement aux concentrations indiquées d'ADA. Ici aussi, pour 4 donneurs sur 5, on observe une inhibition, ainsi qu'il ressort du tableau 2 ci-dessous.

5

Tableau 2

Teneur en interféron- $\gamma$  en pourcentage de l'essai témoin

Concentration en ADA ( $\mu\text{g/ml}$ )	0	0,04	0,2	1	5	10	20
Donneur 1	100	62	112	87	68	23	21
10 Donneur 2	100	53	111	98	128	169	86
Donneur 3	100	99	70	49	62	43	40
Donneur 4	100	82	-	-	57	-	25
Donneur 5	100	38	-	-	25	-	16
Moyenne	100	67	98	78	68	78	38

15

Dans ces deux exemples la diminution de production des cytokines dépend de la quantité d'ADA mise en oeuvre (effet dépendant de la dose) et elle est observée pour des concentrations en ADA n'induisant pas d'effets cytotoxiques.

20

Exemple 3

Effet de l'ADA sur la production d'IL-2, d'IL-5 et d'interféron- $\gamma$  par des lymphocytes T purifiés.

25 Des PBMC de 3 donneurs sains sont purifiées par centrifugation sur gradient de densité (LymphoPrep). Les lymphocytes T sont obtenus à partir de  $15 \cdot 10^6$  PMBC incubées pendant 20 à 30 minutes dans un bain-marie de 37°C avec 0,8 ml d'un mélange LymphoKwik® (One Lambda, Inc., CA, USA). Celui-ci est un mélange de 30 complément et d'anticorps spécifique pour des motifs antigéniques de la membrane des cellules qui lysent les cellules non désirées (lymphocytes B, monocytes,....). Les cellules sont centrifugées et ensuite lavées à deux reprises. Par analyse FACS on constate que les cultures

- 13 -

de lymphocytes T ainsi produites contiennent plus de 85% de CD3 + cellules.

Ces cultures sont soumises à un traitement par diverses concentrations d'ADA. Les résultats sont donnés dans le tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3

Concentration en ADA ( $\mu\text{g/ml}$ )	0	1	5	10	20
En % par rapport au témoin					
IL-2 (moyenne de 2 donneurs)	100	68	27	9	3
IL-5 (moyenne de 2 donneurs)	100	67	60	40	16
IFN- $\gamma$ (moyenne des 3 donneurs)	100	82	34	14	4

15 Exemple 4

Effet de l'ADA sur la production d'IL-2, d'IL-5 et d'interféron- $\gamma$  par des lymphocytes T CD4 purifiés.

20 Des lymphocytes T CD4 purifiés (90% de pureté) et stimulés par du PMA (phorbol myristate acétate) + anticorps anti-CD28 de donneurs sains sont soumis à un traitement par diverses concentrations d'ADA. Les résultats sont donnés dans le tableau 4 ci-dessous.

- 14 -

Tableau 4

Concentration en ADA ( $\mu\text{g/ml}$ )		0	1	5	10	20
En % par rapport au témoin						
5	IL-2 (moyenne des 2 donneurs)	100	82	30	18	10
	IL-5 (1 donneur)	100	69	45	43	38
	IFN- $\gamma$ (moyenne des 2 donneurs)	100	73	36	15	12
10	TNF- $\alpha$ (5 donneurs)	100	90	48	32	14

Dans les exemples 3 et 4, les résultats sont exprimés en % en considérant le milieu sans ADA comme 100%. Les concentrations correspondant à 100% sont respectivement de 90.000 pg/ml de IL-2, 1100 pg/ml de IL-5, 1900 pg/ml de IFN $\gamma$  et 2870 pg/ml de TNF- $\alpha$ . Les résultats sont la moyenne de mesures ELISA indépendantes.

On constate, pour ces donneurs, que la production d'IL-5, d'interféron- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  est inhibée à la concentration de 20  $\mu\text{g/ml}$  d'ADA. Des concentrations inférieures inhibent déjà la sécrétion d'IL-2 par les lymphocytes.

Il ressort de ces expériences que l'ADA agit sur la production et la sécrétion de cytokines à des concentrations d'une manière surprenante très largement inférieures à celles nécessaires pour que cette substance ait une action contre la prolifération des rétrovirus VIH dans des cellules et contre la prolifération de cellules de type cancéreux, ce qui permet d'envisager son emploi, sans problème de toxicité, dans un domaine thérapeutique dans lequel on ne pouvait pas s'attendre jusqu'à présent à son application.

- 15 -

Exemple 5

Effet de l'ADA sur la production de cytokines in vivo.

On effectue une injection i.p. unique d'azodicarbonamide (ADA) en une dose de 100 mg/kg de poids de corps ou du support correspondant sur des souris BALB/C (Harlan, Zeist, Pays-Bas), un jour avant l'inoculation i.p. de 25 µg de 145-2C11 mAb de hamster, un anti-souris CD<sub>3</sub> mAb qui induit une activation massive des cellules T polyclonales in vivo conduisant à une libération systémique de cytokines. Des sérums sont collectés 2, 4, 8 et 24 heures après le traitement anti-CD<sub>3</sub> et les niveaux de cytokines (IL-2, IL-4) sont déterminés par un test ELISA (Genzyme).

Sur les figures 1 et 2, on a représenté des graphiques avec en ordonnée les quantités de IL-2 et de IL-4 dans le sérum, sous la forme d'une moyenne de 5 animaux testés. En abscisse sont indiqués les moments des prélèvements de sang. Les barres vides correspondent aux résultats obtenus avec le support et les barres grisées à ceux obtenus avec un traitement préalable d'ADA.

Il ressort clairement de cet essai et des figures 1 et 2 qui l'illustrent que le traitement à l'ADA provoque une diminution significative de la libération des interleukines IL-2 et IL-4 après injection de 145-2C11 mAb dans des souris.

Exemple 6

Effet de l'ADA sur le rejet de greffes allogènes.

Des greffes de peau bien connues pour leur dépendance vis-à-vis des cellules T sont préparées à partir de queues de souris femelles C57BL/6.CH-2<sup>bm12</sup> (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA). Elles sont greffées sur les flancs de souris C57BL/6 (Harlan,

- 16 -

Zeist, Pays-Bas). Un bandage est appliqué autour du trou. Ce bandage est enlevé 10 jours après et les greffes sont contrôlées chaque jour. Les souris d'essai reçoivent journallement une injection i.p. de 50 mg/kg de poids de corps d'ADA et les témoins reçoivent une quantité équivalente du support correspondant, jusqu'à ce qu'un rejet aigu soit observé.

Sur le graphique de la figure 3 on a indiqué en ordonnée, en %, la survivance de la greffe de peau et en abscisse le nombre de jours après la transplantation.

On peut constater que le rejet de l'allogreffe de peau a été significativement retardé chez les souris traitées à l'ADA (triangles noirs) par rapport au témoin (cercles noirs), ce qui confirme que l'ADA exerce aussi des effets supprimeurs sur des cellules T in vivo.

#### Exemple 7

200 ml de sang sont extraits sur l'héparine à partir de volontaires sains, mâles et femelles. Des cellules mononucléées sont isolées par centrifugation Ficoll-Hypaque et remises en suspension dans un milieu constitué de RPMI 1640 complété de 5% de sérum autologue, de 1 mN de glutamine, de 1001 IU/ml de pénicilline, de 10 µg/ml de streptomycine, de 10 µg/ml de phytohémagglutinine (pha), de 10 µg/ml d'acétate myristate de phorbol (pma) et de composés d'essai, comme indiqué, par expérience individuelle, à une densité cellulaire de 2.000.000 par ml. Les cellules sontensemencées dans des plaques de microtitrage à 96 puits à 250 µl par puits et elles sont mises à incuber pendant 48 heures à 37°C. Ensuite, les surnageants sont récoltés et les concentrations en IL-2 et en IL-5 sont quantifiées par un ELISA standard, utilisant une technologie de biotine - streptavidine. En variante, la

- 17 -

pha a été remplacée par 0,1 µg/ml d'anticorps monoclonaux dirigés contre des CD3 humains, de façon à obtenir une activation plus spécifique des cellules T.

Tableau 5

Composés d'essai	Inhibition de IL-2 (%)	Inhibition de IL-2 (%)		Inhibition de IL-5 (%)	
		10 µM	32 µM	10 µM	32 µM
A	9	3	28	12	29
B	6	0,2	11	17	39
C	5	6	9	37	51

5

A = Diamide

B = 1,1'-(azodicarbonyl)-dipipéridine

C = 1,1'-(azodicarbonyl)-dimorpholine

Exemple 8

10 Effet de l'ADA sur la production in vivo d'interféron-γ.

Des rats Brown-Norway sont sensibilisés activement à l'ovalbumine 21 jours plus tard, les rats sont traités par voie d'aérosol avec une solution  
15 d'ovalbumine à 5% dans du NaCl 0,9%. 24 heures plus tard, la réactivité bronchique à la métacholine est mesurée sur les rats anesthésiés. Dès la fin de la mesure de réactivité bronchique, des splénocytes sont prélevés de ces rats et mis en culture pour déterminer  
20 la production d'IFN-γ par ces cellules.

De l'ADA est administré 24 heures avant le début de la phase de sensibilisation à l'ovalbumine et quotidiennement pendant toute la durée de l'essai, à l'exception du jour des mesures. L'ADA est administré  
25 par voie orale, en suspension dans de la méthylcellulose 1%, en un dosage de 500 mg/kg et de 1000 mg/kg de poids corps, deux fois par jour.

- 18 -

Les résultats sont réunis sur la figure 4. En ordonnée sont indiquées les quantités d'IFN- $\gamma$  en pg/mg de protéine. En abscisse les barres vides A à F correspondent aux expérimentations suivantes :

- 5 A - pas de stimulation à l'ovalbumine, pas de substance active
- B - pas de stimulation à l'ovalbumine, ADA à 500 mg/kg p.o.
- 10 C - pas de stimulation à l'ovalbumine, ADA à 1000 mg/kg p.o.
- D - stimulation à l'ovalbumine, pas de substance active
- E - stimulation à l'ovalbumine, ADA à 500 mg/kg p.o.
- F - stimulation à l'ovalbumine, ADA à 1000 mg/kg p.o.

15 Il ressort clairement de cet essai que l'ADA a un effet d'inhibition de la production d'INF- $\gamma$  par les splénocytes de rats traités pour montrer une forte réactivité bronchique.

#### Exemple 9

Gélules à administrer par voie orale.

20 Composition d'une gélule :

500 mg d'ADA

10 mg de monostéarate de glycérine

10 mg de dioxyde de silicium précipité

5 mg de stéarate de magnésium.

25 On introduit d'une manière courante cette composition dans des capsules de gélatine. On peut par exemple prévoir une administration de gélules à dose croissante (maximum 100 mg/kg/jour) à des patients qui reçoivent une greffe rénale ou autre allogreffe (coeur, 30 poumon, foie, etc...) dans les 72 heures au plus tard précédant la transplantation, afin de diminuer ou de supprimer la phase de rejet aiguë. Un contrôle fréquent de la production d'IL-2 par les patients est recommandé. Les gélules seront administrées seules ou

- 19 -

en association avec de la cyclosporine et des corticostéroïdes ou tout autre traitement immunosuppresseur approprié.

Exemple 10

5 Tablettes enrobées.

On réalise d'une manière courante des tablettes contenant 250 mg d'azobisformamidine à l'aide des excipients suivants : hydroxypropylméthylcellulose, hydroxypropylcellulose, dioxyde de titane, 10 polyéthylèneglycol 400, oxyde noir de fer.

Ces tablettes peuvent être administrées pour réduire de manière adéquate la production d'IgE grâce à la diminution d'IL-5 dans les phénomènes allergiques (rhinite allergique saisonnière par exemple). Ce 15 traitement sera instauré afin d'obtenir une rémission et son maintien.

Exemple 11

Forme à injecter.

On réalise une forme injectable à base de 1g 20 de diméthylazobisformamide et d'eau distillée apyrogène additionnée de NaCl.

Ces formes sont à administrer par exemple dans les phases de poussées aiguës de production d'autoanticorps (maladies autoimmunes, lupus 25 erythémateux, diabète autoimmun, thyroïdite autoimmune, etc...) tout en gardant à l'esprit que l'amélioration s'observe habituellement après un délai de six à huit semaines.

Exemple 12

30 Crème ou onguent.

Une crème ou un onguent est réalisé avec de la 1,1'-azobis-[chloroformamidine] (choroazodine) et comme excipient, notamment de la glycérine, de l'huile de paraffine, de la vaseline.

- 20 -

Cette crème peut être appliquée localement à titre d'immunomodulateur dans la sclérodermie.

Exemple 13

On peut aussi prévoir des systèmes de distribution transdermique de diméthylazobisformamide.

Ces systèmes peuvent être appliqués de manière à obtenir une diminution soutenue des lymphokines circulant chez des patients souffrant d'asthme difficile à contrôler.

Ce traitement peut être combiné avec l'usage de traitements conventionnels.

Exemple 14

Comprimés à administrer par voie orale.

Composition d'un comprimé :

100 mg d'ADA  
10 mg de monostéarate de glycérine  
10 mg de dioxyde de silicium précipité  
5 mg de stéarate de magnésium.

On introduit d'une manière courante cette composition dans une machine à comprimer.

Dans le cadre d'un traitement par exemple d'un cancer, on peut prévoir une administration d'IL-2 au patient. La teneur surabondante d'IL-2 dans le corps du patient ainsi traité a pour effet de stimuler une surproduction par les cellules de ce dernier d'autres cytokines, et notamment d'IL-5, ce qui entraîne des effets secondaires, tels que pemphigus, thyroïdite, polyarthrite rhumatoïde, maladie de Crohn, sclérodermie, hyperéosinophilie, etc....

On peut par conséquent prévoir conjointement à l'administration d'IL-2, la prise régulière de comprimés d'ADA pour contrecarrer ces effets secondaires.

L'administration d'IL-2 et d'ADA peut se faire simultanément, séparément ou d'une manière étalée

- 21 -

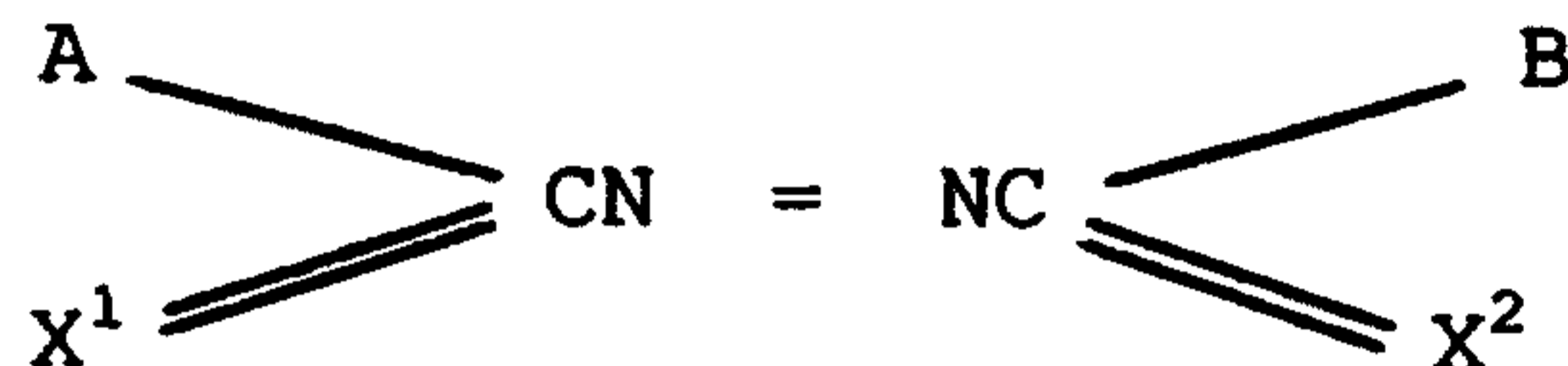
dans le temps.

Il doit être entendu que la présente invention n'est en aucune façon limitée aux modes et formes de réalisation donnés ci-dessus et que bien des  
5 modifications peuvent y être apportées sans sortir du cadre des revendications annexées.

- 22 -

**REVENDICATIONS**

1. Procédé d'inhibition in vitro de production de cytokines par des cellules, notamment animales ou humaines, et de leur sécrétion, comprenant une application sur ces cellules d'au moins un des dérivés azoïques répondant à la formule



10

dans laquelle A représente un groupe carboxyle ou un groupe  $-\text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{R}^1 \\ \diagdown \text{R}^2 \end{array}$ , B représente un groupe carboxyle ou un groupe  $-\text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{R}^3 \\ \diagdown \text{R}^4 \end{array}$ , R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> et R<sup>4</sup> sont identiques ou différents et représentent chacun indépendamment un atome d'hydrogène ou d'halogène, un radical d'hydrocarbure aliphatique ou aromatique, éventuellement substitué, ou un groupe hydroxy, R<sup>1</sup> et R<sup>2</sup> pouvant être liés ensemble pour former un noyau hétérocyclique avec leur atome d'azote adjacent, et R<sup>3</sup> et R<sup>4</sup> pouvant être liés ensemble pour former un noyau hétérocyclique avec leur atome d'azote adjacent, X<sup>1</sup> et X<sup>2</sup> sont identiques ou différents et représentent chacun indépendamment un atome d'oxygène ou un groupe NR<sup>5</sup>, dans lequel R<sup>5</sup> est un atome d'hydrogène ou d'halogène, un radical d'hydrocarbure aliphatique ou aromatique, éventuellement substitué, ou un groupe nitro, et dans lequel, lorsque deux groupes NR<sup>5</sup> sont simultanément présents, chaque R<sup>5</sup> peut être identique à ou différent de l'autre, ainsi que de leurs sels, esters et isomères.

30

2. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend une inhibition de production et de sécrétion d'interleukines.

3. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend une inhibition de

35

- 23 -

production et de sécrétion d'une cytokine choisie parmi le groupe comprenant de l'interféron- $\gamma$  et du facteur de nécrose tumorale  $\alpha$ .

4. Procédé suivant l'une quelconque des  
5 revendications 1 à 3, caractérisé en ce que  $R_1$  à  $R_5$  représentent chacun un radical d'hydrocarbure aliphatique ou aromatique comportant de 1 à 6 atomes de carbone.

5. Procédé suivant l'une quelconque des  
10 revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le dérivé azoïque est choisi parmi le groupe comprenant des dérivés d'azobisformamide, tels que de la 1,1'-azobisformamide, de la 1,1'-azobisnitroformamide, de la 2,2'-azobisméthylformamide, de la 1,1'-  
15 azobisfluoroformamide, de la 1-monochloro-azobisformamide, et de la azobis-[chloroformamide], des dérivés d'azobisformamide, tels que du 1,1'-azobisformamide et du diméthyl-azobisformamide, de la  
20 1,1'-(azodicarbonyl)-dipipéridine, de la 1,1'-(azodicarbonyl)-dimorpholine, de l'acide  
/ azodicarboxamique et ses sels, et de l'acide  
azodicarboxylique et ses sels.

6. Procédé suivant l'une quelconque des  
25 revendications 1 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend une application du dérivé azoïque sur les cellules à une dose n'induisant pas une apoptose de celles-ci.

7. Procédé suivant l'une quelconque des  
30 revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il comprend une application du dérivé azoïque sur les cellules à une concentration micromolaire de 0,4 à 200.

8. Procédé suivant la revendication 7, caractérisé en ce qu'il comprend une application du dérivé azoïque sur les cellules à une concentration micromolaire de 2 à 20, de préférence de 2 à 10.

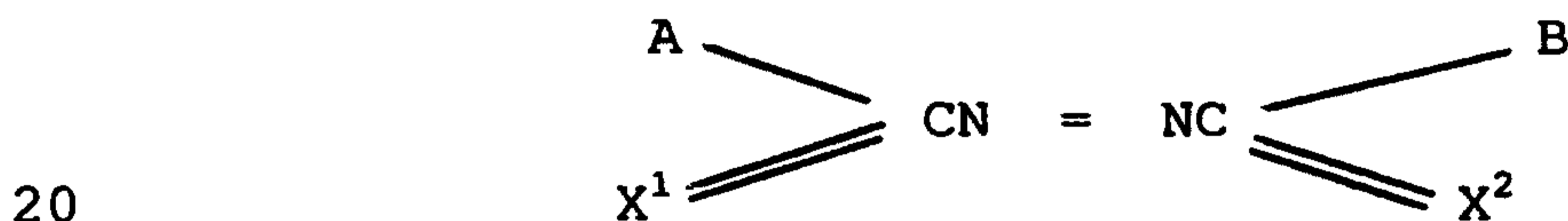
- 24 -

9. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il comprend l'application susdite d'une composition comportant au moins un desdits dérivés azoïques et un support approprié.

10. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend ladite application sur des cellules isolées de macroorganismes ou des cellules de microorganismes.

11. Procédé suivant l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend ladite application sur des cellules d'un organe ou tissu multicellulaire extrait d'un corps humain ou animal.

12. Utilisation d'au moins un des dérivés azoïques répondant à la formule



dans laquelle A représente un groupe carboxyle ou un groupe  $-\text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{R}^1 \\ \diagdown \text{R}^2 \end{array}$ , B représente un groupe carboxyle ou un groupe  $-\text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{R}^3 \\ \diagdown \text{R}^4 \end{array}$ ,  $\text{R}^1$ ,  $\text{R}^2$ ,  $\text{R}^3$  et  $\text{R}^4$  sont identiques ou différents et représentent chacun indépendamment un atome d'hydrogène ou d'halogène, un radical d'hydrocarbure aliphatique ou aromatique, éventuellement substitué, ou un groupe hydroxy,  $\text{R}^1$  et  $\text{R}^2$  pouvant être liés ensemble pour former un noyau hétérocyclique avec leur atome d'azote adjacent, et  $\text{R}^3$  et  $\text{R}^4$  pouvant être liés ensemble pour former un noyau hétérocyclique avec leur atome d'azote adjacent,  $\text{X}^1$  et  $\text{X}^2$  sont identiques ou différents et représentent chacun indépendamment un atome d'oxygène ou un groupe  $\text{NR}^5$ , dans lequel  $\text{R}^5$  est un atome d'hydrogène ou d'halogène,

- 25 -

un radical d'hydrocarbure aliphatique ou aromatique, éventuellement substitué, ou un groupe nitro, et dans lequel, lorsque deux groupes NR<sup>5</sup> sont simultanément présents, chaque R<sup>5</sup> peut être identique à ou différent de l'autre, ainsi que de leurs sels, esters et isomères, pour la fabrication de médicaments à mettre en oeuvre dans le traitement ou la prophylaxie d'affections humaines ou animales résultant d'une production cellulaire pathologique de cytokines, à l'exception des maladies virales.

13. Utilisation suivant la revendication 12, caractérisée en ce que le médicament ainsi fabriqué contient une quantité thérapeutiquement efficace d'au moins un desdits dérivés azoïques ou de leurs sels, esters et isomères ainsi qu'un support pharmaceutiquement approprié.

14. Dérivés azoïques répondant à la formule de la revendication 1, dans laquelle au moins un des groupes A et B représente un groupe carboxyle, ainsi que leurs sels, esters et isomères pharmaceutiquement acceptables, pour leur application en tant que substances thérapeutiquement actives.

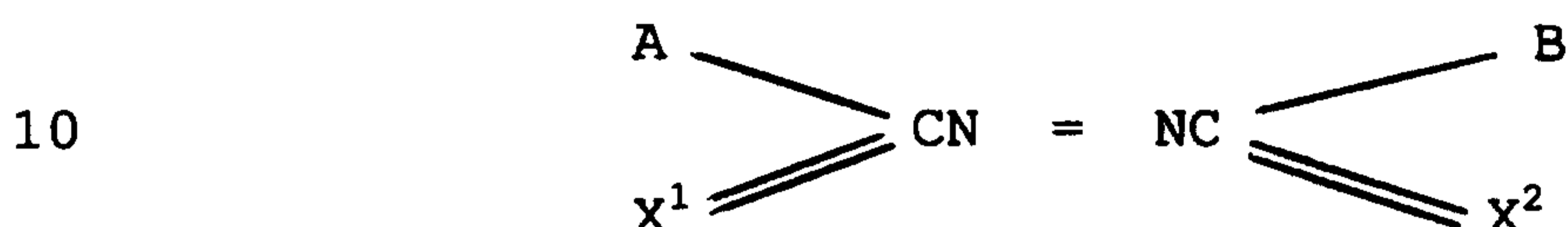
15. Dérivés azoïques répondant à la formule de la revendication 1, dans laquelle le groupe A représente le groupe  $-N \begin{matrix} \nearrow R^1 \\ \searrow R^2 \end{matrix}$ , l'un des radicaux R<sup>1</sup> et R<sup>2</sup> représentant un groupe hydroxy et l'autre un atome d'hydrogène, et dans laquelle le groupe B peut représenter simultanément le groupe  $-N \begin{matrix} \nearrow R^3 \\ \searrow R^4 \end{matrix}$ , l'un des radicaux R<sup>3</sup> et R<sup>4</sup> pouvant représenter un groupe hydroxy et l'autre un atome d'hydrogène, ainsi que leurs sels, esters et isomères pharmaceutiquement acceptables, pour leur application en tant que substances thérapeutiquement actives.

16. Dérivés azoïques répondant à la formule de la revendication 1, dans laquelle X<sup>1</sup> et X<sup>2</sup>

- 26 -

représentent de l'oxygène, et  $NR^1R^2$  ainsi que  $NR^3R^4$  représentent chacun un hétérocycle hexagonal contenant en supplément un atome d'oxygène en position 4, ainsi que leurs sels, esters et isomères pharmaceutiquement acceptables, pour leur application en tant que substances thérapeutiquement actives.

17. Produit contenant au moins un des dérivés azoïques répondant à la formule

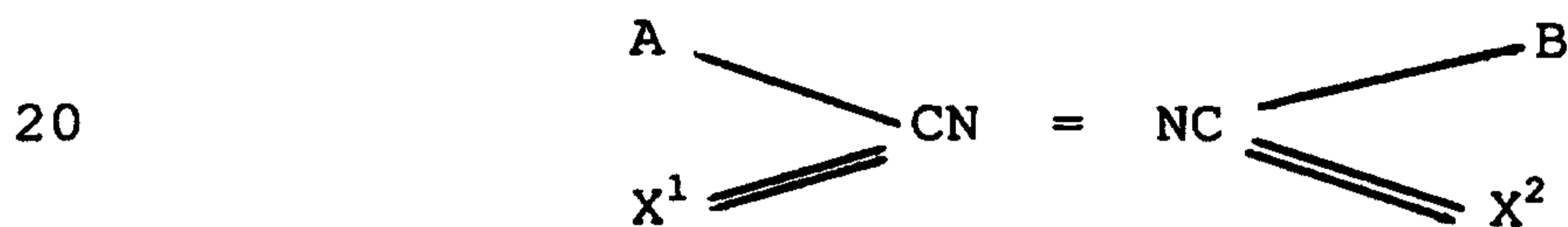


dans laquelle A représente un groupe carboxyle ou un groupe  $-N \begin{array}{l} \diagup R^1 \\ \diagdown R^2 \end{array}$ , B représente un groupe carboxyle ou un groupe  $-N \begin{array}{l} \diagup R^3 \\ \diagdown R^4 \end{array}$ ,  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$  et  $R^4$  sont identiques ou différents et représentent chacun indépendamment un atome d'hydrogène ou d'halogène, un radical d'hydrocarbure aliphatique ou aromatique, éventuellement substitué, ou un groupe hydroxy,  $R^1$  et  $R^2$  pouvant être liés ensemble pour former un noyau hétérocyclique avec leur atome d'azote adjacent, et  $R^3$  et  $R^4$  pouvant être liés ensemble pour former un noyau hétérocyclique avec leur atome d'azote adjacent,  $X^1$  et  $X^2$  sont identiques ou différents et représentent chacun indépendamment un atome d'oxygène ou un groupe  $NR^5$ , dans lequel  $R^5$  est un atome d'hydrogène ou d'halogène, un radical d'hydrocarbure aliphatique ou aromatique, éventuellement substitué, ou un groupe nitro, et dans lequel, lorsque deux groupes  $NR^5$  sont simultanément présents, chaque  $R^5$  peut être identique à ou différent de l'autre, ainsi que leurs sels, esters ou isomères, caractérisé en ce qu'il comprend en outre au moins une cytokine, comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, dans la thérapie ou la prophylaxie d'affections

- 27 -

humaines ou animales résultant d'une production cellulaire pathologique d'au moins une cytokine, différente de ladite au moins une cytokine contenue dans le produit de combinaison, ou dans la thérapie ou la prophylaxie d'affections humaines ou animales ayant pour effet secondaire une production cellulaire pathologique d'au moins une cytokine, différente de ladite au moins une cytokine contenue dans le produit de combinaison.

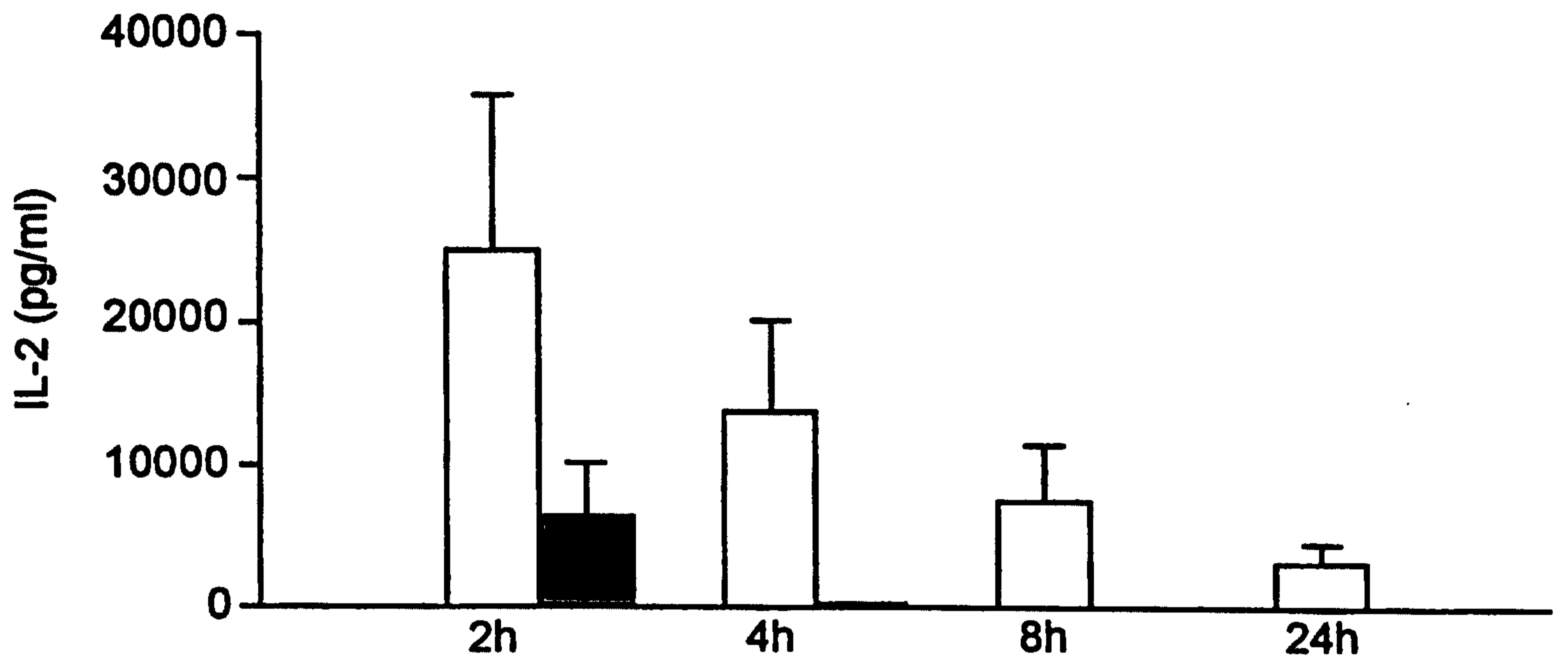
10 18. Méthode de traitement thérapeutique ou prophylactique d'un corps humain ou animal susceptible de présenter une production cellulaire pathologique de cytokines, à l'exception des maladies virales, comprenant l'administration d'une quantité  
15 thérapeutiquement efficace d'une substance active audit corps humain ou animale, cette substance active étant choisie parmi un ou plusieurs dérivés azoïques répondant à la formule



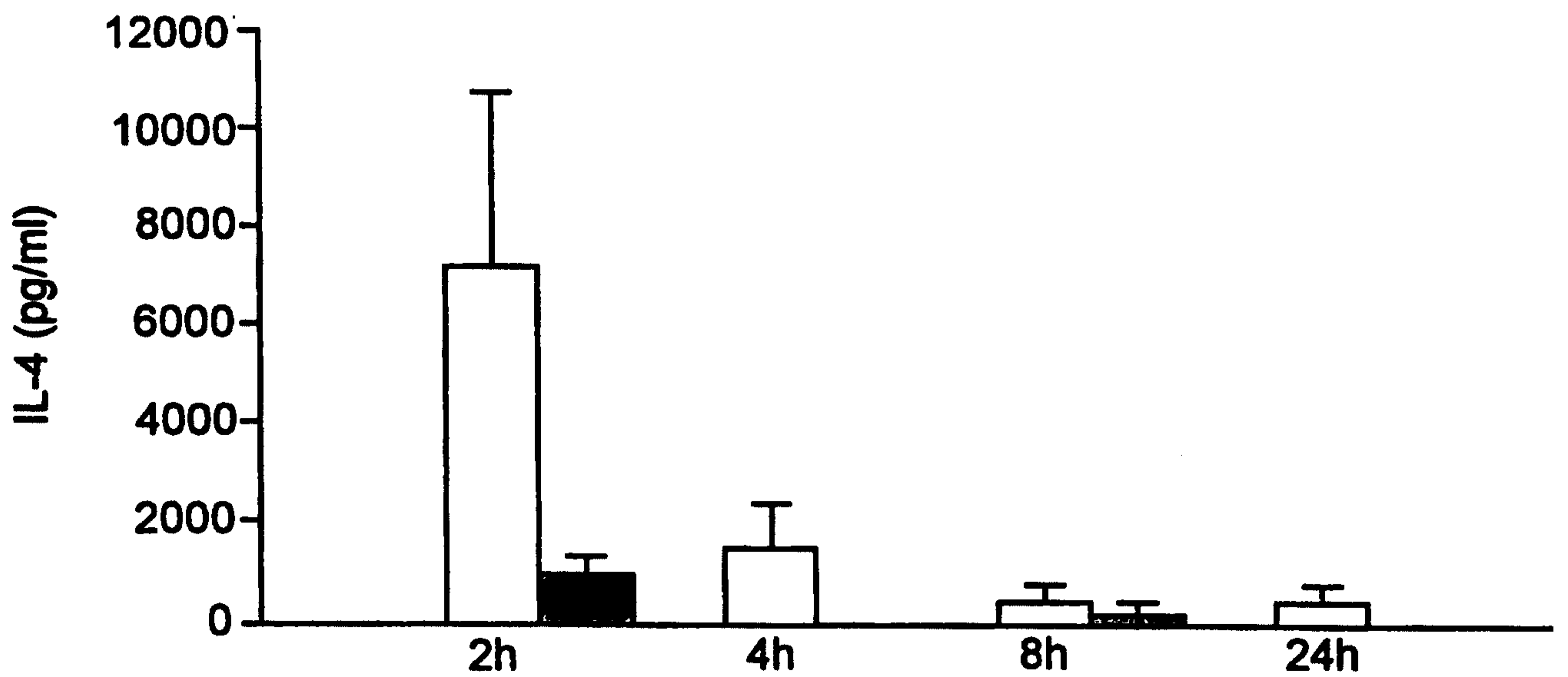
dans laquelle A représente un groupe carboxyle ou un groupe  $-\text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{R}^1 \\ \diagdown \text{R}^2 \end{array}$ , B représente un groupe carboxyle ou un groupe  $-\text{N} \begin{array}{l} \diagup \text{R}^3 \\ \diagdown \text{R}^4 \end{array}$ , R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> et R<sup>4</sup> sont identiques ou différents et représentent chacun indépendamment un atome d'hydrogène ou d'halogène, un radical d'hydrocarbure aliphatique ou aromatique, éventuellement substitué, ou un groupe hydroxy, R<sup>1</sup> et R<sup>2</sup> pouvant être liés ensemble pour former un noyau hétérocyclique avec leur atome d'azote adjacent, et R<sup>3</sup> et R<sup>4</sup> pouvant être liés ensemble pour former un noyau hétérocyclique avec leur atome d'azote adjacent, X<sup>1</sup> et X<sup>2</sup> sont identiques ou différents et représentent chacun  
30 indépendamment un atome d'oxygène ou un groupe NR<sup>5</sup>,  
35

- 28 -

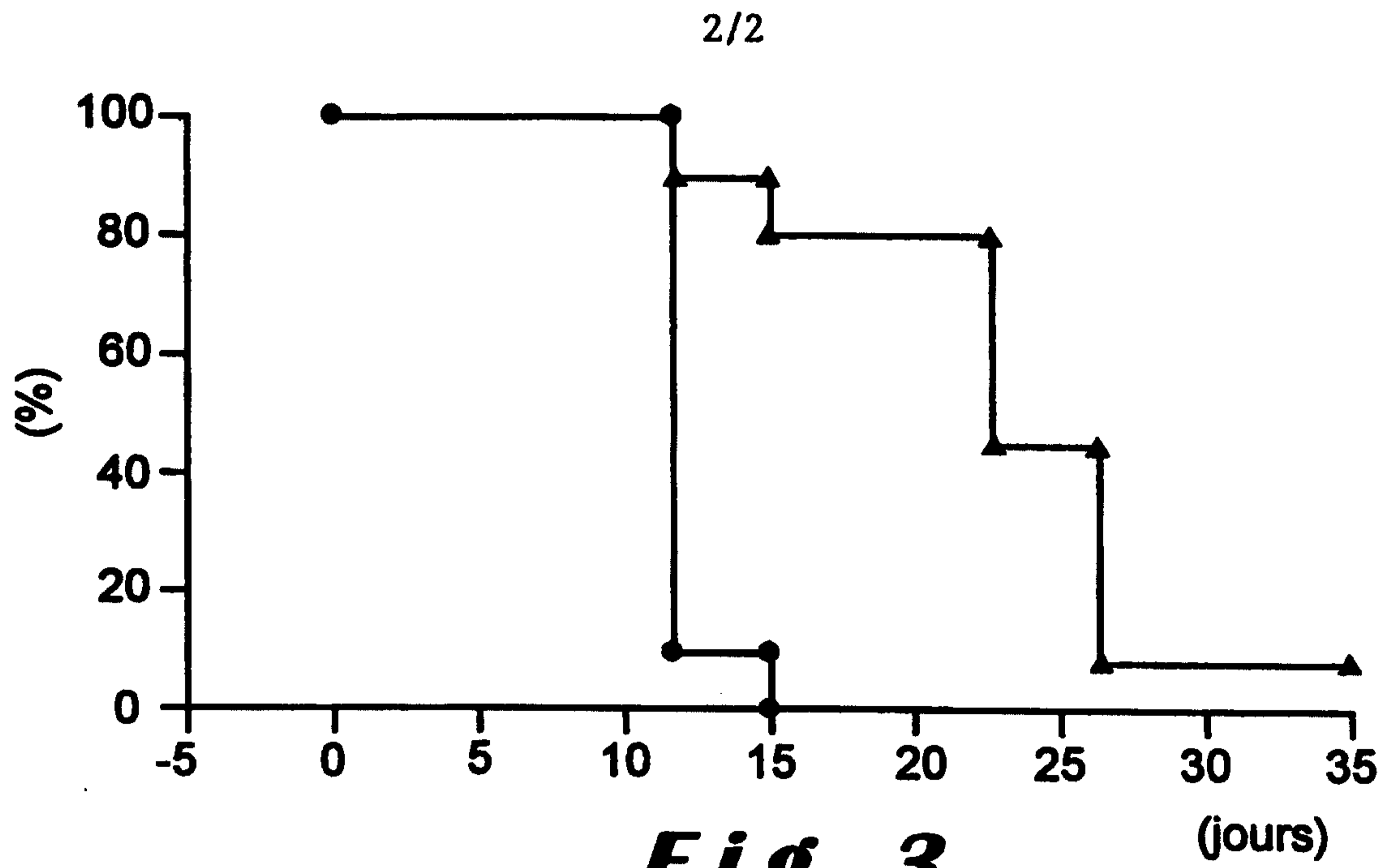
dans lequel  $R^5$  est un atome d'hydrogène ou d'halogène, un radical d'hydrocarbure aliphatique ou aromatique, éventuellement substitué, ou un groupe nitro, et dans lequel, lorsque deux groupes  $NR^5$  sont simultanément  
5 présents, chaque  $R^5$  peut être identique à ou différent de l'autre, ainsi que leurs sels, esters et isomères.



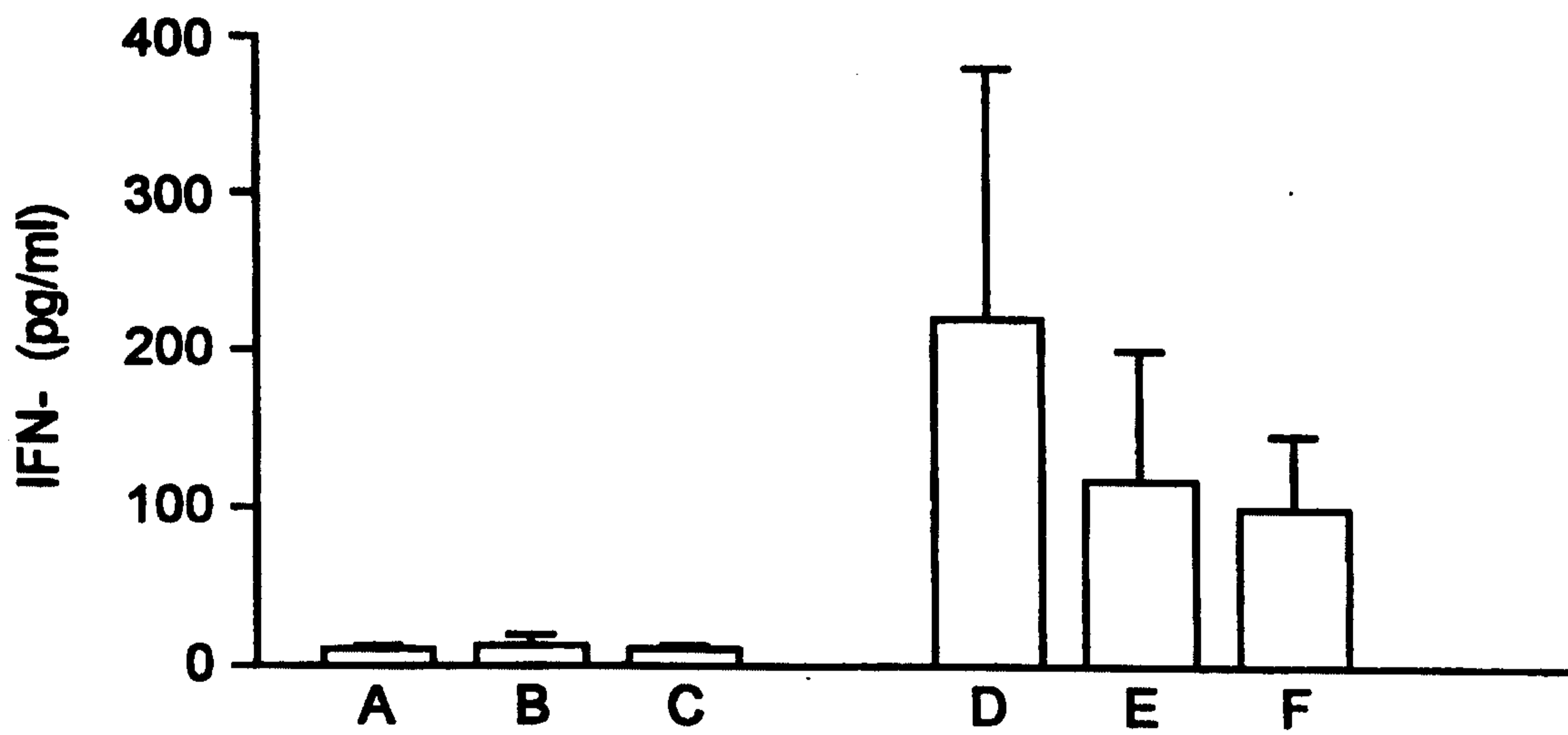
**Fig. 1.**



**Fig. 2.**



**Fig. 3**



**Fig. 4**