



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

5.5.

PATENTE DE INVENCION

P.C.T. (FASE NACIONAL)

07-32692

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO USO DE D-MEALA 3- ETVAL 4-CICLOSPORINA PARA EL TRATAMIENT
DE INFECCION POR HEPATITIS C Y COMPOSICION FARMACEUTICA QUE COM-
PRENDE LA D-MEALA 3- ETVAL 4-CICLOSPORINA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE DEBIOPHARM S.A.

DOMICILIO LAUSANNE, SUIZA

74. APODERADO JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS

22. BOGOTÁ, D. C.,

EN 01-09-2009

Polo, C. 2009

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

1	SOLICITUD DE:		
☒	Patente de Invención	☐	Patente de Modelo de Utilidad
☐ Capítulo I		☒ Capítulo II	
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: DEBIOPHARM S.A. Dirección: Forum "après-demain" Ch. Messidor 5 -7 CH 1002 Lausanné, Suiza Nacionalidad o domicilio: SUIZA Lugar de Constitución: Teléfono: Fax: E-mail:		IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual: _____ Número:
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS Dirección: Avenida 22 No. 37 - 31 Of. 202 BOGOTA D.C., COLOMBIA Teléfono: 2444098 Fax: 2442408 E-mail:		IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual Número: 19.270.935 T.P. 43.308 C.S.J. BOGOTA
4 INVENTOR (58) (72)	Nombre: SCALFARO Pietro, DUMONT, Jean-Maurice, VUAGNIAUX, Grégoire y MAUVERNAY, Roland-Yves Dirección: ver hoja adjunta Nacionalidad o Domicilio: SUIZOS		
5	PCT '(86) Solicitud Internacional No. <u>PCT/IB2004/002946</u> Fecha <u>03 - 10 - 05</u> Publicación Internacional No. <u>WO 2006/038088 A1</u> Fecha <u>13 - 04 - 06</u>		
6	Título (84) <u>USO DE ID-MEALAI3-ETVAL14-CICLOSPORINA PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIÓN POR HEPATITIS C Y COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA QUE COMPRENDE LA ID-MEALAI3-ETVAL14-CICLOSPORINA</u>		
7	Clasificación Internacional (81) <u>A61K 39/12</u>		
8	Prioridad	(33) País de Origen	(32) Fecha
SI ☒ NO ☐	IB	01/10/2004	(31) Número de Solicitud PCT/IB2004/003205
9	Comprobante de pago No.		Fecha:
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.			

INVENTORES**1) SCALFARO Pietro**

Avenue Montagibert 24, CH-1005,
Lausanne, Suiza
Nacionalidad: Suizo

2) DUMONT, Jean-Maurice

Ch. de Pierra-Portay 20, CH-1009,
Pully, Suiza
Nacionalidad: Suizo

3) VUAGNIAUX, Grégoire

Rue Orient-Ville 8, CH-1005.
Lausanne, Suiza
Nacionalidad: Suizo

4) MAUVERNAY, Rolland-Yves

Champ du Moulin, CH-1677
Prez-vers-Siviriez, Suiza
Nacionalidad: Suizo

10

ANEXOS

☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☐

Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☐

Podares, si fuere el caso.

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones

☒

Copia de la solicitud Internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)

☒

Traducción de la solicitud Internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico

☐

Arte final 12X12 cm.

☐

De ser el caso, información de otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas total o parcialmente con la invención de esta solicitud.

☐

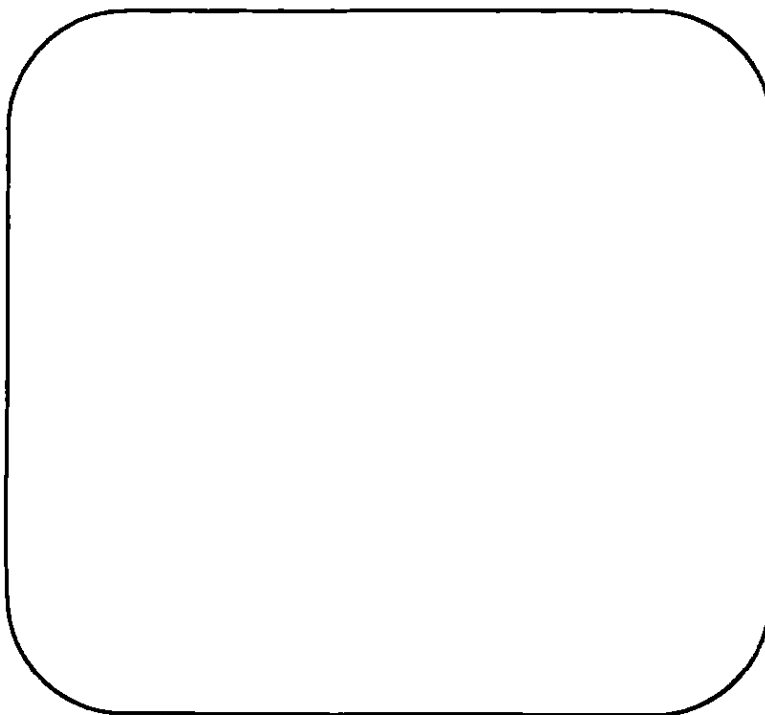
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud Internacional, Nuevas Reivindicaciones

☒

Otros: Informe de Búsqueda de Antecedentes Internacional junto con la traducción

11

FIGURA CARACTERISTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS

FIRMA:

C.C. 19.270.955 Bogotá T.P. 43.308 C.S.J.

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario: ver reverso de esta página

ANEXOS AL PETITORIO SOLICITUD PCT/ IB2005/002940, FASE NACIONAL:

1. *Solicitud PCT/ IB2005/002940 tal como fue presentada el 3 de octubre de 2005, con petitorio, en inglés y español (48 folios).*
2. *Copia de la Publicación Internacional en la Gaceta Oficial del PCT No. WO 2006/038088 A1 del 13 de Abril de 2006, junto con informe de la Búsqueda Internacional del 3 de Enero de 2006 en inglés y español. (38 folios)*
3. *4 Figuras*
4. *Informe del Examen Preliminar junto con notificación del 10 de enero de 2007, en inglés (9 folios).*
5. *Traducción al español del Informe del Examen Preliminar junto con notificación del 10 de enero de 2007, en inglés (10 folios).*
6. *Páginas 2, 18, 19 y 20 corregidas de la descripción de la invención y recibidas por la Oficina de la EPO el 25 de julio de 2006.*
7. *Tarjeta Archivo Temático y Tarjeta Propietarios.*
8. *Extracto para la publicación.*

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

For receiving Office use only

International Application No.

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

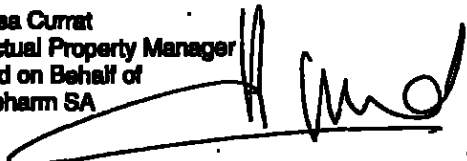
Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) DPH 070 - PCT/1

Box No. I TITLE OF INVENTION Use of cyclosporin for the treatment of hepatitis C infection and pharmaceutical composition comprising said cyclosporin	
Box No. II APPLICANT ☐ This person is also inventor	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) DEBIOPHARM SA Forum "après-demain" Ch. Messidor 5-7 CH - 1002 Lausanne	Telephone No. +4121 3210111 Facsimile No. +4121 3210169 Teleprinter No. Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality: CH	State (that is, country) of residence: CH
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) SCALFARO Pietro 24, Av. Montaglibert CH - 1005 Lausanne	This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (if this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality: CH	State (that is, country) of residence: CH
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.	
Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE	
The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: ☐ agent ☐ common representative	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.) GENIN Denis DEBIOPHARM SA Forum "après-demain" Ch. Messidor 5-7 CH - 1002 Lausanne	Telephone No. +4121 3210111 Facsimile No. +4121 3210169 Teleprinter No. Agent's registration No. with the Office
☒ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.	

Sheet No. ...2...

Continuation of Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)	
<i>If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request.</i>	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) DUMONT Jean-Maurice Ch. de Pierra-Portay 20 CH - 1009 Pully	This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality: CH	State (that is, country) of residence: CH
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☒ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) VUAGNIAUX Grégoire Rue Orient-Ville 8 CH - 1005 Lausanne	This person is: ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality: CH	State (that is, country) of residence: CH
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) 	This person is: ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality:	State (that is, country) of residence:
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.) 	This person is: ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☐ inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.) Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality:	State (that is, country) of residence:
This person is applicant for the purposes of: ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet.	

Box No. V DESIGNATIONS				
The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents. However, ☐ DE Germany is not designated for any kind of national protection ☐ KR Republic of Korea is not designated for any kind of national protection ☐ RU Russian Federation is not designated for any kind of national protection <i>(The check-boxes above may be used to exclude (irrevocably) the designations concerned in order to avoid the causing of the effect, under the national law, of an earlier national application from which priority is claimed. See the Notes to Box No. V as to the consequences of such national law provisions in these and certain other States.)</i>				
Box No. VI PRIORITY CLAIM				
The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed:				
Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is:		
		national application: country or Member of WTO	regional application: regional Office	international application: receiving Office
item (1) 1 October 2004 (04.10.2004)	PCT/IB2004/003205			IB
item (2)				
item (3)				
☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box.				
The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office) identified above as: ☒ all items ☐ item (1) ☐ item (2) ☐ item (3) ☐ other, see Supplemental Box <i>* Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed (Rule 4.10(b)(ii)).</i>				
Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY				
Choice of International Searching Authority (ISA) (if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen; the two-letter code may be used): ISA / .EP..... Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority): Date (day/month/year) Number Country (or regional Office)				
Box No. VIII DECLARATIONS				
The following declarations are contained in Boxes Nos. VIII (i) to (v) (mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration):				Number of declarations
☐ Box No. VIII (i)	Declaration as to the identity of the inventor			:
☐ Box No. VIII (ii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent			:
☐ Box No. VIII (iii)	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application			:
☐ Box No. VIII (iv)	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)			:
☐ Box No. VIII (v)	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty			:

Box No. IX CHECK LIST; LANGUAGE OF FILING		
This international application contains: (a) on paper, the following number of sheets: request (including declaration sheets) : 4 description (excluding sequence listing and/or tables related thereto) : 28 claims : 1 abstract : 1 drawings : 2 Sub-total number of sheets : 34 sequence listing : : tables related thereto : : (for both, actual number of sheets if filed on paper, whether or not also filed in electronic form; see (c) below) Total number of sheets : 34 (b) ☐ only in electronic form (Section 801(a)(i)) (i) ☐ sequence listing (ii) ☐ tables related thereto (c) ☐ also in electronic form (Section 801(a)(ii)) (i) ☐ sequence listing (ii) ☐ tables related thereto Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the ☐ sequence listing: ☐ tables related thereto: (additional copies to be indicated under items 9(ii) and/or 10(ii), in right column)	This international application is accompanied by the following item(s) (mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item): 1. ☐ fee calculation sheet : : 2. ☐ original separate power of attorney : : 3. ☐ original general power of attorney : : 4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any: : : 5. ☐ statement explaining lack of signature : : 6. ☐ priority document(s) identified in Box No. VI as item(s): : : 7. ☐ translation of international application into (language): : : 8. ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material : : 9. ☐ sequence listing in electronic form (indicate type and number of carriers) (i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application) : : (ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter : : (iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column : : 10. ☐ tables in electronic form related to sequence listing (indicate type and number of carriers) (i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quarter) only (and not as part of the international application) : : (ii) ☐ (only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quarter) : : (iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column : : 11. ☐ other (specify): : :	Number of items
Figure of the drawings which should accompany the abstract:	Language of filing of the international application: English	
Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request). Vanessa Currat Intellectual Property Manager For and on Behalf of Debiopharm SA 		

For receiving Office use only	
1. Date of actual receipt of the purported international application:	2. Drawings: ☐ received: ☐ not received:
3. Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application:	
4. Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2):	
5. International Searching Authority (if two or more are competent): ISA /	6. ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid

For International Bureau use only
Date of receipt of the record copy by the International Bureau:

PCT
PETITORIO

El abajo firmante pide que la presente solicitud internacional sea tramitada de conformidad con el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes

Solicitud Internacional No.
Fecha de Presentación Internacional:
Nombre de la Oficina receptora y "Solicitud Internacional PCT"
Referencia al expediente del solicitante o del mandatario (si se desea) (como máximo 12 caracteres)

Recuadro No. I TÍTULO DE LA INVENCIÓN USO DE [D-MEALA] 3 - [ETVAL] 4 - CICLOSPORINA PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIÓN POR HEPATITIS C Y COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA QUE COMPRENDE LA [D-MEALA] 3 - [ETVAL] 4 - CICLOSPORINA	
Recuadro No. II SOLICITANTE ☐ Esta persona es también un inventor	
Nombre y Dirección: (Apellido seguido por el nombre en el caso de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección debe figurar el código postal y nombre del país. El país indicado en el domicilio en esta casilla es el Estado (es decir país) de residencia de la solicitante, si no se indica Estado de residencia) DEBIOPHARM SA Forum "après-demain" Ch. Mesaldor 5-7 CH-1002 Lausanne	No. de Teléfono: 4121 3210111 No. de Facsimil: 4121 3210180 No. de Teleimprenta: No. de registro de la solicitud y oficina
Estado (país) de nacionalidad: CH	Estado (país) de residencia: CH
Esta persona es ☐ todos los Estados designados ☒ todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América ☐ los Estados Unidos de América ☐ los Estados indicados en el recuadro suplementario	
Recuadro No. III OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O OTRO(S) INVENTORES	
Nombre y Dirección: (Apellido seguido por el nombre en el caso de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección debe figurar el código postal y nombre del país. El país indicado en el domicilio en esta casilla es el Estado (es decir país) de residencia de la solicitante, si no se indica Estado de residencia) SCALFARO Pietro 24, Av Montalgibert CH- 1005 Lausanne	Esta persona es: ☐ Solicitante únicamente ☒ Solicitante e inventor ☐ Inventor únicamente (Si se marca este recuadro, no se debe rellenar lo que sigue)
Estado (país) de nacionalidad: CH	Estado (país) de residencia: CH
Esta persona es ☐ todos los Estados designados ☒ todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América ☒ los Estados Unidos de América ☐ los Estados indicados en el recuadro suplementario	
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja de continuación.	
Recuadro No. IV: MANDATARIO O REPRESENTANTE COMÚN; O DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA	
La persona abajo identificada, se designa/ha sido designada para actuar en nombre ☐ mandatario ☐ representante común de/del(s) solicitante(s) ante las administraciones internacionales competentes como:	
Nombre y Dirección: (Apellido seguido por el nombre en el caso de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección debe figurar el código postal y nombre del país) GENIN Denis DEBIOPHARM SA Forum "après-demain" Ch Mesaldor 5-7 CH-1002 Lausanne	No. de Teléfono: + 4121 3210111 No. de Facsimil: + 4121 3210 180 No. de Teleimprenta: No. de registro de la solicitud y oficina
☒ Domicilio para correspondencia: Marque este recuadro cuando no se designe/se haya designado ningún mandatario o representante común y el espacio de arriba se utiliza en su lugar para indicar una dirección especial a la que deba enviarse la correspondencia.	

Continuación del Recuadro No. III		OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTORES	
Si no se ha de utilizar ninguno de estos sub-recuadros, esta hoja no debe ser incluida en el peticionario.			
Nombre y Dirección: (Apellido seguido por el nombre en el caso de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección debe figurar el código postal y nombre del país. El país indicado en el domicilio en este recuadro es el Estado (es decir, país) de residencia de la solicitante, si no se indica Estado de residencia) DUMONT Jean-Maurice Ch . de Pierre-Portay 20 CH-1008 Pully		Esta persona es: ☐ Solicitante únicamente ☒ Solicitante e inventor ☐ Inventor únicamente (Si se marca este recuadro, no se debe rellenar lo que sigue) No. de registro de la solicitud y oficina	
Estado (país) de nacionalidad: CH		Estado (país) de residencia: CH	
Esta persona es solicitante para: ☐ todos los Estados designados ☒ todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América ☐ los Estados Unidos de América ☐ los Estados indicados en el recuadro suplementario			
Nombre y Dirección: (Apellido seguido por el nombre en el caso de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección debe figurar el código postal y nombre del país. El país indicado en el domicilio en este recuadro es el Estado (es decir, país) de residencia de la solicitante, si no se indica Estado de residencia) VUAGNIAUX, Grégoire Rue Orient-Ville 8 CH - 1005 Lausanne		Esta persona es: ☐ Solicitante únicamente ☒ Solicitante e inventor ☐ Inventor únicamente (Si se marca este recuadro, no se debe rellenar lo que sigue) No. de registro de la solicitud y oficina	
Estado (país) de nacionalidad:		Estado (país) de residencia:	
Esta persona es solicitante para: ☐ todos los Estados designados ☐ todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América ☒ los Estados Unidos de América ☐ los Estados indicados en el recuadro suplementario			
Nombre y Dirección: (Apellido seguido por el nombre en el caso de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección debe figurar el código postal y nombre del país. El país indicado en el domicilio en este recuadro es el Estado (es decir, país) de residencia de la solicitante, si no se indica Estado de residencia)		Esta persona es: ☐ Solicitante únicamente ☐ Solicitante e inventor ☐ Inventor únicamente (Si se marca este recuadro, no se debe rellenar lo que sigue)	
Estado (país) de nacionalidad:		Estado (país) de residencia:	
Esta persona es solicitante para: ☐ todos los Estados designados ☐ todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América ☐ los Estados Unidos de América ☐ los Estados indicados en el recuadro suplementario			
Nombre y Dirección: (Apellido seguido por el nombre en el caso de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección debe figurar el código postal y nombre del país. El país indicado en el domicilio en este recuadro es el Estado (es decir, país) de residencia de la solicitante, si no se indica Estado de residencia)		Esta persona es: ☐ Solicitante únicamente ☐ Solicitante e inventor ☐ Inventor únicamente (Si se marca este recuadro, no se debe rellenar lo que sigue)	
Estado (país) de nacionalidad:		Estado (país) de residencia:	
Esta persona es solicitante para: ☐ todos los Estados designados ☐ todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América ☐ los Estados Unidos de América ☐ los Estados indicados en el recuadro suplementario			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en otra hoja de continuación			

Recuadro No. V DESIGNACIONES

El llenado de esta solicitud constituye, conforme a la Regla 4.9(a), la designación de todos los Estados Contratantes obligados al PCT en la fecha de presentación internacional, para el otorgamiento de todo tipo de protección disponible y, en su caso, para el otorgamiento de patentes regionales y nacionales.

Sin embargo,

☐ DE Alemania no está designada para ningún tipo de protección nacional.

☐ KR República de Corea no está designada para ningún tipo de protección nacional.

☐ RU Federación Rusa no está designada para ningún tipo de protección nacional.

(Al marcar las casillas anteriores, se pueden excluir (irrevocablemente), las designaciones deseadas para evitar que se deje sin efecto, conforme a la ley nacional, una solicitud nacional anterior de la cual se reclama la prioridad. Ver las notas de la Casilla No. V sobre las consecuencias de las disposiciones de la ley nacional para estos y otros Estados).

Recuadro No. VI REVINDICACIÓN DE PRIORIDAD

Se reivindica la prioridad de las siguientes solicitudes anteriores:

Fecha de presentación de solicitudes anteriores (día/mes/año)	Número de solicitud anterior	En donde la solicitud anterior es:		
		solicitud nacional País	solicitud regional: * Oficina Regional	solicitud internacional: Oficina Receptora IB
Punto (1) 1 DE OCTUBRE DE 2004 (01.10.2004)	PCT/IB2004/003205			
Punto (2)				
Punto (3)				

☐ Se indican otras reivindicaciones de prioridad en el Recuadro suplementario

Se ruega a la Oficina receptora que prepare y transmita a la Oficina Internacional una copia certificada de la solicitud de las solicitudes anteriores identificadas (s) (únicamente si la solicitud anterior fue presentada en la Oficina que, para los propósitos de la presente solicitud internacional, es la Oficina Receptora) identificada(s) como:

☒ Todos los puntos ☐ Punto (1) ☐ Punto (2) ☐ Punto (3) ☐ otros, ver Recuadro suplementario

* Cuando la solicitud anterior es una solicitud ARIPO, indique por lo menos un país que forme parte de la Convención de París para la Protección de la Propiedad Industrial o un Miembro de la Organización Mundial del Comercio para el cual se presentó la solicitud anterior (Regla 4.10(b)(ii)).

Recuadro No. VII ADMINISTRACIÓN ENCARGADA DE LA BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Elección de la Administración encargada de la búsqueda internacional (BA) (si dos o más Administraciones encargadas de la búsqueda internacional, son competentes para efectuar la búsqueda internacional, indique el nombre de la Administración elegida; se puede utilizar el código de dos letras):

ISA/ EP

La Solicitud para utilizar los resultados de la búsqueda anterior; referencia a la búsqueda (si ya se llevó a cabo una búsqueda anterior por la Administración Encargada de la Búsqueda Internacional):

Fecha (día/mes/año)

Número:

País (u oficina regional)

Recuadro No VIII DECLARACIONES

Las siguientes declaraciones están contenidas en los Recuadros Nos VIII (i) a (v) (marque las casillas indicadas abajo que corresponden, e indique el número de cada tipo de declaración en la columna de la derecha):

☐ Recuadro No VIII (i)	Declaración sobre la identidad del inventor	:
☐ Recuadro No VIII (ii)	Declaración sobre el derecho del solicitante, en la fecha de presentación internacional, para solicitar y que le sea concedida una patente	:
☐ Recuadro No VIII (iii)	Declaración sobre el derecho del solicitante, en la fecha de presentación internacional, a reivindicar la prioridad de la solicitud anterior	:
☐ Recuadro No VIII (iv)	Declaración sobre la calidad de inventor (sólo para la designación de los Estados Unidos de América)	:
☐ Recuadro No VIII (v)	Declaración sobre las divulgaciones no perjudiciales o las excepciones a la falta de novedad	:

Recuadro No. IX LISTA DE VERIFICACIÓN: IDIOMA DE PRESENTACIÓN		
La presente solicitud internacional contiene: (a) el siguiente número de hojas en formato de papel: Petitorio (Incluyendo las hojas de la declaración) : 4 descripción (excluyendo la parte del listado de secuencias) : 26 reivindicaciones : 1 resumen : 1 dibujos : 2 Número subtotal de hojas: 34 parte del listado de secuencias de la descripción (número de hojas, si se presentan en formato de papel, con independencia de que también se presenten en formato legible en computadora; ver (b) abajo) : 34 Número Total de hojas: 34 (b) parte de lista de secuencias de la descripción presentada en formato legible en computadora (i) ☐ sólo (según la Sección 801(a)(i)) (ii) ☐ además de presentarse en formato de papel (según la Sección 801(a)(ii)) Tipo y número de soportes (disquete, CD-ROM, CD-R u otros) que contienen la parte del listado de secuencias (las copias adicionales se deben indicar en el punto 9(i) de la columna de la derecha):	La presente solicitud internacional está acompañada de los documentos que se identifican a continuación: (marcar las casillas que proceden e indicar en la columna de la derecha el número de cada documento): 1. ☐ hoja cálculo de tasas 2. ☐ poder separado original 3. ☐ poder general original 4. ☐ copia del poder general; número de referencia, si lo hay: 5. ☐ declaración que explica la ausencia de una firma 6. ☐ documento(s) de prioridad identificado(s) en el Recuadro No. VI como punto(s): 7. ☐ traducción de la solicitud internacional al (idioma): 8. ☐ indicación separada relativa a los microorganismos depositados u otro material biológico 9. ☐ listado de secuencias en formato legible en computadora (Indicar también el tipo y el número de soportes (disquete, CD-ROM, CD-R u otros)) (i) ☐ copia presentada para la búsqueda internacional conforme a la Regla 13ter sólo (y no como parte de la solicitud internacional): (ii) ☐ (sólo cuando se ha marcado la casilla (b)(i) o (b)(ii) en la columna de la izquierda) copias adicionales, incluyendo, cuando proceda, la copia para la búsqueda internacional según la Regla 13ter: (iii) ☐ junto a la declaración que proceda sobre la identidad de la copia – o copias – respecto de la parte de lista de secuencias mencionada en la columna de la izquierda 10. ☐ Otros (Especifique):	Número de documentos
Figura de los dibujos los cuales deben acompañar el resumen	Idioma de presentación de la solicitud internacional INGLES	
Recuadro No. X FIRMA DEL SOLICITANTE, MANDATARIO O DEL REPRESENTANTE COMÚN Junto a cada una de las firmas, indique el nombre de la persona que firma, así como su calidad (si dicha calidad no es evidente por la lectura del petitorio) Vanessa Courret Gerente de la Oficina de Propiedad Intelectual por y en beneficio de Debiopharm SA [FIRMADO]		

Para uso de la Oficina receptora únicamente		
1. Fecha efectiva de recepción de la pretendida solicitud internacional	2. Dibujos	
3. Fecha efectiva de recepción, rectificada en razón de la recepción ulterior pero dentro del plazo, de documentos o de dibujos que completan la pretendida solicitud internacional:	☐ recibidos:	
4. Fecha de recepción, dentro del plazo, de las correcciones solicitadas según el Artículo 11(2) del PCT:	☐ no recibidos:	
5. Administración de búsqueda internacional especificada por el solicitante	ISA/	6. ☐ Transmisión de la copia para la búsqueda diferida hasta que se pague la tasa de búsqueda
- Para uso de la Oficina Internacional únicamente -		
Fecha de recepción del ejemplar original por la Oficina Internacional:		

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
13 April 2006 (13.04.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/038088 A1(51) International Patent Classification:
A61K 38/13 (2006.01) A61P 31/14 (2006.01)(21) International Application Number:
PCT/IB2005/002940

(22) International Filing Date: 3 October 2005 (03.10.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
PCT/IB2004/003205
1 October 2004 (01.10.2004) IB(71) Applicant (for all designated States except US): DEBIO-
PHARM SA [CH/CH]; Forum "après-demain", Ch. Mes-
skior 5-7, CH-1002 Lausanne (CH).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): SCALFARO,
Pietro [CH/CH]; 24, Avenue Montgibert, CH-1005
Lausanne (CH). DUMONT, Jean-Maurice [CH/CH];
Ch. de Pierra-Portay 20, CH-1009 Pully (CH). VUAGNI-
AUX, Grégoire [CH/CH]; Rue Orient-Ville 8, CH-1005
Lausanne (CH). MAUVERNAY, Rolland-Yves [CH/CH];
Champ du Moulin, CH-1677 Prez-vers-Siviriez (CH).(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AI, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GU, HI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SI, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GI,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CI, CG, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.(54) Title: USE OF (D-MEALA)-[BTVAL]-4-CYCLOSPORIN FOR THE TREATMENT OF HEPATITIS C INFECTION AND
PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING SAID (D-MEALA)-[BTVAL]-4-CYCLOSPORIN(57) Abstract: This invention relates to the use in the treatment of HCV infection, either as single active agents or in combination
with another active agent, of a cyclosporin having increased cyclophilin binding activity and essentially lacking immunosuppressive
activity.

WO 2006/038088 A1

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA CONFORME AL TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial para la Propiedad Intelectual
Oficina Internacional

(43) Fecha de Publicación Internacional
13 de abril de 2006 (13.04.2006)

WIPO
OMPI

(Código de Barras)

PCT (10) No. de Publicación Internacional
W0 2006/038088 A1

(81) Clasificación Internacional de Patentes: A 61K 38/13 (2006.1) A 61P 31/14 (2006.01)	(81) Estados Designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
(21) No. de solicitud internacional: PCT/IB2005/002840	(84) Estados Designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional disponible): Patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(22) Fecha de Presentación Internacional: 3 DE OCTUBRE DE 2005 (03.10.2005)	
(25) Idioma de Presentación: INGLES	
(26) Idioma de Publicación: INGLES	
(30) Datos de Prioridad PCT/IB2004/003205 1 DE OCTUBRE DE 2004 (01.10.2004) IB	
(71) Solicitantes (para todos los estados excepto EUA): DEBIOPHARM SA [CH/CH]; Forum "après-demain", Ch. Mesaldor 5-7, CH-1002 Lausanne (CH).	
(72) Inventores: y (75) Inventores/Solicitantes (solo para EUA): SCALFARO, Pietro [CH/CH]; 24, Avenue Montgibert, CH-1005 Lausanne (CH). DUMONT, Jean-Maurice [CH/CH]; Ch de Pierre-Portay 20, CH-1009 Pully (CH). VAUGNIAUX, Grégoire [CH/CH]; Rue Orient-Ville 8, CH-1005 Lausanne (CH). MAUVERNAY, Roland-Yves [CH/CH]; Champ du Moulin, CH-1877 Prez-vers-Sivriez (CH)	Publicada - Con informe de búsqueda internacional. - Antes del término del plazo para modificar las reivindicaciones y para volverse a publicar en caso de recepción de modificaciones. Para el código de dos letras y otras abreviaciones, referirse a las "Notas de Guía para Códigos y Abreviaciones" que aparece al inicio de cada una de las publicaciones regulares de la Gaceta del PCT.

WO 2006/038088 A1 (CÓDIGO DE BARRAS)

(84) Título: USO DE [D-MEALA]3-[ETVAL]4-CICLOSPORINA PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIÓN POR HEPATITIS C Y COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA QUE COMPRENDE LA [D-MEALA]3-[ETVAL]4-CICLOSPORINA

(87) Extracto:

Esta invención se refiere al uso en el tratamiento de infección por HCV, ya sea como agentes activos simples o en combinación con otro agente activo, de una ciclosporina que tiene actividad de enlace incrementado a ciclofilina y esencialmente carece de actividad inmunodepresora.

USE OF [D-MEALA]3-[ETVAL]4-CYCLOSPORIN FOR THE TREATMENT OF HEPATITIS C INFECTION AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING SAID [D-MEALA]3-[ETVAL]4-CYCLOSPORIN

The present invention relates to the use of a cyclosporin for the treatment of hepatitis C virus (HCV) infection and to a pharmaceutical composition comprising said cyclosporin.

HCV was cloned and characterized about 15 years ago by Choo and colleagues (see Science 244, (1989), 359-362). HCV belongs to the family Flaviviridae and comprises an enveloped nucleocapsid and a single-stranded RNA genome of positive polarity (see Bartenschlager et al., Antiviral Res. 60, (2003), 91-102). HCV is transmitted primarily by blood, blood products and vertical transmission during pregnancy. Introduction of diagnostic tests for screening blood products has significantly reduced the rate of new infection.

Still, HCV remains a serious medical problem. There are currently about 170 million people infected with HCV. The initial course of infection is typically mild. However, the immune system is often incapable of clearing the virus, and people with persistent infections are at a high risk for liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma (see Poynard et al., Lancet 349, (1997), 825-832).

There is no vaccine available, and therapeutic options are very limited (see Manns et al., Indian J. Gastroenterol. 20 (Suppl. 1), (2001), C47-51; Tan et al., Nat. Rev. Drug Discov. 1, (2002), 887-881).

Current therapy is based on a combination of interferon alpha and ribavirin. This therapy produces a sustained anti-viral response in 85-90% of patients infected with genotypes 2 and 3, but, unfortunately, only in about 45% of patients infected with the prevalent genotype 1. Furthermore, side effects are significant and include myalgia, arthralgia, headache, fever, severe depression, leucopenia and haemolytic anaemia.

Clearly, additional therapies, with a higher antiviral activity and a better safety profile, are required for the treatment of HCV infection, particularly e.g. in

CONFIRMATION COPY

- 2 -

the case of the prevention of HCV recurrence. In order to establish the safety profile, criteria such as low cytotoxicity and cytostatic and high selectivity index are particularly relevant for clinical treatment of HCV infection.

5 A novel approach for the treatment of HCV infection using cyclosporins was recently described by clinical observations (see Teraoka et al., Transplant Proc., 1988, 20 (3 suppl 3), 868-876, and Inoue et al. J Gastroenterol, 2003, 38, 567-572). Recently it was shown that Cyclosporin A (CsA) inhibited the *in vitro* intracellular replication of an HCV subgenomic replicon at clinically achievable
10 drug concentrations (see Watahi et al., Hepatology 38, 2003, 1282-1288, and Nakagawa et al., BBRC 313, 2004, 42-47). Both groups suggested that the anti-HCV effect of CsA was not associated with immunosuppressive activity based on observations made with the use respectively of an immunosuppressive macrolide, i.e. the compound known under the name FK 506 and a non-immunosuppressive
15 Cyclosporin A derivative, i.e. the compound known under the name NIM 811 or [Melle]¹-CsA. Nakagawa et al. consider that expanding applications of CsA may cause substantial problems due to its well-known immunosuppressive properties and suggest that one solution to overcome this problem would be to consider the use of non-immunosuppressive cyclosporin analogs.

20

During the last 15 years, a number of medicinal chemistry studies have been conducted with the aim to identify such non-immunosuppressive cyclosporin analogs and compound NIM 811 is one of the most representative compounds having such a property.

25

NIM 811, along with 9 other Cyclosporin A derivatives, were reported by Ko et al. in patent application EP 0 4840 281 for their non-immunosuppressive properties and were considered as being potentially useful in the treatment of HIV infection and the prevention of AIDS. The design of those derivatives involved the
30 modification of the amino-acids in 4- and/or 5-positions of Cyclosporin A.

By modifying amino-acids in 2- and/or 6-positions of Cyclosporin A, Sigal et al. synthesised a total of 61 cyclosporin analogs and observed that such chemical

17
modifications induce a decrease in the immunosuppressive activity (see Sigal et al., J. Exp. Med., 173, 1991, 619-628).

Further attempts for modifying amino-acid in 3-position of Cyclosporin A in order to obtain non-immunosuppressive compounds were described in particular by Barrière et al., in WO 98/28328, WO98/28329, and WO 98/28330.

Wenger et al. have designed a series of compounds that differ from Cyclosporin A in position 3, in which they contain an N-methylated, nonbulky hydrophobic or neutral amino acid other than a glycine, and in position 4, in which they contain an N-methylated or N-ethylated hydrophobic or neutral amino acid other than a leucine and they report that those compounds have a high potency to inhibit HIV-1 replication and essentially lack immunosuppressive activity (see International patent application WO 00/01715 and Tetrahedron Lett., 41, (2000), 7193-8).

The aim of the present invention is to provide the clinician with a new therapy for the treatment of HCV infection, particularly e.g. in the case of the prevention of HCV recurrence. This therapy should offer a higher antiviral activity and a better safety profile in comparison to the already approved therapy or the newly proposed ones.

The present inventors surprisingly found that the administration to a patient infected with HCV of a very specific compound, i.e. [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA, meets the above requirements. They observed that, in addition to its non-immunosuppressive property, [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA has a significantly increased affinity for cyclophilins, which increased affinity is correlated with an elevated efficacy against inhibition of HCV replication.

Accordingly, one of the subject-matters of the present invention relates to the use of [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA for the manufacture of a medicinal product intended for the treatment of HCV infection in a patient.

- 4 -

[D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA has been reported by Wenger et al. in WO 00/01715 and it has been attributed the CAS Registry Number 254435-95-5. It is a cyclic undecapeptide described by the following formula:



where MeBmt is N-methyl-(4R)-4-but-2E-en-1-yl-4-methyl-(L)threonine, α Abu is L- α -aminobutyric acid, D-MeAla is N-methyl-D-alanine, EtVal is N-ethyl-L-valine, Val is L-valine, MeLeu is N-methyl-L-leucine, Ala is L-alanine, (D)Ala is D-alanine, and MeVal is N-methyl-L-valine. The conventional numbering of amino acid positions generally used in reference of Cyclosporin A is shown below the formula. This is achieved by using composite names comprising a first portion indicating the identity of residues that are different from those in cyclosporin A and providing their position, and a second portion labelled "CsA" indicating that all other residues are identical to those in Cyclosporin A. For example, [Melle]⁴-CsA is a cyclosporin that is identical to cyclosporin A except that MeLeu in position 4 is replaced by Melle (N-methyl-L-isoleucine).

20 The present invention will be explained further with following experiments and with the drawing in which:

- Fig. 1 represents a dose response histogram measured by luciferase assay in infected Huh-7-Luxet cells;
- Fig. 2 represents a dose response histogram measured by luciferase assay in infected Huh-7.5 cells;
- Fig. 3 represents clearance response curves of infected Huh-9-13 cells;
- Fig. 4 represents 3D representation of dose response with combination IFN / [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA.

30 Current medical uses of Cyclosporin A relate to the ability of this compound to suppress the cell-mediated immune response by preventing production and release of several autocrine T-cell growth factors, including interleukin 2 (IL-2), from activated T cells (see 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). Upon entry into cells, Cyclosporin A binds to cyclophilins with high affinity (see Handschumacher et al. (1984) Science 226, 544-547). As among different biological function, they have peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) activity that can be measured *in vitro* (see Fischer et al. (1989) Nature 337, 476-478; Takahashi et al. (1989) Nature 337, 473-475). Critical for the immunosuppressive effect of cyclosporin A is an interaction between cyclophilin-Cyclosporin A complex and calcium- and calmodulin-dependent serine/threonine phosphatase 2B (calcineurin) (see Hauske (1993) DN&P 6, 705-711, Friedman et al. (1991) Cell 66, 799-806; Liu et al. (1991) Cell 66, 807-815). Formation of this ternary complex results in an inhibition of the phosphatase activity of calcineurin. (see Jain et al. (1993) Nature 365, 352-355; Rao et al. (1997) Annu. Rev. Immunol. 15, 707-747; Crabtree (1999) Cell 96, 611-614). Calcineurin promotes the selective dephosphorylation of NF-AT that then translocates to the nucleus where it associates with activator protein 1 and transactivates target genes, including the IL-2 gene.

It is believed that, due to the amino-acids in 3- and 4-positions, [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA has a dramatically reduced ability to interact with calcineurin as shown by transcriptional and immunological assays as well as a significantly increased affinity for cyclophilins as indicated by assays of inhibition of peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity.

Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) activity of cyclophilins was determined using a procedure adapted from Kofron et al. (see Biochemistry 30, 6127-6134 (1991); J. Am. Chem. Soc. 114, 2670-2675 (1992)). N-succinylated Ala-Ala-Pro-Phe-para nitro-aniline (Suc-AAPF-pNA, Bachem, Bubendorf, Switzerland) was used as the substrate. The assay was based on the preferential chymotrypsin cleavage of the trans isoform of the Phe-pNA bond in the tetrapeptide Ala-Ala-Pro-Phe-pNA. This cleavage liberates the para-nitroaniline moiety that can be detected and quantitated at 390 nm ($\epsilon = 11,814 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Schutkowski et al. (1995) Biochemistry 34, 13016-13026. Cis-trans isomerization is catalysed by cyclophilin (PPIase, EC 5.2.1.8). After mixing CsA or another cyclosporin ($10^{-9} - 2 \times 10^{-8} \text{ M}$ final concentrations prepared from 1000-fold concentrated stock solutions in ethanol) with 0.1 μg cyclophilin (Sigma) in a total

20
volume of 1.5 ml of 40 mM Hepes, pH 7.9, and incubation for 50 min on ice, the reaction mixture was transferred to a cuvette that was kept at 10°C in a Varian spectrophotometer (Varian). Subsequent to the addition of 3.75 mg of chymotrypsin (70 µl of a solution of chymotrypsin in 10 mM HCl), the reaction was
5 initiated by addition of 10 µl of a 3.2 mM solution of Suc-AAPF-pNA in 0.5 M LiCl/trifluoroethanol. The reaction was monitored for 3 min, and an initial rate constant was determined from the data obtained. As a control, an initial rate constant was also determined for a parallel reaction that lacked cyclophilin. Concentration-response curves were established for cyclosporin A and other
10 cyclosporins, and IC₅₀ (50% inhibitory concentration) values of different cyclosporins were expressed relative to that of cyclosporin A (1.0). A value less than 1 means that the compound has an higher cyclophilin affinity than CsA.

A NF-AT-dependent reporter assay was used initially to estimate
15 immunosuppressive activities of cyclosporins. Baumann et al. (1992) Transplant. Proc. 24, 43-48. Jurkat T cells stably transfected with a reporter construct containing a bacterial β-galactosidase gene under the control of a promoter of an IL-2 gene were obtained from G. Zenke, Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland. The cells were grown in RPMI1640 medium supplemented with
20 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100 u/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 2 mM glutamine, 50 µM 2-mercaptoethanol and 100 u/ml hygromycin B. The cells were stimulated by the addition of 2.4 µM phorbol-12-myristate-13-acetate and 75 µg/ml phytohemagglutinin in the presence or absence of cyclosporin A or another cyclosporin (10^{-6} – 2×10^{-5} M final concentrations prepared from 1000-fold
25 concentrated stock solutions in ethanol). Subsequent to incubation for 20 h at 37°C, cells were harvested and lysed in 50 mM Na₂HPO₄ (pH 9.0), 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 1% Triton X-100, 0.5 mM 4-methylumbelliferyl-β-D-galactoside (Sigma, Buchs, Switzerland). The β-galactosidase reaction was allowed to proceed for 1 h in the dark at room temperature. Fluorescent 4-methyl-
30 umbelliferone was assayed fluorometrically in the supernatant solution (excitation: 355 nm; emission: 480 nm). Concentration-response curves were established for cyclosporin A and other cyclosporins, and the IC₅₀ values of different cyclosporins were calculated relative to that of cyclosporin A (1.0). A value higher than 1 means that the compound is less immunosuppressive than CsA.

Example results are shown in Table 1 below.

Table 1: Cyclophilin binding (PPIase) and immunosuppressive (IL-2) activities of CsA and other cyclosporins

Compound	PPIase	IL-2
CsA	1.0	1.0
[D-MeAla] ³ -[EtVal] ⁴ -CsA	0.3	7161
[Melle] ⁴ -CsA	0.5	2250

The data shown in Table 1 revealed that certain substitutions in position 4 (i.e., Val, Ile) dramatically reduced immunosuppressive activity (measured as inhibition of IL-2 expression) as well as detectably enhanced cyclophilin binding activity (measured as inhibition of PPIase activity of cyclophilin). Substitution in position 3 resulted in a substantial further increase in cyclophilin binding activity (by 2 fold or more; cf [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA. It had a higher cyclophilin binding activity and a lower residual immunosuppressive activity than [Melle]⁴-CsA, the best reference compound available from the literature. [Melle]⁴-CsA is also known as NIM811.

Non-immunosuppressive activity of [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA

In a confirmatory analysis, immunosuppressive activities of CsA, [Melle]⁴-CsA and [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA were estimated using the mixed lymphocyte reaction. In this assay, cyclosporins were dissolved in ethanol (10 mg/ml). Freshly isolated CD4⁺ PBMCs from two healthy donors were mixed subsequent to inactivation by irradiation of one of the populations (stimulator cells; S). After five days of co-culture in the presence or absence of a cyclosporin (1 µg/ml), the proliferative response of the non-inactivated cell population (responder cells; R) was determined by [³H]-thymidine incorporation.

The assay was conducted reciprocally with the two cell populations, each being inactivated and stimulated in turn. Stimulation (%) of responder cells was calculated by the formula:

Percent stimulation = $100 \times (\text{sample with cyclosporin} - \text{background}) / (\text{sample without cyclosporin} - \text{background})$

Sample refers to a mixture of stimulator and responder cells. Background represents a control in which only stimulator cells are mixed. Results are shown in Table 2. They were interpreted to mean that both [Melle]⁴-CsA and [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA are essentially devoid of immunosuppressive activity.

Table 2: Proliferative response of CD4⁺ PBMCs in the presence/absence of cyclosporine

Co-culture	Compound	N	% Stimulation (relative)	Standard deviation
R1 x S2	None	8	100	30
R1 x S2	CsA	4	29	3
R1 x S2	[Melle] ⁴ -CsA	4	84	13
R1 x S2	[D-MeAla] ³ -[EtVal] ⁴ -CsA	4	75	11
R2 x S1	None	8	100	9
R2 x S1	CsA	4	9	2
R2 x S1	[Melle] ⁴ -CsA	4	75	9
R2 x S1	[D-MeAla] ³ -[EtVal] ⁴ -CsA	4	65	7
S1 x S2	None	4	0	0.8

R1 x S2 refers to a co-culture of responder cells from donor 1 and stimulator cells from donor 2. N is the number of measurements.

15 High anti-HCV activity and low cytotoxicity/cytostatic effect of [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA

As mentioned previously, infection with hepatitis virus C (HCV) is a serious health problem because persistently infected patients are at a high risk for developing chronic liver diseases including cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Current available therapy is inadequate for a large fraction of the latter population as well as is associated with significant side effects. Until recently, development of

more effective therapies was hindered by the absence of an appropriate *in vitro* model of HCV replication that allows screening of potentially active compounds prior to evaluation in human clinical trials. This obstacle was overcome by the development of genetically modified HCV minigenomes (replicons) that self-amplify in cultured hepatoma cells to high levels (Lohmann et al. Science 285, (1999), 110-113). This HCV replicon system has rapidly become the standard tool for studying HCV replication, pathogenesis and persistence (Bartenschlager et al. Antiviral Res. 60, (2003), 91-102). The HCV genome consists of a single-stranded RNA that contains a single open reading frame for a polyprotein of about 3000 amino acids. Translation of this polyprotein is initiated at an internal ribosome entry site (IRES) located at the 5' end of the RNA. The HCV polyprotein is cleaved into at least ten proteins. They include capsid protein C, envelope proteins E1 and E2, possible viroporin protein p7, non-structural proteins NS2 and NS3 having serine proteinase as well as ATPase/helicase activities, NS4A, membranous web-inducing protein NS4B, NS5A and RNA-dependent RNA polymerase NS5B. The first successful replicon was a bicistronic RNA containing in a 5' to 3' direction an HCV IRES, a coding sequence for a neomycin phosphotransferase, an IRES from an encephalocarditis virus and coding sequences for HCV proteins NS3 to NS5. Subsequent to introduction into Huh-7 cells and selection using G418 (geneticin), this replicon could be shown to replicate autonomously to high levels (1,000-5,000 copies/cell) (Lohmann et al., 1999). Characterization of the system revealed that replication efficiency depended on permissiveness of the host cell and, importantly, on the selection of cell culture-adaptive mutations in the HCV protein-coding sequences. Replication was found to be sensitive to interferon alpha, providing evidence for the relevance of the system for screening drugs that have *in vivo* efficacy. Variant replicons were also constructed in which the neomycin phosphotransferase-coding sequence was replaced, e.g., by a luciferase-coding sequence or by sequences coding for a luciferase-ubiquitin-neomycin phosphotransferase fusion protein. Replication of the latter variant replicons can be assayed by the convenient luciferase assay, whereas replication of the former replicon requires determinations of RNA copy number.

Watahi et al. (2003) demonstrated by Northern blot and quantitative RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) that HCV RNA

- 10 -

accumulation was inhibited by CsA but not by the immunosuppressive macrolide FK506 and the non-immunosuppressive CsA derivative PSC 833 in HCV replicon-containing MH-14 cells. Their assays that involved 7-day exposures of cells to active agents revealed that HCV RNA titer was reduced by about 200 fold in the presence of 1 µg/ml cyclosporin A. They further found that non-immunosuppressive cyclosporin [Melle]⁴-CsA also inhibited HCV replication. Results indicated that [Melle]⁴-CsA was about equally as effective as CsA in reducing HCV RNA titer.

10 To determine whether the cyclosporin of the present invention has anti-HCV activity and, should it has such activity, how this activity compares with the activities of CsA and [Melle]⁴-CsA, experiments were carried out that compared inhibitory effects of CsA, [Melle]⁴-CsA and [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA in HCV replicon systems.

15 Assays used Huh 5-2 cells that contained a bicistronic RNA encoding a firefly luciferase-ubiquitin-neomycin phosphotransferase fusion protein and HCV proteins NS3-5. The viral sequences originated from an HCV virus of genotype 1b. Cells were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine (Life Technologies), 1 x non-essential amino acids (Life Technologies), 100 u/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 250 µg/ml G418 (Geneticin, Life Technologies) at 37°C and 5% CO₂. For antiviral (replication) assays, cells were seeded at a density of 7000 cells/well in 96-well View PlatesTM (Packard) in the same medium except for G418. After a 24-h incubation, medium was removed, serial dilutions of test compounds in medium were added, and cells were incubated for an additional 72 h.

25 Antiviral effects were estimated either by luciferase assay or quantitative RT-PCR. To carry out luciferase assays, medium was removed, and cells were washed with PBS. Subsequent to lysis in 50 µl of Glo-lysis buffer (Promega) for 15 min, 50 µl of Stead-Glo Luciferase Assay Reagent (Promega) were added to cell lysates. Luciferase activity was measured using a luminometer, and the signal from each test well was expressed as a percentage of the signal measured in wells of cultures not exposed to a test compound.

Cell density and cytostatic effects were estimated in parallel cultures in regular 96-well plates (Beckton-Dickinson) using the MTT assay (CellTiter 96^R AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega). In this assay,
5 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxy-phenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) is bioreduced to a formazan that is quantitated at 498 nm in a plate reader. Formazan production is directly correlated with number of live cells.

RT-PCR analysis quantitated the neomycin region of replicons using an ABI
10 PRISM 7700 sequence detector (Applied Biosystems, Foster City, CA). The forward and reverse primers used were 5'-CCGGCTACCTGCCCCATTC-3' and 5'-CCAGATCATCCTGATCGACAAG-3', respectively. The fluorogenic probe was 5'-ACATCGCATCGAGCGAGCACGTAC-3'. As an internal control, a plasmid containing part of the neomycin phosphotransferase gene sequence was used.

15 Results from these experiments permitted calculation of EC₅₀ for the different cyclosporins, which is the effective concentration required to inhibit HCV replicon replication by 50%, and of CC₅₀, which is the concentration required that inhibits the proliferation of exponentially growing cells by 50%, and a selectivity
20 index SI, which is the ratio between CC₅₀ and EC₅₀.

Table 3 shows values obtained from Huh 5-2 cells using luciferase activity assays for estimation of replication efficiency and MTT assays for calibration of luciferase assays and for estimation of cytostatic effects of compounds. In
25 agreement with the above-discussed observations by Watashi et al. (2003), CsA and [Melle]⁴-CsA had similar anti-HCV (replication) activities.

Surprisingly, [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA was considerably more potent than CsA and [Melle]⁴-CsA. It was also noted that the 50% cytostatic concentration
30 (CC₅₀) for [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA was significantly higher than the values determined for CsA and [Melle]⁴-CsA. Consequently, a considerably higher selectivity index was found for [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA as compared to the two other cyclosporins. Analogous experiments in which EC₅₀ values were derived from determinations of RNA titers using quantitative RT-PCR yielded similar

26
26

conclusions. SI values of 45*, 73 and 625* were obtained for CsA, [Melle]⁴-CsA and [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA, respectively. Asterisks indicate that the lower of two independently determined values are presented.

5 Table 3: EC₅₀, CC₅₀ and SI values determined from luciferase assays of HCV RNA replication and MTT assays of cytotoxicity in Huh 5-2 cells comprising a luciferase-containing HCV minireplicon

Compound	EC ₅₀ (µg/ml) +/- Std.Dev.	CC ₅₀ (µg/ml) +/- Std.Dev.	Selectivity index
CsA	0.28 +/- 0.13	11.6 +/- 5.6	41
[D-MeAla] ³ -[EtVal] ⁴ -CsA	0.03 +/- 0.04	> 27	> 900
[Melle] ⁴ -CsA	0.22	14	64

10 Antiviral activity of [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA measured in infected target cells with recombinant HCV

15 The anti-HCV activity of [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA compared to CsA was further determined in culture systems approaching the *in vivo* situation. The method used hepatoma cells that had been infected with an infectious full length chimeric HCV construct or the same virus that was modified to carry a luciferase receptor gene. After the treatment of the infected cells with the cyclosporin of the invention or CsA, the luciferase activity was measured as being directly correlated to the inhibition of the viral replication.

20 Infectious HCV viruses of full-length chimeric genome between HCV strains J6 and JFH1 (Jc1) were used to inoculate the hepatoma cells of the assays. The construct of Jc1 virus was also modified to obtain a bicistronic genome carrying a luciferase reporter gene (Jc1-Luc). Twenty-four and ninety-six hours after the transfection of RNA transcripts of the genomes by electroporation of Huh-7.5 cells, 25 cell culture supernatant was collected. Supernatants were filtered (0.45 µM) and cell culture infectious dose 50 (CCID50) per ml were determined by the limiting dilution assays according to Lindenbach et al. (Science, 309, (2005), 623-626). The CCID50 were 1.3 x 10⁵ for Jc1 and 4.2 x 10³ for Jc1-Luc.

27
27

Assays used either Huh-7-Lunet or Huh-7.5 cells (Lohmann et al., Science 285(5424), (1999), 110-113). Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FCS) (Integro), 1x non-essential amino acids (Gibco), 100 IU/ml penicillin (Gibco), 100 µg/ml streptomycin (Gibco) or 25 µg/ml hygromycin (Gibco) for Huh-mono cells at 37°C and 5% CO₂. For antiviral (replication) assays, Huh-7-Lunet and Huh-7.5 cells were seeded at a density of 2 x 10⁴ or 4 x 10⁴ cells per well of a 12-well plate. Twenty four hours later, the medium was replaced by 0.5 ml of the Jc1-Luc virus stock (12-well plates) or 0.25 ml of the Jc1 virus stock (12-well plates). Four hours later, the virus inoculum was replaced by medium containing different concentrations of CsA or [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA and were further incubated for an additional 72 hours.

The inhibition of viral replication were estimated by luciferase assay. To carry out luciferase assay, cells were harvested, washed with PBS and lysed in luciferase lysis buffer (1% Triton X-100, 25 mM glycylglycine, 15 mM MgSO₄, 4mM EGTA, and 1 mM DTT). Firefly luciferase activity was measured according to Krieger et al. (J Virol, 75(10), (2001), 4614-4624). Briefly, after one freeze/thaw cycle, cells were resuspended and 100 µl of cell lysate was mixed with 360 µl assay buffer (25 mM glycylglycine, 15 mM MgSO₄, 1 mM DTT, 2 mM ATP, 15 mM potassium phosphate buffer, pH 7.8) and 200 µl substrate solution (200 mM luciferin, 25 mM glycylglycine). Finally, luminescence was measured by using a Lumat LB9507 luminometer (Berthold) for 20 samples.

In these examples (Figs. 1 and 2), both [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA (white bars) and CsA (black bars) resulted in a dose-dependent antiviral activity, whereby [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA proved again superior over CsA, thus corroborating the data obtained with the subgenomic replicons. A 10-fold higher concentration of CsA was needed to result in the same replication inhibiting effect as the cyclosporin of the invention.

High affinity of the cyclosporin of the invention for cyclophilin

In the above-discussed observations by Watashi et al. (2003) and Nagakawa et al. (2003), the anti-HCV effect was related to the binding capacity of cyclosporins to the cyclophilins. The effects on the PPlase activity of CsA, [Melle]⁴-CsA and [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA was measured for cyclophilins to determine the more potent inhibitor of PPlase activity of cyclophilin, e.g. cyclophilin A, and, consequently, of HCV replication.

Commercial human recombinant cyclophilin A (Sigma) was used in the assays. PPlase activity of cyclophilins was determined using a chymotrypsin-coupled spectrophotometric assay according to Garcia-Echverria et al. (BBRC, 191, (1993), 70-75). This method is based on the high trans selectivity of chymotrypsin for peptides of the type N-succinyl-ala-ala-pro-phe-p-nitroanilide. The peptides cleavage liberated the para-nitroaniline moiety that could be detected and quantitated at 390 nm. The hydrolysis of the cis form was limited by the rate of cis-trans isomerisation carried out by cyclophilin A. The peptide was made up in a solution of 25 mM LiCl in 2,2,2-trifluoroethanol at 470 mM to enhance the cis conformer peptides population. The assay was performed on the split beam spectrophotometer and the water bath was set at 5°C. Cyclophilin A (7500 pmol/mg total enzyme concentration; Sigma) were dissolved at 20 nM in a buffer (35 mM HEPES and 0.28 mg/ml chymotrypsin (specific activity 50 units/mg), pH 7.8 with KOH) and were incubated for 6 minutes at room temperature followed by 54 minutes in the water bath. CsA, [Melle]⁴-CsA or [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA were added as appropriate in these incubations using a concentration range of 2-50 nM. Then 3.5 ml of the incubated cyclophilin was added to the sample cuvette. The reference cuvette contained a reaction that had gone to completion to balance the reference beam. Peptide was added at 25 µM to initiate the reaction and the change in absorbance was monitored at 10 data points per second. As a control, rates were also determined for a parallel reaction that lacked cyclophilin. These blank rates of peptide hydrolysis (i.e. in the absence of cyclophilin) were subtracted from rates in the presence of cyclophilin A.

20
29

The initial rates obtained from the PPlase assays were analysed by first order regression analysis by using first order transformation of the traces of the time course of the change in the absorbance at 390 nm. Total enzyme concentration (E_t), the inhibitor dissociation constant (K_i) and the rate constant for the rate limiting reaction was calculated with the software FigSyS (2003, Biosoft) by fitting the data obtained from the regression analysis in the tight binding inhibitor multiprotein equation.

The tight binding inhibitor multiprotein equation had the following formula:
$$v = k \cdot E_t \cdot P - k \cdot (-b - \sqrt{b^2 - 4 \cdot c}) / 2$$

where b is defined as $b = -(E_t \cdot P + I + K_i)$ and c is $c = E_t \cdot P \cdot I$.
Once E_t , K_i and k were calculated by the computer for a given set of data, a graphic representation of the data was plotted and the line fitted to the points assuming tight inhibitor binding to a single protein, defined by the following equations:

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

where $B = E_t \cdot P + I + K_i$ and $C = E_t \cdot P \cdot I$.

Table 4: E_t , K_i and k values of cyclophilin A for CsA, [Melle]⁴-CsA and [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA determined from PPlase activity assays.

Compound	E_t (pmol/mg)	K_i (nM)	k (s ⁻¹)
CsA	7500	9.79 ± 1.37	0.17 ± 0.0069
[Melle] ⁴ -CsA	7500	2.11 ± 0.32	0.17 ± 0.0068
[D-MeAla] ³ -[EtVal] ⁴ -CsA	7500	0.34 ± 0.12	0.16 ± 0.0074

The lowest K_i of cyclophilin A observed for the cyclosporin of the invention corroborated the high potent of antiviral activity, the specificity and selectivity index (as above-mentioned) compared to CsA and [Melle]⁴-CsA. Surprisingly, the non-immunosuppressive [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA showed an almost 6-fold higher affinity for the cyclophilin of the example compared to the other non-immunosuppressive cyclosporin [Melle]⁴-CsA.

The above-described experimentation provided that [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA was a more effective inhibitor of HCV replication than any

other tested cyclosporin. This increased anti-HCV activity correlated with the increased cyclophilin binding activity of [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA.

HCV replicon clearance and rebound

5

The recurrence of HCV infection is a major problem of the disease especially even with the use of potential efficient treatment, e.g. cyclosporin and/or Interferon. To study whether the more potent anti-HCV activity of the cyclosporin of the invention as compared to CsA is reflected in the ability of the compound to more efficiently cure cells producing HCV replicon from those, an *in vitro* cell assay was performed based on presence of the selective drug G418 for recombinant produced replicon.

Assays used Huh-9-13 cells, human hepatoma cells (Huh-7) (Lohmann et al., Science 285(5424), (1999), 110-113) Cells were grown in the usual complete medium DMEM without G418 pressure. The cells were cultured in the presence of either CsA or [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA (both at 0.5 or 1 µg/ml) or were left untreated for 7 consecutive passages. Control was performed to guarantee that the absence of the G418 selective pressure would not influence the HCV replicon content during several passages. To confirm that Huh-9-13 cells that had been treated for 7 days with [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA were indeed cleared from their replicon, G418 selection (1000 µg/ml) was restarted for 2 more passages. Only those cells that were still carrying the HCV replicon have been able to proliferate under these conditions and cells without replicon have died in the presence of G418 during the rebound phase.

RT-PCR were performed on extracts of viral RNA of samples taken at different passage points. The forward and reverse primers used were 5'-CCGGCTACCTGCCCATTC-3' and 5'-CCAGATCATCCTGATCGACAAG-3', respectively. The fluorogenic probe was 5'-ACATCGCATCGAGCGAGCACGTAC-3'. As an internal control, a plasmid containing part of the neomycin phosphotransferase gene sequence was used. Results were analysed and

- 17 -

expressed as a quantity of replicon RNA (ng) per 1'000 cells and used to draft a graph.

Results from these experiments (Fig. 3) showed the superior antiviral effect of [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA compared to CsA in this standard *in vitro* cell assay. Surprisingly, the cyclosporin of the invention showed virucidal effect and not only virustatic effect as the other immunosuppressive CsA. Indeed, when the [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA treated Huh-9-13 cells (circles and square in Fig. 3) were again cultured in the presence of G418 (rebound phase), the cultures died compared to CsA treated cells (diamond and triangle). Both cultures that had been treated with CsA for 7 consecutive passages were able to proliferate in the presence of G418. This confirmed that [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA was able to cure Huh-9-13 cells from their HCV replicon.

15 Drug combination

Interferon (IFN) is part of the current therapy of HCV infection. The effect of [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA / IFN- α 2a combination was evaluated using the method of Prichard and Shipman (Antiviral Res, 1990, 14, 181-205). In brief, the theoretical additive effect is calculated from the dose-response curves of individual compounds by the equation of formula:

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

where X represents the inhibition produced by [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA alone and Y represents IFN- α 2a alone. Z represents the effect produced by the combination of [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA with IFN- α 2a. The theoretical additive surface is subtracted from the actual experimental surface, resulting in a horizontal surface that equals the zero plane when the combination is additive, a surface that lies above the zero plane indicates a synergistic effect of the combination and a surface below the zero plane indicates antagonism. The antiviral assay was carried out essentially as described above for Huh 5-2 cells except that compounds were added in checkerboard format. For each compound three replicate plates were used to measure the dose response curve of each individual compound. The data obtained from all three plates were used to calculate the

theoretical additive surface. Combination studies for each pair of compounds were also done in triplicate. Data were analysed for variance by the ANOVA test.

- 5 A slight synergistic activity was noted at the highest concentrations of IFN- α 2a used, but overall the combined anti-HCV activity of [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA with IFN- α 2a can be considered as additive (Fig. 4).

The findings with [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA can be summarized as follows:

- 10 - [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA has a more potent anti-HCV activity and is less cytotoxic than CsA, as shown in an HCV subgenomic replicon system.
- This has been confirmed in an hepatoma cell culture infected with a full-length infectious chimeric genome between HCV strains J6 and JFH1.
- [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA is able to cure cells from their HCV replicon more efficiently than CsA
- 15 - These effects are related to a more pronounced cyclophilin binding affinity.
- The anti-HCV activity of the combination [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA / IFN- α 2a is additive.

[D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA can be used to treat patients infected with HCV.

- 20 The active compound may be administered by any conventional route. It may be administered parentally, e.g., in the form of injectable solutions or suspensions, or in the form of injectable deposit formulations. Preferably, it will be administered orally in the form of solutions or suspensions for drinking, tablets or capsules. Pharmaceutical compositions for oral administration comprising a cyclosporin of
- 25 the invention are described in Examples. As is demonstrated by the examples, such pharmaceutical compositions typically comprise a cyclosporin of the invention and one or more pharmaceutically acceptable carrier substances. Typically, these compositions are concentrated and need to be combined with an appropriate diluent, e.g., water, prior to administration. Pharmaceutical
- 30 compositions for parenteral administration typically also include one or more excipients. Optional excipients include an isotonic agent, a buffer or other pH-controlling agent, and a preservative. These excipients may be added for maintenance of the composition and for the attainment of preferred ranges of pH (about 6.5-7.5) and osmolarity (about 300 mosm/L).

Additional examples of cyclosporin formulations for oral administration can be found in U.S. Pat. Nos. 5,525,590 and 5,639,724, and U.S. Pat. Appl. 2003/0104992. By the oral route, the indicated dosage of a cyclosporin of the invention for daily to twice weekly administration may be from about 1 mg/kg to about 100 mg/kg, preferably from about 1 mg/kg to about 20 mg/kg. By the intravenous route, the indicated corresponding dosage may be from about 1 mg/kg to about 50 mg/kg, preferably from about 1 mg/kg to about 25 mg/kg. An effective amount of a cyclosporin of the invention is understood to be an amount that when administered repeatedly in the course of a therapeutic regimen to a patient in need of treatment of HCV infection results in an objective clinical response such as a statistically significant reduction in serum HCV titer or a significant reduction of serum ALT activity in the patient.

Initial phase I clinical studies were carried out to assess the safety of oral doses of [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA, and to determine the pharmacokinetic profile and safety profile of the drug substance. Studies showed that doses of 50 to 1800 mg in a micro-emulsion in water were well tolerated. Mild and short-lived side effects were observed including nausea, vomiting, abdominal pain, mild headaches. These side effects were not dose-related.

Numerous factors will be taken into consideration by a clinician when determining trial doses for testing efficacy of a pharmaceutical composition comprising a cyclosporin of the present invention against HCV infection. Primary among these are the toxicity and half-life of the chosen cyclosporin of the invention. Additional factors include the size of the patient, the age of the patient, the general condition of the patient (including significant systemic or major illnesses including decompensated liver disease, severe preexisting bone marrow compromise and other viral infections), the stage of HCV infection (acute vs. chronic) as indicated, e.g., by serum alanine aminotransferase (ALT) levels, the particular genotype of HCV, previous therapy of HCV infection, the presence of other drugs in the patient, and the like. A course of treatment will require repeated administration of a pharmaceutical composition of the invention. Typically, an adequate drug dose will be administered 3-7 times per week, and duration of

treatment may be from about 4 weeks to 6 months, preferably from about 4 weeks to about 12 months. Treatment may be followed by determinations of HCV in serum and measurement of serum ALT levels. The endpoint of treatment is a virological response, i.e., the absence of HCV at the end of a treatment course, several months after initiation of treatment, or several months after completion of treatment. HCV in serum may be measured at the RNA level by methods such as quantitative RT-PCR or northern blots or at the protein level by enzyme immunoassay or enhanced chemiluminescence immunoassay of viral proteins. The endpoint may also include a determination of a serum ALT level in the normal range.

A pharmaceutical composition of the present invention may comprise one or more other ingredients active against HCV infection in addition to a cyclosporin of the present invention such as, for example, another antiviral drug substance, e.g., ribavirin, or an interferon alpha. A cyclosporin of the invention and such other active ingredient can be administered together as part of the same pharmaceutical composition or can be administered separately as part of an appropriate dose regimen designed to obtain the benefits of the combination therapy. The appropriate dose regimen, the amount of each dose administered, and specific intervals between doses of each active agent will depend upon the specific combination of active agents employed, the condition of the patient being treated, and other factors discussed in the previous section. Such additional active ingredients will generally be administered in amounts less than or equal to those for which they are effective as single therapeutic agents. The FDA approved dosages for such active agents that have received FDA approval for administration to humans are publicly available.

All patents, patent applications and publications cited herein shall be considered to have been incorporated by reference in their entirety.

30

The invention is further elaborated by the following examples. The examples are provided for purposes of illustration to a person skilled in the art, and are not intended to be limiting the scope of the invention as described in the claims. Thus, the invention should not be construed as being limited to the examples provided,

- 21 -

but should be construed to encompass any and all variations that become evident as a result of the teaching provided herein.

EXAMPLE 1: Synthesis of [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA

- 5 (Translated from a Ph.D. thesis by Jean Francois Guichou entitled "De nouveaux analogues de Cyclosporin A comme agent anti-VIH-1", Faculte des Sciences, University of Lausanne, CH-1015 Lausanne, Switzerland (2001)).

Synthesis of H-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-
10 Abu-Sar-OMe:

- 4-Dimethylaminopyridine (DMAP) (41.5 mmol; 5.8 g) was added to a solution of cyclosporin A (CsA) (8.3 mmol; 10 g) in 100 ml acetic anhydride. The solution was stirred for 18 h at room temperature. The reaction mixture was then diluted with 600 ml ethyl acetate, and washed twice with water and four times with a
15 saturated aqueous solution of sodium bicarbonate. The organic phase was dried over anhydrous Na₂SO₄, filtered and solvent was evaporated under reduced pressure. The yellow residue obtained was chromatographed on silica gel (eluent: 98:2 dichloromethane/methanol) and recrystallized in ether. 9.5 g of MeBmt(OAc)-CsA, a white powder, were recovered, representing a yield of 92%.

- 20 Trimethyloxonium tetrafluoroborate (22.5 mmol; 3.3 g) was added to a solution of MeBmt(OAc)-Cs (7.5 mmol; 9.4 g) in 60 ml dichloromethane. After 16 h at room temperature, 35 ml of 0.26 M sodium methanolate in methanol were added. After 1 h, 35 ml of methanol and 35 ml of 2 N sulphuric acid were added, and the
25 reaction mixture was stirred for another 15 min, neutralized to pH 6.0 with saturated KHCO₃ (28 ml) and extracted twice with ethyl acetate. The organic phase was washed 2 times with saturated NaCl, dried over anhydrous Na₂SO₄ and filtered. Subsequently, solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was chromatographed on silica gel (eluent: 5:1 ethylacetate/methanol).
30 7.3 g of H-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-Sar-OMe were obtained (yield: 76%).

HPLC t_r =288.23 min (98%)

ES/MS: m/z : 1277.5 [M+H⁺], 639.2 [M+2H⁺]

Synthesis of H-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-Sar-OMe:

DMAP (2.3 mmol; 334 mg) and phenylisothiocyanate (6.9 mmol; 0.75 ml) were added to a solution of H-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-Sar-OMe (4.6 mmol; 7 g) in 48 ml tetrahydrofuran. After 2 h, solvent was evaporated, and the crude product was chromatographed on silica gel (eluant: 9:1 tert-butyl methyl ether (MTBE)/ethylacetate (1); 9:1 MTBE/methanol (2)). 5.8 g of Ph-NH-C(S)- MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-Sar-OMe were obtained (90% yield).

13.8 ml trifluoroacetic acid were added to a solution of the latter compound (4 mmol; 5.8 g) in 290 ml dichloromethane. After 1 h of reaction, the mixture was neutralized using KHCO_3 and diluted with 500 ml dichloromethane. The organic phase was washed 2 times with saturated NaCl, dried over anhydrous Na_2SO_4 and filtered. Subsequently, solvent was evaporated under reduced pressure. The residue was chromatographed on silica gel (eluant: 9:1 MTBE/ethylacetate (1); 3:1 MTBE/methanol (2)). 2.8 g H-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-Sar-OMe were obtained (61% yield). HPLC $t_r=25.80$ min (99%)
ES/MS: m/z : 1050.5 $[\text{M}+\text{H}^+]$, 547.7 $[\text{M}+2\text{H}^+]$

Synthesis of Boc-D-MeAla-EtVal-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-NMe-CH₂-CH₂-OH:

Fluoro-N,N,N',-tetramethylformamidinium hexafluorophosphate (TFFH) (0.96 mmol; 0.25 g) was added, under an inert atmosphere, to a solution of H-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-Sar-OMe (0.87 mmol; 1.00 g), DIPEA (2.78 mmol; 0.48 ml) and Boc-D-MeAla-EtVal-OH (0.96 mmol; 0.32 g) in 15 ml dichloromethane. After 15 min, dichloromethane was evaporated, and the residue was taken up in ethylacetate. The organic phase was washed successively with a saturated NaHCO_3 solution, a 10% solution of citric acid and a saturated NaCl solution, and was then dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated. Chromatography on silica gel (in 98:2 ethylacetate/methanol) yielded 1.14 g (90%) Boc-D-MeAla-EtVal-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-Sar-OMe.

- 23 -

The latter product (0.64 mmol; 0.93 g) was taken up in 45 ml anhydrous methanol, and sodium borohydride (25.5 mmol; 0.96 g) was added in small portions at 15-min intervals over a period of 3 h 30 min. At 4 h, the reaction mixture was cooled to 0°C, hydrolysed by addition of 10% citric acid and concentrated. Residue was taken up in ethylacetate. The organic phase was washed with a 10% solution of citric acid and a saturated NaCl solution, and was then dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. After chromatography on silica gel (in 95:5 ethylacetate/methanol) 0.63 g (81%) of Boc-D-MeAla-EtVal-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-NMe-CH₂-CH₂-OH were obtained.

ES/MS: m/z: 1434.9 [M+H⁺], 717.9 [M+2H⁺]

Synthesis of H-D-MeAla-EtVal-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-Abu-OH:

Methanesulfonic acid (3.18 mmol; 2.060 ml) was added to a solution of Boc-D-MeAla-EtVal-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-NMe-CH₂-CH₂-OH (0.425 mmol; 610 mg) in 42.5 ml methanol, and the mixture was heated to and maintained at 50°C. Progress of the reaction was monitored by HPLC and mass spectrometry. After 80 h, the mixture was cooled to 0°C, and hydrolysed by addition of 1 M NaHCO₃. Methanol was eliminated, and the residue was taken up in ethylacetate. The organic phase was washed with 1 M NaHCO₃ and then a saturated NaCl solution, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The product (557 mg), H-D-MeAla-EtVal-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-O-CH₂-CH₂-NHMe, was used in the next step without purification.

Product (0.42 mmol; 557 mg) was dissolved in 20 ml methanol and combined, under an inert atmosphere, with a solution of sodium methanolate (1.26 mmol) in 1.26 ml methanol. After 18 h at room temperature, the reaction mixture was cooled to 0°C, and sodium hydroxide (4.2 mmol; 168 mg) in 5 ml water was added dropwise. After 21 h at room temperature, the reaction mixture was again cooled to 0°C and neutralized with 1 M KHSO₄. Methanol was eliminated, and the residue was dissolved in ethylacetate. The organic phase was washed with a

semi-saturated NaCl solution, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. The product (335 mg; 64%), H-D-MeAla-EtVal-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-Abu-OH, was used in the next step without purification. HPLC tr=26.27 mn (86%)

5 ES/MS: m/z: 1235.5 [M+H⁺], 618.2 [M+2H⁺]

Synthesis of [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA:

Under an inert atmosphere, a solution of H-D-MeAla-EtVal-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt-Abu-OH (0.162 mmoles; 200 mg) and sym.collidine
10 (1.78 mmoles; 0.24 ml) in 50 ml dichloromethane was added dropwise to a solution of (7-azabenzotriazole-1-yloxy)tripyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate (PyAOP, 0.486 mmoles; 254 mg) in 3.2 liter dichloromethane. 72 h later, the reaction mixture was hydrolysed by addition of a 10% Na₂CO₃ solution. Dichloromethane was evaporated, and residue taken up in ethylacetate.
15 The organic phase was washed successively with a 0.1 N HCl solution and a saturated solution of NaCl, dried over anhydrous Na₂SO₄ and concentrated. Crude product was purified on silica gel, yielding 110 mg (59%) [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA HPLC tr=30.54 mn (100%)
ES/MS: m/z: 1217.6 [M+H⁺], 609.3 [M+2H⁺]

20

EXAMPLE 2: Oral formulations of cyclosporins of the invention.
Amounts are expressed as % w/w.

Example A:

25	Cyclosporin of the Invention	10
	Glycofurol 75	35.95
	Miglycol 812	18
	Cremophor RH40	35.95
	Alpha-Tocopherol	0.1

30

Example B:

	Cyclosporin of the Invention	10
	Tetraglycol	2
	Captex 800	2

34
39

- 25 -

Nikkol HCO-40	85.9
Butylhydroxytoluene (BHT)	0.1

Example C:

5	Cyclosporin of the invention	10
	Glycofurol 75	39.95
	Miglycol 812	14
	Cremophor RH40	.36
	Butylhydroxyanisole (BHA)	0.05-0.1

10

40

40

Example D:

	Cyclosporin of the invention	10
	Tetraglycol	10
5	Myritol	5
	Cremophor RH40	74.9
	Alpha-Tocopherol	0.1

Example E:

10	Cyclosporin of the invention	10
	Ethanol	9
	Propylene glycol	8
	Cremophor RH40	41
	Glycerol monolinoleate	32

15

For individual components of formulations A-D and for methods of preparation see British Patent Appl. No. 2,222,770.

- 27 -

Claims

1. Use of [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA for the manufacture of a medicinal product intended for the treatment of HCV infection in a patient.
5
2. Use according to claim 1 characterised in that said [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA is co-administered or administered separately with at least a second ingredient that is active against HCV infection as part of an appropriate dose regimen designed to obtain the benefits of the combination therapy of HCV infection in said
10 patient.
3. A pharmaceutical composition comprising [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA and a second ingredient that is active against HCV infection.
- 15 4. A pharmaceutical composition according to claim 3 characterised in that it comprises further a pharmaceutically acceptable carrier and, optionally, a diluent.
5. A method for treatment of HCV infection in a patient comprising administering to the patient an effective amount of [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA.
20
6. A method according to claim 5 for treatment of HCV infection comprising co-administering or administering separately as part of an appropriate dose regimen designed to obtain the benefits of the combination treatment effective amounts of said [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA and of a second ingredient that is active
25 against HCV infection.

42
42

Fig. 1

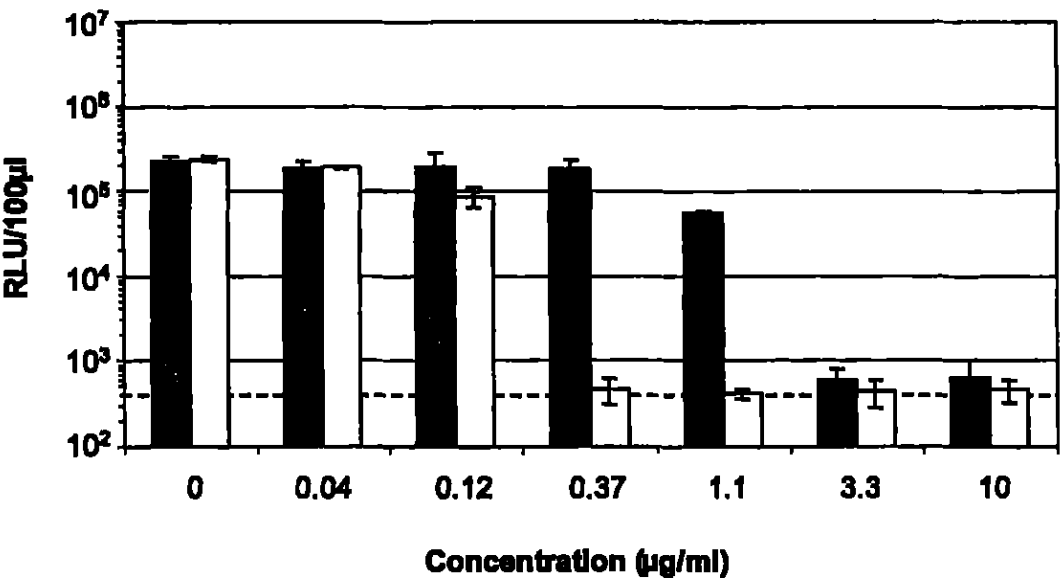


Fig. 2

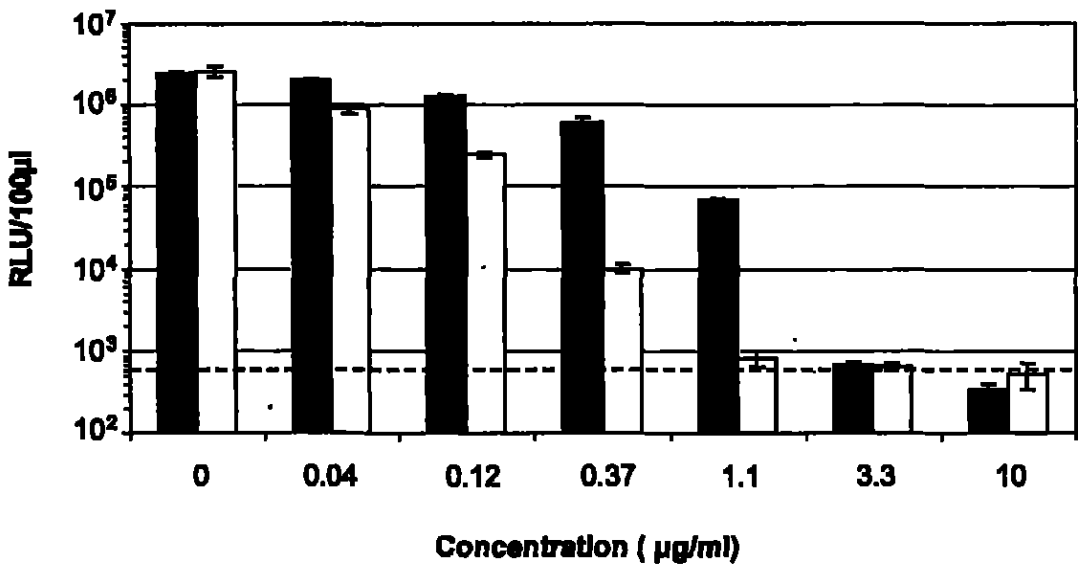


Fig. 3

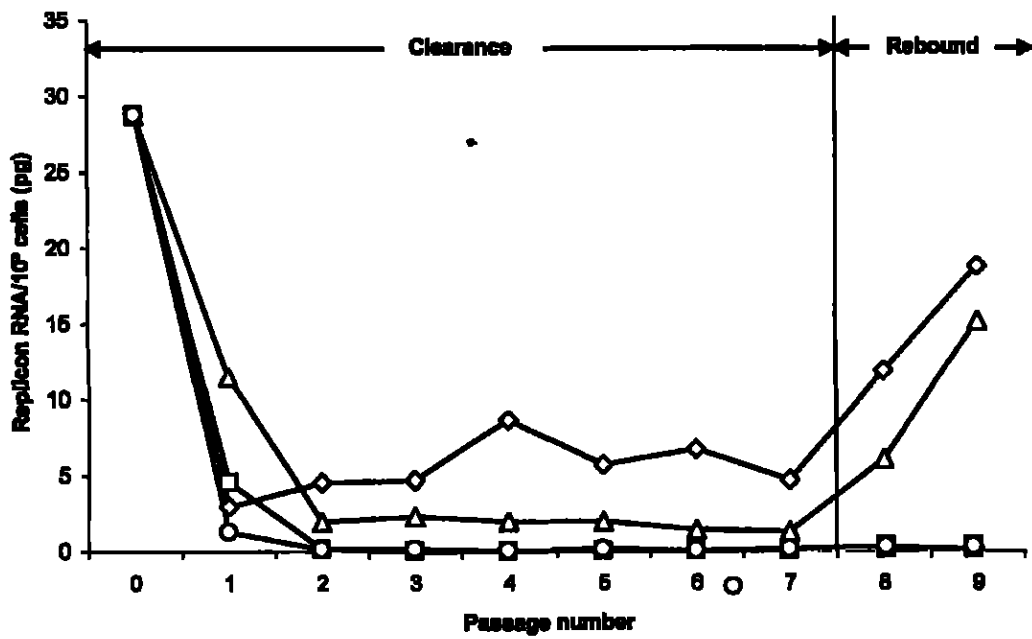
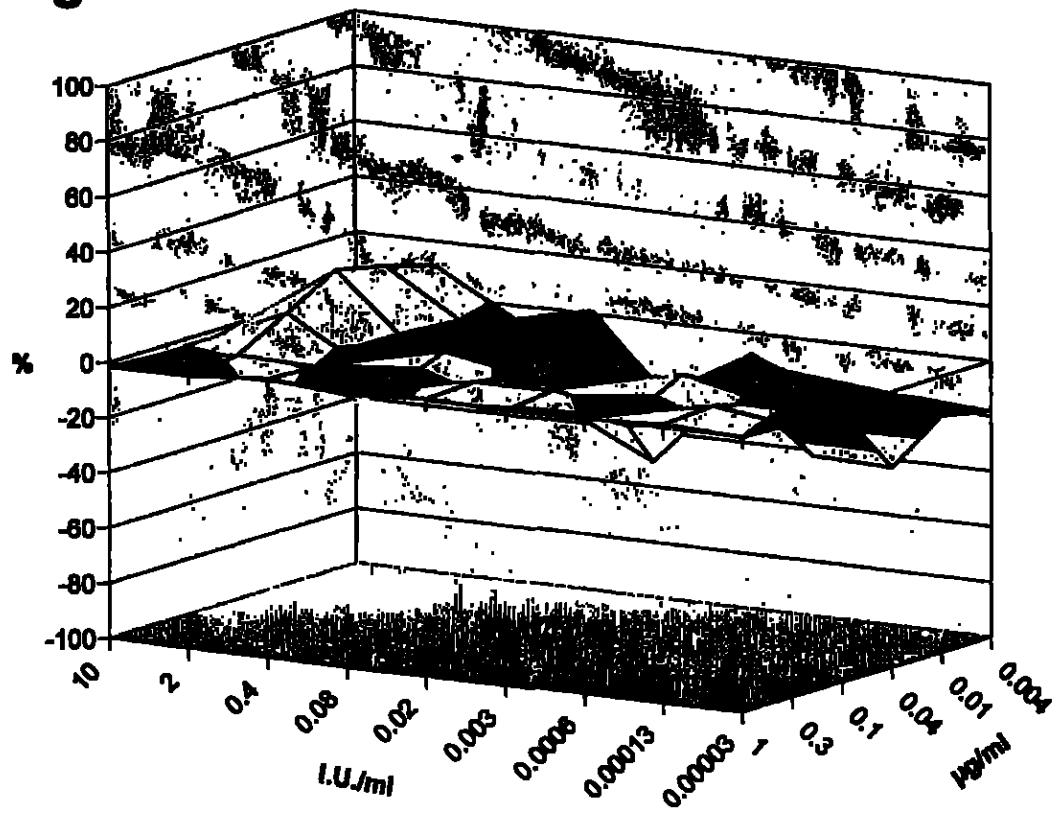


Fig. 4



the case of the prevention of HCV recurrence. In order to establish the safety profile, criteria such as low cytotoxicity and cytostatic effect and high selectivity index are particularly relevant for clinical treatment of HCV infection.

5 A novel approach for the treatment of HCV infection using cyclosporins was recently described by clinical observations (see Teraoka et al., Transplant Proc., 1988, 20 (3 suppl 3), 868-876, and Inoue et al. J Gastroenterol, 2003, 38, 567-572). Recently it was shown that Cyclosporin A (CaA) inhibited the *in vitro* intracellular replication of an HCV subgenomic replicon at clinically achievable
10 drug concentrations (see Watashi et al., Hepatology 38, 2003, 1282-1288, and Nakagawa et al., BBRC 313, 2004, 42-47). Both groups suggested that the anti-HCV effect of CaA was not associated with immunosuppressive activity based on observations made with the use respectively of an immunosuppressive macrolide, i.e. the compound known under the name FK 506 and a non-immunosuppressive
15 Cyclosporin A derivative, i.e. the compound known under the name NIM 811 or [Melle]¹-CaA. Nakagawa et al. consider that expanding applications of CaA may cause substantial problems due to its well-known immunosuppressive properties and suggest that one solution to overcome this problem would be to consider the use of non-immunosuppressive cyclosporin analogs.

20

During the last 15 years, a number of medicinal chemistry studies have been conducted with the aim to identify such non-immunosuppressive cyclosporin analogs and compound NIM 811 is one of the most representative compounds having such a property.

25

NIM 811, along with 9 other Cyclosporin A derivatives, were reported by Ko et al. in patent application EP 0 484 281 for their non-immunosuppressive properties and were considered as being potentially useful in the treatment of HIV infection and the prevention of AIDS. The design of these derivatives involved the
30 modification of the amino-acids in 4- and/or 5-positions of Cyclosporin A.

By modifying amino-acids in 2- and/or 6-positions of Cyclosporin A, Sigal et al. synthesised a total of 61 cyclosporin analogs and observed that such chemical

- 18 -

theoretical additive surface. Combination studies for each pair of compounds were also done in triplicate. Data were analysed for variance by the ANOVA test.

5 A slight synergistic activity was noted at the highest concentrations of IFN- α 2a used, but overall the combined anti-HCV activity of [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CaA with IFN- α 2a can be considered as additive (Fig. 4).

The findings with [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CaA can be summarized as follows:

- 10 - [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CaA has a more potent anti-HCV activity and is less cytotoxic than CaA, as shown in an HCV subgenomic replicon system.
- This has been confirmed in an hepatoma cell culture infected with a full-length infectious chimeric genome between HCV strains J6 and JFH1.
- [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CaA is able to cure cells from their HCV replicon more efficiently than CaA
- 15 - These effects are related to a more pronounced cyclophilin binding affinity.
- The anti-HCV activity of the combination [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CaA / IFN- α 2a is additive.

[D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CaA can be used to treat patients infected with HCV.

- 20 The active compound may be administered by any conventional route. It may be administered parentally, e.g., in the form of injectable solutions or suspensions, or in the form of injectable deposit formulations. Preferably, it will be administered orally in the form of solutions or suspensions for drinking, tablets or capsules.
- 25 Pharmaceutical compositions for oral administration comprising the cyclosporin of the invention are described in Examples. As is demonstrated by the examples, such pharmaceutical compositions typically comprise the cyclosporin of the invention and one or more pharmaceutically acceptable carrier substances.
- Typically, these compositions are concentrated and need to be combined with an appropriate diluent, e.g., water, prior to administration. Pharmaceutical
- 30 compositions for parenteral administration typically also include one or more excipients. Optional excipients include an isotonic agent, a buffer or other pH-controlling agent, and a preservative. These excipients may be added for maintenance of the composition and for the attainment of preferred ranges of pH (about 6.5-7.5) and osmolarity (about 300 mosm/L).

Additional examples of cyclosporin formulations for oral administration can be found in U.S. Pat. Nos. 5,525,590 and 5,639,724, and U.S. Pat. Appl. 2003/0104992. By the oral route, the indicated dosage of the cyclosporin of the invention for daily to twice weekly administration may be from about 1 mg/kg to about 100 mg/kg, preferably from about 1 mg/kg to about 20 mg/kg. By the intravenous route, the indicated corresponding dosage may be from about 1 mg/kg to about 50 mg/kg, preferably from about 1 mg/kg to about 25 mg/kg. An effective amount of the cyclosporin of the invention is understood to be an amount that when administered repeatedly in the course of a therapeutic regimen to a patient in need of treatment of HCV infection results in an objective clinical response such as a statistically significant reduction in serum HCV titer or a significant reduction of serum ALT activity in the patient.

Initial phase I clinical studies were carried out to assess the safety of oral doses of [D-MeAla]⁶-[EtVal]⁴-CysA, and to determine the pharmacokinetic profile and safety profile of the drug substance. Studies showed that doses of 50 to 1600 mg in a micro-emulsion in water were well tolerated. Mild and short-lived side effects were observed including nausea, vomiting, abdominal pain, mild headaches. These side effects were not dose-related.

Numerous factors will be taken into consideration by a clinician when determining trial doses for testing efficacy of a pharmaceutical composition comprising the cyclosporin of the present invention against HCV infection. Primary among these are the toxicity and half-life of the chosen cyclosporin of the invention. Additional factors include the size of the patient, the age of the patient, the general condition of the patient (including significant systemic or major illnesses including decompensated liver disease, severe preexisting bone marrow compromise and other viral infections), the stage of HCV infection (acute vs. chronic) as indicated, e.g., by serum alanine aminotransferase (ALT) levels, the particular genotype of HCV, previous therapy of HCV infection, the presence of other drugs in the patient, and the like. A course of treatment will require repeated administration of a pharmaceutical composition of the invention. Typically, an adequate drug dose will be administered 3-7 times per week, and duration of

47

47

treatment may be from about 4 weeks to 6 months, preferably from about 4 weeks to about 12 months. Treatment may be followed by determinations of HCV in serum and measurement of serum ALT levels. The endpoint of treatment is a virological response, i.e., the absence of HCV at the end of a treatment course, several months after initiation of treatment, or several months after completion of treatment. HCV in serum may be measured at the RNA level by methods such as quantitative RT-PCR or northern blots or at the protein level by enzyme immunoassay or enhanced chemiluminescence immunoassay of viral proteins. The endpoint may also include a determination of a serum ALT level in the normal range.

A pharmaceutical composition of the present invention may comprise one or more other ingredients active against HCV infection in addition to the cyclosporin of the present invention such as, for example, another antiviral drug substance, e.g., ribavirin, or an interferon alpha. The cyclosporin of the invention and such other active ingredient can be administered together as part of the same pharmaceutical composition or can be administered separately as part of an appropriate dose regimen designed to obtain the benefits of the combination therapy. The appropriate dose regimen, the amount of each dose administered, and specific intervals between doses of each active agent will depend upon the specific combination of active agents employed, the condition of the patient being treated, and other factors discussed in the previous section. Such additional active ingredients will generally be administered in amounts less than or equal to those for which they are effective as single therapeutic agents. The FDA approved dosages for such active agents that have received FDA approval for administration to humans are publicly available.

All patents, patent applications and publications cited herein shall be considered to have been incorporated by reference in their entirety.

30 The invention is further elaborated by the following examples. The examples are provided for purposes of illustration to a person skilled in the art, and are not intended to be limiting the scope of the invention as described in the claims. Thus, the invention should not be construed as being limited to the examples provided,

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

... IB2005/002940

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A61K38/13 A61P31/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NAKAGAWA M ET AL: "Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 313, no. 1, 2 January 2004 (2004-01-02), pages 42-47, XP004479114 ISSN: 0006-291X abstract page 46, column 1, line 18 - line 22 page 46, column 1, line 49 - page 47, column 2, paragraph 2 ----- -/-	1-6



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *A* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 January 2006

Date of mailing of the international search report

15/02/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2
NL - 2200 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Fayos, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

IB2005/002940

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/01715 A (DEBIOPHARM S.A; WENGER, ROLAND, M; MUTTER, MANFRED; RUCKLE, THOMAS) 13 January 2000 (2000-01-13)	3,4
Y	page 3, line 13 - line 16 page 7, line 1 - line 7 page 16; table III; compound 8 page 6, line 8 - line 10	1-6
Y	WO 98/28328 A (RHONE-POULENC RORER S.A; BARRIERE, JEAN-CLAUDE; BASHIARDES, GEORGES; C) 2 July 1998 (1998-07-02) page 3, line 9 - line 18 example 1 claims 1-4	1-6
Y	WO 98/28329 A (RHONE-POULENC RORER S.A; BARRIERE, JEAN-CLAUDE; BASHIARDES, GEORGES; C) 2 July 1998 (1998-07-02) page 5, line 8 - line 18 examples 1-7 page 26, line 17 - line 34	1-6
P,X	WO 2005/021028 A (NOVARTIS AG; NOVARTIS PHARMA GMBH; HIJIKATA, MAKOTO; SHIMOTOHNO, KUNIT) 10 March 2005 (2005-03-10) page 4; example b page 3, formula I page 11, paragraph 4 claims 1-12	1-6
Y	WATASHI KOICHI ET AL: "Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes." HEPATOLOGY, vol. 38, no. 5, November 2003 (2003-11), pages 1282-1288, XP009047548 ISSN: 0270-9139 the whole document	1-6
P,Y	INOUE K ET AL: "Interferon Combined With Cyclosporine Treatment as an Effective Countermeasure Against Hepatitis C Virus Recurrence in Liver Transplant Patients With End-Stage Hepatitis C Virus Related Disease" TRANSPLANTATION PROCEEDINGS, ORLANDO, FL, US, vol. 37, no. 2, March 2005 (2005-03), pages 1233-1234, XP004860087 ISSN: 0041-1345 the whole document	1-6

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

IB2005/002940

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HUBLER F ET AL: "Synthetic routes to NETXaa<4>-cyclosporin A derivatives as potential anti-HIV I drugs" TETRAHEDRON LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 41, no. 37, September 2000 (2000-09), pages 7193-7196, XP004210230 ISSN: 0040-4039 the whole document	1-6
P,X	XIA WEI-LIANG ET AL: "Inhibitory effect of cyclosporine A on hepatitis B virus replication in vitro and its possible mechanisms." HEPATOBIILIARY & PANCREATIC DISEASES INTERNATIONAL : HBPD INT. FEB 2005, vol. 4, no. 1, February 2005 (2005-02), pages 18-22, XP002361357 ISSN: 1499-3872 the whole document page 20, right-hand column, paragraph 2	1-6
Y	HANSSON M J ET AL: "The nonimmunosuppressive cyclosporin analogs NIM811 and UNIL025 display nanomolar potencies on permeability transition in brain-derived mitochondria" JOURNAL OF BIOENERGETICS AND BIOMEMBRANES, PLENUM PUBLISHING, NEW YORK, NY, US, vol. 36, no. 4, August 2004 (2004-08), pages 407-413, XP002330699 ISSN: 0145-479X the whole document	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
.../IB2005/002940

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0001715	A	13-01-2000	AU 759480 B2	17-04-2003
			AU 4385699 A	24-01-2000
			BR 9911724 A	20-03-2001
			CA 2335903 A1	13-01-2000
			CN 1308635 A	15-08-2001
			EP 1091975 A1	18-04-2001
			JP 2002519434 T	02-07-2002
			MX PAD0013019 A	14-07-2003
			US 6927208 B1	09-08-2005
WO 9828328	A	02-07-1998	AT 218581 T	15-06-2002
			AU 5669198 A	17-07-1998
			DE 69713151 D1	11-07-2002
			DK 951473 T3	16-09-2002
			EP 0951473 A1	27-10-1999
			ES 2178036 T3	16-12-2002
			FR 2757520 A1	26-06-1998
			JP 2001507016 T	29-05-2001
			PT 951473 T	29-11-2002
			US 5948755 A	07-09-1999
WO 9828329	A	02-07-1998	AT 218580 T	15-06-2002
			AU 5669298 A	17-07-1998
			DE 69713148 D1	11-07-2002
			DK 948527 T3	16-09-2002
			EP 0948527 A1	13-10-1999
			ES 2178037 T3	16-12-2002
			FR 2757522 A1	26-06-1998
			JP 2001507346 T	05-06-2001
			MA 26459 A1	20-12-2004
			PT 948527 T	29-11-2002
			US 5965527 A	12-10-1999
			ZA 9711606 A	25-06-1998
WO 2005021028	A	10-03-2005	NONE	

USO DE [D-MEALA]3-[ETVAL]4-CICLOSPORINA PARA EL TRATAMIENTO
DE INFECCIÓN POR HEPATITIS C Y COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA QUE
COMPRENDE LA [D-MEALA]3-[ETVAL]4-CICLOSPORINA

5

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al uso de una ciclosporina
para el tratamiento de infección por virus de hepatitis C
(HCV) y a una composición farmacéutica que comprende la
ciclosporina.

15

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El HCV se clonó y se caracterizó hace aproximadamente 15 años
por Choo et al. (ver Science 244, (1989, 359-362). El HCV
pertenece a la familia *Flaviviridae* y comprende una
nucleocápside envuelta y un genoma de ARN de hebra simple, de
polaridad positiva (ver Bartenschlager et al., Antiviral Res.
60, (2003), 91-102). El HCV se transmite principalmente por
la sangre, productos sanguíneos y transmisión vertical
durante el embarazo. La introducción de pruebas de
diagnóstico para seleccionar productos sanguíneos ha reducido
significativamente la velocidad de nuevas infecciones.

Todavía, el HCV sigue siendo un problema médico serio.
Actualmente existen aproximadamente 170 millones de personas
infectadas con HCV. El curso inicial de la infección
comúnmente es leve. Sin embargo, el sistema inmunitario

frecuentemente es incapaz de eliminar el virus, y las personas con infecciones persistentes están en un gran riesgo de adquirir cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular (ver Poynard et al., Lancet 349, (1997), 825-832).

- 5 No existe vacuna disponible, y las opciones terapéuticas son muy limitadas (ver Manns et al., Indian J. Gastroenterol. 20 (Suppl.1), (2001), C47-51; Tan et al., Nat. Rev. Drug Discov. 1, (2002), 867-881).
- 10 La terapia actual se basa en una combinación de interferón alfa y ribavirina. Esta terapia produce una respuesta antiviral sostenida en 85-90% de pacientes infectados con genotipos 2 y 3, pero, desafortunadamente sólo en aproximadamente en 45% de pacientes infectados con el
- 15 genotipo 1 frecuente. Además, los efectos secundarios son significativos e incluyen mialgia, artralgia, dolor de cabeza, fiebre, depresión severa, leucopenia y anemia hemolítica.
- 20 Sin duda, se requieren terapias adicionales, con una actividad antiviral superior y un mejor perfil de seguridad, para el tratamiento de infección por HCV, particularmente por ejemplo en el caso de la prevención de recurrencia de HCV. Con el fin de establecer el perfil de seguridad, criterios
- 25 como la baja toxicidad y el efecto citostático y el gran índice de selectividad, son particularmente relevantes para el tratamiento clínico de infección por HCV.

- Recientemente se describió por observaciones clínicas un
- 30 nuevo procedimiento para el tratamiento de infección por HCV utilizando ciclosporinas (ver Teraoka et al., Transplant Proc., 1988, 20 (3 suppl 3), 868-876, y Inoue et al., J.

Gastroenterol. 2003, 38, 567-572). Hace poco se mostró que la Ciclosporina A (CsA) inhibía la replicación intracelular *in vitro* de un replicón subgenómico de HCV a concentraciones de fármaco clínicamente factibles (ver Watashi et al., Hepatology 38, 2003, 1282-1288, y Nakagawa et al., BBRC 313, 2004, 42-47). Ambos grupos sugieren que el efecto anti-HCV de CsA no estaba asociado con la actividad inmunodepresora con base en observaciones realizadas con el uso respectivamente de un macrólido inmunodepresor, por ejemplo, el compuesto conocido bajo el nombre FK 506 y un derivado de Ciclosporina A no inmunosupresor, por ejemplo el compuesto conocido bajo el nombre NIM 811 o [Melle]⁴-CsA. Nakagawa et al., consideran que expandir las aplicaciones de CsA puede provocar problemas sustanciales, debido a sus propiedades inmunodepresoras bien conocidas, y sugieren que una solución para superar este problema sería considerar el uso de análogos de ciclosporina, no inmunodepresores.

Durante los últimos 15 años, se han efectuado diversos estudios de química médica, con el objetivo de identificar tales análogos de Ciclosporina no inmunodepresores, y el compuesto NIM 811 es uno de los compuestos más representativos que tienen tal propiedad.

NIM 811, junto con otros 9 derivados de Ciclosporina A, fueron reportados por Ko et al., en la Solicitud de Patente EP 0 484 281 por sus propiedades no inmunodepresoras y se consideró que son potencialmente útiles en el tratamiento de infección por VIH 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.

Al modificar 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
5 actividad inmunodepresora (ver Sigal et al., J. Exp. Med.,
173, 1991, 619-628).

En particular se describieron intentos adicionales para
modificar el aminoácido en la posición 3 de Ciclosporina A,
10 con el fin de obtener compuestos no inmunodepresores por
Barrière et al. en las patentes internacionales WO 98/28328,
WO 98/28329, y WO 98/28330.

Wenger et al. diseñaron una serie de compuestos que difieren
15 de la Ciclosporina A en la posición 3, ahí ellos contienen un
aminoácido hidrofóbico o neutro no voluminoso, N-metilado,
diferente a una glicina, y en la posición 4, en donde éstos
contienen un aminoácido hidrofóbico o neutro, N-metilado o N-
etilado, diferente a una leucina y reportan que esos
20 compuestos tienen una gran potencia para inhibir la
replicación de HIV-1 y esencialmente carecen de actividad
inmunodepresora (ver la Solicitud de Patente Internacional WO
00/01715 y Tetrahedron Lett., 41, (2000), 7193-6).

OBJETIVOS Y VENTAJAS DE LA INVENCION

El objetivo de la presente invención es proporcionar a los
30 médicos una nueva terapia para el tratamiento de infección
por HCV, particularmente por ejemplo en el caso de prevención
de recurrencia de HCV. Esta terapia debe ofrecer una mayor

actividad antiviral y un mejor perfil de seguridad en comparación a la terapia ya aprobada o a las recientemente propuestas.

5 Los presentes inventores descubrieron sorprendentemente que la administración a un paciente infectado con HCV, de un compuesto muy específico, por ejemplo [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA, cumple los requerimientos anteriores. Ellos observaron que, además de su propiedad no inmunodepresora, [D-MeAla]³-
10 [EtVal]⁴-CsA tiene una afinidad significativamente incrementada por las ciclofilinas, tal afinidad incrementada está correlacionada con una eficacia elevada contra la inhibición de replicación de HCV.

15 Por consiguiente, uno de los temas objeto de la presente invención se refiere al uso de [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA para la fabricación de un producto medicinal, destinado para el tratamiento de infección de HCV en un paciente.

20 [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA se ha reportado por Wenger et al. en el documento WO 00/01715 y se le ha otorgado el Número de Registro CAS 254435-95-5. Éste es un undecapéptido cíclico descrito por la siguiente fórmula:



en donde MeBmt es N-metil-(4R)-4-but-2E-en-1-il-4-metil-(L)treonina, Abu es el ácido L- -aminobutírico, D-MeAla es
30 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. La numeración convencional de posiciones de aminoácidos, generalmente

utilizada en referencia a Ciclosporina A, se muestra debajo de la fórmula. Esto se logra mediante el uso de nombres compuestos que comprenden una primera porción que indica la identidad de residuos que son diferentes de aquellos en la ciclosporina A y proporcionando su posición, y una segunda porción denominada "CsA" que indica que todos los otros residuos son idénticos a aquellos en la ciclosporina A. Por ejemplo, [Melle]⁴-CsA es una ciclosporina que es idéntica a la Ciclosporina A, excepto que MeLeu en la posición 4 se reemplaza por Melle (N-metil-L-isoleucina).

La presente invención se explicará adicionalmente con los siguientes experimentos y con los dibujos, en los cuales:

La figura 1 representa un histograma de dosis-respuesta medido por ensayo de luciferasa en células Huh-7-Lunet infectadas;

La figura 2 representa un histograma de dosis-respuesta medido por ensayo de luciferasa en células Huh-7.5 infectadas;

La figura 3 representa las curvas de eliminación-respuesta de células Huh-9-13 infectadas;

La figura 4 indica la representación tridimensional de dosis-respuesta con IFN/[D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA en combinación.

Los usos médicos actuales de la Ciclosporina A se refieren a la habilidad de este compuesto para suprimir la respuesta inmunitaria mediada por células a través de la prevención de producción y liberación de diversos factores de crecimiento

autócrinos de células T, que incluyen interleucina 2 (IL-2), a partir de células T activadas (ver 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). Después de la entrada en las células, la Ciclosporina A se une a las ciclofilinas con gran afinidad (ver Handschumacher et al. (1984) Science 226, 544-547). Como entre funciones biológicas diferentes, éstos tienen actividad de peptidil-prolil-cis-trans-isomerasa (PPIasa) que se puede medir *in vitro* (ver 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 dependiente de calcio calmodulina/treonina-fosfatasa 2B (calcineurina) (ver 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 por resultado una inhibición de la actividad de fosfatasa de calcineurina. (Ver 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 luego se transpone al núcleo, en donde se asocia con la proteína 1 activadora y transactiva los genes blanco, incluyendo el gen IL-2.

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

La actividad de peptidil-propil-cis-trans-isomerasa (PPIasa) de ciclofilinas se determinó utilizando un procedimiento adaptado de Kofron et al. (ver Biochemistry 30, 6127-6134 (1991); J. Am. Chem. Soc. 114, 2670-2675 (1992)). Como el sustrato se utilizó Ala-Ala-Pro-Phe-para-nitro-anilina N-succinilada (Suc-AAPF-pNA, Bachem, Bubendorf, Suiza). El ensayo se basó en la escisión preferencial con quimotripsina de la isoforma trans del enlace Phe-pNA en el tetrapéptido Ala-Ala-Pro-Phe-pNA. Esta escisión libera la porción de para-nitroanilina que puede ser detectada y cuantificada 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 la ciclofilina (PPIasa, EC 5.2.1.8). Después de mezclar CsA u otra ciclosporina (concentraciones finales de 10^{-9} - $2 \times 10^{-5} \text{ M}$, preparadas a partir de soluciones de reserva, concentradas 1000 veces en etanol) con 0.1 g de ciclofilina (Sigma) en un volumen total de 1.5 ml de Hepes, 40 mM pH 7.9, e incubación durante 50 minutos sobre hielo, la mezcla de reacción se transfirió a una cubeta que se mantuvo a 10°C en un espectrofotómetro Varian (Varian). Después de la adición de 3.75 mg de quimotripsina (70 μl de una solución de quimotripsina en HCl 10 mM), la reacción se inició mediante la adición de 10 μl de una solución 3.2 mM de Suc-AAPF-pNA en LiCl/trifluoroetanol 0.5 M. La reacción se monitorizó por 3 minutos, y se determinó una constante de velocidad inicial a partir de los datos obtenidos. Como un control, también se determinó una constante de velocidad inicial para una reacción paralela que carecía de ciclofilina. Las curvas de concentración-respuesta se establecieron para la Ciclosporina A y otras ciclosporinas, y los valores IC_{50} (50% de concentración inhibitoria) de diferentes ciclosporinas con

relación al de Ciclosporina A (1.0). Un valor menor a 1 significa que el compuesto tiene una mayor afinidad de ciclosporina que CsA.

- 5 Un ensayo de reportero dependiente de NF-AT se utilizó inicialmente para estimar las actividades inmunodepresoras de ciclosporina. Baumann et al. (1992) Transplant. Proc. 24, 43-48. Células T Jurkat establemente transfectadas con una construcción de reportero que contenía un gen β -galactosidasa bacteriana bajo el control de un promotor de un gen IL-2, se
10 obtuvieron de G. Zenke, Novartis Pharma AG, Basilea, Suiza).

Las células se desarrollaron en medio RPMI1640, suplementado con suero fetal de ternera, inactivado térmicamente al 10%,
15 100 u/ml de penicilina, 100 g/ml de estreptomicina, glutamina 2 mM, 2-mercaptoetanol 50 mM y 100 u/ml de higromicina B. Las células se estimularon mediante la adición de forbol-12-miristato-13-acetato 2.4 M y 75 g/ml de fitohemaglutinina en presencia o ausencia de Ciclosporina
20 A u otra ciclosporina (concentraciones finales de 10^{-9} - 2×10^{-5} M, preparadas a partir de soluciones de reserva concentradas 1000 veces en etanol). Después de la incubación por 20 horas a 37°C, las células se cosecharon y se lisaron en Na_2HPO_4 50 mM (pH 9.0), KCl 10 mM, MgSO_4 1 mM, Triton X-100 al 1%, 4-
25 metilumbeliferil- β -D-galactósido 0.5 mM (Sigma, Buchs, Suiza). La reacción de β -galactosidasa se siguió para proceder por 1 hora en la oscuridad a temperatura ambiente. 4-metil-umbeliferona fluorescente se analizó fluorométricamente en la solución sobrenadante (excitación:
30 355 nm; emisión: 460 nm). Se establecieron las curvas de concentración-respuesta para ciclosporina A y otras ciclosporinas, y se calcularon los valores IC_{50} de diferentes

ciclosporinas con relación al de la Ciclosporina A (1.0). Un valor mayor a 1 significa que el compuesto es menos inmunosupresor que CsA.

- 5 Los resultados ejemplares se muestran en la Tabla 1 siguiente.

Tabla 1: Enlace de Ciclofilina (PPIasa) y actividades inmunodepresoras (IL-2) de CsA y otras ciclosporinas

10

Compuesto	PPIasa	IL-2
CsA	1.0	1.0
[D-MeAla] ³ - [EtVal] ⁴ -CsA	0.3	7161
[Melle] ⁴ -CsA	0.5	2250

15

Los datos mostrados en la Tabla 1 revelaron que ciertas sustituciones en la posición 4 (por ejemplo, Val, Ile) redujeron dramáticamente la actividad inmunodepresora (medida como inhibición de expresión de IL-2) así como la actividad de enlace de ciclofilina detectablemente mejorada (medida como inhibición de actividad de PPIasa de ciclofilina). La sustitución en la posición 3 dio por resultado un incremento sustancial adicional en la actividad de enlace de ciclofilina (por 2 veces o más); compárese [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA. Ésta tuvo una mayor actividad de enlace a ciclofilina y una menor actividad inmunodepresora residual que [Melle]⁴-CsA, el compuesto de mejor referencia disponible en la literatura. [Melle]⁴-CsA también es conocido como NIM811.

20

25

Actividad no inmunodepresora de [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA

En un análisis confirmatorio, se estimaron las actividades inmunodepresoras de CsA, [Melle]⁴-CsA y [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA utilizando la reacción de linfocitos mixtos. En este ensayo, las ciclosporinas se disolvieron en etanol (10 mg/ml). Células mononucleares de sangre periférica o PBMCs CD4⁺ recién aisladas de dos donadores saludables, se mezclaron posteriormente para la inactivación por irradiación de una de las poblaciones (células estimuladoras: S). Después de cinco días de cocultivo en presencia o ausencia de una ciclosporina (1 g/ml), se determinó la respuesta proliferativa de la población de células no inactivadas (células respondedoras: R) por incorporación de [³H]-timidina.

El ensayo se condujo recíprocamente con las dos poblaciones celulares, cada una se activó y se estimuló a su vez. Se calculó la estimulación (%) de células respondedoras por la fórmula:

$$\text{Por ciento estimulación} = 100 \times (\text{muestra con ciclosporina} - \text{antecedente}) / (\text{muestra sin ciclosporina} - \text{antecedente})$$

La muestra se refiere a una mezcla de estimulador y células respondedoras. El antecedente representa un control en el que solamente se mezclan células estimuladoras. Los resultados se muestran en la Tabla 2. Se interpretaron con el significado de que tanto [melle]⁴-CsA como [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA están desprovistas esencialmente de actividad inmunodepresora.

Tabla 2: Respuesta proliferativa de PBMCs CD4⁺ en presencia/ausencia de ciclosporinas

Cocultivo	Compuesto	N	%estimulación (relativa)	Desviación estándar
R1 x S2	Ninguno	8	100	30
R1 x S2	CsA	4	29	3
R1 x S2	[Melle] ⁴ -CsA	4	84	13
R1 x S2	[D-MeAla] ³ -[EtVal] ⁴ -CsA	4	75	11
R2 x S1	Ninguno	8	100	9
R2 x S1	CsA	4	9	2
R2 x S1	[Melle] ⁴ -CsA	4	75	9
R2 x S1	[D-MeAla] ³ -[EtVal] ⁴ -CsA	4	65	7
S1 x S2	Ninguno	4	0	0.6

R1 x S2 se refiere a un cocultivo de células respondedoras
 5 provenientes del donador 1 y células estimuladoras
 provenientes del donador 2. N es el número de mediciones.

Gran actividad anti-HCV y bajo efecto de
 citotoxicidad/citostático de [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA

10

Como se mencionó anteriormente, la infección con el virus de
 la hepatitis C (HCV) es un problema serio de salud, debido a
 que los pacientes infectados persistentemente están en un
 gran riesgo de desarrollar enfermedades hepáticas crónicas,
 15 que incluyen cirrosis y carcinoma hepatocelular. La terapia
 actual disponible es inadecuada para una gran parte de la
 población más reciente, también está asociada con efectos
 secundarios significativos. Hasta ahora, se ha impedido el
 desarrollo de terapias más efectivas por la falta de un
 20 modelo *in vitro* apropiado de replicación de HCV, que permita
 la selección de compuestos potencialmente activos, antes de

la evaluación en pruebas clínicas en humanos. Este obstáculo se superó por el desarrollo de minigenomas de HCV modificados genéticamente (replicones) que se autoamplifican en células de hematoma, cultivadas a grandes niveles (Lohmann et al. Science 285, (1999), 110-113). Este sistema de replicón de HCV se volvió rápidamente la herramienta normal para el estudio de la replicación de HCV, patogénesis y persistencia (Bartenschlager et al. Antiviral Res. 60, (2003), 91-102).

El genoma de HCV consiste de un ARN de hebra simple que contiene un cuadro de lectura abierta, simple, para una poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos. La traducción de esta poliproteína se inicia en un sitio de entrada de ribosoma interno (IRES) ubicado en el extremo 5' del ARN. La poliproteína de HCV se escinde en al menos 10 proteínas. Éstas incluyen la proteína C de cápside, las proteínas envueltas E1 y E2, la proteína de viroporina posible p7, las proteínas no estructurales NS2 y NS3 que tienen serina-proteinasa así como actividades de ATPasa/helicasa, NS4A, proteína NS4B inductora de red membranosa, ARN-polimerasa NS5B dependiente de ARN y NS5A.

El primer replicón exitoso fue un ARN bicistrónico que contiene en una dirección 5' a 3' un sitio interno de entrada al ribosoma o IRES de HCV, una secuencia de codificación para una neomicin-fosfotransferasa, un IRES de un virus de encefalocarditis y secuencias de codificación para proteínas NS3 a NS5 de HCV. Después de la introducción en células Huh-7 y selección utilizando G418 (geneticina), este replicón pudo mostrar que se replica de manera autónoma en grandes niveles (1,000-5,000 copias/célula) (Lohmann et al., 1999). La caracterización del sistema reveló que la eficiencia de la

replicación dependía de la permisividad de la célula
hospedera y, de manera importante, de la selección de
mutaciones adaptativas de cultivo en las secuencias de
codificación de proteína de HCV. Se descubrió que la
5 replicación es sensible al interferón alfa, proporcionando
evidencia respecto a la relevancia del sistema, para la
selección de fármacos que tienen eficacia *in vivo*. También
se construyeron replicones variantes, en los cuales se
reemplazó la secuencia de codificación de neomicin-
10 fosfotransferasa, por ejemplo, mediante una secuencia de
codificación de luciferasa o por secuencias que codifican
para una proteína de fusión de luciferasa-ubiquitin-neomicin-
fosfotransferasa. La replicación de los últimos replicones
variantes se puede analizar por el ensayo conveniente de
15 luciferasa, mientras que la replicación del último replicón
requiere determinaciones del número de copias de ARN.

Watashi et al. (2003) demostraron por inmunotransferencia
Northern y RT-PCR cuantitativa (reacción en cadena de
20 polimerasa-transcriptasa inversa) que la acumulación de ARN
de HCV se inhibió por CsA, pero no por el macrólido
inmunosupresor FK506 y el PSC 833 derivado de CsA no
inmunosupresor en células MH-14 que contienen replicón de
HCV. Sus ensayos que implicaron exposiciones de las células
25 por 7 días a agentes activos, revelaron que el título del ARN
de HCV se redujo aproximadamente 200 veces en presencia de 1
g/ml de Ciclosporina A. Además descubrieron que la
ciclosporina no inmunodepresora (Melle)⁴-CsA también inhibió
la replicación de HCV. Los resultados indican que [Melle]⁴-
30 CsA fue aproximadamente tan efectiva como CsA en la reducción
del título del ARN de HCV.

66

Para determinar si la ciclosporina de la presente invención tiene actividad anti-HCV, y si tiene tal actividad, cómo se compara esta actividad con las actividades de Csa y [Melle]⁴-Csa, se llevaron a cabo experimentos que compararon los efectos inhibitorios de Csa, [Melle]⁴-Csa y [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-Csa en sistemas de replicón de HCV.

Los ensayos utilizaron células Huh 5-2 que contenían un ARN bicistrónico que codifica para una proteína de fusión luciferasa-ubiquitin-neomicin-fosfotransferasa de luciérnaga y proteínas NS3-5 de HCV. Las secuencias virales se originaron de un virus de HCV de genotipo 1b. Las células se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con suero fetal de ternera al 10% glutamina 2 mM (Life Technologies), aminoácidos no esenciales 1 x (Life Techonologies), 100 u/ml de penicilina, 100 g/ml de estreptomicina y 250 g/ml de G418 (Geneticin, Life Technologies) a 37°C y 5% de CO₂. Para los ensayos antivirales (replicación), las células se sembraron a una densidad de 7000 células/pozo en placas TM View de 96 pozos (Packard) en el mismo medio, excepto por G418. Después de una incubación de 24 horas, el medio se retiró, se agregaron diluciones seriadas de compuestos de prueba en medio, y las células se incubaron por otras 72 horas.

Los efectos antivirales se estimaron ya sea por el ensayo de luciferasa o por RT-PCR cuantitativa. Para efectuar los ensayos de luciferasa, el medio se retiró, y las células se lavaron con PBS. Después de la lisis en 50 l de amortiguador Glo-lysis (Promega) durante 15 minutos, se agregaron a los lisados celulares 50 l de reactivo de ensayo de luciferasa Stead-Glo (Promega). Se midió la actividad de

luciferasa utilizando un luminómetro, y la señal proveniente de cada pozo de prueba se expresó como un porcentaje de la señal medida en pozos de cultivos no expuestos a un compuesto de prueba.

5

Se estimaron los efectos citostáticos y de densidad celular en cultivos paralelos, en placas regulares de 96 pozos (Beckton-Dickinson) utilizando el ensayo con MTT (Ensayo de Proliferación Celular No Radioactivo CellTiter 96^R AQueous, Promega). En este ensayo, el 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxi-fenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) se biorreduce hasta un formazán que está cuantificado a 498 nm en un lector de placas. La producción de formazán está correlacionada directamente con el número de células vivas.

15

El análisis de RT-PCR cuantificó la región de neomicina de replicones, utilizando un detector de secuencias ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los cebadores delantero e inverso utilizados fueron 5'-CCGGCTACCTGCCCATTC-3' y 5'-CCAGATCATCCTGATCGACAAG-3', respectivamente. La sonda fluorogénica fue 5'-ACATCGCATCGAGCGAGCACGTAC-3'. Como un control interno, se utilizó un plásmido que contenía parte de la secuencia génica de neomicin-fosfotransferasa.

20

Los resultados de estos experimentos permitieron el cálculo de EC₅₀ para las diferentes ciclosporinas, que es la concentración efectiva requerida para inhibir la replicación del replicón de HCV en 50%, y de CC₅₀, que es la concentración requerida que inhibe la proliferación de células con crecimiento exponencial por 50%, y un índice de selectividad SI, que es la relación entre CC₅₀ y EC₅₀.

30

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

De manera sorprendente, [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA fue considerablemente más potente que CsA y [Melle]⁴-CsA. También se observó que el 50% de la concentración citostática (CC50) para [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA fue significativamente superior a los valores determinados para CsA y [Melle]⁴-CsA. Por consiguiente, se encontró un índice de selectividad considerablemente superior para el compuesto [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA en comparación a las dos otras ciclosporinas. Experimentos similares en los cuales los valores EC₅₀ se derivaron de determinaciones de títulos de ARN utilizando RT-PCR cuantitativa, produjeron conclusiones similares. Los valores SI de 45*, 73 y 625* se obtuvieron para CsA, [Melle]⁴-CsA y [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA, respectivamente. Los asteriscos indican que se presentan los menores de dos valores determinados independientemente.

Tabla 3: valores EC_{50} , CC_{50} , y SI determinados de ensayos de luciferasa de replicación de ARN de HCV y ensayos con MTT de citotoxicidad en células Huh 5-2 que comprenden un mini-replicón de HCV que contiene luciferasa

5

Compuesto	EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) $\pm$ desviación estándar	CC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) $\pm$ desviación estándar	Índice de selectividad
CsA	0.28 $\pm$ 0.13	11.6 $\pm$ 5.6	41
[D-MeAla] ³ -[EtVal] ⁴ -CsA	0.03 $\pm$ 0.04	> 27	> 900
[Melle] ⁴ -CsA	0.22	14	64

Actividad antiviral de [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA medida en células blanco infectadas con HCV recombinante

10

La actividad anti-HCV de [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA comparada con CsA, se determinó adicionalmente en sistemas de cultivo que semejan la situación *in vivo*. El método utilizó células de hepatoma que habían sido infectadas con una construcción de HCV quimérico de longitud completa, infeccioso o el mismo virus que se modificó para llevar un gen receptor de luciferasa. Después del tratamiento de las células infectadas con la ciclosporina de la invención o CsA, se midió la actividad de luciferasa como estaba correlacionada directamente a la inhibición de la replicación viral.

20

Virus infecciosos de HCV de genoma quimérico de longitud completa entre las cepas de HCV J6 y JFH1 (Jc1), se utilizaron para inocular las células de hepatoma de los ensayos. La construcción del virus Jc1 también se modificó para obtener un genoma bicistrónico que llevaba un gen reportero de luciferasa (Jc1-Luc). 24 y 96 horas después de la transfección de transcritos de ARN, se recolectó el

25

sobrenadante de cultivo de los genomas mediante electroporación de células Huh-7.5. Los sobrenadantes se filtraron (0.45 M) y se determinaron 50 dosis infecciosas por cultivo celular (CCID50) mediante los ensayos de dilución
5 limitante de acuerdo a Lindenbach et al. (Science, 309, (2005), 623-626). Las CCID50 fueron 1.3×10^5 para Jc1 y 4.2×10^3 para Jc1-Luc.

Los ensayos utilizaron las células Huh-7-Lunet o bien Huh-7.5
10 (Lohmann et al., Science 285(5424), (1999), 110-113). Las células se desarrollaron en Medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM; Gibco) suplementado con suero bovino fetal inactivado térmicamente al 10% (FCS) (Integro), aminoácidos no esenciales 1x (Gibco), 100 UI/ml de penicilina (Gibco),
15 100 g/ml de estreptomicina (Gibco) o 25 g/ml de higromicina (Gibco) para células Huh-mono a 37°C y 5% de CO₂. Para los ensayos antivirales (replicación), se sembraron células Huh-7-Lunet y Huh-7.5 a una densidad de 2×10^4 ó 4×10^4 células por pozo de una placa de 12 pozos. 24 horas más tarde, el
20 medio se reemplazó con 0.5 ml de la reserva de virus Jc1-Luc (placas de 12 pozos) ó 0.25 ml de la reserva de virus Jc1 (placas de 12 pozos). 4 horas después, el inóculo viral se reemplazó por un medio que contenía concentraciones diferentes de CsA o [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA y se incubaron
25 posteriormente por 72 horas más.

La inhibición de la replicación viral se estimó por ensayo de luciferasa. Para llevar a cabo el ensayo de luciferasa, las células se cosecharon, se lavaron con PBS y se lisaron en
30 amortiguador de lisis de luciferasa (1% Triton X-100, glicilglicina 25 mM, MgSO₄ 15 mM, EGTA 4 mM, y DTT 1 mM). La actividad de luciferasa de luciérnaga se midió de acuerdo a

Krieger et al. (J. Virol, 75(10), (2001), 4614-4624). En resumen, después de un ciclo de congelación/descongelación, las células se resuspendieron, y se mezclaron 100 μ l de lisado celular con 360 μ l de amortiguador de ensayo (glicilglicina 25 mM, $MgSO_4$ 15 mM, DTT 1 mM, ATP 2 mM, amortiguador de fosfato de potasio 15 mM, pH 7.8) y 200 μ l de solución sustrato (luciferina 200 mM, glicilglicina 25 mM). Finalmente, se midió la luminiscencia utilizando un luminómetro Lumat LB9507 (Berthold) para 20 muestras.

10

En estos ejemplos (figuras 1 y 2), ambas $[D-MeAla]^3-[EtVal]^4$ -CsA (barras blancas) y CsA (barras negras) dieron como resultado una actividad antiviral dependiente de la dosis, por medio de lo cual $[D-MeAla]^3-[EtVal]^4$ -CsA probó nuevamente ser superior sobre CsA, corroborando así los datos obtenidos con los replicones subgenómicos. Se necesitó una concentración superior a 10 veces de CsA para originar el mismo efecto inhibitorio de la replicación que la ciclosporina de la invención.

20

Alta afinidad de la ciclosporina de la invención para ciclofilina

En las observaciones anteriormente descritas por Watashi et al. (2003) y Nagakawa et al. (2003), el efecto anti-HCV estuvo relacionado a la capacidad de enlace de ciclosporinas a las ciclofilinas. Los efectos sobre la actividad de PPIasa de CsA, $[Melle]^4$ -CsA y $[D-MeAla]^3-[EtVal]^4$ -CsA se midió por la ciclofilina para determinar el inhibidor más potente de actividad PPIasa de ciclofilina, por ejemplo Ciclofilina A, y por consiguiente, de replicación de HCV.

30

Se utilizó Ciclofilina A recombinante humana comercial (Sigma) en los ensayos. Se determinó la actividad de PPIasa de ciclofilinas utilizando un ensayo espectrofotométrico acoplado a quimotripsina de acuerdo a García-Echverría et al. (BBRC, 191, (1993), 70-75). Este método se basa en la gran selectividad trans de quimotripsina para péptidos del tipo N-succinil-ala-ala-pro-phe-p-nitroalínida. Los péptidos escindidos se liberaron de la porción para-nitroanilina que pudo ser detectada y cuantificada a 390 nm. La hidrólisis de la forma cis se limitó por la velocidad de isomerización cis-trans efectuada por la Ciclofilina A. El péptido se formó en una solución de LiCl 25 mM en 2,2,2-trifluoroetanol 470 mM para aumentar la población de péptidos conformadores de cis.

El ensayo se efectuó en el espectrofotómetro de haz dividido y el baño de agua se estableció a 5°C. La Ciclofilina A (7500 pmol/mg de concentración enzimática total; Sigma) se disolvió a 20 mM en un amortiguador (HEPES 35 mM y 0.26 mg/ml de quimotripsina (actividad específica 50 unidades/mg), pH 7.8 con KOH) y se incubaron durante 6 minutos a temperatura ambiente, seguido por 54 minutos en el baño de agua. CsA, [Melle]⁴-CsA o [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA se agregaron como fuera apropiado en estas incubaciones, utilizando un intervalo de concentración de 2-50 nM. Después se agregaron 3.5 ml de la ciclofilina incubada a la cubeta de muestra. La cubeta de referencia contenía una reacción que llevó a la terminación del balance del haz de referencia. Se agregó péptido a 25 M para iniciar la reacción, y el cambio en la absorbancia se monitorizó a 10 puntos de datos por segundo. Como un control, también se determinaron las velocidades para una reacción paralela que carecía de ciclofilina. Estas velocidades blanco de hidrólisis peptídica (por ejemplo en

73

ausencia de ciclofilina) se restaron de las velocidades en presencia de Ciclofilina A.

Las velocidades iniciales obtenidas de los ensayos de PPIasa se analizaron por análisis de regresión de primer orden mediante el uso de transformación de primer orden de las trazas del curso de tiempo del cambio en la absorbancia a 390 nm. Se calculó la concentración de enzima total (E_t), la constante de disociación de inhibidor (K_i) y la velocidad constante para la reacción limitante de velocidad con el software FigSys (2003, Biosoft) al ajustar los datos obtenidos del análisis de regresión en la ecuación de multiproteínas de inhibidor de enlace estrecho.

La ecuación de multiproteínas de inhibidor de enlace estrecho tuvo la siguiente fórmula:

$$V = k \cdot E_t \cdot P - k \cdot (-b - \sqrt{b^2 - 4 \cdot c}) / 2$$

en donde b se define como $b = -(E_t \cdot P + I + K_i)$ y c es $c = E_t \cdot P \cdot I$.

Una vez que E_t , K_i y k se calcularon por la computadora para un grupo dado de datos, se trazó una representación gráfica de los datos y las líneas ajustadas a los puntos, asumiendo la unión estrecha de inhibidor a una proteína simple, definida por las siguientes ecuaciones:

$$V = K \cdot E_t \cdot P - K(B - \sqrt{B^2 - 4 \cdot C}) / 2$$

en donde $B = E_t \cdot P + I + K_i$ y $C = E_t \cdot P \cdot I$.

Tabla 4: Valores E_t , K_i y k de ciclofilina A para CsA, [Melle]⁴-CsA y [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA determinados a partir de ensayos de actividad de PPIasa

Compuesto	E_t (pmol/mg)	K_i (nM)	K (s ⁻¹)
CsA	7500	9.79 ± 1.37	0.17 ± 0.0069
[Melle] ⁴ -CsA	7500	2.11 ± 0.32	0.17 ± 0.0068
[D-MeAla] ³ -[EtVal] ⁴ -CsA	7500	0.34 ± 0.12	0.16 ± 0.0074

5

El K_i más bajo de ciclofilina A, observado para la ciclosporina de la invención, corroboró la gran potencia de actividad antiviral, la especificidad y el índice de selectividad (como se mencionó anteriormente) en comparación a CsA y [Melle]⁴-CsA. De manera sorprendente, [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA no inmunodepresora mostró una afinidad casi 6 veces más alta para la ciclofilina del ejemplo, en comparación a la otra ciclosporina [Melle]⁴-CsA no inmunodepresora.

10

15

La experimentación anteriormente descrita indicó que [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA fue un inhibidor más efectivo de replicación de HCV que cualquier otra ciclosporina probada. Esta actividad incrementada anti-HCV se correlacionó con la actividad de enlace incrementado a ciclofilina de [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA.

20

Eliminación y rebote del replicón de HCV

25

La recurrencia de la infección por HCV es un problema mayor de la enfermedad, especialmente incluso con el uso de tratamiento eficiente potencial, por ejemplo ciclosporina y/o interferón. Para estudiar si la actividad anti-HCV más

potente de la ciclosporina de la invención comparada con CsA, se refleja en la habilidad del compuesto para curar más eficientemente células que producen replicón de HCV de éstas, se efectuó un ensayo celular *in vitro* en presencia del fármaco selectivo G418 para el replicón recombinante producido.

Los ensayos utilizaron células Huh-9-13, células de hepatoma humano (Huh-7) (Lohmann et al., Science 285(5424), (1999), 110-113). Las células se desarrollaron en medio DMEM completo, usual, sin presión de G418. Las células se cultivaron en presencia ya sea de CsA o de [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA (ambas a 0.5 ó 1 g/ml) o se dejaron sin tratar por 7 pases consecutivos. El control se efectuó para garantizar que la ausencia de la presión selectiva de G418 no influiría en el contenido del replicón de HCV durante varios pases. Para confirmar que las células Huh-9-13 que habían sido tratadas durante 7 días con [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA se eliminaban realmente de su replicón, se reinició la selección de G418 (1000 g/ml) por 2 pases más. Solamente aquellas células que todavía llevaban el replicón de HCV, habían sido capaces de proliferar bajo estas condiciones y las células sin replicón habían muerto en presencia de G418 durante la fase de rebote.

Se realizó RT-PCR sobre extractos de ARN viral de muestras tomadas en diferentes puntos de pase. Los cebadores delantero e inverso utilizados fueron 5'-CCGGCTACCTGCCCCATTC-3' y 5'-CCAGATCATCCTGATCGACAAG-3', respectivamente. La sonda fluorogénica fue 5'-ACATCGCATCGAGCGAGCACGTAC-3'. Como un control interno, se utilizó un plásmido que contenía parte de la secuencia génica de neomicin-fosfotransferasa. Los

resultados se analizaron y se expresaron como una cantidad de ARN replicón (ng) por 1000 células y se utilizaron para elaborar una gráfica.

5 Los resultados de estos experimentos (figura 3) mostraron el efecto antiviral superior de [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA comparado a CsA en este ensayo celular *in vitro*, estándar. Sorprendentemente, la ciclosporina de la invención mostró efecto viricida y no solamente efecto viristático como la
10 otra CsA inmunodepresora. Desde luego, cuando la [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA trató a las células Huh-9-13 (círculos y cuadro en la figura 3) nuevamente se cultivaron en presencia de G418 (fase de rebote), los cultivos murieron, comparados a las células tratadas con CsA (diamante y triángulo). Ambos
15 cultivos que habían sido tratados con CsA por 7 pases consecutivos, fueron capaces de proliferar en presencia de G418. Esto confirmó que [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA fue capaz de curar células Huh-9-13 provenientes de su replicón de HCV.

20 Combinación de fármacos

El interferón (IFN) es parte de la terapia actual de infección por HCV. El efecto de la combinación de [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA/IFN- 2a se evaluó utilizando el método
25 de Prichard y Shipman (Antiviral Res, 1990, 14, 181-205). En resumen, el efecto aditivo teórico se calcula a partir de las curvas de dosis-respuesta de compuestos individuales por la ecuación de la fórmula:

$$30 \quad Z = X + Y(1-X),$$

en donde X representa la inhibición producida por [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA solo e Y representa IFN- 2a solo. Z representa

el efecto producido por la combinación de [D-MeAla]³-
[EtVal]⁴-CsA con IFN- 2a. La superficie aditiva teórica se
resta de la superficie experimental real, dando como
resultado una superficie horizontal que iguala el plano cero
5 cuando la combinación es aditiva, una superficie que se
encuentra por arriba de plano cero indica un efecto sinérgico
de la combinación y una superficie debajo del plano cero
indica antagonismo. El ensayo antiviral se llevó a cabo
esencialmente como se describe anteriormente para las células
10 Huh 5-2, excepto que se agregaron compuestos en formato de
celosía. Para cada compuesto, se utilizaron tres placas de
replicados para medir la curva de dosis-respuesta de cada
compuesto individual. Los datos obtenidos de todas las tres
placas, se utilizaron para calcular la superficie aditiva
15 teórica. También se realizaron por triplicado estudios de
combinación para cada par de compuestos. Los datos se
analizaron para la varianza por la prueba ANOVA.

Se observó una actividad sinérgica ligera en las
20 concentraciones más altas de IFN- 2a utilizado, pero toda la
actividad combinada anti-HCV de [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA con
IFN- 2a se puede considerar como aditiva (figura 4).

Los descubrimientos respecto a [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA se
25 pueden resumir como sigue:

- [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-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.

30 -Esto se confirmó en un cultivo de células de hematoma,
infectadas con un genoma quimérico infeccioso de longitud
completa entre cepas de HCV J6 y JFH1.

-[D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA es capaz de curar células de su replicón de HCV de manera más eficiente que CsA

-Estos efectos están relacionados a una afinidad de enlace de ciclofilina más pronunciada.

5 -La actividad anti-HCV de la combinación [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA/IFN- 2a es aditiva.

[D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA se puede utilizar para tratar a
pacientes infectados con HCV. El compuesto activo se puede
10 administrar por cualquier ruta convencional. Se puede
administrar parenteralmente, por ejemplo, en la forma de
soluciones o suspensiones inyectables, o en la forma de
formulaciones de depósito inyectable. De preferencia, se
administrará oralmente en la forma de soluciones o
15 suspensiones para beber, tabletas o cápsulas. Las
composiciones farmacéuticas para la 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
20 ciclosporina de la invención y una o varias sustancias
portadoras farmacéuticamente aceptables. Comúnmente, estas
composiciones están concentradas y necesitan ser combinadas
con un diluyente apropiado, por ejemplo, agua, antes de su
administración. Las composiciones farmacéuticas para la
25 administración parenteral también incluyen normalmente uno o
más excipientes. Los excipientes opcionales incluyen un
agente isotónico, un amortiguador u otro agente para control
del pH, y un conservador. Estos excipientes se pueden
agregar para mantener la composición y para lograr los
30 intervalos preferidos de pH (aproximadamente 6.5-7.5) y la
osmolaridad (aproximadamente 300 mosm/L).

Ejemplos adicionales de formulaciones de ciclosporina para la administración oral, se pueden encontrar en las patentes de los Estados Unidos Nos. 5,525,590 y 5,639,724, y en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos 2003/0104992. Por la ruta oral, la dosificación indicada de la ciclosporina de la invención para la administración diaria a tres veces por semana, puede ser desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg, de preferencia desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg. Por la ruta intravenosa, la dosificación correspondiente indicada puede ser desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg, de preferencia desde aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 25 mg/kg. Se entiende que una cantidad eficaz de la ciclosporina de la invención, es una cantidad que cuando se administra repetidamente en el curso de un régimen terapéutico a un paciente que necesita el tratamiento de la infección por HCV, da como resultado una respuesta clínica objetiva, como una reducción estadísticamente significativa en el título sérico de HCV o una reducción significativa de la actividad sérica de ALT en el paciente.

Se efectuaron estudios clínicos de fase I inicial, para evaluar la seguridad de las dosis orales de [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA, y para determinar el perfil farmacocinético y el perfil de seguridad de la sustancia fármaco. Los estudios mostraron que dosis de 50 a 1600 mg en una microemulsión en agua, se toleraron perfectamente. Se observaron efectos secundarios leves y pasajeros, que incluyen náusea, vómito, dolor abdominal, dolores de cabeza leves. Estos efectos secundarios no estaban relacionados con la dosis.

Numerosos factores serán tomados en cuenta por un médico

cuando determine las dosis de prueba, para evaluar la eficacia de una composición farmacéutica que comprende la ciclosporina de la presente invención contra la infección de HCV. Primero, entre éstos están la toxicidad y la vida media de la ciclosporina de la invención elegida. Factores adicionales incluyen el tamaño del paciente, la edad del paciente, la condición general del paciente (que incluye enfermedades sistémicas significativas o mayores, que comprenden enfermedad hepática descompensada, compromiso de médula ósea preexistente severo y otras infecciones virales), la etapa de la infección por HCV (aguda versus crónica) como se indica, por ejemplo, por niveles de alanina-aminotransferasa en suero (ALT), el genotipo particular de HCV, terapia previa de 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. Comúnmente, una dosis de fármaco, adecuada se administrará 3-7 veces por semana, y la duración del tratamiento puede ser desde aproximadamente 4 semanas hasta 6 meses, de preferencia desde aproximadamente 4 semanas hasta aproximadamente 12 meses. El tratamiento se puede seguir por las determinaciones de HCV en suero y la medición de niveles de ALT en suero. El punto final del tratamiento es una respuesta virológica, es decir, la ausencia de HCV al final de un curso del tratamiento, varios meses después del inicio del tratamiento, o varios meses después de la terminación del tratamiento. El HCV en suero se puede medir en el nivel de ARN por métodos como RT-PCR cuantitativa o inmunotransferencias de northern o en el nivel proteico por inmunoensayo enzimático o inmunoensayo de quimioluminiscencia aumentada de proteínas virales. El punto final también puede incluir una determinación de un nivel

sérico de ALT en el intervalo normal.

Una composición farmacéutica de la presente invención puede comprender uno o varios ingredientes diferentes, activos
5 contra la infección por HCV además de la ciclosporina de la presente invención, por ejemplo, como otra sustancia fármaco antiviral, por ejemplo, ribavirina, o un interferón alfa. La ciclosporina de la invención y tales otros ingredientes activos se pueden administrar juntos, como parte de la misma
10 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
15 específicos entre dosis de cada agente activo, dependerán de la combinación específica de agentes activos empleados, la condición del paciente que se está tratando, y otros factores discutidos en la sección previa. Tales ingredientes activos adicionales generalmente se administrarán en cantidades
20 menores o iguales a aquellas para las cuales son efectivos como agentes terapéuticos simples. La FDA aprobó dosificaciones para tales agentes activos que han recibido la aprobación de la FDA para la administración a humanos, y están disponibles al público.

25 Todas las patentes, solicitudes de patentes y publicaciones citadas aquí, se considerarán como que han sido incorporadas como referencia en su totalidad.

30 La invención se elabora adicionalmente por los siguientes ejemplos. Los ejemplos se proporcionan para fines de ilustración para una persona experta en la técnica, y no se

pretende que limiten el alcance de la invención, como se describe en las reivindicaciones. Por lo tanto, la invención no debe estar elaborada para estar limitada por los ejemplos provistos, sino que debe ser elaborada para abarcar
5 cualquiera y todas las variaciones que se vuelvan evidentes como resultado de la enseñanza provista en la presente.

EJEMPLO 1: Síntesis de [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA

(traducido de la tesis para Doctorado en Farmacia por Jean
10 Francois Guichou, titulada "De nouveaux analogues de Cyclosporin A comme agent anti-VIH-1", Facultad de Ciencias, Universidad de Lausana, CH-1015 Lausana, Suiza (2001)).

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

Se agregó 4-dimetilaminopiridina (DMAP) (41.5 mmoles; 5.8 g) a una solución de ciclosporina A (CsA) (8.3 mmoles; 10 g) en 100 ml de anhídrido acético. La solución se agitó durante 18
20 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción después se diluyó con 600 ml de acetato de etilo, y se lavó dos veces con agua y cuatro veces con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio. La fase orgánica se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, se filtró y el solvente se evaporó bajo presión
25 reducida. El residuo amarillo obtenido se sometió a cromatografía sobre gel de sílice (eluyente: 98:2 diclorometano/metanol) y se recristalizó en éter. Se recuperaron 9.5 g de MeBmt(OAc)-CsA, como un polvo blanco, representando un rendimiento de 92%.

30 Se agregó tetrafluoroborato de trimetiloxonio (22.5 mmoles; 3.3 g) a una solución de MeBmt(OAc)-Cs (7.5 mmoles; 9.4 g) en

60 ml de diclorometano. Después de 16 horas a temperatura ambiente, se agregaron 35 ml de metanolato de sodio 0.26 M en metanol. Después de 1 hora, se agregaron 35 ml de metanol y 35 ml de ácido sulfúrico 2 N, y la mezcla de reacción se
5 agitó por otros 15 minutos, se neutralizó a pH 6.0 con KHCO_3 saturado (28 ml) y se extrajo dos veces con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó dos veces con NaCl saturado, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se filtró. Posteriormente, el solvente se evaporó bajo presión reducida. El residuo se
10 sometió a cromatografía sobre gel de sílice (eluyente: 5:1 acetato de etilo/metanol). Se obtuvieron 7.3 g de H-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-Sar-OMe (rendimiento 76%).
HPLC $t_r=268.23$ mn (98%)
15 ES/MS: m/z : 1277.5 $[\text{M}+\text{H}^+]$, 639.2 $[\text{M}+2\text{H}^+]$

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

20 Se agregaron DMAP (2.3 mmoles; 334 mg) e isotiocianato de fenilo (6.9 mmoles; 0.75 ml) a una solución de H-MeLeu-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-Sar-OMe (4.6 mmoles; 7 g) en 48 ml de tetrahidrofurano. Después de 2 horas, el solvente se evaporó, y el producto crudo se sometió
25 a cromatografía sobre gel de sílice (eluyentes: 9:1 éter metílico de ter-butilo (MTBE)/acetato de etilo (1); 9:1 MTBE/metanol (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).

30 Se agregaron 13.8 ml de ácido trifluoracético a una solución del compuesto anterior (4 mmoles; 5.6 g) en 290 ml de

diclorometano. Después de 1 hora de reacción, la mezcla se neutralizó utilizando KHCO_3 y se diluyó con 500 ml de diclorometano. La fase orgánica se lavó dos veces con NaCl saturado, se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se filtró. Después, el solvente se evaporó bajo presión reducida. El residuo se sometió a cromatografía sobre gel de sílice (eluyentes: 9:1 MTBE/acetato de etilo (1); 3:1 MTBE/metanol(2)). Se obtuvieron 2.8 g de H-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-Sar-OMe (61% de rendimiento).

10 HPLC tr=25.80 mn (99%)

ES/MS: m/z 1050.5 $[\text{M}+\text{H}^+]$, 547.7 $[\text{M}+2\text{H}^+]$

Síntesis de Boc-D-MeAla-EtVal-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-NMe- CH_2 - CH_2 -OH:

15

Se agregó hexafluorofosfato de fluoro-N,N,N'-tetrametilformamidinio (TFFH) (0.96 mmoles; 0.25 g) bajo una atmósfera inerte, a una solución 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 de diclorometano. Después de 15 minutos, el diclorometano se evaporó, y el residuo se recogió en acetato de etilo. La fase orgánica se lavó sucesivamente con una solución de NaHCO_3 saturado, una solución al 10% de ácido cítrico y una solución de NaCl saturado, y luego se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se concentró. La cromatografía sobre gel de sílice (en 98:2 acetato de etilo/metanol) produjo 1.14 g (90%) de Boc-D-MeAla-EtVal-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-Sar-OMe.

20

25

30

El último producto (0.64 mmoles; 0.93 g) se recogió en 45 ml de metanol anhidro, y se agregó borohidruro de sodio (25.5 mmoles; 0.96 g) en pequeñas porciones a intervalos de 15

minutos en un periodo de 3 horas 30 minutos. A las 4 horas, la mezcla de reacción se enfrió a 0°C, se hidrolizó mediante la adición de ácido cítrico al 10% y se concentró. El residuo se recogió en acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con una solución al 10% de ácido cítrico y una solución de NaCl saturado, y luego se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró. Después de la cromatografía sobre gel de sílice (en 95:5 de acetato de etilo/metanol) se obtuvieron 0.63 g (81%) de Boc-D-MeAla-EtVal-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-NMe-CH₂-CH₂-OH.

ES/MS: m/z: 1434.9 [M+H⁺], 717.9 [M+2H⁺]

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

Se agregó ácido metansulfónico (3.18 mmoles; 2.060 ml) a una solución de Boc-D-MeAla-EtVal-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-NMe-CH₂-CH₂-OH (0.425 mmoles; 610 mg) en 42.5 ml de metanol, y la mezcla se calentó y se mantuvo a 50°C. El progreso de la reacción se monitorizó por HPLC y espectrometría de masa. Después de 80 horas, la mezcla se enfrió a 0°C, y se hidrolizó mediante la adición de NaHCO₃ 1 M. El metanol se eliminó, y el residuo se recogió en acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con NaHCO₃ 1 M y luego con una solución de NaCl saturado, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró. El producto (557 mg), H-D-MeAla-EtVal-Val-MeLeu-Ala-D-Ala-MeLeu-MeLeu-MeVal-MeBmt(OAc)-Abu-O-CH₂-CH₂-NHMe, se utilizó en la siguiente etapa sin purificación.

El producto (0.42 mmoles; 557 mg) se disolvió en 20 ml de

metanol y se combinó, bajo un atmósfera inerte, con una solución de metanolato de sodio (1.26 mmoles) en 1.26 ml de metanol. Después de 18 horas a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se enfrió a 0°C, y se agregó por goteo hidróxido de sodio (4.2 mmoles; 168 mg) en 5 ml de agua. Después de 21 horas a temperatura ambiente, la mezcla de reacción nuevamente se enfrió a 0°C y se neutralizó con KHSO₄ 1 M. El metanol se eliminó, y el residuo se disolvió en acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con una solución semisaturada de NaCl, se secó sobre Na₂SO₄ 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 utilizó en la siguiente etapa sin purificación.

HPLC tr=26.27 mn (86%)

ES/MS: m/z: 1235.5 [M+H⁺], 618.2 [M+2H⁺]

Síntesis de [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA:

Bajo una atmósfera inerte, se agregó por goteo una solución 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 solución de hexafluorofosfato de (7-azabenzotriazol-1-iloxi)tripirrolidino fosfonio (PyAOP, 0.486 mmoles; 254 mg) en 3.2 litros de diclorometano. 72 horas más tarde, la mezcla de reacción se hidrolizó mediante la adición de una solución al 10% de Na₂CO₃. El diclorometano se evaporó, y el residuo se recogió en acetato de etilo. La fase orgánica se lavó sucesivamente con una solución de HCl 0.1 N y una solución saturada de NaCl, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró.

El producto crudo se purificó sobre gel de sílice, produciendo 110 mg (59%) de [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA.

HPLC tr=30.54 min (100%)

ES/MS: m/z: 1217.6 [M+H⁺], 609.3 [M+2H⁺]

5

EJEMPLO 2: Formulaciones orales de ciclosporinas de la invención

Las cantidades se expresan como % p/p.

Ejemplo A:

Ciclosporina de la invención	10
Glicofurol 75	35.95
Miglicol 812	18
Cremofor RH40	35.95
Alfa-Tocoferol	0.1

10

Ejemplo B:

Ciclosporina de la invención	10
Tetraglicol	2
Captex 800	2
Nikkol HCO-40	85.9
Butilhidroxitolueno (BHT)	0.1

Ejemplo C:

Ciclosporina de la invención	10
Glicofurol 75	39.95
Miglicol 812	14
Cremofor RH40	36
Butilhidroxianisol (BHA)	0.05-0.1

Ejemplo D:

Ciclosporina de la invención	10
------------------------------	----

Tetraglicol	10
Miritol	5
Cremofof RH40	74.9
Alfa-Tocoferol	0.1

Ejemplo E:

Ciclosporina de la invención	10
Etanol	9
Propilenglicol	8
Cremofof RH40	41
Monolinoleato de Glicerol	32

Para los componente individuales de las formulaciones A-D y para los métodos de preparación, ver la Solicitud de Patente

5 Británica No. 2,222.770.

REIVINDICACIONES:

1. El uso de [D-MeAla]¹-[EtVal]⁴-CsA para la fabricación de un producto medicinal destinado para el tratamiento de infección por HCV en un paciente.

2. El uso según la reivindicación 1, caracterizado porque la [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA se coadministra o se administra separadamente con al menos un segundo ingrediente que es activo contra la infección por HCV, como parte de un régimen de dosificación apropiado, destinado para obtener los beneficios de la terapia de combinación de la infección por HCV en el paciente.

3. Una composición farmacéutica que comprende [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA y un segundo ingrediente que es activo contra la infección por HCV.

4. Una composición farmacéutica según la reivindicación 3, caracterizada porque comprende además un portador farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, un diluyente.

5. Método de tratamiento de infección por HCV en un paciente, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz del medicamento.

6. Método de tratamiento de conformidad con la reivindicación 5, para el tratamiento de infección por HCV en un paciente, que comprende coadministrar o administrar separadamente como parte de un régimen de dosificación apropiado, destinado para obtener los beneficios del

tratamiento de combinación, cantidades eficaces de [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA y de un segundo ingrediente que es activo contra la infección por HCV.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Esta invención se refiere al uso en el tratamiento de
infección por HCV, ya sea como agentes activos simples o en
5 combinación con otro agente activo, de una ciclosporina que
tiene actividad de enlace incrementado a ciclofilina y
esencialmente carece de actividad inmunodepresora.

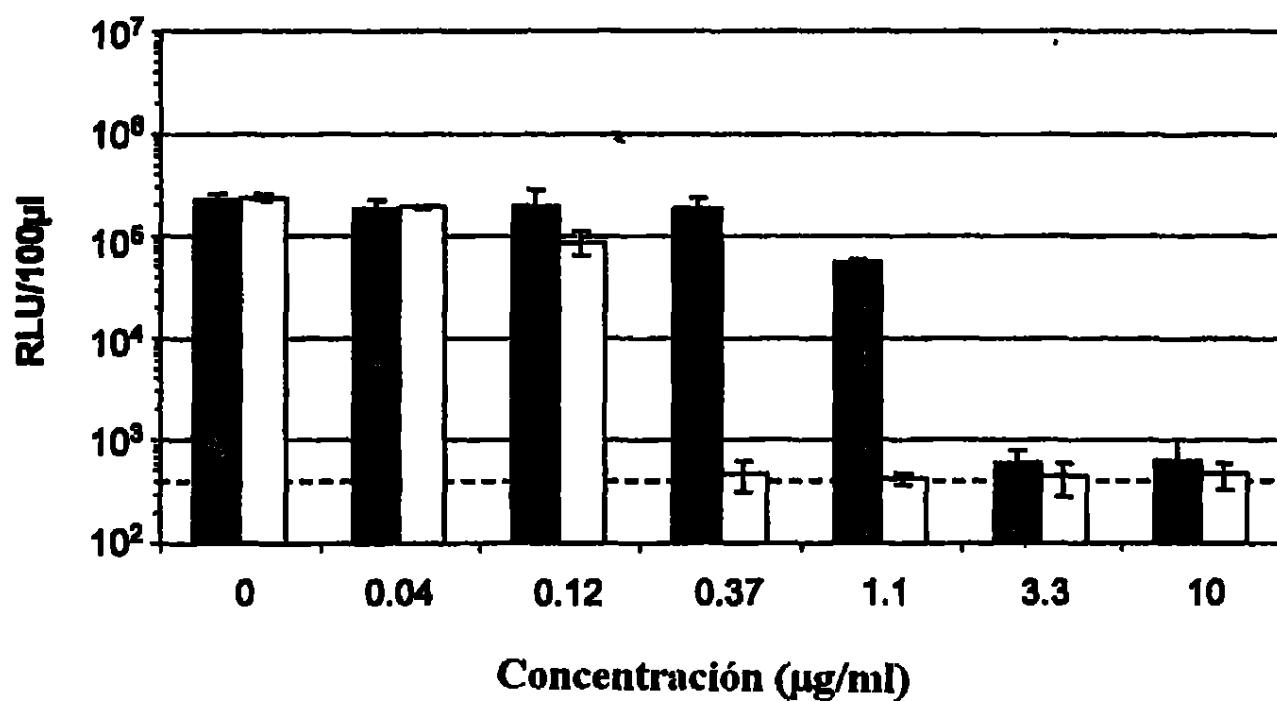
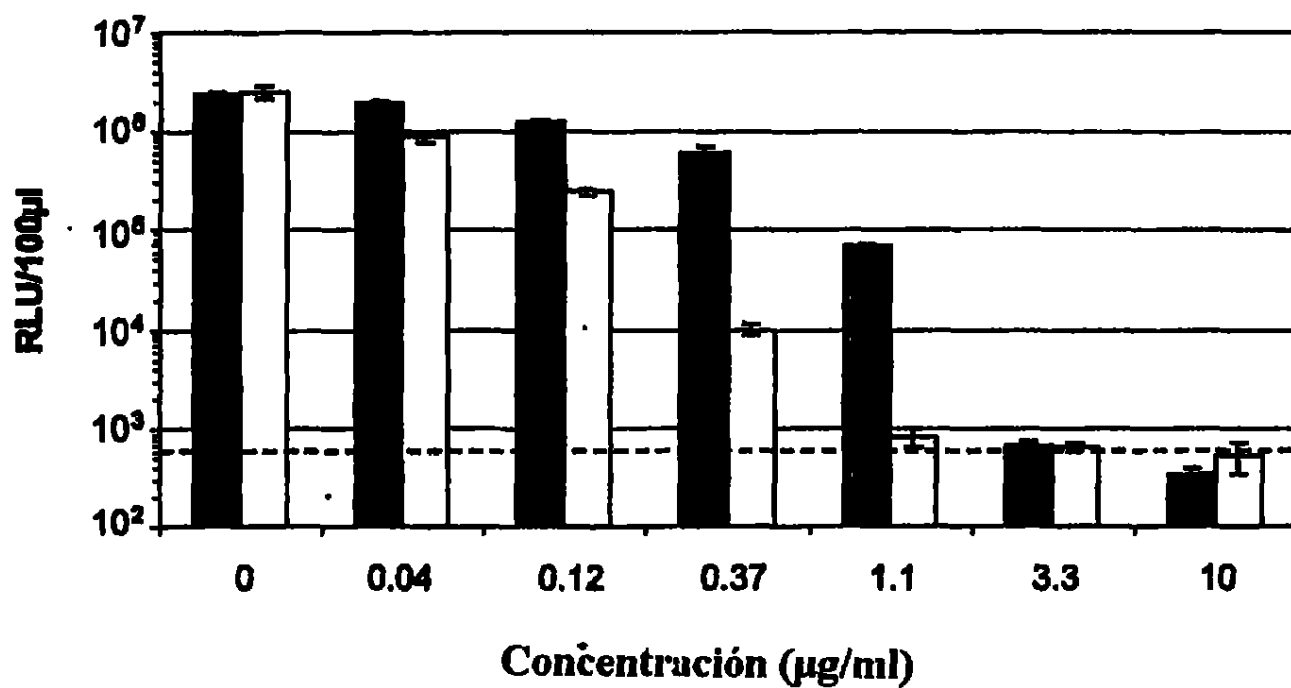
Fig. 1**Fig. 2**

Fig. 3

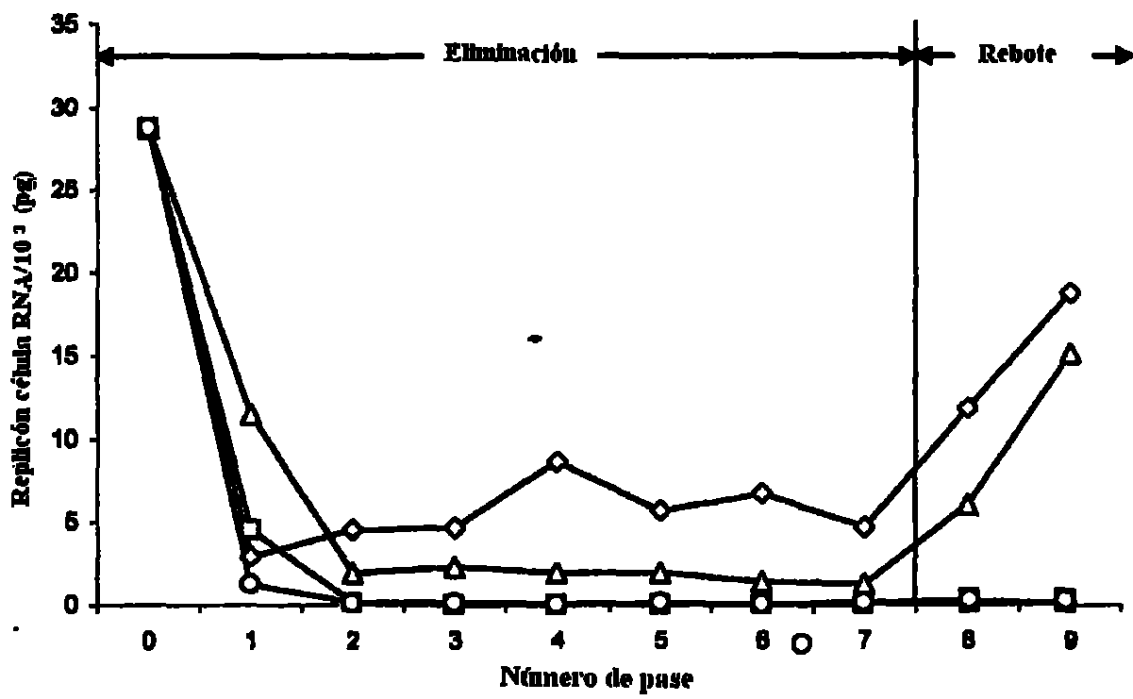
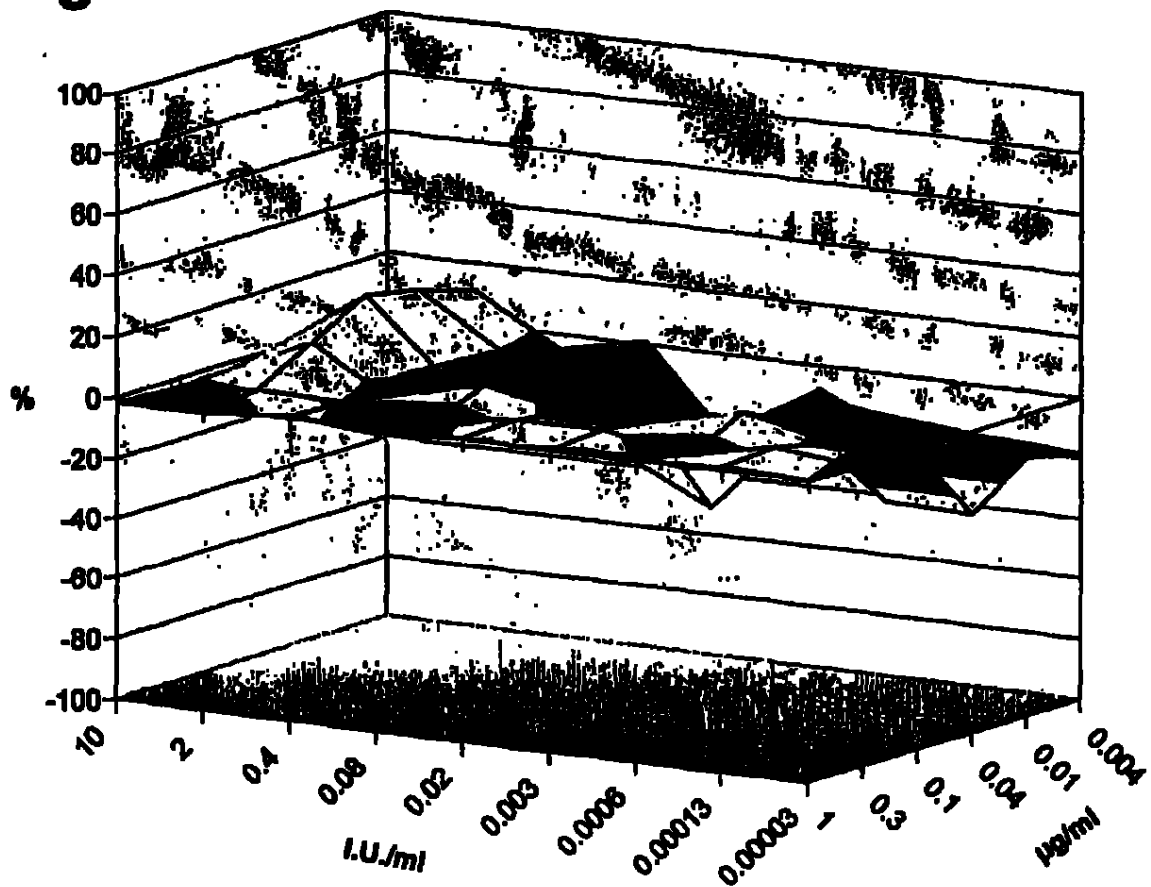


Fig. 4



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

IB2005/002940

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A61K38/13 A61P31/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data bases consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NAKAGAWA M ET AL: "Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 313, no. 1, 2 January 2004 (2004-01-02), pages 42-47, XP004479114 ISSN: 0006-291X abstract page 46, column 1, line 18 - line 22 page 46, column 1, line 49 - page 47, column 2, paragraph 2 -/--	1-6



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 January 2006

Date of mailing of the international search report

15/02/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.O. 5818 Patentplan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-8040, Tx. 31 651 apo nl,
Fax (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Fayos, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

IB2005/002940

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00/01715 A (DEBIOPHARM S.A; WENGER, ROLAND, M; MUTTER, MANFRED; RUCKLE, THOMAS) 13 January 2000 (2000-01-13)	3,4
Y	page 3, line 13 - line 16 page 7, line 1 - line 7 page 16; table III; compound 8 page 6, line 8 - line 10	1-6
Y	WO 98/28328 A (RHONE-POULENC RORER S.A; BARRIERE, JEAN-CLAUDE; BASHIARDES, GEORGES; C) 2 July 1998 (1998-07-02) page 3, line 9 - line 18 example 1 claims 1-4	1-6
Y	WO 98/28329 A (RHONE-POULENC RORER S.A; BARRIERE, JEAN-CLAUDE; BASHIARDES, GEORGES; C) 2 July 1998 (1998-07-02) page 5, line 8 - line 18 examples 1-7 page 26, line 17 - line 34	1-6
P,X	WO 2005/021028 A (NOVARTIS AG; NOVARTIS PHARMA GMBH; HIJIKATA, MAKOTO; SHIMOTOHNO, KUNIT) 10 March 2005 (2005-03-10) page 4; example b page 3, formula I page 11, paragraph 4 claims 1-12	1-6
Y	WATASHI KOICHI ET AL: "Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes." HEPATOLOGY, vol. 38, no. 5, November 2003 (2003-11), pages 1282-1288, XP009047548 ISSN: 0270-9139 the whole document	1-6
P,Y	INOUE K ET AL: "Interferon Combined With Cyclosporine Treatment as an Effective Countermeasure Against Hepatitis C Virus Recurrence in Liver Transplant Patients With End-Stage Hepatitis C Virus Related Disease" TRANSPLANTATION PROCEEDINGS, ORLANDO, FL, US, vol. 37, no. 2, March 2005 (2005-03), pages 1233-1234, XP004860087 ISSN: 0041-1345 the whole document	1-6

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
IB2005/002940

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HUBLER F ET AL: "Synthetic routes to NetXaa<4>-cyclosporin A derivatives as potential anti-HIV I drugs" TETRAHEDRON LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 41, no. 37, September 2000 (2000-09), pages 7193-7196, XP004210230 ISSN: 0040-4039 the whole document	1-6
P,X	XIA WEI-LIANG ET AL: "Inhibitory effect of cyclosporine A on hepatitis B virus replication in vitro and its possible mechanisms." HEPATOBIILIARY & PANCREATIC DISEASES INTERNATIONAL : HBPD INT. FEB 2005, vol. 4, no. 1, February 2005 (2005-02), pages 18-22, XP002361357 ISSN: 1499-3872 the whole document page 20, right-hand column, paragraph 2	1-6
Y	HANSSON M J ET AL: "The nonimmunosuppressive cyclosporin analogs NIM811 and UNIL025 display nanomolar potencies on permeability transition in brain-derived mitochondria" JOURNAL OF BIOENERGETICS AND BIOMEMBRANES, PLENUM PUBLISHING, NEW YORK, NY, US, vol. 36, no. 4, August 2004 (2004-08), pages 407-413, XP002330699 ISSN: 0145-479X the whole document	1-6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

.../IB2005/002940

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0001715	A	13-01-2000	AU 759480 B2	17-04-2003
			AU 4385699 A	24-01-2000
			BR 9911724 A	20-03-2001
			CA 2335903 A1	13-01-2000
			CN 1308635 A	15-08-2001
			EP 1091975 A1	18-04-2001
			JP 2002519434 T	02-07-2002
			MX PA00013019 A	14-07-2003
			US 6927208 B1	09-08-2005
WO 9828328	A	02-07-1998	AT 218581 T	15-06-2002
			AU 5669198 A	17-07-1998
			DE 69713151 D1	11-07-2002
			DK 951473 T3	16-09-2002
			EP 0951473 A1	27-10-1999
			ES 2178036 T3	16-12-2002
			FR 2757520 A1	26-06-1998
			JP 2001507016 T	29-05-2001
			PT 951473 T	29-11-2002
			US 5948755 A	07-09-1999
WO 9828329	A	02-07-1998	AT 218580 T	15-06-2002
			AU 5669298 A	17-07-1998
			DE 69713148 D1	11-07-2002
			DK 948527 T3	16-09-2002
			EP 0948527 A1	13-10-1999
			ES 2178037 T3	16-12-2002
			FR 2757522 A1	26-06-1998
			JP 2001507346 T	05-06-2001
			MA 26459 A1	20-12-2004
			PT 948527 T	29-11-2002
			US 5965527 A	12-10-1999
			ZA 9711606 A	25-06-1998
WO 2005021028	A	10-03-2005	NONE	

48
98

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL		Solicitud Internacional No. IB2005/002840
A. CLASIFICACIÓN DE LA MATERIA EN CUESTIÓN A61K38/13 A61P31/14 De acuerdo a la clasificación internacional de Patentes (IPC) o con las clasificaciones nacional e IPC		
B. CAMPOS DE BÚSQUEDA Documentación mínima examinada (sistema de clasificación seguido por símbolos de clasificación) A61K A61P Documentación examinada diferente de la documentación mínima para el alcance de que tales documentos sean incluidos en el campo de búsqueda Base de datos electrónicas consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, en su caso, términos de búsqueda usados) EPO -Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Cita del documento, con indicación, en su caso, de los pasajes relevantes	Relevancia relevante No.
Y	NAKAGAWA M ET AL: "Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 313, no. 1, 2 de enero de 2004 (2004-01-02), páginas 42-47, XP004479114 ISSN: 0006-291X resumen página 46, columna 1, línea 18 - línea 22 página 46, columna 1, línea 49 - página 47, columna 2, párrafo 2	1-6
--		
--		
☒ En la continuación del cuadro C se enlistan documentos adicionales ☒ En el anexo se enlistan miembros de la familia de Patentes		
* Categorías especiales de los documentos citados: "A" documento que define el estado general de la técnica, pero que no es considerado de particular relevancia. "E" documento de fecha anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional. "L" documento que puede arrojar duda en la(s) reivindicación(es) de prioridad o que es citado para establecer la fecha de publicación de otra referencia o por otra razón especial (como se especificó). "O" documento referido a una descripción oral, uso, exhibición u otros medios. "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reclamada. "T" último documento presentado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no se opone a la solicitud pero es citado para entender el principio o teoría implícito de la invención. "X" documento de particular relevancia, la invención reivindicada no puede ser considerada original o no puede ser considerada con actividad inventiva, cuando solo se toma el documento. "Y" documento de particular relevancia; no se puede considerar que la invención reivindicada involucre una actividad inventiva cuando el documento es combinado con uno o más documentos diferentes, siendo tal combinación evidente para una persona experta en la técnica. "Z" documento miembro de la misma familia de patentes.		
Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional 3 de enero de 2006		Fecha de envío por correo del informe de búsqueda internacional 15/02/2006
Nombre y domicilio postal de la Administración de Búsqueda Internacional Oficina Europea de Patentes, P.B. 5018 Patristaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3018		Funcionario Autorizado Fayos, C

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.

IB2005/002840

99

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Cita de documentos, con indicación, en su caso, de los pasajes relevantes	Reivindicación relevante No.
X	WO 00/01715 A (DEBIOPHARM S.A; WENGER, ROLAND, M; MUTTER, MANFRED; RUCKLE, THOMAS) 23 de enero de 2000 (2000-01-13)	3-4
Y	página 3 , línea 13 -línea 18 página 7 , línea 1 -línea 7 página 18 , tabla III -componente 8 página 8 , línea 8 -línea 10	1-8
Y	WO 88/28328 A (RHONE POULENC RORER S.A.; BARRIERE, JEAN-CLAUDE; BASHIARDES, GEORGES; C) 2 de julio de 1988 (1988-07-02)	1-8
	página 3, línea 9 - línea 18 ejemplo 1 reivindicaciones 1-4	
Y	WO 88/28329 A (RHONE POULENC RORER S.A.; BARRIERE, JEAN-CLAUDE; BASHIARDES, GEORGES; C) 2 de julio de 1988 (1988-07-02)	1-8
	página 5 , línea 8 - línea 18 ejemplo 1-7 página 28, línea 17- línea 34	
P, X	WO 2005/021028 A (NOVARTIS AG; NOVARTIS PHARMA GMBH; HIJIKATA, MAKOTO; SHIMOTOHNO KUNIT) 10 de marzo de 2005 (2005-03-10)	1-8
	página 4 , ejemplo b página 3, fórmula I página 11, párrafo 4 reivindicaciones 1-12	
Y	WATASI KOICHI ET AL: " Cyclosporin A supresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes." HEPATOLOGY, vol. 38, no.5, Noviembre de 2003 (2003-11), páginas 1282-1288, XP009047548 ISSN: 0270-9139 todo el documento	1-8
P, Y	INOUE K ET AL: "Interferon Combined With Cyclosporine Treatment as an Effective Countermeasure Against Hepatitis C Virus Recurrence In Liver Transplant Patients with End-Stage Hepatitis C Virus Related Disease" TRANSPLANTATION PROCEEDINGS, ORLANDO, FL, US, vol.37, no. 2, March 2005 (2005-03), páginas 1233-1234, XP004880087 ISSN: 0041-1345 todo el documento	1-8

100

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.

IB2005/002840

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría	Cita de documentos, con indicación, en su caso, de los pasajes relevantes	Reivindicación relevante No.
A	HUBLER F ET AL : "Synthetic routes to NEIXas<4>-cyclosporin A derivatives as potencial anti-HIV I drugs" TETRAHEDRON LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 41, no.37, septiembre de 2000(200-09) páginas 7193-7196, XP004210230 ISSN: 0040-4039 todo el documento	1-6
P, X	XIA WEI-LIANG ET AL:" Inhibitory effect of cyclosporins A on hepatitis B virus replication in vitro and its possible mechanisms" HEPATOBIILIARY & PANCREATIC DISEASES INTERNATIONAL: HBPD INT. FEB 2005, vol. 4, no.1, febrero 2005 (2005-02) páginas 18-22, XP002361357 ISSN: 1499-3672 todo el documento página20 columna derecha, párrafo 2	1-6
Y	HANSSON M J ET AL: "The nonimmunosuppressive cyclosporin analogs NIM811 and UNIL025 display nanomolar potencies on permeability transition in brain-derived mitochondria" JOURNAL OF BIOENERGETICS AND BIOMEMBRANES, PLENUM PUBLISHING, NEW YORK, NY, US, vol. 36, no. 4, agosto de 2004 (2004-08) páginas 407-413, XP002330699 ISSN: 0145-479X todo el documento	1-6

101

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL				Solicitud Internacional No. 183005/002240	
Información sobre Familia de Patentes					
Documento de patentes citado en el informe de búsqueda		Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patente(s)		Fecha de publicación
WO 0001715	A	13-01-2000	AU	759480 B2	17-04-2003
			AU	4385699 A	24-01-2000
			BR	9911724 A	20-03-2001
			CA	2335903 A1	13-01-2000
			CN	1308635 A	15-08-2001
			EP	1091975 A1	18-04-2001
			JP	2002519434 T	02-07-2002
			MX	PA00013019 A	14-07-2003
			US	6927208 B1	09-08-2005
WO 9828328	A	02-07-1998	AT	218581 T	15-06-2002
			AU	5669198 A	17-07-1998
			DE	69713151 D1	11-07-2002
			DK	951473 T3	16-09-2002
			EP	0951473 A1	27-10-1999
			ES	2178036 T3	16-12-2002
			FR	2757520 A1	26-06-1998
			JP	2001507016 T	29-05-2001
			PT	951473 T	29-11-2002
			US	5948755 A	07-09-1999
WO 9828329	A	02-07-1998	AT	218580 T	15-06-2002
			AU	5669298 A	17-07-1998
			DE	69713148 D1	11-07-2002
			DK	948527 T3	16-09-2002
			EP	0948527 A1	13-10-1999
			ES	2178037 T3	16-12-2002
			FR	2757522 A1	26-06-1998
			JP	2001507346 T	05-06-2001
			MA	26459 A1	20-12-2004
			PT	948527 T	29-11-2002
			US	5965527 A	12-10-1999
			ZA	9711606 A	25-06-1998
WO 2005021028	A	10-03-2005	NINGUNO		

PATENT COOPERATION TREATY

Wfe
16/10/07
102

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

To:

Pascal le Chat
Debiopharm S.A.
Forum "après-demain"
Chemin Messidor 5-7
1002 Lausanne
SUISSE

RECU le
12 JAN. 2007

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(PCT Rule 71.1)

Date of mailing
(day/month/year)

10.01.2007

Applicant's or agent's file reference
DPH 070-PCT/1

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/IB2005/002940

International filing date (day/month/year)
03.10.2005

Priority date (day/month/year)
01.10.2004

Applicant
DEBIOPHARM SA

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.
4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the international
preliminary examining authority:



European Patent Office
D-80299 Munich
Tel. +49 89 2369 - 0 Tlx: 523658 epmu d
Fax: +49 89 2369 - 4466

Authorized Officer

Ladumer, Yvan

Tel. +49 89 2369-7913



103

PATENT COOPERATION TREATY
PCT
INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY
(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)
(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference DPH 070-PCT/1		FOR FURTHER ACTION See Form PCT/PEAA16
International application No. PCT/B2005/002940	International filing date (day/month/year) 03.10.2005	Priority date (day/month/year) 01.10.2004
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. A61K38/13 A61P31/14		
Applicant DEBIOPHARM SA		
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ sent to the applicant and to the International Bureau a total of 4 sheets, as follows: ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 807 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in Item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).		
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application		
Date of submission of the demand 25.07.2006		Date of completion of this report 10.01.2007
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-60298 Munich Tel. +49 89 23699 - 0 Tlx 523656 epmu d Fax +49 89 2369 - 4465		Authorized officer Fayos, Cécile Telephone No. +49 89 2369-2180 

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

international application No.
PCT/IB2005/002940

109

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the language, this report is based on

- ☒ the international application in the language in which it was filed
- ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))

2. With regard to the elements* of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report):*

Description, Pages

1, 3-17, 21-26 as originally filed
2, 18-20 received on 25.07.2006 with letter of 25.07.2006

Claims, Numbers

1-6 as originally filed

Drawings, Sheets

12, 22 as originally filed

☐ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing *(specify):*
- ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify):*

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

- ☐ the description, pages
- ☐ the claims, Nos.
- ☐ the drawings, sheets/figs
- ☐ the sequence listing *(specify):*
- ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify):*

* If item 4 applies, some or all of these sheets may be marked "superseded."

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/IB2005/002940

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application,

☒ claims Nos. 5-6

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 5-6 industrial applicability relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ no international search report has been established for the said claims Nos.

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b) and 13ter.2.

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☐ See separate sheet for further details

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/IB2005/002940

106

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-2, 5-6
	No: Claims	3-4
Inventive step (IS)	Yes: Claims	-
	No: Claims	1-6
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-4; 5-6 see separate sheet
	No: Claims	-

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/IB2005/002940

Note: The current assessment is based on the assumption that all claims enjoy priority rights from the filing date of the priority document. If it later turns out that this is not correct, the documents D5, D7 and D9 cited in the International search report could become relevant.

No amendments have been made to the claims. The previously expressed opinion with regards to novelty is therefore maintained.

Re item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

- 1- Claims 5-6 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(i) PCT).

Re item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

- 2- Reference is made to the following documents:

- D1 NAKAGAWA M ET AL: "Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 313, no. 1, 2 January 2004 (2004-01-02), pages 42-47, XP004479114 ISSN: 0006-291X
- D2 WO 00/01715 A (DEBIOPHARM S.A; WENGER, ROLAND, M; MUTTER, MANFRED; RUCKLE, THOMAS) 13 January 2000 (2000-01-13)
- D3 WO 98/28328 A (RHONE-POULENC RORER S.A; BARRIERE, JEAN-CLAUDE; BASHIARDES, GEORGES; C) 2 July 1998 (1998-07-02)
- D4 WO 98/28329 A (RHONE-POULENC RORER S.A; BARRIERE, JEAN-CLAUDE; BASHIARDES, GEORGES; C) 2 July 1998 (1998-07-02)
- D5 WO 2005/021028 A (NOVARTIS AG; NOVARTIS PHARMA GMBH; HIJIKATA, MAKOTO; SHIMOTOHNO, KUNIT) 10 March 2005 (2005-03-10)

428
108

- D6 WATASHI KOICHI ET AL: "Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes." HEPATOLOGY, vol. 38, no. 5, November 2003 (2003-11), pages 1282-1288, XP009047548 ISSN: 0270-9139
- D7 INOUE K ET AL: "Interferon Combined With Cyclosporine Treatment as an Effective Countermeasure Against Hepatitis C Virus Recurrence in Liver Transplant Patients With End-Stage Hepatitis C Virus Related Disease" TRANSPLANTATION PROCEEDINGS, ORLANDO, FL, US, vol. 37, no. 2, March 2005 (2005-03), pages 1233-1234, XP004860087 ISSN: 0041-1345
- D8 HUBLER F ET AL: "Synthetic routes to NetXaa<4>-cyclosporin A derivatives as potential anti-HIV 1 drugs" TETRAHEDRON LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 41, no. 37, September 2000 (2000-09), pages 7193-7196, XP004210230 ISSN: 0040-4039
- D9 XIA WEI-LIANG ET AL: "Inhibitory effect of cyclosporine A on hepatitis B virus replication in vitro and its possible mechanisms." HEPATOBILIARY & PANCREATIC DISEASES INTERNATIONAL : HBPD INT. FEB 2005, vol. 4, no. 1, February 2005 (2005-02), pages 18-22, XP002361357 ISSN: 1499-3872
- D10 HANSSON M J ET AL: "The nonimmunosuppressive cyclosporin analogs NIM811 and UNIL025 display nanomolar potencies on permeability transition in brain-derived mitochondria" JOURNAL OF BIOENERGETICS AND BIOMEMBRANES, PLENUM PUBLISHING, NEW YORK, NY, US, vol. 36, no. 4, August 2004 (2004-08), pages 407-413, XP002330699 ISSN: 0145-479X

2.1- The relevant passages are those indicated in the search report, unless otherwise specified.

NOVELTY - Art. 33 (1) and (2) PCT

- 3- The feature "a second ingredient that is active against HCV infection" is not clear (Art. 6 PCT) in that it is merely defined in terms of the result to be achieved. There are no technical features to define the ingredient. Neither the feature "a second ingredient that is active against HCV infection" in the claims, nor the passage on p 20 lines 13-15 is restricted to any specific agent or ingredient.

4- Claims 3-4 lack novelty in view of D2 or in view of D10.

INVENTIVE STEP - Art. 33 (1) and (3) PCT

5- Claims 1-6 lack Inventive step: -

5.1- The closest prior art is represented by D1, which relates to the specific inhibition of Hepatitis C virus replication by cyclosporin A. Furthermore, D1 suggests the use of modified cyclosporin A, which is less or not immunosuppressive.

The closest prior art differs from the present application in that it does not provide the specific cyclosporin A of the present application.

The technical effect achieved in the present application is shown in the examples.

The objective problem posed in the present application is to provide further cyclosporin A compounds, which are less immunosuppressive and are suitable for and effective in the treatment of HCV infection.

The solution proposed is the use of [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA. This cyclosporin shows an antiviral activity about 10 times higher and a cytotoxicity 2,5 times less compared to CsA as reported on table 3 p 12 (see also fig 3). According to the applicant, the improved virucidal activity of the cyclosporin used in the invention prevents the rebound phase of HCV replicon cells.

5.2- D1 relates to the specific inhibition of Hepatitis C virus replication by cyclosporin A and suggests the use of modified cyclosporin A, which is less or not immunosuppressive.

D2 provides cyclosporins of the present application which are effective in the treatment of HIV and which are less immunosuppressive and highly effective in inhibiting HIV infection.

Hence, in view of D1, taken in combination with D2, the skilled man would have used the cyclosporins of D2 for the purpose of treating HCV infection. The same applies to the combination of D1 with D10.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/IB2005/002940

It is noted, however, that the effect obtained in the present application (clearance of HCV replicon) is neither disclosed, nor suggested in any of these documents.
The same applies to the combination of D1 with D10.

It seems therefore that claims 1-2 and 5-6, which appear to be formally novel over the available prior art, could also be considered as being inventive.

INDUSTRIAL APPLICABILITY - Art. 33 (1) and (4) PCT

- 6- For the assessment of the present claims 5-6 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES

De la
ADMINISTRACIÓN ENCARGADA DEL EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

Para: Pascale la Chat Debipharm S.A. Forum "après-demain" Chemin Messidor 5-7 1002 Lausanne SUISSE		PCT NOTIFICACIÓN DE TRANSMISIÓN DEL INFORME DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL (PCT Regla 71.1)	
RECIBIDO EL 12 de enero de 2007		Fecha de envío por correo (día/mes/año) 10.01.2007	
Referencia del solicitante o mandatario DPH 070-PCT/1		AVISO IMPORTANTE	
Solicitud Internacional No. PCT/IB2006/002940	Fecha de Presentación Internacional (día/mes/año) 03.10.2006	Fecha de Prioridad (día/mes/año) 01.10.2004	
Solicitante DEBIOPHARM SA			
- El solicitante es notificado por este conducto de que la Administración Encargada del Examen Preliminar Internacional transmite con el presente el Informe de Examen Preliminar Internacional y sus anexos, si los hay, establecidos en la solicitud internacional. - Una copia del informe y sus anexos, si existen, se han transmitido a la Oficina Internacional para las comunicaciones con todas las Oficinas elegidas. - Cuando cualquiera de las Oficinas elegidas lo requieran, la Oficina Internacional preparará una traducción al inglés del informe (pero no de los anexos) y transmitirá la traducción a esas Oficinas. RECORDATORIO El solicitante deberá entrar a la fase nacional ante cada Oficina elegida, realizando ciertas diligencias (presentar traducciones y pagar tasas nacionales) dentro de los 30 meses a partir de la fecha de prioridad (o posteriormente en algunas Oficinas) (Artículo 39(1)) (ver también el recordatorio enviado por la Oficina Internacional con la forma PCT/IB/301). Cuando se proporciona una traducción de la solicitud internacional a una Oficina elegida, esa traducción deberá contener la traducción de cualquier anexo al Informe de Examen Preliminar Internacional. Es responsabilidad del solicitante preparar y proporcionar dicha traducción directamente a cada Oficina elegida interesada. Para mayores detalles sobre los plazos aplicables y los requerimientos de las Oficinas elegidas, ver el Volumen II de la Guía del Solicitante del PCT. Se dirige la atención del solicitante al Artículo 33(5), que proporciona los criterios de novedad, actividad inventiva y aplicación industrial descritas en el Artículo 33(2) a (4) únicamente para los propósitos del examen preliminar internacional y que "cualquier Estado Contratante puede aplicar un criterio adicional o diferente con el objeto de decidir si en ese Estado la invención reivindicada es patentable o no" (ver también Artículo 27(5)). Tales criterios adicionales pueden estar relacionados, por ejemplo, con excepciones de patentabilidad, requisitos de formato, claridad y fundamento de las reivindicaciones.			
Nombre y domicilio postal de la Administración Encargada del Examen Preliminar Internacional: Oficina Europea de Patentes D-80295 Munich Tel. (+49-89) 2399-0, Tlx: 523866 epmu d Fax: (+49-89) 2399-4465		Funcionario autorizado Ladumer, Yvan Teléfono No.: 49 89 2399-7913	



42

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES

PCT

INFORME DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL
(Capítulo II del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes)
(Artículo 36 y Regla 70 del PCT)

Referencia del solicitante o mandatario DPH 070-PCT/1	ACCIONES A SEGUIR Ver Formulario PCT/IPEAM16)	
Solicitud Internacional No. PCT/IB2005/002940	Fecha de Presentación Internacional (día/mes/año) 03.10.2005	Fecha de Prioridad (día/mes/año) 01.10.2004
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o ambas, la clasificación nacional y la IPC INV. A61K38/13 A61P31/14		
Solicitante DEBIOPHARM SA		
1. Este es el informe del examen preliminar internacional formulado por esta Administración encargada del examen preliminar internacional con base en el Artículo 35 y se ha transmitido al solicitante conforme al Artículo 36. 2. Este INFORME consta de un total de 8 hojas, incluyendo esta carátula 3. Este informe también está acompañado por los ANEXOS que comprenden: a. ☒ enviado al solicitante y a la Oficina Internacional) un total de 4 hojas, conforme a lo siguiente: ☒ las hojas de la descripción, de las reivindicaciones y/o de los dibujos que se han modificado y que son la base de este informe y/o las hojas que contienen las rectificaciones autorizadas por Administración (ver Regla 70.16 y Sección 807 de las Instrucciones administrativas). ☐ las hojas que sustituyen a las hojas anteriores, pero que esta Administración considera que contienen una enmienda que va más allá de la exposición en la solicitud internacional, tal como se presentó, como se indica en el punto 4 de la Casilla Núm. I y en la Casilla Suplementaria. b. ☐ (enviado únicamente a la Oficina Internacional) un total de (indicar el tipo y número de medios portadores electrónicos), que contienen un listado de secuencias y/o tablas relacionadas con el mismo, únicamente en formato legible en computadora, de conformidad con lo indicado en la Casilla Suplementaria Relacionada con el Listado de Secuencias (ver Sección 802 de las Instrucciones Administrativas) 4. El presente informe contiene indicaciones relacionadas con las siguientes cuestiones: ☒ Casilla Núm. I Bases del dictamen. ☐ Casilla Núm. II Prioridad ☒ Casilla Núm. III El dictamen no se formula con respecto a la novedad, actividad inventiva o aplicación industrial ☐ Casilla Núm. IV Falta de unidad en la invención ☒ Casilla Núm. V Declaración con exposición de motivos conforme al Artículo 35(2) con respecto a la novedad, actividad inventiva o aplicación industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha declaración ☐ Casilla Núm. VI Algunos documentos citados ☐ Casilla Núm. VII Algunas irregularidades en la solicitud internacional ☐ Casilla Núm. VIII Algunas observaciones en la solicitud internacional		
Fecha de presentación de la solicitud 25.07.2008	Fecha de terminación del presente informe 10.01.2007	
Nombre y domicilio postal de la Administración Encargada del Examen Preliminar Internacional Oficina Europea de Patentes D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tlx 523858 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Funcionario autorizado Fayos, Cécile Teléfono No.: +49 89 2399-2180	OFICINA EUROPEA DE PATENTES

Casilla Núm. I. Bases del Informe

1. Con respecto al idioma, este informe se basa en
☒ la solicitud internacional en el idioma en el que se presentó.
- ☐ una traducción del idioma original al siguiente idioma,
que es el idioma de una traducción proporcionada para propósitos de:
☐ búsqueda internacional (con base en las Reglas 12.3 y 23.1(b))
☐ publicación de la solicitud internacional (con base en la Regla 12.4)
☐ examen preliminar internacional (con base en las Reglas 55.2 y/o 55.3)
2. Con respecto a los elementos* de la solicitud internacional, este informe se basa en (se hace referencia en este informe a las hojas de reemplazo que hayan sido proporcionadas a la Oficina Receptora en respuesta a la invitación con base en el Artículo 14 como "originalmente presentadas" y no se anexan a este reporte)

Descripción, páginas

1, 3-17, 21-28
2, 18-20

tal como se presentaron originalmente.
recibido el 25.07.2008 con la carta del 25.07.2008

Reivindicaciones, números

1-8

tal como se presentaron originalmente.

Dibujos, hojas

1/2, 2/2

tal como se presentaron originalmente.

☐ un listado de secuencias y/o cualquier tabla relacionada; ver Casilla Suplementaria Relacionada con el Listado de Secuencias

3. ☐ Las modificaciones dieron como resultado la cancelación de:
- ☐ la descripción, páginas
 - ☐ las reivindicaciones, números
 - ☐ los dibujos, hojas
 - ☐ el listado de secuencias (especifique):
 - ☐ cualquier tabla relacionada con el listado de secuencias (especifique)
4. ☐ Este informe se ha formulado como si (algunas de) las modificaciones adjuntas a este informe y citadas más adelante no se hubieran hecho, puesto que se considera que van más allá de la exposición tal como fue presentada, conforme se indica en la Casilla Suplementaria (Regla 70.2(c)).
- ☐ la descripción, páginas
 - ☐ las reivindicaciones, números
 - ☐ los dibujos, hojas
 - ☐ el listado de secuencias (especifique):
 - ☐ cualquier tabla relacionada con el listado de secuencias (especifique)

* En caso que aplique el punto 4, algunas o todas estas hojas se pueden marcar como "sustituidas".

114

Casilla Núm. III	El dictamen no se formula con respecto a la novedad, actividad inventiva o aplicación industrial
1.	La cuestión respecto a saber si el objeto de la invención reivindicada es novedoso, implica una actividad inventiva (no es evidente) o es susceptible de aplicación industrial no se ha examinado en lo que se refiere a: ☐ el conjunto de la solicitud Internacional, ☒ las reivindicaciones Nos. 5-6 debido a que: ☒ la solicitud internacional o las reivindicaciones Nos.5-6 en cuestión se relacionan al siguiente objeto que no requiere Examen Preliminar Internacional (precisar): ver hoja separada ☐ la descripción, las reivindicaciones o los dibujos (indicando los elementos a continuación) o las reivindicaciones Nos.en cuestión no son claras, de manera que no es posible formular una opinión válida (precisar): ☐ las reivindicaciones o las reivindicaciones Nos. en cuestión no están fundadas en forma adecuada en la descripción de manera que no es posible formular una opinión válida. ☐ no se ha establecido un informe de búsqueda Internacional para las reivindicaciones Nos. . ☐ No es posible emitir una opinión significativa sin contar con el listado de secuencias; el solicitante no cumplió con lo siguiente dentro del plazo establecido para ello: ☐ Proporcionar el listado de secuencias en papel, en cumplimiento con la norma que se proporciona en el Anexo C de las Instrucciones administrativas, ya que dicho listado no estuvo disponible para la Administración del Examen Preliminar Internacional en una forma aceptable. ☐ Proporcionar un listado de secuencias en forma electrónica, en cumplimiento con la norma que se proporciona en el Anexo C de las instrucciones administrativas, ya que dicho listado no estuvo disponible para la Administración del Examen Preliminar Internacional en una forma aceptable. ☐ Pagar los derechos por presentación tardía del listado de secuencias en respuesta a una invitación hecha conforme a la Regla 13ter o (b), y 13ter 2. ☐ No es posible emitir una opinión significativa sin contar con las tablas que se relacionan con el listado de secuencias; el solicitante no cumplió con lo siguiente dentro del plazo establecido para ello: proporcionar las tablas en forma electrónica y con los requisitos técnicos establecidos en el Anexo C-bis de las Instrucciones administrativas, y dichas tablas no estuvieron disponibles para la Administración del Examen Preliminar Internacional en una forma aceptable ☐ las tablas relacionadas con el listado de secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos, en caso que se encuentren únicamente en formato legible en computadora, no cumplen con los requerimientos técnicos establecidos en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas ☐ ver hoja separada para detalles adicionales

Casilla Núm. V.			
Declaración con exposición de motivos conforme al Artículo 35(2) con respecto a la novedad, actividad inventiva y aplicación industrial; citas y explicaciones que sustentan esta declaración.			
1. DECLARACIÓN			
Novedad (N)	SI NO	Reivindicaciones Reivindicaciones	1-2, 5-6 3-4
Actividad Inventiva (IS)	SI NO	Reivindicaciones Reivindicaciones	- 1-6
Aplicación industrial (IA)	SI NO	Reivindicaciones Reivindicaciones	1-4; 5-6 ver hoja separada
2. CITAS Y EXPLICACIONES (Regla 70.7):			
ver hoja separada			

116

Nota: La evaluación actual se basa en la suposición de que todas las reivindicaciones disfrutaban de derechos de prioridad a partir de la fecha de presentación del documento de prioridad. Si resulta que esto último no es correcto, los documentos D5, D7 y D9 citados en el reporte de búsqueda internacional se volverían relevantes.

No se han realizado enmiendas a las reivindicaciones. Por lo tanto, se mantiene la opinión expresada previamente con respecto a la novedad.

Respecto al punto III

El dictamen no se formula con respecto a la novedad, actividad inventiva o aplicación industrial

1- Las reivindicaciones 5-6 se refieren a materia objeto considerada por esta Autoridad como cubierta por las disposiciones de la Regla 67.1(iv) del PCT. Por consiguiente, no se formulará opinión con respecto a la aplicabilidad industrial de la materia objeto de estas reivindicaciones (Artículo 34(4)(a)(I) del PCT).

117

117

Respecto al inciso V

Declaración con exposición de motivos conforme al Artículo 35(2) con respecto a la novedad, actividad inventiva y aplicación industrial; citas y explicaciones que sustentan esta declaración.

2- Se hace referencia a los siguientes documentos:

D1 NAKAGAWA M ET AL: "Specific inhibition of hepatitis C virus replication by cyclosporin A" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL., US, vol. 313, No. 1, 2 enero 2004 (2004-01-02), páginas 42-47, XP004479114 ISSN: 0006-291X

D2 WO 00/01715 A (DEBIOPHARM S.A; WENGER, ROLAND, M; MUTTER, MANFRED; RUCKLE, THOMAS) 13 de Enero 2000 (2000-01-13)

D3 WO 98/28328 A (RHONE-POULENC RORER S.A.; BARRIERE, JEAN-CLAUDE; BASHIARDES, GEORGES; C) 2 Julio 1998 (1998-07-02)

D4 WO 98/28329 A (RHONE-POULENC RORER S.A.; BARRIERE, JEAN-CLAUDE; BASHIARDES, GEORGES; C) 2 Julio 1998 (1998-07-02)

D5 WO 2005/021028 A (NOVARTIS AG; NOVARTIS PHARMA GMBH; HIJIKATA, MAKOTO; SHIMOTOHNO, KUNIT) 10 Marzo 2005 (2005-03-10)

D6 WATASHI KOICHI ET AL: "Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes", HEPATOLOGY, vol. 38, no. 5, Noviembre 2003

118

118

(2003-11), páginas 1282-1288, XP009047548 ISSN: 0270-9139

D7 INOUE K ET AL: "Interferon Combined With Cyclosporine Treatment as an Effective Countermeasure Against Hepatitis C Virus Recurrence in Liver Transplant Patients With End-Stage Hepatitis C Virus Related Disease" TRANSPLANTATION PROCEEDINGS, ORLANDO, FL., US, vol. 37, no. 2, Marzo 2005 (2005-03), páginas 1233-1234, XP004860087 ISSN: 0041-1345

D8 HUBLER F ET AL: "Synthetic routes to NetXaa<4>cyclosporin A derivatives as potential anti-HIV I drugs" TETRAHEDRON LETTERS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 41, no. 37, Septiembre 2000 (2000-09), páginas 7193-7196, XP004210230 ISSN: 0040-4039

D9 XIA WEI-LIANG ET AL: "Inhibitory effect of cyclosporine A on hepatitis B virus replication in vitro and its possible mechanisms". HEPATOBILIARY & PANCREATIC DISEASES INTERNATIONAL: HEPD INT. FEB 2005, vol. 4, no. 1, Febrero 2005 (2005-02), páginas 18-22, XP002361357 ISSN: 1499-3872

D10 HANSSON M J ET AL: "The nonimmunosuppressive cyclosporin analogs NIM811 and UNIL025 display nanomolar potencies on permeability transition in brain-derived mitochondria" JOURNAL OF BIOENERGETICS AND BIOMEMBRANES, PLENUM PUBLISHING, NEW YORK, NY, US, vol. 36, no. 4, Agosto 2004 (2004-08), páginas 407-413, XP002330699 ISSN: 0145-479X

119

2.1- Los pasajes relevantes son aquellos indicados en el reporte de búsqueda, excepto que se especifique de otro modo.

NOVEDAD - Art. 33 (1) y (2) del PCT

3- La característica "un segundo ingrediente que es activo contra la infección por HCV" no es clara (Art. 6 del PCT) porque solamente se define en términos del resultado que se va a lograr. No existen características técnicas para definir el ingrediente. Ni la característica "un segundo ingrediente que es activo contra la infección por HCV" en las reivindicaciones, ni el pasaje en la página 20, líneas 13-15 está restringida a algún agente o ingrediente específico.

4- Las reivindicaciones 3-4 carecen de novedad en vista de D2 o en vista de D10.

ACTIVIDAD INVENTIVA - Art. 33 (1) y (3) del PCT

5- Las reivindicaciones 1-6 carecen de actividad inventiva:

5.1- La técnica anterior más parecida está representada por D1, que se refiere a la inhibición específica de la replicación del virus de la Hepatitis C por ciclosporina A. Además, D1 sugiere el uso de ciclosporina A modificada, que es menos o nada inmunosupresora.

La técnica anterior más parecida difiere de la presente solicitud en que no proporciona la ciclosporina A específica de la presente solicitud.

El efecto técnico logrado en la presente solicitud se muestra en los ejemplos.

El problema objetivo presentado en la presente solicitud es proporcionar compuestos adicionales de ciclosporina A, que son menos inmunosupresores y son adecuados y efectivos en el tratamiento de la infección por HCV.

La solución propuesta es el uso de [D-MeAla]¹-[EtVal]⁴-CaA. Esta ciclosporina muestra una actividad antiviral aproximadamente 10 veces más alta y una toxicidad 2.5 veces menor comparada a CaA, como se reporta en la Tabla 3, página 12 (ver también figura 3). De acuerdo al solicitante, la actividad viricida de la ciclosporina utilizada en la invención, previene la fase de rebote de las células replicones de HCV.

5.2- D1 se refiere a la inhibición específica de la replicación del virus de Hepatitis C por ciclosporina A y sugiere el uso de ciclosporina A modificada, que es menos o nada inmunosupresora.

D2 proporciona ciclosporinas de la presente solicitud, que son efectivas en el tratamiento de VIH y que son menos inmunosupresoras y muy efectivas para inhibir la infección por VIH.

Aquí, en vista de D1, tomado en combinación con D2, la persona experta habría utilizado las ciclosporinas de D2 para fines de

tratamiento de infección por HCV. Lo mismo se aplica a la combinación de D1 con D10.

Sin embargo, se observa que el efecto obtenido en la presente solicitud (eliminación del replicón de HCV) no se describe, ni se sugiere en ninguno de estos documentos.

Lo mismo se aplica a la combinación de D1 con D10.

Por lo tanto, parece que las reivindicaciones 1-2 y 5-6, que parecen ser formalmente nuevas sobre la técnica anterior disponible, también podrían considerarse como inventivas.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL - Art. 33 (1) y (4) del PCT

6- Para la evaluación de las presentes reivindicaciones 5-6 sobre la cuestión de si son industrialmente aplicables, no existen criterios unificados en los Estados Contratantes del PCT. La patentabilidad también puede depender de la formulación de las reivindicaciones. La EPO, por ejemplo, no reconoce como industrialmente aplicable la materia objeto de reivindicaciones para el uso de un compuesto en el tratamiento médico, pero puede permitir, sin embargo, reivindicaciones para un compuesto conocido, para el primer uso en el tratamiento médico y el uso de tal compuesto para la fabricación de un medicamento para un nuevo tratamiento médico.

122

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud (22) Fecha de solicitud		(51) Int Cl: (71) Solicitante(s) DEBIOPHARM S.A.	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad PCT/IB2004/003205	(32) Fecha 01-10-04	(33) País IB
		(72) Inventor(es) SCALFARO Pietro, DUMONT, Jean-Maurice, VUAGNIAUX, Grégoire MAUVERNAY, Rolland-Yves	
		(74) Apoderado: JAIME EDUARDO DELGADO VILLEGAS	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 01-05-2007		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 03-10-05 No. de solicitud PCT/IB2005/02940		Fecha: 13-04-06 Fecha (dd/mm/aa) N° publicación: WO 2006/038086 A1	
(54) Título: USO DE [D-MEALA]³-[ETVAL]⁴-CICLOSPORINA PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIÓN POR HEPATITIS C Y COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA QUE COMPRENDE LA [D-MEALA]³-[ETVAL]⁴-CICLOSPORINA			

Resumen - Reivindicación(es):

Una composición farmacéutica que comprende [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA y un segundo ingrediente que es activo contra la infección por HCV, además un portador farmacéuticamente aceptable y, opcionalmente, un diluyente. El uso de un producto medicinal que contienen [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA para tratar infección por HCV en un paciente.

El producto medicinal que contiene [D-MeAla]³-[EtVal]⁴-CsA se coadministra o se administra separadamente con al menos un segundo ingrediente que es activo contra la infección por HCV, como parte de un régimen de dosificación apropiado, destinado para obtener los beneficios de la terapia de combinación contra la infección por HCV en el paciente.

Letras Folios 123 y 124
Togel

126

124

Este recibo debe ser utilizado
Únicamente para tramites de
Mario Delgado Echeverry e Hijos Ltda.

Marca: USO DE [D-MEALA]3-[ETVAL]4 CICLOSPORINA PARA EL
TRATAMIENTO DE INFECCIÓN POR HEPATITIS C Y COMPOSICIÓN
FARMACÉUTICA QUE COMPRENDE LA [D-MEALA]3-[ETVAL]4-CYCLOSPORINA
Expediente:

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 82,487
FECHA : OCTUBRE 25 DE 2006

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-032692- -00000-0000
Fec: 2007-03-30 15:59:17 Dep. 2020 INJECREACIONES
TRI. 11 PATENTENYII
Ere: 379 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folio: 127

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
MARIO DELGADO ECHEVERRY	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	4936981B	25/10/2006	6,826,000.00

***** CONCEPTO *****

CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN 463,000.00
	TOTAL : \$ 463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

127
125

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 07 - 721
FECHA : ENERO 4 DE 2007

Este recibo debe ser utilizado
Únicamente para tramites de
Mario Delgado Echeverry e Hijos Ltda.
Marca: _____
Expediente: _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-032882- -00000-0000
Fec: 2007-03-30 15:38:17 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tm. 11 PATENTERYII
Eve: 379 FASENACIONALII
Act 411 PRESENTACION Folios: 127

CONSIGNACION

DEBITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
MARIO DELGADO ECHEVERRY	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	55766735	04/01/2007	4,599,300.00

CONCEPTO

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS
			TOTAL : \$ 19,000.00

SON: DIEZ Y NUEVE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION



MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

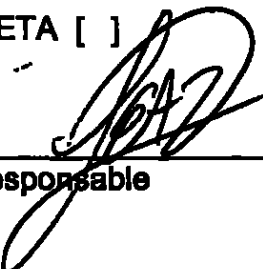
INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable

Fecha 30 MAR 2007

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@slc.gov.co
www.slc.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

127

Bogotá,
2020

Doctor(a)
DELGADO VILLEGAS JAIME EDUARDO

REFERENCIA	Radicación No.	07 32692
	Solicitud internacional	PCT/IB2005/002940
	Fecha inicio fase nacional	01/05/2007
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	07933

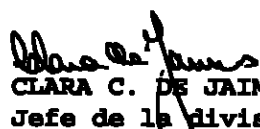
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, deben legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


CLARA C. DE JAIMES
Jefe de la división de Nuevas Creaciones (E)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 6 JUL. 2007.
adpa11