



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 587**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/13** (2006.01)  
**A61P 31/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05791430 .1**  
96 Fecha de presentación : **03.10.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1793844**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.06.2007**

54 Título: **Uso de [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-ciclosporina para el tratamiento de infección por hepatitis C.**

30 Prioridad: **01.10.2004 PCT/IB2004/003205**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**27.04.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**27.04.2011**

73 Titular/es: **DEBIOPHARM S.A.**  
**Forum "Apres-Demain", Ch. Messidor 5-7**  
**1002 Lausanne, CH**

72 Inventor/es: **Scalfaro, Pietro;**  
**Dumont, Jean-Maurice;**  
**Vuagniaux, Grégoire y**  
**Mauvernay, Rolland-Yves**

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 357 587 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere al uso de [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA para el tratamiento de infección por virus de hepatitis C (HCV), y a una composición farmacéutica que comprende dicho [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA, posiblemente en combinación con Ribavirina o un interferón alfa. La presente invención se define en las reivindicaciones.

5 El HCV se clonó y caracterizó hace aproximadamente 15 años por Choo y colegas (véase Science 244, (1989), 359-362). El HCV pertenece a la familia de Flaviviridae, y comprende una nucleocápside con cubierta y un genoma de ARN monocatenario de polaridad positiva (véase Bartenschlager *et al.*, Antiviral Res. 60, (2003), 91-102). El HCV se transmite principalmente por la sangre, productos de la sangre y transmisión vertical durante el embarazo. La introducción de ensayos de diagnóstico para identificar productos de la sangre ha reducido significativamente la tasa de  
10 nueva infección.

Aun así, el HCV sigue siendo un problema médico serio. Actualmente hay aproximadamente 170 millones de personas infectadas con HCV. El curso inicial de la infección es típicamente leve. Sin embargo, el sistema inmunitario es a menudo incapaz de aclarar el virus, y las personas con infecciones persistentes tienen riesgo elevado de sufrir cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular (véase Poynard *et al.*, Lancet 349, (1997), 825-832).

15 No existe ninguna vacuna disponible, y las opciones terapéuticas son muy limitadas (Manns *et al.*, Indian J. Gastroenterol. 20 (Supl. 1), (2001), C47-51; Tan *et al.*, Nat. Rev. Drug Discov. 1, (2002), 867-881).

La terapia actual se basa en una combinación de interferón alfa y ribavirina. Esta terapia produce una respuesta antiviral sostenida en el 85-90% de pacientes infectados con los genotipos 2 y 3, pero, desafortunadamente, sólo en aproximadamente 45% de pacientes infectados con el genotipo 1 predominante. Adicionalmente, los efectos secundarios son significativos, e incluyen mialgia, artralgia, cefalea, fiebre, depresión grave, leucopenia y anemia hemolítica.  
20

Claramente, se necesitan terapias adicionales, con una mayor actividad antivírica y un mejor perfil de seguridad, para el tratamiento de infección por HCV, particularmente, por ejemplo, en el caso de la prevención de la recidiva del HCV. A fin de establecer el perfil de seguridad, para el tratamiento clínico de la infección por HCV son particularmente relevantes los criterios tales como baja citotoxicidad y efecto citostático, y alto índice de selectividad.  
25

Recientemente se describió un nuevo enfoque para el tratamiento de infección por HCV usando ciclosporinas, mediante observaciones clínicas (véanse Teraoka *et al.*, Transplant Proc., 1988, 20 (3 supl 3), 868-876, e Inoue *et al.* J Gastroenterol, 2003, 38, 567-572). Recientemente, se demostró que la ciclosporina A (CsA) inhibió la replicación intracelular *in vitro* de un replicón subgenómico del HCV a concentraciones farmacéuticas clínicamente logrables (véanse Watashi *et al.*, Hepatology 38, 2003, 1282-1288, y Nakagawa *et al.*, BBRC 313, 2004, 42-47). Ambos grupos sugirieron que el efecto anti-HCV de la CsA no estaba asociado con actividad inmunosupresora, basándose en las observaciones realizadas con el uso respectivamente de un macrólido inmunosupresor, es decir, el compuesto conocido con el nombre FK506, y un derivado de ciclosporina A no inmunosupresor, es decir, el compuesto conocido con el nombre NIM 811 o [Melle]<sup>4</sup>-CsA. Nakagawa *et al.* considera que la expansión de las aplicaciones de CsA puede provocar problemas sustanciales debido a sus propiedades inmunosupresoras bien conocidas, y sugiere que una solución para superar este problema sería considerar el uso de análogos de ciclosporina no inmunosupresores.  
30  
35

Durante los últimos 15 años, se ha realizado un número de estudios de química médica con el objeto de identificar tales análogos de ciclosporina no inmunosupresores, y el compuesto NIM 811 es uno de los compuestos más representativos que tienen tal propiedad.

40 NIM 811, junto con otros 9 derivados de ciclosporina A, fueron dados a conocer por Ko *et al.* en la solicitud de patente EP 0 484 281 por sus propiedades no inmunosupresoras, y se consideraron como potencialmente útiles en el tratamiento de la infección por HIV y en la prevención de SIDA. El diseño de esos derivados implicó la modificación de los aminoácidos en las posiciones 4 y/o 5 de ciclosporina A.

45 Modificando los aminoácidos en las posiciones 2 y/o 6 de ciclosporina A, Sigal *et al.* sintetizaron un total de 61 análogos de ciclosporina, y observaron que tales modificaciones químicas inducen una disminución en la actividad inmunosupresora (véase Sigal *et al.*, J. Exp. Med., 173, 1991, 619-628).

Se describieron intentos adicionales para modificar aminoácidos en la posición 3 de ciclosporina A, a fin de obtener compuestos inmunosupresores, en particular por Barrière *et al.*, en los documentos WO 98/28328, W098/28329 y WO 98/28330.

50 Wenger *et al.* han diseñado una serie de compuestos que difieren de la ciclosporina A en la posición 3, en la que contienen un aminoácido hidrófobo o neutro no voluminoso N-metilado distinto de una glicina, y en la posición 4, en la que contienen un aminoácido hidrófobo o neutro N-metilado o N-etilado distinto de una leucina, y dan a conocer que esos compuestos tienen una potencia elevada para inhibir la replicación del HIV-1 y carecen esencialmente de actividad inmunosupresora (véanse la solicitud de patente internacional WO 00/01715 y Tetrahedron Lett., 41, (2000), 7193-6).

55 El objetivo de la presente invención es proporcionar al médico una nueva terapia para el tratamiento de la

infección por HCV, particularmente por ejemplo en el caso de la prevención de la recidiva del HCV. Esta terapia debería ofrecer una mayor actividad antivírica y un mejor perfil de seguridad en comparación con la terapia ya aprobada o las recientemente propuestas.

5 Sorprendentemente, se ha encontrado que la administración a un paciente infectado con HCV de un compuesto muy específico, es decir, [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA, satisface los requisitos anteriores. Se observó que, además de su propiedad no inmunosupresora, [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA tiene una afinidad significativamente aumentada por ciclofilinas, afinidad incrementada la cual se correlaciona con una eficacia elevada frente a la inhibición de la replicación del HCV.

10 En consecuencia, uno de los objetos de la presente invención se refiere al uso de [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA para la preparación de un producto médico destinado al tratamiento de la infección por HCV en un paciente, o para la prevención de la recidiva del HCV.

[D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA fue dada a conocer por Wenger *et al.* en el documento WO 00/01715, y se le ha dado el número de registro CAS 254435-95-5. Es un undecapéptido cíclico descrito por la siguiente fórmula:



1      2      3      4      5      6      7      8      9      10      11

15 en la que MeBmt es N-metil-(4R)-4-but-2E-en-1-il-4-metil-(L)treonina,  $\alpha$ Abu es ácido L- $\alpha$ -aminobutírico, D-MeAla es N-metil-D-alanina, EtVal es N-etil-L-valina, Val es L-valina, MeLeu es N-metil-L-leucina, Ala es L-alanina, (D)Ala es D-alanina, y MeVal es N-metil-L-valina. En la fórmula más abajo se muestra la numeración convencional de las posiciones de los aminoácidos generalmente usada con referencia a ciclosporina A. Esto se logra usando nombres compuestos que comprenden una primera porción que indica la identidad de los restos que son diferentes de aquellos en la ciclosporina A y proporcionando su posición, y una segunda porción etiquetada "CsA" que indica que todos los otros restos son idénticos a aquellos en la ciclosporina A. Por ejemplo, [Melle]<sup>4</sup>-CsA es una ciclosporina que es idéntica a la ciclosporina A excepto que MeLeu en la posición 4 se sustituye por Melle (N-metil-L-isoleucina).

La presente invención se explicará adicionalmente con los siguientes ejemplos y con el dibujo, en el que:

- La Fig. 1 representa un histograma de respuesta a la dosis medido por un ensayo de luciferasa en células Huh-7-Lunet infectadas;
- 25 - La Fig. 2 representa un histograma de respuesta a la dosis medido por un ensayo de luciferasa en células Huh-7.5 infectadas;
- La Fig. 3 representa curvas de respuesta al aclaramiento de células Huh-9-13 infectadas;
- La Fig. 4 representa una representación tridimensional de la respuesta a la dosis con la combinación IFN / [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA.

30 Los usos médicos actuales de ciclosporina A se refieren a la capacidad de este compuesto para suprimir la respuesta inmunitaria mediada por células, evitando la producción y liberación de varios factores de crecimiento de células T autocrinos, incluyendo interleucina 2 (IL-2), a partir de células T activadas (véanse Borel (1989) *Transplant. Proceed.* 21, 810-815; Kronke *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5214-5218; Faulds *et al.* (1993) *Drugs* 45, 953-1040). Con la entrada en las células, la ciclosporina A se une a ciclofilinas con afinidad elevada (véase Handschumacher *et al.* (1984) *Science* 226, 544-547). Entre otras funciones biológicas diferentes, tienen actividad de peptidil-prolil cis-trans isomerasa (PPlasa), que se puede medir *in vitro* (véanse Fischer *et al.* (1989) *Nature* 337, 476-478; Takahashi *et al.* (1989) *Nature* 337, 473-475). Para el efecto inmunosupresor de ciclosporina A, es crítica una interacción entre el complejo de ciclofilina-ciclosporina A y serina/treonina fosfatasa 2B (calcineurina) dependiente de calcio y de calmodulina (véanse Hauske (1993) *DN&P* 6, 705-711, Friedman *et al.* (1991) *Cell* 66, 799-806; Liu *et al.* (1991) *Cell* 66, 807-815). La formación de este complejo ternario da como resultado la inhibición de la actividad de fosfatasa de calcineurina (véanse Jain *et al.* (1993) *Nature* 365, 352-355; Rao *et al.* (1997) *Annu. Rev. Immunol.* 15, 707-747; Crabtree (1999) *Cell* 96, 611-614). La calcineurina promueve la desfosforilación selectiva de NF-AT, que entonces se transloca al núcleo, donde se asocia con la proteína activadora 1 y transactiva genes diana, incluyendo el gen de IL-2.

45 Se cree que, debido a los aminoácidos en las posiciones 3 y 4, [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA tiene una capacidad drásticamente reducida para interactuar con calcineurina, según se muestra mediante ensayos transcripcionales e inmunológicos, así como una afinidad significativamente incrementada por ciclofilinas, como se indica por los ensayos de inhibición de la actividad de peptidil-prolil cis-trans isomerasa.

50 La actividad de peptidil-prolil cis-trans isomerasa (PPlasa) de ciclofilinas se determinó usando un procedimiento adaptado a partir de Kofron *et al.* (véanse *Biochemistry* 30, 6127-6134 (1991); *J. Am. Chem. Soc.* 114, 2670-2675 (1992)). Como sustrato, se usó Ala-Ala-Pro-Phe-para nitro-anilina N-succinilada (Suc-AAPF-pNA, Bachem, Bubendorf, Suiza). El ensayo se basó en la escisión preferente por quimiotripsina de la isoforma trans del enlace Phe-pNA en el

5 tetrapéptido Ala-Ala-Pro-Phe-pNA. Esta escisión libera el resto de para-nitroanilina, que se puede detectar y cuantificar a 390 nm ( $\epsilon = 11.814 \text{ m}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). Schutkowski *et al.* (1995) *Biochemistry* 34, 13016-13026. La isomerización cis-trans está catalizada por ciclofilina (PPlasa, EC 5.2.1.8). Tras mezclar CsA u otra ciclosporina (concentraciones finales de  $10^9 - 2 \times 10^5 \text{ M}$  preparadas a partir de disoluciones madre concentradas 1000 veces en etanol) con 0,1  $\mu\text{g}$  de ciclofilina (Sigma) en un volumen total de 1,5 ml de 40 mM de Hepes, pH 7,9, e incubar durante 50 minutos en hielo, la mezcla de reacción se transfirió a una cubeta que se mantuvo a  $10^\circ\text{C}$  en un espectrofotómetro Varian (Varian). Tras la adición de 3,75 mg de quimiotripsina (70  $\mu\text{l}$  de una disolución de quimiotripsina en HCl 10 mM), la reacción se inició por adición de 10  $\mu\text{l}$  de una disolución 3,2 mM de Suc-AAPF-pNA en 0,5 M de LiCl/trifluoroetanol. La reacción se monitorizó durante 3 minutos, y se determinó una constante de velocidad inicial a partir de los datos obtenidos. Como control, también se determinó una constante de velocidad inicial para una reacción paralela que carecía de ciclofilina. Se establecieron curvas de concentración frente a respuesta para ciclosporina A y otras ciclosporinas, y los valores de  $\text{CI}_{50}$  (concentración inhibidora del 50%) de diferentes ciclosporinas se expresaron con relación al de ciclosporina A (1,0). Un valor menor que 1 significa que el compuesto tiene una afinidad por ciclofilina mayor que CsA.

15 Inicialmente se usó un ensayo informador dependiente de NF-AT para estimar las actividades inmunosupresoras de ciclosporinas. Baumann *et al.* (1992) *Transplant. Proc.* 24, 43-48. Las células T Jurkat transfectadas establemente con un constructo informador que contiene un gen de  $\beta$ -galactosidasa bacteriano bajo el control de un promotor de un gen de IL-2 se obtuvieron de G. Zenke, Novartis Pharma AG, Basel, Suiza. Las células se hicieron crecer en medio RPMI1640 suplementado con suero fetal de ternera inactivado con calor al 10%, 100 u/ml de penicilina, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomocina, 2 mM de glutamina, 50  $\mu\text{M}$  de 2-mercaptoetanol y 100 u/ml de higromicina B. Las células se estimularon por adición de 2,4  $\mu\text{M}$  de 12-miristato-13-acetato de forbol y 75  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de fitohemaglutinina en presencia o ausencia de ciclosporina A u otra ciclosporina (concentraciones finales de  $10^9 - 2 \times 10^5 \text{ M}$  preparadas a partir de disoluciones madre concentradas 1000 veces en etanol). Tras la incubación durante 20 h a  $37^\circ\text{C}$ , las células se cosecharon y se lisaron en 50 mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 9,0), 10 mM de KCl, 1 mM de  $\text{MgSO}_4$ , 1% de Triton X-100, 0,5 mM de 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-galactosidasa (Sigma, Buchs, Suiza). La reacción de  $\beta$ -galactosidasa se dejó transcurrir durante 1 h en la oscuridad a temperatura ambiente. La 4-metilumbeliferona fluorescente se ensayó fluorométricamente en la disolución del sobrenadante (excitación: 355 nm; emisión: 460 nm). Se establecieron curvas de concentración frente a respuesta para ciclosporina A y otras ciclosporinas, y los valores de  $\text{IC}_{50}$  de diferentes ciclosporinas se calcularon con relación al de ciclosporina A (1,0). Un valor mayor que 1 significa que el compuesto es menos inmunosupresor que CsA.

30 A continuación, en la Tabla 1, se muestran los resultados de los ejemplos.

Tabla 1: Actividades de unión a ciclofilina (PPlasa) e inmunosupresora (IL-2) de CsA y otras ciclosporinas

Compuesto	PPlasa	IL-2
CsA	1,0	1,0
[D-MeAla] <sup>3</sup> -[EtVal] <sup>4</sup> -CsA	0,3	7161
[Melle] <sup>4</sup> -CsA	0,5	2250

35 Los datos mostrados en la Tabla 1 dieron a conocer que ciertas sustituciones en la posición 4 (es decir, Val, Ile) redujeron drásticamente la actividad inmunosupresora (medida como inhibición de la expresión de IL-2), así como potenciaron de forma detectable la actividad de unión a ciclofilina (medida como inhibición de la actividad de PPlasa de ciclofilina). La sustitución en la posición 3 dio como resultado un incremento adicional sustancial en la actividad de unión a ciclofilina (en 2 veces o más; véase [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA. Tuvo una mayor actividad de unión a ciclofilina y una menor actividad inmunosupresora residual que [Melle]<sup>4</sup>-CsA, el mejor compuesto de referencia disponible en la bibliografía. [Melle]<sup>4</sup>-CsA también es conocido como NIM 811.

#### 40 Actividad no inmunosupresora de [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA

45 En un análisis de confirmación, se estimaron las actividades inmunosupresoras de CsA, [Melle]<sup>4</sup>-CsA y [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA usando la reacción de linfocitos mixtos. En este ensayo, se disolvieron ciclosporinas en etanol (10 mg/ml). Se mezclaron las PBMC CD4<sup>+</sup> recientemente aisladas procedentes de dos donantes sanos tras la inactivación por irradiación de una de las poblaciones (células estimulantes; S). Después de cinco días de cocultivo en presencia o ausencia de una ciclosporina (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), se determinó la respuesta proliferativa de la población celular no inactivada (células respondedoras; R) mediante incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina.

El ensayo se realizó de forma recíproca con las dos poblaciones celulares, siendo cada una inactivada y estimulada a su vez. La estimulación (%) de las células respondedoras se calculó mediante la fórmula:

$$\text{Porcentaje de estimulación} = 100 \times (\text{muestra con ciclosporina} - \text{fondo}) / (\text{muestra sin ciclosporina} - \text{fondo})$$

La muestra se refiere a una mezcla de células estimulantes y respondedoras. El fondo representa un control en el que sólo se mezclan células estimulantes. Los resultados se muestran en la Tabla 2. Se interpretaron de forma que tanto [Melle]<sup>4</sup>-CsA como [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA están desprovistas esencialmente de actividad inmunosupresora.

Tabla 2: Respuesta proliferativa de las PPMC CD4<sup>+</sup> en presencia/ausencia ciclosporinas

Co-cultivo	Compuesto	N	% de estimulación (relativa)	Desviación estándar
R1 x S2	Ninguno	8	100	30
R1 x S2	CsA	4	29	3
R1 x S2	[Melle] <sup>4</sup> -CsA	4	84	13
R1 x S2	[D-MeAla] <sup>3</sup> -[EtVal] <sup>4</sup> -CsA	4	75	11
R2 x S1	Ninguno	8	100	9
R2 x S1	CsA	4	9	2
R2 x S1	[Melle] <sup>4</sup> -CsA	4	75	9
R2 x S1	[D-MeAla] <sup>3</sup> -[EtVal] <sup>4</sup> -CsA	4	65	7
S1 x S2	Ninguno	4	0	0,6

5

R1 x S2 se refiere a un cocultivo de células respondedoras procedentes del donante 1 y células estimulantes procedentes del donante 2. N es el número de medidas.

#### Actividad anti-HCV elevada y bajo efecto citotóxico/citostático de [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA

10 Como se menciona previamente, la infección con el virus de la hepatitis C (HCV) es un problema sanitario serio debido a que los pacientes infectados persistentemente están en un gran riesgo de desarrollar enfermedades hepáticas crónicas, incluyendo cirrosis y carcinoma hepatocelular. La terapia disponible actual es inadecuada para una gran fracción de esta última población, así como está asociada con efectos secundarios significativos. Hasta hace poco, el desarrollo de terapias más eficaces estaba impedido por la ausencia de un modelo *in vitro* apropiado de la replicación del HCV que permitiese identificar compuestos potencialmente activos antes de la evaluación en ensayos clínicos con seres humanos. Este obstáculo se superó mediante el desarrollo de minigenomas de HCV genéticamente modificados (replicones) que se autoamplifican hasta niveles elevados en células de hepatoma cultivadas (Lohmann *et al.* Science 285, (1999), 110-113). Este sistema de replicón de HCV se ha convertido rápidamente en la herramienta estándar para estudiar la replicación, patogénesis y persistencia del HCV (Bartenschlager *et al.* Antiviral Res. 60, (2003), 91-102). El genoma del HCV consiste en un ARN monocatenario que contiene un único marco de lectura abierto para una poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos. La traducción de esta poliproteína se inicia en un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) localizado en el extremo 5' del ARN. La poliproteína del HCV se escinde en por lo menos 10 proteínas. Ellas incluyen la proteína C de la cápside, las proteínas E1 y E2 de la cubierta, la proteína p7 de la posible viroporina, las proteínas NS2 y NS3 no estructurales que tienen actividades de serina proteinasa así como ATPasa/helicasa, NS4A, la proteína NS4B inductora de la red membranosa, NS5A y la ARN polimerasa NS5B dependiente del ARN. El primer replicón con éxito fue un ARN bicistrónico que contiene en una dirección de 5' a 3' un IRES de HCV, una secuencia codificante para una neomicina fosfotransferasa, un IRES de un virus de encefalocarditis, y secuencias codificantes para las proteínas NS3 a NS5 del HCV. Después de la introducción en células Huh-7 y la selección usando G418 (geneticina), se pudo demostrar que este replicón se replica autónomamente en niveles elevados (1.000-5.000 copias/célula) (Lohmann *et al.*, 1999). La caracterización del sistema reveló que la eficiencia de la replicación depende de la permisividad de la célula hospedante y, de forma importante, de la selección de mutaciones adaptables al cultivo celular en las secuencias que codifican la proteína de HCV. Se encontró que la replicación es sensible a interferón alfa, proporcionando signos de la relevancia del sistema para identificar fármacos que tienen eficacia *in vivo*. También se construyeron replicones variantes, en los que la secuencia que codifica la neomicina fosfotransferasa se sustituyó, p.ej., por una secuencia que codifica luciferasa o por secuencias que codifican una proteína de fusión de luciferasa-ubiquitina-neomicina fosfotransferasa. La replicación de estos últimos replicones variantes se puede evaluar mediante el ensayo de luciferasa conveniente, mientras que la replicación del primer replicón requiere determinaciones del número de copias de ARN.

40 Watashi *et al.* (2003) demostraron mediante transferencia Northern y RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa) cuantitativa que la acumulación de ARN de HCV se inhibió mediante CsA pero no mediante el macrólido inmunosupresor FK506 ni el derivado de CsA no inmunosupresor PSC 833 en células MH-14 que contienen el replicón del HCV. Sus ensayos que implicaron exposiciones durante 7 días de células a agentes activos revelaron que el título de ARN del HCV se redujo en aproximadamente 200 veces en presencia de 1 µg/ml de

ciclosporina A. Encontraron además que la ciclosporina no inmunosupresora [Melle]<sup>4</sup>-CsA también inhibió la replicación del HCV. Los resultados indicaron que [Melle]<sup>4</sup>-CsA fue casi igual de eficaz que CsA reduciendo el título de ARN del HCV.

Para determinar si la ciclosporina de la presente invención tiene actividad anti-HCV y, en caso de que tenga tal actividad, cómo esta actividad se compara con las actividades de CsA y [Melle]<sup>4</sup>-CsA, se llevaron a cabo experimentos que compararon efectos inhibidores de CsA, [Melle]<sup>4</sup>-CsA y [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA en sistemas de replicones del HCV.

Los ensayos usaron células Huh 5-2 que contenían un ARN bicistrónico que codifica una proteína de fusión de luciferasa de luciérnaga-ubiquitina-neomicina fosfotransferasa y las proteínas NS3-5 del HCV. Las secuencias víricas se originaron de un virus de HCV de genotipo 1 b. Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con 10% de suero fetal de ternera, 2 mM de glutamina (Life Technologies), 1 x de aminoácidos no esenciales (Life Technologies), 100 u/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina y 250 µg/ml de G418 (Geneticina, Life Technologies) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Para ensayos (de replicación) antivíricos, las células se sembraron a una densidad de 7000 células/pocillo en View Plates™ de 96 pocillos (Packard) en el mismo medio, excepto por G418. Después de incubar durante 24 h, el medio se retiró, se añadieron diluciones en serie de compuestos de ensayo en medio, y las células se incubaron durante 72 h adicionales.

Los efectos antivíricos se estimaron mediante ensayo de luciferasa o RT-PCR cuantitativa. Para llevar a cabo el ensayo de luciferasa, el medio se retiró, y las células se lavaron con PBS. Tras la lisis en 50 µl de tampón Glo-lisis (Promega) durante 15 minutos, a los lisados celulares se añadieron 50 µl de reactivo de ensayo de luciferasa Stead-Glo (Promega). La actividad de luciferasa se midió usando un luminómetro, y la señal procedente de cada pocillo de ensayo se expresó como un porcentaje de la señal medida en los pocillos de cultivos no expuestos a un compuesto de ensayo.

La densidad celular y los efectos citostáticos se estimaron en cultivos paralelos en placas de 96 pocillos normales (Beckton-Dickinson) usando el ensayo de MTT (ensayo de proliferación celular no radiactivo CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous, Promega). En este ensayo, se biorredujo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxi-fenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio (MTS) a un formazano que se cuantificó a 498 nm en un lector de placas. La producción de formazano está directamente correlacionada con el número de células vivas.

El análisis mediante RT-PCR cuantificó la región de neomicina de replicones usando un detector de secuencias ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los cebadores directo e inverso usados fueron 5'-CCGGCTACCTGCCCATTC-3' y 5'-CCAGATCATCCTGATCGACAAG-3', respectivamente. La sonda fluorógena fue 5'-ACATCGCATCGAGCGAGCACGTAC-3'. Como control interno, se usó un plásmido que contiene parte de la secuencia génica de neomicina fosfotransferasa.

Los resultados de estos experimentos permitieron el cálculo de EC<sub>50</sub> para las diferentes ciclosporinas, que es la concentración eficaz requerida para inhibir la replicación del replicón de HCV en un 50%, y de CC<sub>50</sub>, que es la concentración requerida que inhibe en un 50% la proliferación de células que crecen exponencialmente, y un índice de selectividad SI, que es la relación entre CC<sub>50</sub> y EC<sub>50</sub>.

La Tabla 3 muestra valores obtenidos de células Huh 5-2 usando ensayos de actividad de luciferasa para la estimación de la eficiencia de la replicación, y ensayos de MTT para la calibración de ensayos de luciferasa y para estimar los efectos citostáticos de los compuestos. De acuerdo con las observaciones explicadas anteriormente hechas por Watashi *et al.* (2003), CsA y [Melle]<sup>4</sup>-CsA tuvieron actividades anti-HCV (de replicación) similares.

Sorprendentemente, [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA se consideró más potente que CsA y [Melle]<sup>4</sup>-CsA. También se observó que la concentración citostática del 50% (CC<sub>50</sub>) para [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA fue significativamente mayor que los valores determinados para CsA y [Melle]<sup>4</sup>-CsA. En consecuencia, se encontró un índice de selectividad considerablemente mayor para [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA en comparación con las otras dos ciclosporinas. Experimentos análogos, en los que se derivaron valores de EC<sub>50</sub> a partir de las determinaciones de los títulos de ARN usando RT-PCR cuantitativa, produjeron conclusiones similares. Se obtuvieron valores de SI de 45\*, 73 y 625\* para CsA, [Melle]<sup>4</sup>-CsA y [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA, respectivamente. Los asteriscos indican que se presenta el menor de dos valores determinados independientemente.

Tabla 3: Valores de EC<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub> y SI determinados a partir de ensayos de luciferasa de replicación del ARN de HCV y de MTT de citotoxicidad en células Huh 5-2 que comprenden un minirreplicón de HCV que contiene luciferasa

Compuesto	EC <sub>50</sub> (µg/ml) +/- Desv. Est.	CC <sub>50</sub> (Rg/ml) +/- Desv. Est.	Índice de selectividad
CsA	0,28 +/- 0,13	11,6 +/- 5,6	41
[D-MeAla] <sup>3</sup> -[EtVal] <sup>4</sup> -CsA	0,03 +/- 0,04	> 27	> 900
[Melle] <sup>4</sup> -CsA	0,22	14	64

Actividad antivírica de [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA medida en células diana infectadas con HCV recombinante

La actividad anti-HCV de [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA, en comparación con CsA, se determinó adicionalmente en sistemas de cultivo que se aproximan a la situación *in vivo*. El método usó células de hepatoma que se habían infectado con un constructo de HCV quimérico de longitud completa infeccioso o con el mismo virus que se modificó para portar un gen receptor de luciferasa. Después del tratamiento de las células infectadas con la ciclosporina de la invención o con CsA, se midió la actividad de luciferasa, estando directamente correlacionada con la inhibición de la replicación vírica.

Para inocular las células de hepatoma de los ensayos, se usaron virus de HCV infecciosos de genoma quimérico de longitud completa entre cepas J6 y JFH1 (Jc1) de HCV. El constructo vírico de Jc1 también se modificó para obtener un genoma bicistrónico que posee un gen informador de luciferasa (Jc1-Luc). El sobrenadante del cultivo celular se recogió veinticuatro y noventa y seis horas después de la transfección de los transcritos de ARN de los genomas mediante electroporación de las células Huh-7.5. Los sobrenadantes se filtraron (0,45 μM), y se determinaron las dosis infecciosas 50 del cultivo celular (CCID50) por ml mediante los ensayos de dilución limitante según Lindenbach *et al.* (Science, 309, (2005), 623-626). Las CCID50 fueron 1,3 x 10<sup>5</sup> para Jc1, y 4,2 x 10<sup>3</sup> para Jc1-Luc.

Los ensayos usaron células Huh-7-Lunet o Huh-7.5 (Lohmann *et al.*, Science 285(5424), (1999), 110-113). Las células se hicieron crecer en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FCS) inactivado por calor (Integro), 1x de aminoácidos no esenciales (Gibco), 100 UI/ml de penicilina (Gibco), 100 μg/ml de estreptomycin (Gibco) o 25 μg/ml de higromicina (Gibco) para células Huh-mono a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Para los ensayos antivíricos (de replicación), se sembraron células Huh-7-Lunet o Huh-7.5 a una densidad de 2 x 10<sup>4</sup> ó 4 x 10<sup>4</sup> células por pocillo de una placa de 12 pocillos. Veinticuatro horas más tarde, el medio se sustituyó por 0,5 ml del lote vírico de Jc1-Luc (placas de 12 pocillos) o 0,25 ml del lote vírico de Jc1 (placas de 12 pocillos). Cuatro horas más tarde, el inóculo de virus se sustituyó por medio que contiene concentraciones diferentes de CsA o [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA, y se incubaron posteriormente durante 72 horas adicionales.

La inhibición de la replicación vírica se estimó mediante ensayo de luciferasa. Para llevar a cabo el ensayo de luciferasa, las células se cosecharon, se lavaron con PBS y se lisaron en tampón de lisis de luciferasa (1% de Triton X-100, 25 mM de glicilglicina, 15 mM de MgSO<sub>4</sub>, 4 mM de EGTA, y 1 mM de DTT). La actividad de luciferasa de luciérnaga se midió según Krieger *et al.* (J Virol, 75(10), (2001), 4614-4624). De forma breve, después de un ciclo de congelación/descongelación, las células se resuspendieron, y se mezclaron 100 μl de lisado celular con 360 μl de tampón de ensayo (25 mM de glicilglicina, 15 mM de MgSO<sub>4</sub>, 1 mM de DTT, 2 mM de ATP, 15 mM de tampón de fosfato potásico, pH 7,8) y 200 μl de disolución de sustrato (200 mM de luciferina, 25 mM de glicilglicina). Finalmente, la luminiscencia se midió usando un luminómetro Lumat LB9507 (Berthold) para 20 muestras.

En estos ejemplos (Figs. 1 y 2), tanto [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA (barras blancas) como CsA (barras negras) dieron como resultado una actividad antivírica dependiente de la dosis, con lo que [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA demostró nuevamente ser superior con respecto a CsA, corroborando así los datos obtenidos con los replicones subgenómicos. Se necesitó una concentración 10 veces mayor de CsA para dar como resultado el mismo efecto inhibitorio de la replicación como la ciclosporina de la invención.

Afinidad elevada de la ciclosporina de la invención por ciclofilina

En las observaciones explicadas anteriormente de Watashi *et al.* (2003) y Nagakawa *et al.* (2003), el efecto anti-HCV se relacionó con la capacidad de ciclosporinas a las ciclofilinas. Los efectos sobre la actividad de PPlasa de CsA, [Melle]<sup>4</sup>-CsA y [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA se midieron para ciclofilinas para determinar el inhibidor más potente de la actividad de PPlasa de ciclofilina, por ejemplo ciclofilina A, y, en consecuencia, de la replicación del HCV.

En los ensayos se usó ciclofilina A recombinante humana comercial (Sigma). La actividad de PPlasa de ciclofilinas se determinó usando un ensayo espectrofotométrico acoplado a quimi tripsina según Garcia-Echverria *et al.* (BBRC, 191, (1993), 70-75). Este método se basa en la elevada selectividad trans de quimi tripsina por péptidos del tipo N-succinil-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilida. La escisión de los péptidos liberó el resto de para-nitroanilina, que se pudo detectar y cuantificar a 390 nm. La hidrólisis de la forma cis estaba limitada por la velocidad de isomerización cis-trans llevada a cabo por la ciclofilina A. El péptido se constituyó en una disolución de 25 nM de LiCl en 2,2,2-trifluoroetanol a 470 mM, para potenciar la población de conformeros peptídicos cis. El ensayo se llevó a cabo en un espectrofotómetro de haz de división, y el baño de agua se ajustó a 5°C. Se disolvió ciclofilina A (7500 pmoles/mg de concentración enzimática total; Sigma) a 20 nM en un tampón (35 mM de HEPES y 0,26 mg/ml de quimi tripsina (actividad específica 50 unidades/mg), pH 7,8 con KOH) y se incubó durante 6 minutos a temperatura ambiente, seguido de 54 minutos en el baño de agua. Se añadieron CsA, [Melle]<sup>4</sup>-CsA o [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA según sea apropiado en estas incubaciones usando un intervalo de concentraciones de 2-50 nM. Después, a la cubeta de muestras se le añadieron 3,5 ml de la ciclofilina incubada. La cubeta de referencia contenía una reacción que se había llevado hasta terminación para equilibrar el haz de referencia. Se añadió péptido a 25 μM para iniciar la reacción, y el cambio en la absorbancia se monitorizó a 10 puntos de dato por segundo. Como control, también se determinaron las velocidades para una reacción paralela que carecía de ciclofilina. Estas velocidades de blancos de la hidrólisis peptídica (es decir, en ausencia de ciclofilina) se restaron de las velocidades en presencia de ciclofilina A.

Las velocidades iniciales obtenidas de los ensayos de PPlasa se analizaron mediante análisis de regresión de primer orden usando una transformación de primer orden de las trazas del transcurso de tiempo del cambio en la absorbancia a 390 nm. La concentración enzimática total ( $E_t$ ), la constante de disociación del inhibidor ( $K_i$ ) y la constante de velocidad para la reacción limitante de la velocidad se calcularon con el software FigSyS (2003, Biosoft) ajustando los datos obtenidos a partir del análisis de regresión en la ecuación de multiproteína inhibidora de la unión fuerte.

La ecuación de multiproteína inhibidora de la unión fuerte tuvo la siguiente fórmula:

$$v = k * E_t * P - k * (-b - \sqrt{(b * b - 4 * c)}) / 2$$

en la que b se define como  $b = -(E_t * P + I + K_i)$  y c es  $c = E_t * P * I$ .

Una vez que se calculan  $E_t$ ,  $K_i$  y k por el ordenador para un conjunto dado de datos, se realizó una representación gráfica de los datos, y la recta se ajustó a los puntos suponiendo unión de inhibidor fuerte a una única proteína, definida mediante las siguientes ecuaciones:

$$v = K * E_t * P - K(B - \sqrt{(B * B - 4 * C)}) / 2$$

en la que  $B = E_t * P + I + K_i$  y  $C = E_t * P * I$ .

Tabla 4: Valores de  $E_t$ ,  $K_i$  y k de ciclofilina A para CsA, [Melle]<sup>4</sup>-CsA y [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA, determinados a partir de los ensayos de actividad de PPlasa.

Compuesto	$E_t$ (pmol/mg)	$K_i$ (nM)	k (s <sup>-1</sup> )
CsA	7500	9,79 ± 1,37	0,17 ± 0,0069
[Melle] <sup>4</sup> -CsA	7500	2,11 ± 0,32	0,17 ± 0,0068
[D-MeAla] <sup>3</sup> -[EtVal] <sup>4</sup> -CsA	7500	0,34 ± 0,12	0,16 ± 0,0074

La  $K_i$  más baja de ciclofilina A observada para la ciclosporina de la invención corroboró la potentísima actividad antivírica, la especificidad y el índice de selectividad (como se menciona anteriormente) en comparación con CsA y [Melle]<sup>4</sup>-CsA. Sorprendentemente, la [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA no inmunosupresora mostró una afinidad casi 6 veces mayor por la ciclofilina de los ejemplos en comparación con la otra ciclosporina no inmunosupresora [Melle]<sup>4</sup>-CsA.

La experimentación descrita anteriormente demostró que [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA fue un inhibidor más eficaz de la replicación del HCV que cualquier otra ciclosporina ensayada. Esta actividad anti-HCV incrementada se correlacionó con la actividad de unión incrementada a ciclofilina de [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA.

#### Aclaramiento del replicón del HCV y rebote

La recidiva de la infección por HCV es un problema importante de la enfermedad, especialmente incluso con el uso de un tratamiento eficiente potencial, por ejemplo ciclosporina y/o interferón. Para estudiar si la actividad anti-HCV más potente de la ciclosporina de la invención en comparación con CsA se refleja en la capacidad del compuesto para curar más eficazmente células que producen replicón de HCV a partir de aquellas, se llevó a cabo un ensayo celular *in vitro* basándose en la presencia del fármaco selectivo G418 para el replicón producido recombinante.

Los ensayos usaron células Huh-9-13, células de hepatoma humano (Huh-7) (Lohmann *et al.*, Science 285(5424), (1999), 110-113). Las células se hicieron crecer en el medio completo habitual DMEM sin presión de G418. Las células se cultivaron en presencia de CsA o [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA (ambas a 0,5 ó 1 µg/ml), o se dejaron sin tratar durante 7 pasadas consecutivas. Se llevó a cabo un control para garantizar que la ausencia de la presión selectiva de G418 no influiría en el contenido del replicón de HCV durante varias pasadas. Para confirmar que las células Huh-9-13 que se habían tratado durante 7 días con [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA se aclararon ciertamente de su replicón, se recomenzó la selección con G418 (1000 µg/ml) durante 2 pasadas más. Sólo aquellas células que todavía poseían el replicón de HCV fueron capaces de proliferar en estas condiciones, y las células sin replicón murieron en presencia de G418 durante la fase de rebote.

Se llevó a cabo una RT-PCR sobre extractos de ARN vírico de muestras tomadas a diferentes puntos de pasada. Los cebadores directo e inverso usados fueron 5'-CCGGCTACCTGCCCATTC-3' y 5'-CCAGATCATCCTGATCGACAAG-3', respectivamente. La sonda fluorógena fue 5'-ACATCGCATCGAGCGACGTAC-3'. Como control interno, se usó un plásmido que contiene parte de la secuencia génica de neomicina fosfotransferasa. Los resultados se analizaron y se expresaron como una cantidad de ARN de replicón (ng) por 1000 células, y se usaron para representar una gráfica.



Los resultados de estos experimentos (Fig. 3) mostraron el efecto antivírico superior de [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA en comparación con CsA en este ensayo celular *in vitro* estándar. Sorprendentemente, la ciclosporina de la invención mostró un efecto viricida y no sólo un efecto virostático como la otra CsA inmunosupresora. De hecho, cuando las células Huh-9-13 tratadas con [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA (círculos y cuadrado en la Fig. 3) se cultivaron nuevamente en presencia de G418 (fase de rebote), los cultivos murieron, en comparación con las células tratadas con CsA (diamante y triángulo). Los dos cultivos que se habían tratado con CsA durante 7 pasadas consecutivas fueron capaces de proliferar en presencia de G418. Esto confirmó que [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA fue capaz de curar células Huh-9-13 de su replicón de HCV.

#### Combinación de fármacos

El interferón (IFN) es parte de la terapia actual de la infección por HCV. Se evaluó el efecto de la combinación de [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA/IFN- $\alpha$  2a usando el método de Prichard y Shipman (Antiviral Res, 1990, 14, 181-205). De forma breve, el efecto aditivo teórico se calculó a partir de las curvas de respuesta frente a la dosis de compuestos individuales mediante la ecuación de fórmula:

$$Z = X + Y(1-X),$$

en la que X representa la inhibición producida por [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA sola, e Y representa IFN- $\alpha$  2a solo. Z representa el efecto producido por la combinación de [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA con IFN- $\alpha$  2a. La superficie aditiva teórica se resta de la superficie experimental real, dando como resultado una superficie horizontal que iguala el plano cero cuando la combinación es aditiva; una superficie que está por encima del plano cero indica un efecto sinérgico de la combinación; y una superficie por debajo del plano cero indica antagonismo. El ensayo antivírico se llevó a cabo esencialmente como se describe anteriormente para las células Huh 5-2, excepto que los compuestos se añadieron en formato de damero. Para cada compuesto, se usaron tres placas repetidas, para medir la curva de respuesta frente a la dosis de cada compuesto individual. Los datos obtenidos de las tres placas se usaron para calcular la superficie aditiva teórica. También se realizaron por triplicado estudios de combinación para cada par de compuestos. Los datos se analizaron para determinar la varianza mediante la prueba de ANOVA.

Se observó una actividad sinérgica ligera a las concentraciones más elevadas de IFN- $\alpha$  2a usadas, pero en conjunto la actividad anti-HCV de [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA con IFN- $\alpha$  2a se puede considerar aditiva (Fig. 4).

Los hallazgos con [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA se pueden resumir en lo siguiente:

- [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA tiene una actividad anti-HCV más potente y es menos citotóxica que CsA, como se muestra en un sistema de replicón subgenómico de HCV.
- Esto se ha confirmado en un cultivo celular de hepatoma infectado con un genoma quimérico infeccioso de longitud completa entre las cepas J6 y JFH1 de HCV.
- [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA es capaz de curar células de su replicón de HCV de forma más eficaz que CsA.
- Estos efectos están relacionados con una afinidad de unión a ciclofilina más pronunciada.
- La actividad anti-HCV de la combinación [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA/IFN- $\alpha$  2a es aditiva.

[D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA se puede usar para tratar pacientes infectados con HCV. El compuesto activo se puede administrar por una vía convencional. Se puede administrar parenteralmente, por ejemplo en forma de disoluciones o suspensiones inyectables, o en forma de formulaciones de depósito inyectables. Preferentemente, se administrará oralmente en forma de disoluciones o suspensiones para beber, comprimidos o cápsulas. Las composiciones farmacéuticas para administración oral que comprenden la ciclosporina de la invención se describen en los Ejemplos. Como se demuestra por los ejemplos, tales composiciones farmacéuticas comprenden típicamente la ciclosporina de la invención y una o más sustancias vehículo farmacéuticamente aceptables. Típicamente, estas composiciones están concentradas y es necesario combinarlas con un diluyente apropiado, por ejemplo agua, antes de la administración. Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral también incluyen típicamente uno o más excipientes. Los excipientes opcionales incluyen un agente isotónico, un tampón u otro agente de control del pH, y un conservante. Estos excipientes se pueden añadir para el mantenimiento de la composición para lograr intervalos preferidos de pH (aproximadamente 6,5-7,5) y de osmolaridad (aproximadamente 300 mosm/l).

En las patentes US nº 5.525.590 y nº 5.639.724, y en la solicitud de patente US 2003/0104992, se pueden encontrar ejemplos adicionales de formulaciones de ciclosporina para administración oral. Mediante la vía oral, la dosis indicada de la ciclosporina de la invención para la administración de dos a tres veces por semana puede ser de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, preferentemente de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg. Por la vía intravenosa, la dosis correspondiente indicada puede ser de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, preferentemente de aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 25 mg/kg. Se entiende que una cantidad eficaz de la ciclosporina de la invención es una cantidad que, cuando se administra de forma repetida durante un régimen terapéutico a un paciente que necesite de tratamiento de infección por HCV, da como resultado una respuesta clínica objetiva, tal como una reducción estadísticamente significativa en el título de HCV sérico,

o una reducción significativa de la actividad de ALT sérica en el paciente.

Se llevaron a cabo estudios clínicos de fase I iniciales para evaluar la seguridad de las dosis orales de [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA, y para determinar el perfil farmacocinético y el perfil de seguridad de la sustancia farmacéutica. Los estudios mostraron que las dosis de 50 a 1600 mg en una microemulsión en agua eran bien toleradas. Se observaron efectos secundarios leves y de poco tiempo, incluyendo náusea, vómitos, dolor abdominal, cefaleas leves. Estos efectos secundarios no estaban relacionados con la dosis.

Se tomarán en cuenta numerosos factores por el médico a la hora de determinar las dosis de ensayo para estudiar la eficacia de una composición farmacéutica que comprende la ciclosporina de la presente invención frente a la infección por HCV. Principalmente entre estos están la toxicidad y la semivida de la ciclosporina de la invención elegida. Factores adicionales incluyen el tamaño del paciente, la edad del paciente, el estado general del paciente (incluyendo enfermedades sistémicas o principales significativas, incluyendo hepatopatía descompensada, compromiso de médula ósea preexistente grave y otras infecciones víricas), la etapa de la infección por HCV (aguda frente a crónica) según se indica, por ejemplo, mediante los niveles de alanina aminotransferasa (ALT) sérica, el genotipo particular de HCV, la terapia previa de la infección por HCV, la presencia de otros fármacos en el paciente, y similares. Un curso de tratamiento requerirá la administración repetida de una composición farmacéutica de la invención. Típicamente, se administrará una dosis farmacéutica adecuada 3-7 veces por semana, y la duración del tratamiento será desde aproximadamente 4 semanas hasta 6 meses, preferentemente desde 4 semanas hasta aproximadamente 12 meses. El tratamiento puede ser seguido de las determinaciones de HCV en suero y la medida de los niveles de ALT sérica. El punto final de tratamiento es una respuesta virológica, es decir, la ausencia de HCV al final de un curso de tratamiento, varios meses tras el inicio del tratamiento, o varios meses después de terminar el tratamiento. El HCV en suero se puede medir a nivel de ARN por métodos tales como RT-PCR cuantitativa o transferencias Northern, o a nivel proteico mediante inmunoensayo enzimático o inmunoensayo de quimioluminiscencia potenciada de proteínas víricas. El punto final también puede incluir una determinación de un nivel de ALT sérica en el intervalo normal.

Una composición farmacéutica de la presente invención puede comprender uno o más ingredientes activos frente a la infección por HCV, además de la ciclosporina de la presente invención, a saber, otra sustancia farmacéutica antivírica seleccionada de ribavirina, o un interferón alfa. La ciclosporina de la invención y tal otro ingrediente activo se pueden administrar juntos como parte de la misma composición farmacéutica, o se pueden administrar separadamente como parte de un régimen de dosificación apropiado, diseñado para obtener los beneficios de la terapia de combinación. El régimen de dosificación apropiado, la cantidad de cada dosis administrada, y los intervalos específicos entre dosis de cada agente activo dependerán de la combinación específica de agentes activos empleados, del estado del paciente tratado, y de otros factores explicados en la sección previa. Tales ingredientes activos adicionales se administrarán generalmente en cantidades menores o iguales a aquellas para las cuales son eficaces como agentes terapéuticos individuales. Están disponibles al público las dosis aprobadas por la FDA para tales agentes activos que han recibido la aprobación de la FDA para su administración a seres humanos.

La invención se elabora adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. Los ejemplos se proporcionan con fines ilustrativos para un experto en la materia, y no pretenden limitar el alcance de la invención como se describe en las reivindicaciones. De este modo, la invención no se debería interpretar como limitada a los ejemplos proporcionados, sino que se debería interpretar como que comprende cualquiera de las variaciones que resulten evidentes como resultado de la enseñanza proporcionada en la presente memoria.

#### EJEMPLO 1: Síntesis de [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA

(Traducido de la tesis doctoral por Jean Francois Guichou titulada "De nouveaux analogues de Ciclosporin A comme agent anti-VIH-1", Facultad de Ciencias, Universidad de Lausanne, CH-1015 Lausanne, Suiza (2001)).

Síntesis de H-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-Sar-OMe:

Se añadió 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (41,5 mmoles; 5,8 g) a una disolución de ciclosporina A (CsA) (8,3 mmoles; 10 g) en 100 ml de anhídrido acético. La disolución se agitó durante 18 h a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se diluyó después con 600 ml de acetato de etilo, y se lavó dos veces con agua y cuatro veces con una disolución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. La fase orgánica se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró, y el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo amarillo obtenido se cromatografió sobre gel de sílice (eluyente: diclorometano/metanol 98:2) y se recristalizó en éter. Se recuperaron 9,5 g de MeBmt(OAc)-CsA, un polvo blanco, que representa un rendimiento de 92%.

Se añadió tetrafluoroborato de trimetiloxonio (22,5 mmoles; 3,3 g) a una disolución de MeBmt(OAc)-Cs (7,5 mmoles; 9,4 g) en 60 ml de diclorometano. Tras 16 h a temperatura ambiente, se añadieron 35 ml de metanolato de sodio 0,26 M en metanol. Después de 1 h, se añadieron 35 ml de metanol y 35 ml de ácido sulfúrico 2 N, y la mezcla de reacción se agitó durante otros 15 min., se neutralizó hasta pH 6,0 con KHCO<sub>3</sub> saturado (28 ml), y se extrajo dos veces con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó 2 veces con NaCl saturado, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se filtró. Subsiguientemente, el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo se cromatografió sobre gel de sílice (eluyente: acetato de etilo/metanol 5:1). Se obtuvieron 7,3 g de H-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-Sar-OMe (rendimiento: 76%).

HPLC tr = 268,23 mn (98%)

ES/MS: m/z: 1277,5 [M+H<sup>+</sup>], 639,2 [M+2H<sup>+</sup>]

Síntesis de H-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-Sar-OMe:

5 Se añadieron DMAP (2,3 mmoles; 334 mg) e isotiocianato de fenilo (6,9 mmoles; 0,75 ml) a una disolución de H-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-Sar-OMe (4,6 mmoles; 7 g) en 48 ml tetrahidrofurano. Después de 2 h, el disolvente se evaporó, y el producto bruto se cromatografió sobre gel de sílice (eluyentes: terc-butil metil éter (MTBE)/acetato de etilo 9:1 (1); MTBE/metanol 9:1 (2)). Se obtuvieron 5,8 g de Ph-NH-C(S)-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-Sar-OMe (90% de rendimiento).

10 Se añadieron 13,8 ml de ácido trifluoroacético a una disolución del último compuesto (4 mmoles; 5,6 g) en 290 ml de diclorometano. Tras 1 h de reacción, la mezcla se neutralizó usando KHCO<sub>3</sub> y se diluyó con 500 ml de diclorometano. La fase orgánica se lavó 2 veces con NaCl saturado, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se filtró. Subsiguientemente, el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo se cromatografió sobre gel de sílice (eluyentes: MTBE/acetato de etilo 9:1 (1); MTBE/metanol 3:1 (2)). Se obtuvieron 2,8 g de H-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-Sar-OMe (61% de rendimiento).

15 HPLC tr = 25,80 mn (99%)

ES/MS: m/z: 1050,5 [M+H<sup>+</sup>], 547,7 [M+2H<sup>+</sup>]

Síntesis de Boc-D-MeAla-EtVal-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-NMe-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH:

20 Se añadió hexafluorofosfato de fluoro-N,N,N'-tetrametilformamidinio (TFFH) (0,96 mmoles; 0,25 g), en una atmósfera inerte, a una disolución de H-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-Sar-OMe (0,87 mmoles; 1,00 g), DIPEA (2,78 mmoles; 0,48 ml) y Boc-D-MeAla-EtVal-OH (0,96 mmoles; 0,32 g) en 15 ml diclorometano. Después de 15 min., el diclorometano se evaporó, y el residuo se recogió en acetato de etilo. La fase orgánica se lavó sucesivamente con una disolución saturada de NaHCO<sub>3</sub>, una disolución al 10% de ácido cítrico y una disolución saturada de NaCl, y después se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró. La cromatografía sobre gel de sílice (en acetato de etilo/metanol 98:2) produjo 1,14 g (90%) de Boc-D-MeAla-EtVal-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt (OAc)-Abu-Sar-OMe.

25 El último producto (0,64 mmoles; 0,93 g) se recogió en 45 ml de metanol anhidro, y se añadió borohidruro de sodio (25,5 mmoles; 0,96 g) en pequeñas porciones a intervalos de 15 minutos durante un período de 3 h 30 min. A las 4 h, la mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C, se hidrolizó por adición de ácido cítrico al 10% y se concentró. El residuo se recogió en acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con una disolución al 10% de ácido cítrico y una disolución saturada de NaCl, y después se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró. Tras cromatografía sobre gel de sílice (en acetato de etilo/metanol 95:5), se obtuvieron 0,63 g (81%) de Boc-D-MeAla-EtVal-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-NMe-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH.

ES/MS: m/z: 1434,9 [M+H<sup>+</sup>], 717,9 [M+2H<sup>+</sup>]

Síntesis de H-D-MeAla-EtVal-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-Abu-OH:

35 Se añadió ácido metanosulfónico (3,18 mmoles; 2,060 ml) a una disolución de Boc-D-MeAla-EtVal-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-NMe-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-OH (0,425 mmoles; 610 mg) en 42,5 ml de metanol, y la mezcla se calentó y se mantuvo hasta 50°C. El progreso de la reacción se monitorizó mediante HPLC y espectrometría de masas. Después de 80 h, la mezcla se enfrió hasta 0°C, y se hidrolizó por adición de NaHCO<sub>3</sub> 1 M. El metanol se eliminó, y el residuo se recogió en acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con NaHCO<sub>3</sub> 1 M y después con una disolución saturada de NaCl, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró. El producto (557 mg), H-D-MeAla-EtVal-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NHMe, se usó en la siguiente etapa sin purificación.

45 El producto (0,42 mmoles; 557 mg) se disolvió en 20 ml de metanol y se combinó, en una atmósfera inerte, con una disolución de metanolato de sodio (1,26 mmoles) en 1,26 ml de metanol. Después de 18 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se enfrió hasta 0°C, y se añadió gota a gota hidróxido de sodio (4,2 mmoles; 168 mg) en 5 ml de agua. Tras 21 h a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se enfrió de nuevo hasta 0°C y se neutralizó con KHSO<sub>4</sub> 1 M. El metanol se eliminó, y el residuo se disolvió en acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con una disolución semi-saturada de NaCl, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró. El producto (335 mg; 64%), H-D-MeAla-EtVal-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-Abu-OH, se usó en la siguiente etapa sin purificación.

50 HPLC tr = 26,27 mn (86%)

ES/MS: m/z: 1235,5 [M+H<sup>+</sup>], 618,2 [M+2H<sup>+</sup>]

Síntesis de [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA:

5 En una atmósfera inerte, se añadió gota a gota una disolución de H-D-MeAla-EtVal-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-Abu-OH (0,162 mmoles; 200 mg) y colidina sim. (1,78 mmoles; 0,24 ml) en 50 ml de diclorometano a una disolución de hexafluorofosfato de (7-azabenzotriazol-1-iloxi)tripirrolidinofosfonio (PyAOP, 0,486 mmoles; 254 mg) en 3,2 litros de diclorometano. Setenta y dos h después, la mezcla de reacción se hidrolizó mediante adición de una disolución al 10% de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. El diclorometano se evaporó, y el residuo se recogió en acetato de etilo. La fase orgánica se lavó sucesivamente con una disolución 0,1 N de HCl y una disolución saturada de NaCl, se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró. El producto bruto se purificó sobre gel de sílice, produciendo 110 mg (59%) de [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA

HPLC tr = 30,54 mn (100%)

10 ES/MS: m/z: 1217,6 [M+H<sup>+</sup>], 609,3 [M+2H<sup>+</sup>]

EJEMPLO 2: Formulaciones orales de ciclosporinas de la invención.

Las cantidades se expresan como % p/p.

Ejemplo A:

	Ciclosporina de la invención	10
15	Glycofurool 75	35,95
	Miglycol 812	18
	Cremophor RH40	35,95
	Alfa-tocoferol	0,1

Ejemplo B:

20	Ciclosporina de la invención	10
	Tetraglycol	2
	Captex 800	2
	Nikkol HCO-40	85,9
	Butilhidroxitolueno (BHT)	0,1

25 Ejemplo C:

	Ciclosporina de la invención	10
	Glycofurool 75	39,95
	Miglycol 812	14
	Cremophor RH40	36
30	Butilhidroxianisol (BHA)	0,05-0,1

Ejemplo D:

	Ciclosporina de la invención	10
	Tetraglycol	10
	Myritol	5
35	Cremophor RH40	74,9
	Alfa-tocoferol	0,1

Ejemplo E:

	Ciclosporina de la invención	10
	Etanol	9
40	Propilenglicol	8

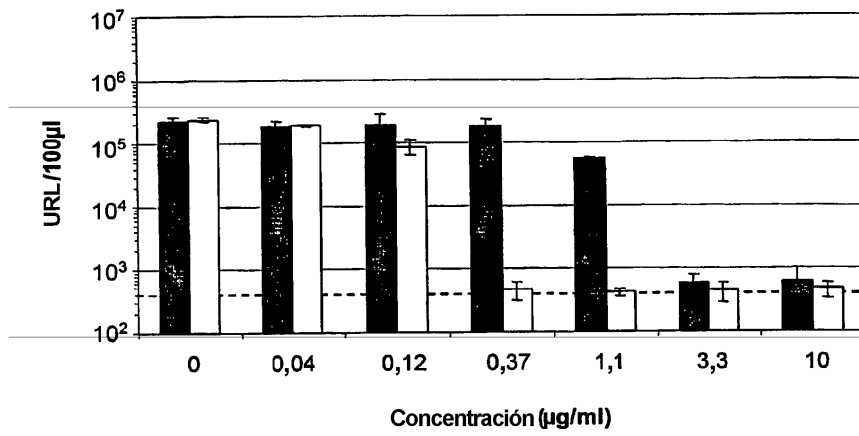
Cremophor RH40	41
Monolinoleato de glicerol	32

Para componentes individuales de formulaciones A-D y para métodos de preparación véase la solicitud de patente británica nº 2.222.770.

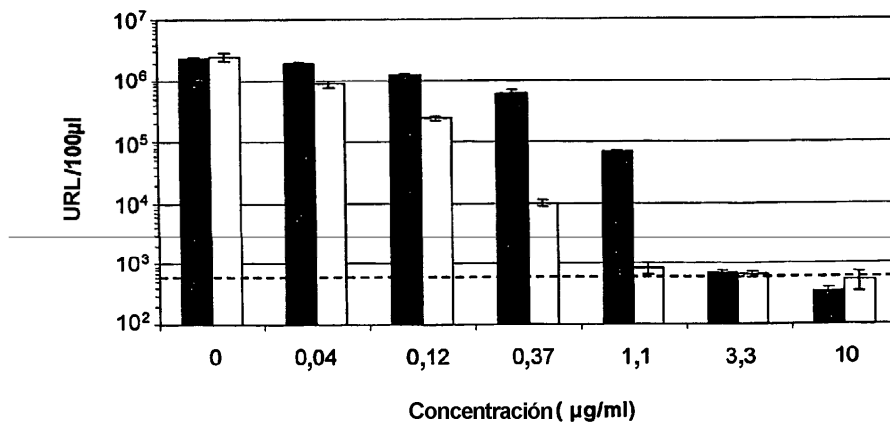
**REIVINDICACIONES**

1. Uso de [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA para la preparación de un producto medicinal para el tratamiento de infección por HCV, o para la prevención de la recidiva por HCV.
- 5 2. Uso según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA, siendo un primer ingrediente, se coadministra o se administra separadamente con por lo menos un segundo ingrediente que es una sustancia farmacéutica antivírica activa frente a HCV, seleccionada de entre el grupo constituido por ribavirina y un interferón alfa.
- 10 3. Composición farmacéutica que comprende [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA como primer ingrediente, y por lo menos una sustancia farmacéutica antivírica activa frente a HCV como segundo ingrediente, caracterizada porque dicho segundo ingrediente se selecciona de entre el grupo constituido por ribavirina y un interferón alfa.
- 10 4. Composición farmacéutica según la reivindicación 3, que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, un diluyente.
5. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, para uso en el tratamiento de infección por HCV o en la prevención de recidiva por HCV.
- 15 6. [D-MeAla]<sup>3</sup>-[EtVal]<sup>4</sup>-CsA para uso en el tratamiento de infección por HCV, o en la prevención de recidiva por HCV.

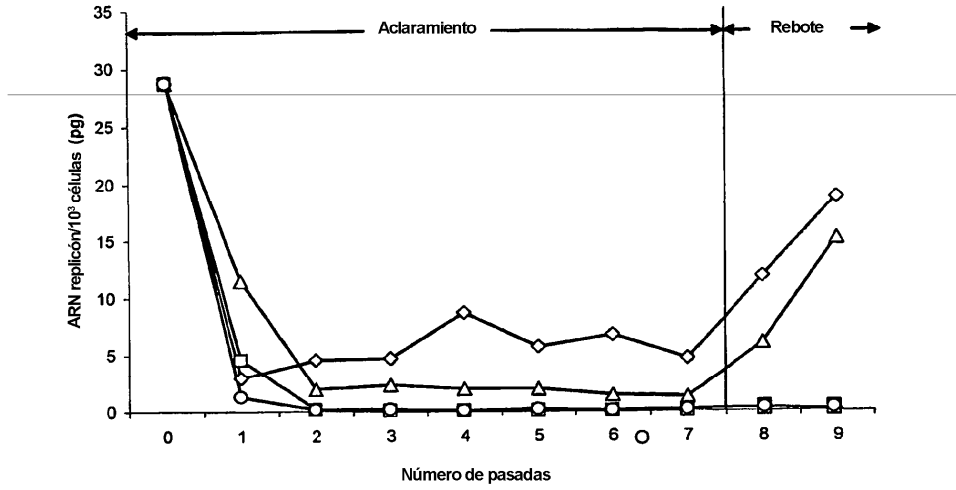
**Fig. 1**



**Fig. 2**



**Fig. 3**



**Fig. 4**

