



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

05-51554

54. TITULO

COMPOSICION PARA EL TRATAMIENTO DE LA INFECCION POR

VIRUS FLAVIVIRIDAE

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

A61P 35/00

71. SOLICITANTE

BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

DOMICILIO

Ingelheim, República Federal de Alemania,

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén.

22. BOGOTA, D.C.,





Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 65051534 00000000 Folios: 151
Fecha (MM): 2005-05-26 16:41:13
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 0020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL 29-05-05

SOLICITUD DE:

- 1

☒ Patente de Invención.
☐ Capítulo I.
- ☐ Patente de Modelo de Utilidad.
☒ Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: **BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH**
sociedad constituida y existente bajo las leyes de la República Federal de Alemania

Dirección: Binger Strasse 173,
55216 Ingelheim,
República Federal de Alemania

Domicilio: Ingelheim,
República Federal de Alemania

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____

Número _____

3

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: **EMILIO FERRERO**
Dirección: **Carrera 4ª. No. 72-35**
Teléfono: **347 36 11**
Fax: **211 86 50**
E-mail: clientes@camyp.com.
Domicilio: **Bogotá, Colombia.**

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____

Número **438.019** T.P **31.929**

4

INVENTOR (ES)
(72)

1. **Daniel LAMARRE**
2100 Cunard Street,
Laval, Québec H7S 2G5,
Canadá

2. **Liesette LAGACÉ**
2100 Cunard Street,
Laval, Québec H7S 2G5,
Canadá

5

PCT (86)
Solicitud Internacional No. PCT/CA2003/001634 Fecha: 24 de Octubre de 2003
Publicación Internacional No. WO 2004/039833 A1 Fecha: 13 de Mayo de 2004

6

Título (54)
COMPOSICIÓN PARA EL TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR VIRUS FLAVIVIRIDAE

7

Clasificación Internacional (51) C07K 5/08

8 Prioridad SI ☒ NO ☐	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
	<u>US</u> <u>US</u>	<u>29 de Octubre de 2002</u> <u>27 de Enero de 2003</u>	<u>60/421.900</u> <u>60/442.769</u>

9

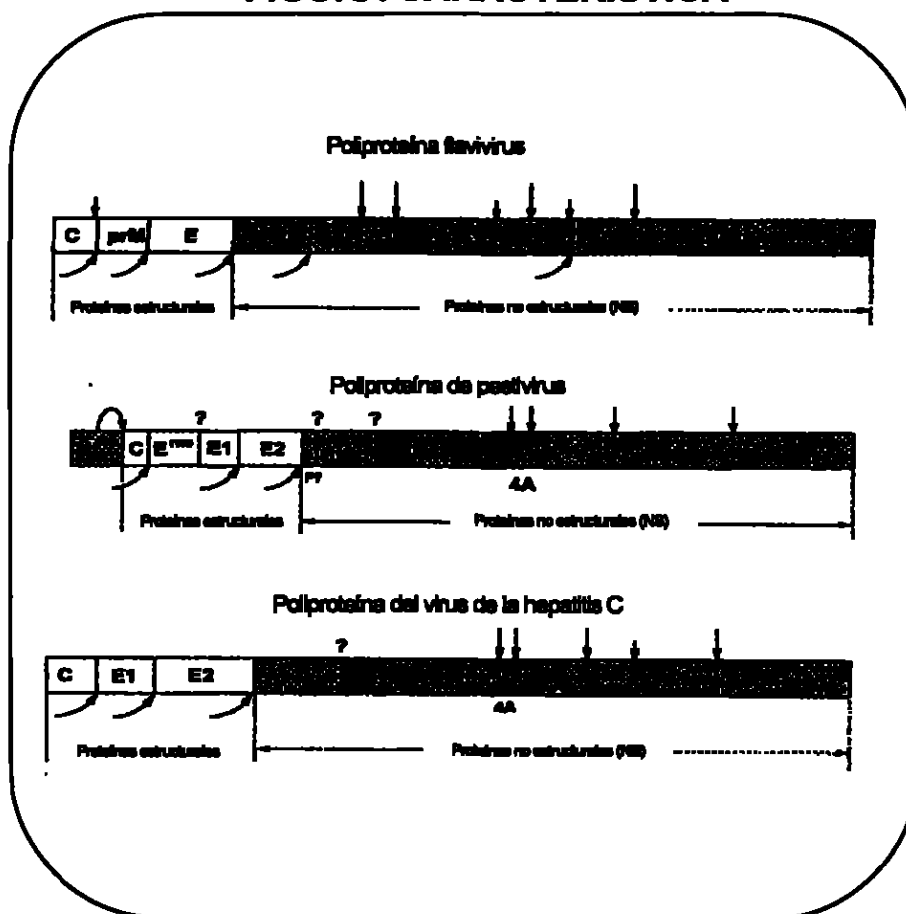
Comprobante de pago No.: 05 – 34.757 **Fecha:** 11 de Mayo de 2005

10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 443.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, 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 efectuado por la IPEA.
- ☒ Traducción del examen preliminar 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
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

FIGURA CARACTERÍSTICA

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERREROFIRMA: *Emilio Ferrero*
C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

PRP

For patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, slogans.

Para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, lemas comerciales.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND
POWER OF ATTORNEY

9255
0569

I (we), the undersigned/Yo (nosotros), abajo firmado (a)
BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

of/domiciliado (a) en **D-55216 Ingelheim am Rhein,
GERMANY**

por el presente nombramos a GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistirse, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

In due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO, tpa. 31929; and LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555; domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation shall be taken up again in their sequence, by the principal, the first or second alternate in their turn, and the mere fact or its expiration shall not constitute the end of the representation by the first or second alternate in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a power of Attorney to the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose (s) authorize the said attorneys to represent me (us) before administrative, judicial, arbitral, administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Ingelheim am Rhein, 12.12.1995

Given and signed this/Dado y firmado hoy

BOEHRINGER INGELHEIM

in/en **INTERNATIONAL GMBH**

ppa. *[Signature]*

ppa. *[Signature]*

Dr. Dieter Laudien

Dr. Gerhard Huber

Signature

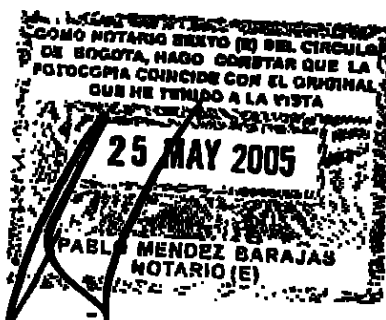
Firma

LEGALIZACION

El Señor Cónsul de Colombia debe expedir un *certificado consular* sobre (1) la existencia legal de la compañía que otorga el poder, (2) que ésta ejerce su objeto social, y (3) que las personas que otorgan el poder están autorizadas para darlo. A este efecto les solicitamos que muestren al Señor Cónsul las pruebas que acreditan esos hechos (1), (2) y (3).

LEGALIZATION

The Colombia Consul must issue a *consular certificate*, on (1) the legal existence of The company, which grants Power-of-Attorney, (2) that it is in actual exercise of company purposes, and (3) that the persons who execute the Power of Attorney is authorized to do so. To this effect, please show the Consul the evidence to prove the above facts (1), (2) and (3).



Vorseltige, vor mir gefertigte Namensunterschriften der Herren:

1. Dr. Dieter L a u d i e n, Dipl.-Chemiker, wohnhaft in 55127 Mainz,.
2. Dr. Gerhard H u b e r, Rechtsanwalt, wohnhaft in 55411 Bingen,

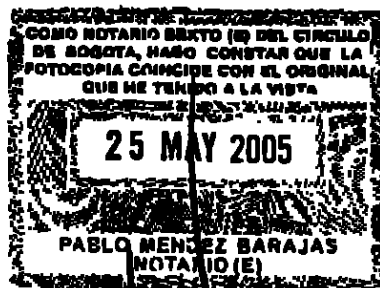
- mir bekannt -

beglaubige ich hiermit.

Gleichzeitig bescheinige ich aufgrund heutiger Einsichtnahme in das Handelsregister des Amtsgerichts Bingen, daß die Firma Boehringer Ingelheim International GmbH mit Sitz in Ingelheim am Rhein im Handelsregister des Amtsgerichts Bingen unter HR B 1083 eingetragen ist und daß die Herren Dr. Laudien und Dr. Huber als Prokuristen gemeinschaftlich zur Vertretung der Gesellschaft berechtigt sind.

Ingelheim am Rhein, den 12. Dezember 1995/hün


Notariatsverweser
anstelle des Notars
Prof. Dr. Weirich in Ingelheim

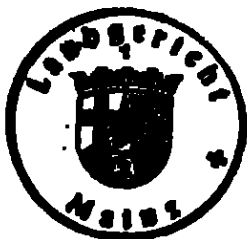


- 910 E 1 -

Die Echtheit vorstehender Unterschrift des Notarassessors Dr. Peter Wirth - Notariatsverweser anstelle des Notars Prof. Dr. Weirich in Ingelheim und die Echtheit des beigedruckten Dienst - ~~schreibens~~ - siegels werden hierdurch bestätigt. Zugleich wird bescheinigt, daß der Vorgenannte zur Vornahme der Amtshandlung gesetzlich befugt war.

Mainz, den dreizehnten Dezember neunzehnhundertfünfundneunzig
Der Präsident des Landgerichts


(Dr. Hans Paul Tüllerberg)



Kostenberechnung:

Gebühr für Legalisation

(Wert: DM 5.000,-)

JVKostO. v. 26.7.1987

BGBI. I S. 881

DM 20,-

12. DEZ. 1995

Mainz, den





CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA

MUNICH

Nr. 169

El Cónsul General de Colombia

CERTIFICA

Que el Dr. Hanns Paul Tüttenberg -----, quién autentica la firma del signatario en el presente documento, ejercía en la fecha allí indicada las funciones de Presidente del Tribunal Regional -en Mainz-.

Que la firma BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GmbH, domiciliada en 55216 Ingelheim am Rhein, Registro Mercantil Nr. HR B 1063 del Juzgado Municipal de Bingen está constituida y ejerce su objeto social de conformidad con las leyes de la República Federal de Alemania.

Que los señores Dr. DIETER LAUDIN y Dr. GERNARD HUBER

quien (es) firman el presente documento tiene (n) facultad legal suficiente para representar a la mencionada firma y otorgar poderes en su nombre.

Que ha tenido a la vista la documentación que prueba lo anterior.

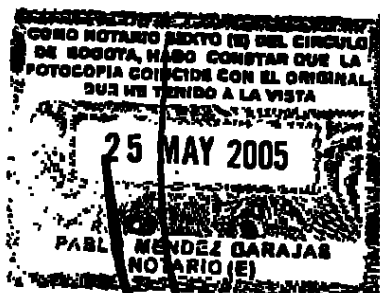
Munich, 18 de Diciembre de 1995


RICARDO MOSQUERA MESA
CONSUL GENERAL DE COLOMBIA



Derechos para la Nación	US \$	6.-
Fondo Rotatorio	US \$	100.-
Tasa consular	US \$	1 x DM 1,60 = DM 169.60

PAGADO





MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES
P. García
Mosquera
RESPONSABILIDAD DEL TS/10
MAY 25 1965
MEX - LA 11:44

EL DEPARTAMENTO DE RELACIONES
EXTERIORES
RECIBIÓ
25 MAY 25 1965
PABLO
NO

44-5133-1027

TRADUCCION OFICIAL No. 5133

de un documento escrito en Alemán, el cual para su identificación se sella con el sello de la traductora, lo mismo que la presente.-

(A continuación del poder conferido a GERMAN CAVELIER, tpa. 832; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; EMILIO FERRERO tpa, 31929; y LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa 23555; domiciliados en la Carrera 4 No. 72-35, Bogotá, Colombia, por la BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH, domiciliada en D-55216 Ingelheim am Rhein, RFA, a través de sus representantes los Srs. Dr. Dieter Laudien y Dr. Gerhard Huber:)

Legalización

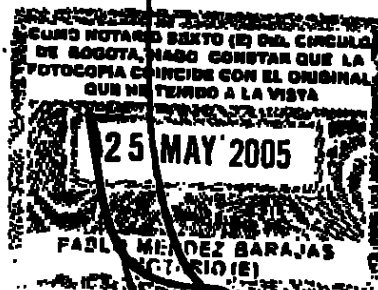
Protocolo notarial No. 2659/95 y

Certifico la autenticidad de las firmas antecedentes puestas ante mí por los señores:

1. Dr. Dieter Laudien, Dipl. Chim., domiciliado en 55127 Mainz,
2. Dr. Gerhard Huber, abogado, domiciliado en 55411 Bingen

a quienes conozco en persona.

1



Igualmente certifico, por haber examinado en la fecha el Registro de Comercio del Juzgado Municipal de Bingen, HR B 1063, que la firma Boehringer Ingelheim International GmbH, domiciliada en Ingelheim am Rhein, está inscrita bajo el No. HR B 1063 en el Registro de Comercio del Juzgado Municipal de Bingen y que los señores Dr. Laudien y Dr. Huber, en su calidad de apoderados, están facultados para representar conjuntamente a la sociedad.

Ingelheim am Rhein, 12 de diciembre de 1995/hün

Fdo.: firma ilegible

(Hilo y oblea roja en relieve:)

El notario suplente

El notario suplente - Ingelheim

del notario de Ingelheim

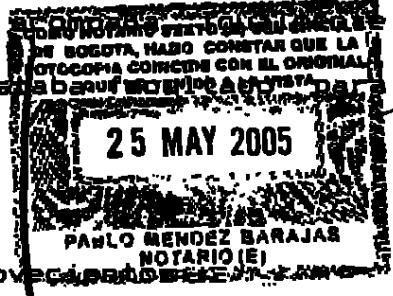
Prof. Dr. Weirich

(dos sellos redondos en tinta del Tribunal Regional de Mainz)

910 E 1

Se certifica la autenticidad de la firma antecedente del Dr. Peter Wirth, como notario suplente del Prof. Dr. Weirich, notario de Ingelheim, y la del sello oficial que la acompaña. Como notario suplente del Prof. Dr. Weirich, notario de Ingelheim, y la del sello oficial que la acompaña, se certifica que el mencionado notario está facultado para realizar ese acto oficial.

Mainz, trece de diciembre de mil novecientos
noventa y cinco



U2 AKP
RUBEN
Resolución No. 53, Pinar del Rio

El Presidente del Tribunal Regional

(E) Fdo.: firma ilegible

(Dr. Hanns Paul Tüttenberg)

Costas

Derechos de legalización
(Valor: DM 5.000,-)
JVKostO del 26 de julio 1957
Bacetas Oficial I Pag. 861
DM 20,--
Mainz, 13 de diciembre de 1995
Fdo.: firma ilegible
Inspector

EN ESPAÑOL: La legalización de las firmas anteriormente por el
Consulado de Colombia en Munich bajo el No. 129 de 19 de
diciembre de 1995, y por el Ministerio de Relaciones Exteriores
de Colombia bajo el No. 051606 del 4 de enero de 1996.
Pagados derechos y Fondo Rotatorio US\$ 106,--

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, de la cual se deja copia en los
archivos de estas oficinas para su confrontación.

Santafé de Bogotá, 6 de enero de 1996.



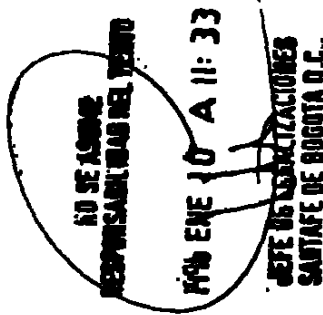
COMO NOTARIO SEXTO ENCARGADO DE SANTAFE
DE BOGOTA HAGO CONSTAR QUE LA FIRMA DE

Fey Arango
del Trator

C. G. _____
CONCIDE CON LA REGISTRADA POR EL (ELLA)
EN ESTA NOTARIA

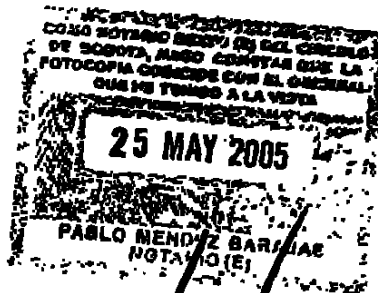
09 ENE 1996

SANTAFE DE BOGOTA D.C.



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

801911
[Signature]
CUYAFUNCIONARIO
RODRIGO LOPERA
LASERACION



TELEFAX (57) (1) 322-7850
TELEX: 45479 CAVE CO
(23) 740 7375 CAVE. UC

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 49, No. 72-35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

CORREO ELECTRONICO MUNDIAL CAVE
TELEFONO (57) (1) 2120100
CABLES: CAVELEYES

Señor Jefe de la
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

Poderdante: BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

Poder conferido el: 12-12-95.

Yo, GERMAN CAVELIER, obrando en mi calidad de apoderado principal del poderdante arriba mencionado atentamente manifiesto a Usted que sustituyo el poder que me ha sido conferido en la persona del doctor EMILIO FERRERO, Abogado con Tarjeta Profesional No. 31.929, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil ya que los otros sustitutos faltan en este momento.

Señor Jefe,



GERMAN CAVELIER

T.P.A. No. 832

C.C. No. 2.877.924 de Bogotá

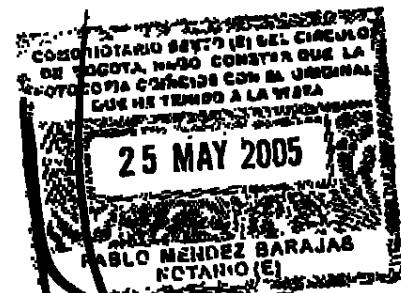
Acepto:



EMILIO FERRERO

T.P.A. No. 31.929

C.C. No. 438.019 de Usaquén



2e-780-2

NOTARIA SEXTA DE BOGOTA
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL

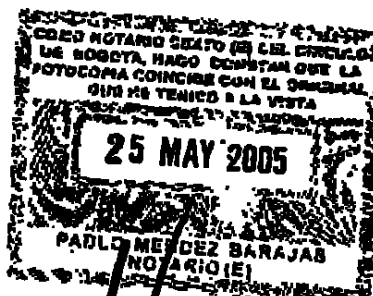
Bogotá, D. C. 11 ENE 1996
Ante M. PABLO MENDEZ BARAJAS S.
NOTARIO SEXTO ENCARGADO DEL CIRCULO DE BOGOTA
Compareció(eron) [Signature]

quien(es) exhibió(aron) la(s) 2877924
938014

y la(s) Libreta(s) Militar(es) [Signature]

domiciliado(s) en Bogotá y declaró(aron) que la(s) firma(s) que
aparecen(n) en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y
que el contenido del mismo es cierto.
En constancia se firma esta Diligencia.

[Signature]



[Signature]



MONTREAL

10

**CONSULADO GENERAL DE COLOMBIA
MONTREAL, CANADA**

AUTENTICACION No. 00438

El suscrito Cónsul General de Colombia

CERTIFICA:

Que MICHEL POULIN quien certifica el presente documento
ejercía legalmente en la fecha allí expresada el cargo
**SECRETARIO DE LA CAMARA DE NOTARIOS DE LA
PROVINCIA DE QUEBEC, CANADA**, jurisdicción de este
Consulado General, y que la firma y sello que en el documento
aparecen como suyos, son los que usa y acostumbra en sus
actos oficiales.

El Cónsul no asume ninguna responsabilidad por el
contenido del documento.

Montreal, 06 de Mayo de 2005

**Derechos Pagados: US\$24.00
Fondo Rotatorio : US\$15.00
Impuesto de Timbre : US\$9.00**



**EDUARDO CAMACHO BARCO
Cónsul General de Colombia
Montreal, Canadá**



MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 MAY 20 P 1 35

112761
Edwdo Carrascho
GUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

mas
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C

**CANADA
PROVINCE OF QUEBEC**

I, the undersigned, Michel Poulin, Secretary of the *Chambre des notaires du Québec*, a professional order duly constituted in virtue of the *Notarial Act* and the *Professional Code*, having its Head Office at Montreal, do hereby certify under my oath of office:



THAT Mtre Jean Yves Lacasse, Notary at Montreal, is a member of the *Ordre des notaires du Québec* since the 2nd day of July 1986, date of his entry on the Roll of the Order;

That since that date, Mtre Lacasse has always been entered on the Roll of the *Chambre des notaires du Québec*;

THAT his signature affixed to the attached document corresponds to that filed in my office in accordance with the *Notarial Act*.

IN WITNESS WHEREOF, I have signed the present certificate at Montreal, on this Friday, May 6, 2005.

Michel Poulin, Notary
Secretary



Membre de l'Union internationale du notariat latin

Tour de la Bourse, 800, Place-Victoria, bureau 700, case postale 182, Montréal (Québec) H4Z 1L8
Téléphone : (514) 879-1783 • Télécopieur : (514) 879-1923
admin@cdnq.org

73160

SULADO GENERAL

374

CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SISKI

CARRERA 4a N° 72-35

BOGOTÁ, D. C. COLOMBIA

CESION

ASSIGNMENT

Yo, (nosotros) abajo firmado (s)

1. Daniel LAMARRE
2. Lisette LAGACÉ

Domiciliado(s)

en

1. 2100 Cunard Street, Laval Québec H7S 2G5, Canadá
2. 2100 Cunard Street, Laval Québec H7S 2G5, Canadá

Declaro(amos) bajo juramento ser único(s) y verdadero(s) inventor(es) de la invención: **COMPOSICION PARA EL TRATAMIENTO DE LA INFECCION POR VIRUS FLAVIVIRIDAE**

declaro(amos) así mismo que cedo(amos) y transfiero(amos), sin limitación, a favor de la sociedad

Boehringer Ingelheim International GmbH

constituida y existente de conformidad con las leyes de

Alemania

domiciliada en **Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim, Alemania**

todos los derechos inherentes a dicha invención y que la citada Compañía queda facultada para solicitar en su nombre la patente de invención correspondiente en la República de Colombia.

I (we), the undersigned

1. Daniel LAMARRE
2. Lisette LAGACÉ

of

1. 2100 Cunard Street, Laval Québec H7S 2G5, Canada
2. 2100 Cunard Street, Laval Québec H7S 2G5, Canada

state(s) under oath to be sole and true inventor(s) of the invention: **"Composition for the Treatment of Infection by Flaviviridae Viruses"**

state as well, that assign, without reservations or limitations in favour of **Boehringer Ingelheim International GmbH**

a corporation constituted and existing in conformity with the laws of

Germany

domiciled in **Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim, Germany**

all rights inherent to said invention and that the above mentioned company hereby is enabled to apply, in its name, for the corresponding patent invention, in the Republic of Colombia

Dado y firmado hoy/Given and signed this

APR 29 2005

en/in

CAVALIER ABOGADOS

Firma/Signature

[Signature of Daniel Lamarre]

DANIEL LAMARRE
SWORN BEFORE ME
IN MONTREAL, QC, CANADA
ON THIS

MAY 0-5 2005

CAVELIER ABOGADOS
WPP00E01-374

[Signature of Jean-Yves Lacasse]
JEAN-YVES LACASSE
NOTAIRE

[Signature of Lisette Lagacé]

Lisette LAGACÉ

APR 29 2005

SWORN BEFORE ME BY LISELLE LAGACÉ
IN MONTREAL, QC, CANADA
ON THIS

APR 29 2005

[Signature of Jean-Yves Lacasse]
JEAN-YVES LACASSE
NOTAIRE



CERTIFICACIÓN NOTARIAL (INDIVIDUO)

A los _____ días del mes de _____
de 200 ____ Ante mí, Notario Público de _____

compareció(eron) personalmente _____

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s)
persona(s) firmante(s) del documento que precede, y quien(es)
tiene(n) capacidad legal para otorgarlo

NOTARIAL CERTIFICATION (INDIVIDUAL)

On this _____ day of _____
200 ____ before me, a Notary Public of _____

personally appeared _____

to me known, and known to me to be the person(s) who executed
that foregoing document, and who has(have) legal capacity to
execute it.

NOTARIO PÚBLICO-NOTARY PUBLIC

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country:
This public document
2. has been signed by
3. acting in the capacity of
4. bears the seal/stamp of

Certified

5. at 6. the
7. by
8. No.
9. Seal/stamp 10. Signature

.....

CAVELIER ABOGADOS

WPP00E01- 374

TRADUCCIÓN OFICIAL 114/2005 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS Y EN ESPAÑOL, REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA, TRADUCTOR OFICIAL APROBADO POR RESOLUCIÓN 541 DEL 27 DE FEBRERO DE 1976 POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEBIDAMENTE REGISTRADO ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE LA REPÚBLICA DE COLOMBIA Y MEDIANTE EL CUAL 1. Daniel LAMARRE y 2. Lisette LAGACÉ, DOMICILIADOS AMBOS EN 2100 CANARD STREET, LAVAL QUÉBEC H7S 2G5, CANADA, INVENTOR ÚNICOS Y VERDADEROS DE LA INVENCION: COMPOSICIÓN PARA EL TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR VIRUS FLAVIVIRIDAE, DECLARAN POR EL PRESENTE QUE CEDEN DICHA INVENCION A BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GmbH EMPRESA ORGANIZADA Y EXISTENTE DE CONFORMIDAD CON LAS LEYES DE ALEMANIA, DOMICILIADA EN BINGER STRASSE 173, 55216 INGELHEIM, ALEMANIA, JUNTO CON TODOS LOS DERECHOS INHERENTES Y QUE DICHA COMPAÑÍA QUEDA FACULTADA PARA SOLICITAR EN SU NOMBRE LA PATENTE CORRESPONDIENTE EN LA REPÚBLICA DE COLOMBIA.

DADO Y FIRMADO HOY 29 DE ABRIL DE 2005

FIRMA ILEGIBLE. NOMBRE DANIEL LAMARRE, 5 DE MAYO DE 2005

FIRMA ILEGIBLE. NOMBRE LISETTE LAGACÉ, 29 DE ABRIL DE 2005

SELLO: JURAMENTADO ANTE MI POR LISETTE LAGACÉ, EN MONTREAL, QC, CANADA EL 29 DE ABRIL DE 2005

SELLO: JURAMENTADO ANTE MI POR DANIEL LAMARRE, EN MONTREAL, QC, CANADA HOY 5 DE MAYO DE 2005

CANADA, PROVINCIA DE QUEBEC

Y , el abajo firmante, Michel Poulin, secretario de la cámara de notarios de Quebec, una orden profesional debidamente constituida en virtud de la ley notarial y el código profesional, con sede principal en Montreal, certifico después de haberme juramentado oficialmente que JEAN YVES LACASSE, notario de Montreal, es miembro de la orden de notarios de Québec desde el 2 de julio de 1986, fecha de ingreso a la lista de la orden;

Que desde esa fecha, el señor Lacasse siempre ha sido incorporado a la lista de la cámara de notarios de Quebec

Que su firma que aparece en el documento adjunto corresponde a la depositada en mi oficina de acuerdo con la ley notarial

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, he firmado este certificado en Montreal hoy viernes 6 de mayo de 2005.

Firmado: Michel Poulin, notario, secretario

Sello fijado por el Consulado General de Colombia en Montreal, Canada, autenticación 00436 del 6 de mayo de 2005 de la firma de Michel Poulin, secretario de la cámara de notarios de la provincia de Quebec, Canada. Firmado: Eduardo Camacho Barco, cónsul general de Colombia, Montreal, Canada.

Sello fijado por el Ministerio de Relaciones Exteriores, diligencia 112761 del 20 de mayo de 2005 para autenticar la firma de Eduardo Camacho. Firmado: ilegible. Jefe de legalizaciones, Santafé de Bogotá, D.C.

COLO-9255-841-016-0

WPCL002G ID 6748

Bogotá, 24 de mayo de 2005


Eduardo Calado Riquelme
"TRADUCTOR OFICIAL"
C.R. - 1970
Aos 31 de Febrero de 1970

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTA
BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRMA(S)
Pablo J. Barrios
COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR
EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA
SANTAFE DE BOGOTA, 24 MAY 2005



UP DE ASUME
COMUNICACION DEL TEXTO
2005 MAY 24 12:51
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

319108
Eduardo Celado
LA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ **Publicación Internacional WO 2004/039833 A1**

Descripción:

Páginas 1-39 en el idioma original

Páginas 1-43 en español

Reivindicaciones: Número (s) 1-15

Figuras: Número (s) 1-7

Listado de secuencias: 1 - 4

2. ☒ **Forma PCT/RO/101. PCT Request**
3. ☐ **Forma PCT/RO/106. Invitation to Correct Defects.**
4. ☒ **Forma PCT/ISA/210. Informe de Búsqueda Internacional.**
5. ☐ **Forma PCT/ISA/220. Notificación De La Transmisión Del Informe De Búsqueda Internacional Y De La Opinión Escrita De La Administración Encargada De La Búsqueda Internacional, O De La Declaración.**
6. ☐ **Forma PCT/ISA/237. Opinión Escrita De La Administración Encargada De La Búsqueda Internacional.**
7. ☒ **Forma PCT/IB/304. Notification Concerning Submission Or Transmittal Of Priority Document.**
8. ☐ **Forma PCT/IB/306. Notification Of The Recoding Of A Change.**
Descripción De Modificación:

9. ☒ **Forma PCT/IB/308. Notice Informing The Applicant Of The Communication Of The International Application To The Designated Offices.**
10. ☒ **Forma PCT/IB/332. Information Concerning Elected Offices Notified Of Their Election.**
11. ☒ **Forma PCT/IPEA/401. PCT Demand**
12. ☐ **Forma PCT/IPEA/402. Notification Of Receipt Of Demand By Competent International Preliminary Examining Authority.**
13. ☐ **Forma PCT/IPEA/408. Written Opinion.**
14. ☐ **Forma PCT/IPEA/416. Notification Of Transmittal Of The International Preliminary Examination Report.**
15. ☒ **Forma PCT/IPEA/409. Informe Del Examen Preliminar Internacional.**
16. ☒ **Traducción Al Español Del Informe Del Examen Preliminar Internacional.**
17. ☐ **Traducción Al Español De Los Anexos Presentados Junto Con El Informe Del Examen Preliminar Internacional.**

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
13 May 2004 (13.05.2004)

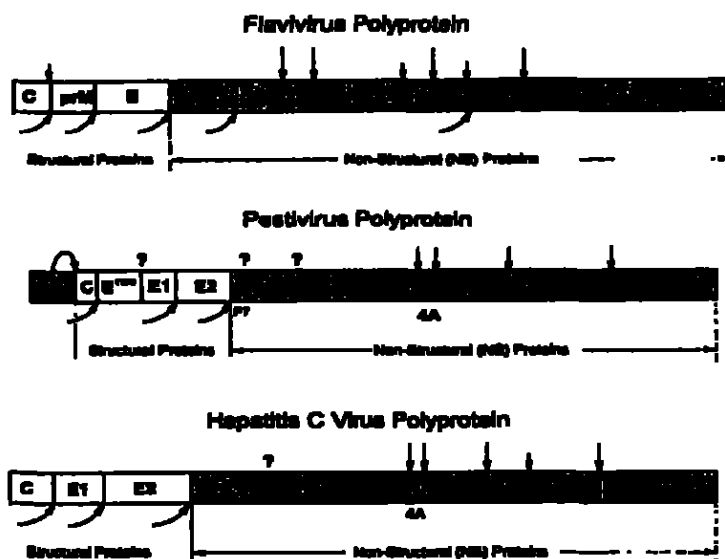
PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/039833 A1

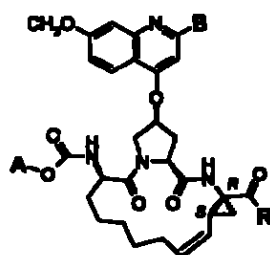
- (51) International Patent Classification⁷: C07K 5/08, A61K 38/05, 38/06, A61P 31/14
- (21) International Application Number: PCT/CA2003/001634
- (22) International Filing Date: 24 October 2003 (24.10.2003)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60421,900 29 October 2002 (29.10.2002) US
60442,769 27 January 2003 (27.01.2003) US
- (71) Applicant (for all designated States except US):
BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL
GMBH [DE/DE]; Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim
(DE).
- (72) Inventors; and
(73) Inventors/Applicants (for US only): LAMARRE, Daniel
[CA/CA]; 2100 Cunard Street, Laval, Québec H7S 2G5
(CA). LAGACÉ, Lisette [CA/CA]; 2100 Cunard Street,
Laval, Québec H7S 2G5 (CA).
- (74) Agent: BERNIER, Louise, G.; Boehringer Ingelheim
(Canada) Ltd., 2100 Cunard Street, Laval, Québec H7S
2G5 (CA).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GH,
GI, GM, GR, GU, HK, HN, ID, IL, IN, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MY, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KH, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),

[Continued on next page]

(54) Title: COMPOSITION FOR THE TREATMENT OF INFECTION BY FLAVIVIRIDAE VIRUSES



(57) Abstract: Compositions, use, article of manufacture and method for the treatment of a mammal infected with a virus of the *Flaviviridae* family are provided comprising administration to the infected mammal of a compound having Formula (I), wherein A is selected from: C₁ to C₆ alkyl and C₃ to C₆ cycloalkyl; and B is selected from: phenyl or thiazolyl, both of which optionally substituted with a group selected from NH(R¹) and NH(CO)R¹, wherein R¹ is C₁ to C₆ alkyl; R is OH or a sulfonamide derivative; or a pharmaceutically acceptable salt thereof.



(I)



18

Burasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO,
SE, SI, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, 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.

19

COMPOSITION FOR THE TREATMENT OF INFECTION BY *FLAVIVIRIDAE* VIRUSES

FIELD OF THE INVENTION

- 5 The present invention relates to compounds, compositions, use and method for the treatment of a *Flaviviridae* viral infection in a mammal. More particularly, the present invention relates to the use and a method of treatment comprising administration of a compound selected from a macrocyclic peptide family of compounds.

10 BACKGROUND OF THE INVENTION

- The *Flaviviridae* family of viruses are enveloped positive-stranded RNA viruses comprising a number of human pathogenic viruses such as viruses of the hepacivirus genus, including Hepatitis C, viruses of the flavivirus genus, including the Dengue Fever viruses, encephalitis viruses, West Nile viruses and Yellow Fever
15 viruses, and viruses of the pestivirus genus, including the bovine viral diarrhea virus and border disease virus, both of which are animal pathogens. The most newly discovered viruses, hepatitis G virus (HGV) and hepatitis GB virus (GBV-A, B, C), are also provisionally considered to be members of the *Flaviviridae* family belonging to a distinct genus.

20

- Dengue viruses, members of the family of *Flaviviridae* are transmitted by mosquitos. There are four serotypes that cause widespread human diseases, one of which causes dengue hemorrhagic fever, and about 40% of the population living in tropical and subtropical regions of the world is at risk for infection. Of the 1 million cases of
25 hemorrhagic fever cases per year, about 5% are fatal. There is currently no effective vaccine or antiviral drug to protect against dengue diseases.

- Pestiviruses such as bovine diarrhea virus (BVDV), classical swine fever virus (CSFV) and border disease virus (BDV) comprise a group of economically important
30 animal pathogens affecting cattle, pigs and sheep. These positive-sense RNA viruses are classified as a separate genus in the family *Flaviviridae*.

- GB-viruses have been classified as members of the *Flaviviridae* family, but have not yet been assigned to a particular genus based on the analysis of genomic
35 sequences. These RNA viruses, in addition to infecting humans, can cause acute

19
20

resolving hepatitis in experimentally infected tamarins.

Viruses within the *Flaviviridae* family possess a number of similarities despite a relatively low overall sequence homology among its members. The genome of these viruses is a small single-stranded RNA (~ 10 kilobases in length) having a single open reading frame (ORF). The ORF encodes a polyprotein of about 3000 amino acids that contains structural proteins at its 5' end and non-structural (NS) proteins at its 3' end. The polyprotein is proteolytically processed by both viral and host-encoded proteases into mature polypeptides, which for HCV, are as follows: NH₂-(C-E1-E2-P7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B)-COOH. The core protein or nucleocapsid (C) and the two envelope glycoproteins (E1 and E2) represent the constitutive structural proteins of the virions. These structural proteins are followed by the nonstructural (NS) proteins, which at least some are thought to be essential for viral RNA replication.

Enzymatic activities have been ascribed to several of these NS proteins. In particular, the NS3 protein contains sequences with similarity to the serine protease and the nucleoside triphosphate-binding helicase of pestiviruses and flaviviruses. Analysis of sequence alignments had predicted the existence of a trypsin-like serine protease domain within the N-terminal region of flav-, pest-, hepac- and GB-viruses. Sequence similarities between NS3 proteolytic domains of *Flaviviridae* viruses are well-established (Ryan MD *et al.* 1998). The HCV NS3 protease domain shares a sequence similarity of about 77-90% among HCV genotypes and a sequence similarity of about 25-50% with other members of the *Flaviviridae* family. With respect to the three dimensional structure, the available atomic co-ordinates of the various crystallized HCV and Dengue NS3 proteases show an overall architecture that is characteristic of the trypsin-like fold (Kim *et al.* 1996, Love *et al.* 1996; Murthy *et al.* 1999). Many studies have now firmly established that the N-terminal portion of the NS3 region encodes a serine protease that has a very specific and pivotal role in viral polyprotein processing within *Flaviviridae*. In hepacivirus, pestivirus and GB viruses, polyprotein processing shows a requirement for the downstream NS4A protein. The NS4A protein acts as a cofactor that enhances the NS3 protease cleavage efficiency (Lin *et al.*, 1995; Kim *et al.*, 1996; Steinkuler *et al.*, 1996). In flavivirus, this requirement for enhancing the NS3 protease activity is provided by the upstream NS2B protein. The genomic organization and structure of

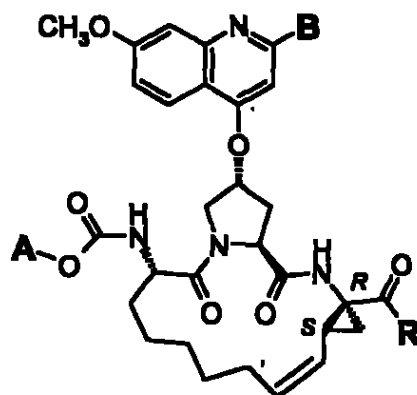
20
21

GBV-B and HCV are similar despite the fact that the sequence homology between the polyprotein sequences of GBV-B and HCV is about 25 to 30%.

Given apparent similarities of viruses within the *Flaviviridae* family of viruses, it would be desirable to develop therapeutic agents effective against *Flaviviridae* viruses, and more particularly, effective against the pathogenic members of the *Flaviviridae* family.

SUMMARY OF THE INVENTION

Accordingly, in a first aspect of the present invention, there is provided an anti-*Flaviviridae* virus composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier in combination with a compound of Formula (I):



Formula (I)

15

wherein,

A is selected from: C₁ to C₈ alkyl and C₃ to C₈ cycloalkyl; and B is selected from: phenyl or thiazolyl, both of which optionally substituted with a group selected from NH(R¹) and NH(CO)R¹, wherein R¹ is C₁ to C₈ alkyl; R is OH or a sulfonamide

20

derivative, or
a pharmaceutically acceptable salt thereof.

In a second aspect, the present invention provides a method for treating a mammal infected with a virus of the *Flaviviridae* family comprising administering to the infected mammal a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier in combination with a therapeutically effective amount of a compound of Formula (I) as defined above.

25

A
22

In a third aspect, the present invention provides a method of treating a mammal infected with a virus of the *Flaviviridae* family wherein a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier in combination with a
5 therapeutically effective amount of a compound of Formula (I) as defined above is co-administered with at least one additional agent selected from: an antiviral agent, an immunomodulatory agent, an HCV inhibitor, an HIV inhibitor, an HAV inhibitor and an HBV inhibitor, to the infected mammal.

10 In a fourth aspect, the present invention provides a pharmaceutical composition for treating or preventing an infection of a mammal caused by a virus of the *Flaviviridae* family comprising a pharmaceutically acceptable carrier in combination with a therapeutically effective amount of a compound of Formula (I) and at least one additional agent selected from: an antiviral agent, an immunomodulatory agent, an
15 HCV inhibitor, an HIV inhibitor, an HAV inhibitor and an HBV inhibitor.

In a fifth aspect of the present invention, there is provided the use of a compound of Formula (I) as defined above, for the manufacture of a medicament for the treatment of *Flaviviridae* viral infection.

20 In a sixth aspect of the present invention, there is provided an article of manufacture comprising packaging material contained within which is a composition effective to inhibit a virus of the *Flaviviridae* family and the packaging material comprises a label which indicates that the composition can be used to treat infection by a virus of the
25 *Flaviviridae* family and, wherein said composition comprises a compound of Formula (I) as defined above.

While not wishing to be bound to any particular mode of action, the macrocyclic peptide family of compounds generally represented by Formula (I) as set out above
30 are believed to interact at a conserved substrate binding site in the NS3 protease domain. Crystal structure studies confirm that the present macrocyclic compounds interact at the substrate-binding site within the HCV NS3 domain, a region that is functionally conserved among *Flaviviridae* viruses.

35 Other objects, advantages and features of the present invention will become more

28
23

apparent upon reading the following non-restrictive description of the preferred embodiments with reference to the accompanying drawings and tables in which:

BRIEF DESCRIPTION OF TABLES

- 5 Tables 4-8 provide a sequence similarity comparison between members of the *Flaviviridae* family.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

- Figure 1 provides a comparison of polyproteins of viruses belonging to the
10 *Flaviviridae* family (taken from: Ryan *et al.*, 1998, J. Gen. Virology 79, 947-959);
Figure 2 is a sequence comparison of the NS3 protease domain between HCV
genotypes and subtypes;
Figures 3A-B are the IC₅₀ curves of a macrocyclic peptide compound according to
Formula (I) against HCV genotype 1a and 1b NS3-NS4A proteases, respectively;
15 Figures 4A-B are the Dixon and Cornish-Bowden plots of the macrocyclic peptide of
Figure 3 against the HCV genotype 1a NS3-NS4A proteases;
Figures 5A-B are the Dixon and Cornish-Bowden plots of the macrocyclic peptide of
Figure 3 against the HCV genotype 1b NS3-NS4A proteases;
Figure 6 illustrates the inhibition of GBV-B replication by macrocyclic peptides
20 according to Formula (I) in tamarin hepatocytes in culture;
Figure 7 graphically illustrates dose-dependent inhibition of GBV-B replication by the
macrocyclic peptide III of Figure 6; and
Figure 8 illustrates the 3-dimensional crystal structure of the HCV NS3-NS4A
peptide structure complexed with a macrocyclic peptide according to Formula (I).

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Definitions

- Unless defined otherwise, the scientific and technological terms and nomenclature
used herein have the same meaning as commonly understood by a person of
30 ordinary skill in the art to which this invention pertains. Generally, the procedures for
cell culture, infection, molecular biology methods and the like are common methods
used in the art. Such standard techniques can be found in reference manuals such
as for example Sambrook *et al.* (1989) and Ausubel *et al.* (1994).

- 35 The term "*Flaviviridae*" as it is used herein to designate a viral family is meant to

25
24

encompass viruses of the hepacivirus genus, such as Hepatitis C, viruses of the flavivirus genus, such as the Dengue Fever viruses, Encephalitis viruses, West Nile viruses and Yellow Fever viruses, and viruses of the pestivirus genus, such as the bovine viral diarrhea virus and border disease virus. Hepatitis G virus (HGV) and
5 Hepatitis GB virus are also included in this viral family although the genus of these viruses has not yet been determined. Moreover, all subtypes and genotypes of the above-mentioned viruses are also encompassed within the *Flaviviridae* family, including for example, HCV 1a, HCV1b, HCV 2a-c, HCV 3a-b, HCV 4a, HCV 5 and HCV 8a,h,d & k, as well as GBV-A, B & C.

10

The term "mammal" as it is used herein is meant to encompass humans, as well as non-human mammals which are susceptible to infection by a *Flaviviridae* virus including domestic animals, such as cows, pigs, horses, dogs and cats, and sheep.

15 With respect to the compounds of Formula (I) administered in the treatment of *Flaviviridae* infection, the term "C₁₋₆ alkyl" or "C₁-C₆" as used herein, either alone or in combination with another substituent, means acyclic, straight or branched chain alkyl substituents containing from one to six carbon atoms and includes, for example, methyl, ethyl, propyl, isopropyl, butyl, *tert*-butyl, hexyl, 1-methylethyl, 1-methylpropyl,
20 2-methylpropyl, 1,1-dimethylethyl.

The term "C₃₋₆ cycloalkyl" as used herein, either alone or in combination with another substituent, means a cycloalkyl substituent containing from three to six carbon atoms and includes cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, and cyclohexyl.

25

The term "pharmaceutically acceptable salt" means a salt of a compound of formula (I) which is, within the scope of sound medical judgment, suitable for use in contact with the tissues of humans and lower animals without undue toxicity, irritation, allergic response, and the like, commensurate with a reasonable benefit/risk ratio,
30 generally water or oil-soluble or dispersible, and effective for their intended use. The term includes pharmaceutically-acceptable acid addition salts and pharmaceutically-acceptable base addition salts. Lists of suitable salts are found in, e.g., S.M. Birge *et al.* J. Pharm. Sci., 1977, 66, pp. 1-19.

35 The term "pharmaceutically-acceptable acid addition salt" means those salts which

39
25

retain the biological effectiveness and properties of the free bases and which are not biologically or otherwise undesirable, formed with inorganic acids such as hydrochloric acid, hydrobromic acid, hydroiodic acid, sulfuric acid, sulfamic acid, nitric acid, phosphoric acid, and the like, and organic acids such as acetic acid, trichloroacetic acid, trifluoroacetic acid, adipic acid, alginic acid, ascorbic acid, aspartic acid, benzenesulfonic acid, benzoic acid, 2-acetoxybenzoic acid, butyric acid, camphoric acid, camphorsulfonic acid, cinnamic acid, citric acid, digluconic acid, ethanesulfonic acid, glutamic acid, glycolic acid, glycerophosphoric acid, hemisulfic acid, heptanoic acid, hexanoic acid, formic acid, fumaric acid, 2-hydroxyethanesulfonic acid (sethionic acid), lactic acid, maleic acid, hydroxymaleic acid, malic acid, malonic acid, mandelic acid, mesitylenesulfonic acid, methanesulfonic acid, naphthalenesulfonic acid, nicotinic acid, 2-naphthalenesulfonic acid, oxalic acid, pantoic acid, pectinic acid, phenylacetic acid, 3-phenylpropionic acid, picric acid, pivalic acid, propionic acid, pyruvic acid, pyruvic acid, salicylic acid, stearic acid, succinic acid, sulfanilic acid, tartaric acid, p-toluenesulfonic acid, undecanoic acid, and the like.

The term "pharmaceutically-acceptable base addition salt" means those salts which retain the biological effectiveness and properties of the free acids and which are not biologically or otherwise undesirable, formed with inorganic bases such as ammonia or hydroxide, carbonate, or bicarbonate of ammonium or a metal cation such as sodium, potassium, lithium, calcium, magnesium, iron, zinc, copper, manganese, aluminum, and the like. Particularly preferred are the ammonium, potassium, sodium, calcium, and magnesium salts. Salts derived from pharmaceutically-acceptable organic nontoxic bases include salts of primary, secondary, and tertiary amines, quaternary amine compounds, substituted amines including naturally occurring substituted amines, cyclic amines and basic ion-exchange resins, such as methylamine, dimethylamine, trimethylamine, ethylamine, diethylamine, triethylamine, isopropylamine, tripropylamine, tributylamine, ethanolamine, diethanolamine, 2-dimethylaminoethanol, 2-diethylaminoethanol, dicyclohexylamine, lysine, arginine, histidine, caffeine, hydrabamine, choline, betaine, ethylenediamine, glucosamine, methylglucamine, theobromine, purines, piperazine, piperidine, N-ethylpiperidine, tetramethylammonium compounds, tetraethylammonium compounds, pyridine, N,N-dimethylaniline, N-methylpiperidine, N-methylmorpholine, dicyclohexylamine, dibenzylamine, N,N-dibenzylphenethylamine, 1-phenamine, .

25
26

N,N'-dibenzylethylenediamine, polyamine resins, and the like. Particularly preferred organic nontoxic bases are isopropylamine, diethylamine, ethanolamine, trimethylamine, dicyclohexylamine, choline, and caffeine.

- 5 The term "sulfonamide derivative" as used herein means a sulfonamide group of the formula $\text{-NHSO}_2\text{-R}^2$ wherein R^2 is $\text{-(C}_{1-6}\text{)alkyl}$, $\text{-(C}_{2-7}\text{)cycloalkyl}$ or $\{\text{-(C}_{1-6}\text{)alkyl-(C}_{2-6}\text{)cycloalkyl}\}$, which are all optionally substituted from 1 to 3 times with halo, cyano, nitro, $\text{O-(C}_{1-6}\text{)alkyl}$, amido, amino or phenyl, or R^2 is C_6 or C_{10} aryl which is optionally substituted from 1 to 3 times with halo, cyano, nitro, $\text{(C}_{1-6}\text{)alkyl}$, $\text{O-(C}_{1-6}\text{)alkyl}$, amido, amino or phenyl.
- 10

- The term "antiviral agent" as used herein means an agent (compound or biological) that is effective to inhibit the formation and/or replication of a virus in a mammal. This includes agents that interfere with either host or viral mechanisms necessary for the formation and/or replication of a virus in a mammal. Antiviral agents include, for example, ribavirin, amantadine, VX-497 (merimepodib, Vertex Pharmaceuticals), VX-498 (Vertex Pharmaceuticals), Levovirin, Viramidine, Cephene (maxamine), XTL-001 and XTL-002 (XTL Biopharmaceuticals).
- 15

- 20 The term "immunomodulatory agent" as used herein means those agents (compounds or biologicals) that are effective to enhance or potentiate the immune system response in a mammal. Immunomodulatory agents include, for example, class I interferons (such as α -, β - and omega interferons, tau-interferons, consensus interferons and asialo-interferons), class II interferons (such as γ -interferons) and pegylated interferons.
- 25

- The term "inhibitor of HCV NS3 protease" as used herein means an agent (compound or biological) that is effective to inhibit the function of HCV NS3 protease in a mammal. Inhibitors of HCV NS3 protease include, for example, those compounds described in WO 99/07733, WO 99/07734, WO 00/09558, WO 00/09543 or WO 00/59929, WO 03/064416; WO 03/064455; WO 03/064456 and the Vertex pre-development candidate identified as VX-950.
- 30

- The term "HCV inhibitor" as used herein means an agent (compound or biological) that is effective to inhibit the formation and/or replication of HCV in a mammal. This
- 35

Includes agents that interfere with either host or HCV viral mechanisms necessary for the formation and/or replication of HCV in a mammal. Inhibitors of HCV include, for example, agents that inhibit a target selected from: NS3 protease, NS3 helicase, HCV polymerase, NS2/3 protease or IRES. Specific examples of inhibitors of HCV
5 include ISIS-14803 (ISIS Pharmaceuticals).

The term "inhibitor of HCV polymerase" as used herein means an agent (compound or biological) that is effective to inhibit the function of an HCV polymerase in a mammal. This includes, for example, inhibitors of HCV NS5B polymerase. Inhibitors
10 of HCV polymerase include non-nucleosides, for example, those compounds described in:

- WO 03/010140 (Boehringer Ingelheim),
- WO 03/010141 (Boehringer Ingelheim),
- WO 03/007945 (Boehringer Ingelheim),
- 15 • WO 02/100846 A1 and WO 02/100851 A2 (both Shire),
- WO 01/85172 A1 and WO 02/098424 A1 (both GSK),
- WO 00/06529 and WO 02/06246 A1 (both Merck),
- WO 01/47883 and WO 03/000254 (both Japan Tobacco) and
- EP 1 256 628 A2 (Agouron).

20 Furthermore other inhibitors of HCV polymerase also include nucleoside analogs, for example, those compounds described in:

- WO 01/90121 A2 (Idenix),
- WO 02/069903 A2 (Bicocyst Pharmaceuticals Inc.), and
- WO 02/057287 A2 and WO 02/057425 A2 (both Merck/Isis).

25 Specific examples of inhibitors of an HCV polymerase, include JTK-002/003, JTK-109 (Japan Tobacco), and NM283 (Idenix).

The term "HIV inhibitor" as used herein means an agent (compound or biological) that is effective to inhibit the formation and/or replication of HIV in a mammal. This
30 includes agents that interfere with either host or viral mechanisms necessary for the formation and/or replication of HIV in a mammal. HIV inhibitors include, for example, nucleosidic inhibitors, non-nucleosidic inhibitors, protease inhibitors, fusion inhibitors and integrase inhibitors.

The term "HAV inhibitor" as used herein means an agent (compound or biological) that is effective to inhibit the formation and/or replication of HAV in a mammal. This includes agents that interfere with either host or viral mechanisms necessary for the formation and/or replication of HAV in a mammal. HAV inhibitors include Hepatitis A vaccines, for example, Havrix[®] (GlaxoSmithKline), VAQTA[®] (Merck) and Avaxim[®] (Aventis Pasteur).

The term "HBV inhibitor" as used herein means an agent (compound or biological) that is effective to inhibit the formation and/or replication of HBV in a mammal. This includes agents that interfere with either host or viral mechanisms necessary for the formation and/or replication of HBV in a mammal. HBV inhibitors include, for example, agents that inhibit HBV viral DNA polymerase or HBV vaccines. Specific examples of HBV inhibitors include Lamivudine (EpiVir-HBV[®]), Adefovir Dipivoxil, Entecavir, FTC (Coviracil[®]), DAPD (DXG), L-FMAU (Clevudine[®]), AM365 (Amrad), Ldt (Telbivudine), monoval-LdC (Valtorditabine), ACH-126,443 (L-Fd4C) (Achillion), MCC478 (Eli Lilly), Radvir (RCV), Fluoro-L and D nucleosides, Robustaflavone, ICN 2001-3 (ICN), Bam 205 (Novelos), XTL-001 (XTL), Imino-Sugars (Nonyl-DNJ) (Synergy), HepBzyme; and immunomodulator products such as: interferon alpha 2b, HE2000 (Hollis-Eden), Theradigm (EpiImmune), EHT899 (Enzo Biochem), Thymosin alpha-1 (Zadaxin[®]), HBV DNA vaccine (PowderJect), HBV DNA vaccine (Jefferson Center), HBV antigen (OraGen), BayHep B[®] (Bayer), Nabi-HB[®] (Nabi) and Anti-hepatitis B (Cangene); and HBV vaccine products such as the following: Engerix B, Recombivax HB, GenHevac B, Hepacare, Bio-Hep B, TwinRix, Comvax, Hexavac.

The term "class I Interferon" as used herein means an Interferon selected from a group of Interferons that all bind to receptor type I. This includes both naturally and synthetically produced class I Interferons. Examples of class I Interferons include α -, β -, δ -, omega Interferons, tau-Interferons, consensus Interferons, asialo-Interferons.

The term "class II Interferon" as used herein means an Interferon selected from a group of Interferons that all bind to receptor type II. Examples of class II Interferons include γ -Interferons.

Moreover, the term "therapeutically effective amount" as it is used herein with



respect to compounds of Formula I means an amount of the compound which is effective to treat a *Flaviviridae* viral infection, i.e. to inhibit or at least reduce viral replication, while not being an amount that is toxic to a mammal being treated or an amount that may otherwise cause significant adverse effects in a mammal.

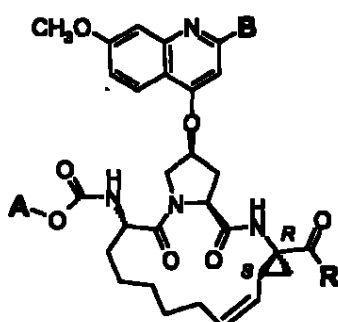
5

The term "carrier" is used to refer to compounds or mixtures of compounds for combination with the present therapeutic compounds which facilitate the administration thereof and/or enhance the function of the therapeutic compounds to inhibit a virus of the *Flaviviridae* family including, for example, diluents, excipients, adjuvants and
10 vehicles. Stabilizers, colorants, flavorants, anti-microbial agents, and the like may also be combined with the therapeutic compound. Moreover, in some cases, the pH of the formulation may be adjusted with pharmaceutically acceptable acids, bases or buffers to enhance the stability of the formulated compound or its delivery form. Other suitable additives include those with which one of skill in the art would be familiar
15 that function to improve the characteristics of the present combination while not adversely affecting its function. Reference may be made to "Remington's Pharmaceutical Sciences", 17th Ed., Mack Publishing Company, Easton, Penn., 1985, for carriers that would be suitable for admixture with the present therapeutic compounds. The term "pharmaceutically acceptable" as it is used herein with respect
20 to a carrier compound is meant to indicate that the carrier is suitable for administration to a mammal, i.e. is non-toxic and does not cause any adverse effect when used in amounts appropriate to function as a carrier.

Preferred Embodiments

25 Anti-Flaviviridae virus composition

In a first embodiment of the present invention, there is provided a composition effective to treat a mammal infected with a virus of the *Flaviviridae* family. The composition comprises a pharmaceutically acceptable carrier in combination with a compound of Formula (I):

29
30

Formula (I)

wherein,

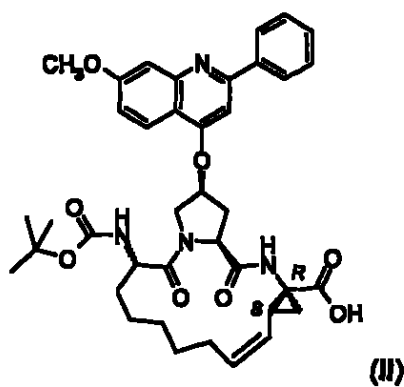
- A is selected from: C₁ to C₆ alkyl and C₃ to C₆ cycloalkyl; and B is selected from: phenyl or thiazolyl, both of which optionally substituted with a group selected from
- 5 NH(R¹) and NH(CO)R¹, wherein R¹ is C₁ to C₆ alkyl; R is OH or a sulfonamide derivative, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

- In one embodiment, A of Formula (I) is a branched C₄ to C₆ alkyl or C₄ to C₆
- 10 cycloalkyl group. In a preferred embodiment, A is cyclopentyl or *tert*-butyl.

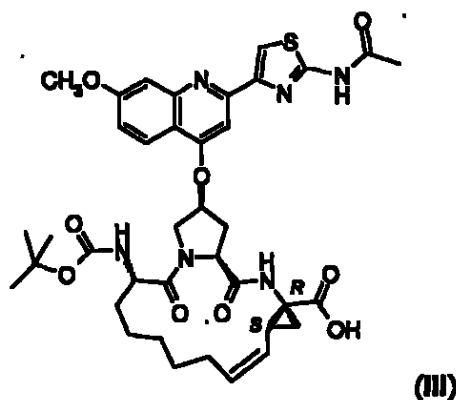
- In another embodiment, B of Formula (I) is phenyl or a thiazole substituted at position 2 with NH(R¹) or NH(CO) R¹ in which R¹ is a C₁ to C₄ alkyl. In a preferred embodiment, B is a thiazole substituted at position 2 with NH(R¹) or NH(CO) R¹ in
- 15 which R¹ is a C₁ to C₄ alkyl. More preferably, B is 4-thiazole substituted at position 2 with NH(CO)CH₃ or with NHCH(CH₃)₂.

- In a further preferred embodiment, R of formula (I) is OH or a sulfonamide group of formula -NHSO₂-R² wherein R² is -(C₁₋₆)alkyl, -(C₂₋₆)cycloalkyl, both optionally
- 20 substituted 1 or 2 times with halo or phenyl, or R² is C₆ aryl optionally substituted from 1 or 2 times with halo or (C₁₋₆)alkyl. More preferably, R is OH or a sulfonamide group wherein R² is methyl, cyclopropyl or phenyl.

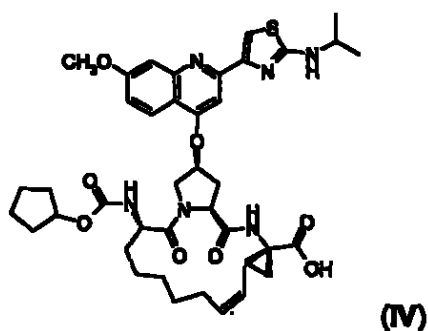
- In a more preferred embodiment, the present invention is conducted with a
- 25 compound of Formula (I) in which A is *tert*-butyl and B is phenyl as set out below in the formula of compound (II):



In another more preferred embodiment, the present invention is conducted with a compound of Formula (I) in which A is *tert*-butyl and B is 4-thiazole substituted at its
 5 2 position with $\text{NH}(\text{CO})\text{CH}_3$ as set out below in the formula for compound (III):



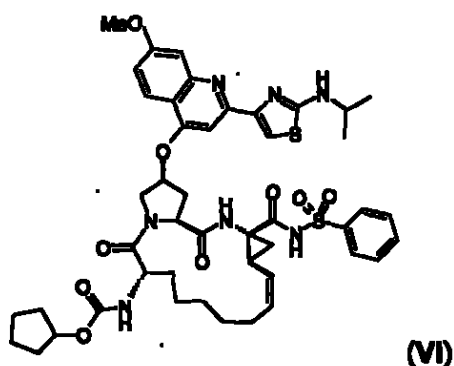
In a most preferred embodiment, the present invention is conducted with a compound of Formula (I) in which A is cyclopentyl and B is 4-thiazole substituted at its
 10 its 2 position with $\text{NHCH}(\text{CH}_3)_2$ as set out below in the formula for compound (IV):



In a most preferred embodiment, the present invention is conducted with a compound of Formula (I) in which A is cyclopentyl, B is 4-thiazole substituted at its 2

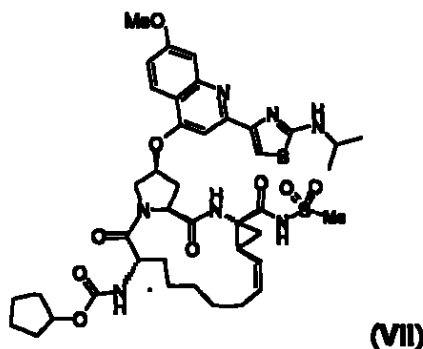
3/32

position with $\text{NHCH}(\text{CH}_3)_2$, and R is a sulfonamide group wherein R^2 is phenyl as set out below in the formula for compound (VI):



(VI)

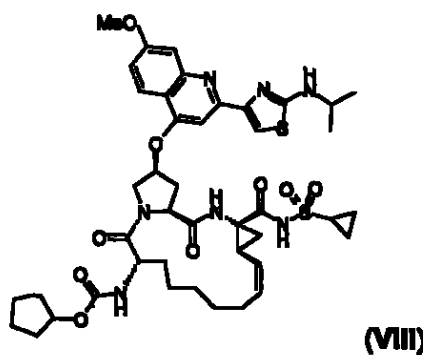
- 5 In a most preferred embodiment, the present invention is conducted with a compound of Formula (I) in which A is cyclopentyl, B is 4-thiazole substituted at its 2 position with $\text{NHCH}(\text{CH}_3)_2$, and R is a sulfonamide group wherein R^2 is methyl as set out below in the formula for compound (VII):



(VII)

10

- In a most preferred embodiment, the present invention is conducted with a compound of Formula (I) in which A is cyclopentyl, B is 4-thiazole substituted at its 2 position with $\text{NHCH}(\text{CH}_3)_2$, and R is a sulfonamide group wherein R^2 is cyclopropyl as set out below in the formula for compound (VIII):



(VIII)

15

33

Method of Treatment

In a second aspect of the present invention, a method for treating a mammal infected with a virus of the *Flaviviridae* family is provided comprising administering to
5 an infected mammal a pharmaceutical composition comprising a pharmaceutically acceptable carrier in combination with a therapeutically effective amount of a compound having Formula (I), (II), (III), (IV), (VI), (VII) or (VIII) as defined above.

In accordance with the method of the present invention, a therapeutically effective
10 amount of a compound of Formula (I), (II), (III), (IV), (VI), (VII) or (VIII) is administered to a mammal infected with a *Flaviviridae* virus. To be therapeutically effective, a dosage of between about 0.01 and about 100mg/kg body weight per day, preferably between about 0.1 and about 50mg/kg body weight per day of the compound is administered to the infected mammal. Typically, the method will
15 involve administration of the compound from about 1 to about 5 times per day or alternatively, as a continuous infusion. Such administration can be used as a chronic or acute therapy.

As one of skill in the art will appreciate, lower or higher doses than those recited
20 above may be required. Specific dosage and treatment regimens will depend upon a variety of factors, including the activity of the specific compound employed, the age, body weight, general health status, sex and diet of the infected mammal, the time of administration, the rate of excretion, the severity and course of the infection, the patient's disposition to the infection and the judgment of the treating physician.
25 Generally, treatment is initiated with small dosages substantially less than the optimum dose of the peptide. Thereafter, the dosage is increased by small increments until the optimum effect under the circumstances is reached. In general, the compound is most desirably administered at a concentration level that will generally afford a therapeutic effect without causing any harmful or deleterious side
30 effects.

Administration of the therapeutic compound in the treatment of *Flaviviridae* viral infection may be by any one of several routes including administration orally, parenterally or via an implanted reservoir. The term "parenteral" as used herein
35 includes subcutaneous, intracutaneous, intravenous, intramuscular, intra-articular,

3A
3B

Intrasynovial, Intrasternal, Intrathecal, and Intralesional Injection or Infusion techniques. Oral administration or administration by injection are preferred. Orally acceptable dosage forms include, but not limited to, capsules, tablets, and aqueous suspensions and solutions.

5

As set out above, the compound of Formula (I), (II), (III), (IV), (VI), (VII) or (VIII) is administered in combination with one or more pharmaceutically acceptable carriers. The nature of the carrier(s) will, of course, vary with the dosage form. Accordingly, in the case of tablets for oral use, carriers which are commonly used include lactose and corn starch. Lubricating agents, such as magnesium stearate, are also typically added. For oral administration in a capsule form, useful diluents include lactose and dried corn starch. When aqueous suspensions are administered orally, the active ingredient is combined with emulsifying and suspending agents. If desired, certain sweetening and/or flavoring and/or coloring agents may be added. Injectable preparations including injectable aqueous or oleaginous suspensions, are formulated according to techniques known in the art using suitable dispersing or wetting agents such as Tween 80 and suspending agents.

10

15

The amount of the present therapeutic compound that is combined with the carrier materials to produce a single dosage form will vary depending upon the host treated and the particular mode of administration. A typical preparation will contain from about 5% to about 95% therapeutic compound (w/w). Preferably, such preparations contain from about 20% to about 80% therapeutic compound.

20

In another aspect, a combination therapy is contemplated wherein the compound of Formula (I), (II), (III), (IV), (VI), (VII) or (VIII), or a pharmaceutically acceptable salt thereof, is co-administered with at least one additional agent selected from: an antiviral agent, an immunomodulatory agent, an HCV inhibitor, an HIV inhibitor, an HAV inhibitor, an HBV inhibitor, and a therapeutic effective to treat the symptoms of the viral infection. Examples of such agents are well known to those of skill in the art. These additional agents may be combined with the compounds of this invention to create a single pharmaceutical dosage form. Alternatively these additional agents may be separately administered to the infected patient as part of a multiple dosage form, for example, using a kit. Such additional agents may be administered to the patient prior to, concurrently with, or following the administration of the therapeutic

25

30

35

3/5

compound of Formula (I), (II), (III), (IV), (VI), (VII) or (VIII), or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

When a combination therapy is utilized, both the present compound and the
5 additional therapeutic and/or prophylactic agents should be present at dosage levels of between about 10 to 100%, and more preferably between about 10 and 80% of the dosage normally administered in a monotherapy regimen.

Article of Manufacture

10 In a further aspect of the present invention, there is provided an article of manufacture comprising packaging material contained within which is a composition effective to treat a mammal infected with a virus of the *Flaviviridae* family and the packaging material comprises a label which indicates that the composition can be used to treat infection by a virus of the *Flaviviridae* family, wherein said composition
15 comprises a compound of Formula (I), (II), (III), (IV), (VI), (VII) or (VIII) as defined above.

Flaviviridae viruses

Particularly, the different embodiments of the present invention may be directed to
20 distinct viruses, particularly viruses which are pathogenic in mammal. Preferably, the above-mentioned compounds or compositions can be used for the treatment of hepatitis virus genus, such as Hepatitis C. Preferred examples of HCV viruses are selected from genotypes: 1, 2, 3, 4, 5, and 6. More preferred examples of HCV viruses are selected from genotypes: 2, 3, 4, 5, and 6. Preferably, HCV viruses are
25 selected from subtypes: HCV 1a, HCV1b, HCV 2a-c, HCV 3a-b, HCV 4a, HCV 5 and HCV 6a,h,d & k. More preferably, HCV viruses are selected from subtypes: HCV 1a, HCV 2a-c, HCV 3a-b, HCV 4a, HCV 5 and HCV 6a,h,d & k.

Alternatively, the compounds of the invention may be directed against viruses of the
30 flavivirus genus, such as the Dengue Fever viruses, Japanese Encephalitis viruses, West Nile viruses and Yellow Fever viruses. Preferably, the invention is directed at the treatment of viral disease in a human caused by Dengue virus. Preferably, the invention is directed at the treatment of viral disease in a human caused by Japanese encephalitis virus. Alternatively, the invention is directed at the treatment
35 of viral disease in a human caused by Yellow Fever virus. Alternatively, the invention

36
36

is directed at the treatment of viral disease in a human caused by West Nile virus.

In addition, the invention may be directed to the treatment of viral disease caused by viruses of the pestivirus genus, such as the bovine viral diarrhea virus (BVDV),
5 classical swine fever virus (CSFV) and border disease virus (BDV). Preferably, the invention is directed at the treatment of viral diseases in cattle caused by BVDV. Alternatively, the invention is directed at the treatment of viral diseases in pigs caused by CSFV. Alternatively, the invention is directed at the treatment of viral diseases in sheep caused by BDV.

10

Furthermore, GB viruses can also be treated with composition of the present invention. Included in this viral family are Hepatitis G virus (HGV) and Hepatitis GB virus. Preferred examples are selected from: GBV-A, B & C. Preferably, the invention is directed at the treatment of viral disease in a human caused by GBV-C.

15 Alternatively, the invention is directed at the treatment of viral disease in a human caused by GBV-A. Alternatively, the invention is directed at the treatment of viral disease in a human caused by HGV.

Embodiments of the present invention are exemplified by the following specific
20 examples which are not to be construed as limiting.

EXAMPLES

Abbreviations used in the examples include:

Abu: aminobutyric acid; DABCYL: 4-((4-(dimethylamino)phenyl) azo)benzoic acid;
25 DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium; DMSO: dimethyl sulfoxide; EDANS: 5-((2-aminoethyl)amino)naphthalene-1-sulfonic acid; HPLC: high performance liquid chromatography; IPTG: isopropyl- β -D-thiogalactoside; LB: Luria-Bertoni (as in LB broth); Nva: norvaline; PenStrep: penicillin/streptomycin; PCR: polymerase chain reaction; r.m.s.: root mean square; RT-PCR: real-time polymerase chain reaction;
30 and TCEP: tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride.

Synthesis of Compounds of Formula (I)

Compounds of Formula (I) were prepared using the protocol outlined in detail in WO 00/059929, published October 12, 2000. In particular, reference is made to page 89,
35 Example 34C for the preparation of compound (IV).

35
37

Example 1 – Inhibition of HCV NS3-NS4A proteases of different genotypes by compounds II, III and IV

HCV NS3/4A 1a and 1b

- 5 For production of the HCV genotype 1b NS3-NS4A heterodimer protein, a full-length HCV cDNA was cloned by RT-PCR using RNA extracted from the serum of an HCV genotype 1b infected individual (provided by Dr. Bernard Willems, Hôpital St-Luc, Montréal, Canada). The DNA region encoding the NS3-NS4A heterodimer protein was PCR-amplified (forward primer: 'CTCGGATCCGGCGCCCATCACGGCCTAC3'
- 10 (SEQ ID No.1) ; reverse primer: 5'CTCTCTAGATCAGCACTCTTCCATTTCAT CGAA3') (SEQ ID No.2)) from the full-length HCV cDNA and subcloned into the pFastBac™ HTa baculovirus expression vector (Gibco/BRL). For HCV genotype 1a, the DNA encoding NS3-NS4A heterodimer protein was PCR-amplified (forward primer: 5'CTCTCTAGATCAGCACTCTTCCATTTCATCGAACTC3' (SEQ ID No.3);
- 15 reverse primer: 5'CTCGGATCCGGCGCCCATCACGGCCTACTCCCAA3' (SEQ ID No.4)) from the HCV genotype 1a strain H77 (provided by ViroPharma Inc., Exton, PA, US) and subcloned as described above. The cloning into the pFastBac™ HTa baculovirus expression vector generated a recombinant fusion protein containing an additional N-terminal 28 residues that comprised a hexahistidine tag and a rTEV
- 20 protease cleavage site. The Bac-to-Bac™ baculovirus expression system (Gibco/BRL) was used to produce the recombinant baculovirus for protein expression.

- His-tagged NS3-NS4A heterodimer protease was expressed by infecting Sf21 insect
- 25 cells (Invitrogen) at a density of 10^8 cells/mL with the recombinant baculovirus at a multiplicity of infection of 0.1-0.2 at 27°C. The infected culture was harvested 48 to 64 h later by centrifugation at 4°C. The cell pellet was homogenized in 50 mM sodium phosphate, pH 7.5, 40% glycerol (w/v), 2mM β -mercaptoethanol. His-NS3-NS4A heterodimer protease was then extracted from the cell lysate with 1.5% NP-
- 30 40, 0.5% Triton X-100, 0.5M NaCl, and a DNase treatment. After ultracentrifugation (100,000xg for 30 min at 4°C), the soluble extract was diluted 4-fold in 50 mM sodium phosphate, pH 7.5, 0.5M NaCl and loaded on a Pharmacia Hi-Trap Ni²⁺-chelating column. The His-NS3-NS4A heterodimer protein was eluted using a 50 to 400 mM imidazole gradient prepared in 50 mM sodium phosphate, pH 7.5, 10%

3/30

(w/v) glycerol, 0.1% NP-40, 0.5M NaCl. Co-purification of mature NS3 and NS4A protein complex was verified by Western blot analysis of the purified proteins using an anti-NS3 and an anti-NS4A antiserum produced in-house. The purified NS3 protease domain and the peptide H₂N-PDREVLVREFDEMEEC-OH (SEQ ID No. 5) were used to immunize rabbits for the production of antisera specific to NS3 and NS4A respectively. The proper N-terminal amino acid of both proteins was confirmed by N-terminal amino acid sequencing (PE Biosystems 491/491C Proclese Sequencer). The purified enzymes were stored at -80°C in 50 mM sodium phosphate, pH 7.5, 10% (w/v) glycerol, 0.5 M NaCl, 0.25 M imidazole, 0.1% NP-40.

10

HCV NS3/4A 2b and 3a

The NS3-NS4 protease genes of HCV genotypes 2b and 3a were amplified from RNA isolated from clinical samples of HCV-infected patients obtained from Dr. G. Steinmann (Germany) using RT-PCR. The primers used for the RT-PCR were 5'CTCGGATCCGGCTCCCATTAAGCTTAC3' (SEQ ID No. 6) as the forward and 5'GACGCGTCGACGCGGCCGCTCAGCACTCTTCCATTTCACCTGAA3' (SEQ ID No.7) as the reverse primer for the NS3-NS4A of HCV genotype 2b and; 5'CTCGGATCGGGCCCCGATCAGCATACGCC3' (SEQ ID No. 8) as the forward and 5'CACCGCTCGAGTCAGCATTCTTCCATCTCATCATATTGTTG3' (SEQ ID No. 9) as the reverse primer for HCV genotype 3a. Each primer contained a unique restriction site for subcloning the fragment in the bacterial expression vector pET11a. The cloning into the vector generated a recombinant fusion protein containing an additional N-terminal 28 residues that comprised a hexahistidine tag and a rTEV protease cleavage site. The recombinant plasmids were used to transform the bacterial strain BL21 DE3 pLysS for protein expression and recombinant protein expression was induced by the addition of IPTG. Following expression, the cells were collected by centrifugation at 4°C and the cell pellet lysed in a buffer containing 50mM sodium phosphate, 0.5M NaCl, 40% glycerol, 1.5% NP-40, 0.5% Triton X-100 and the soluble protein fraction was passed through a 5ml HiTrap chelating affinity column as described above. A poly(U)-Sepharose purification step can optionally be conducted in order to remove degradation products and contaminants.

In Vitro HCV NS3 Protease Assay

The fluorogenic decapeptide substrate used to assess inhibition of protease activity of the HCV 1a, 1b, 2b, 2a-c and 3a NS3-NS4A heterodimer protein was anthranilyl-

35

DDIVPAbu[C(O)-O]-AMY(3-NO₂)TW-OH (SEQ ID No.10). This substrate is cleaved between the aminobutyric (Abu) and the alanine residues. The sequence DDIVPAbu-AMYTW (SEQ ID No.11) is derived from the sequence DDIVPC-SMSYTW (SEQ ID No.12) corresponding to the NS5A/NS5B natural cleavage site.

- 5 The introduction of the aminobutyric residue at position P1 resulted in a significant decrease of the N-terminal product inhibition while the deletion of the serine residue at position P3 improved the internal quenching efficiency. The protease activity was assayed in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.25M sodium citrate, 0.01% n-dodecyl-β-D-maltoside, 1 mM TCEP. The assay was performed in a Microfluor®2 White U-
- 10 Bottom Microtiter® plate. 5 μM of the substrate and various concentrations of the test compound were incubated with 1.5 nM of HCV 1a or 1b NS3-NS4A heterodimer protein for 45 minutes at 23°C under gentle agitation. The final DMSO content did not exceed 5.25%. The reaction was terminated by the addition of a 1M 2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid solution at pH 5.8.

15

The fluorescence was monitored using the BMG POLARstar Galaxy 96-well plate reader with an excitation filter of 320 nm, and an emission filter of 405 nm. The level of inhibition (% inhibition) of each well containing test compound was calculated with the following equation (FU = fluorescence unit):

20

$$\% \cdot \text{inhibition} = \left(1 - \left[\frac{FU \cdot \text{well} - FU \cdot \text{blank}}{FU \cdot \text{control} - FU \cdot \text{blank}} \right] \right) * 100.$$

The calculated % inhibition values were then used to determine IC₅₀, slope factor (n) and maximum inhibition (I_{max}) by the non-linear regression routine NLIN procedure of SAS using the following equation:

25

$$\% \cdot \text{inhibition} = \frac{I_{\text{max}} \times [\text{inhibitor}]^n}{[\text{inhibitor}]^n + IC_{50}^n}$$

Inhibition constant (K_i) determination and mode of inhibition

- The fluorogenic decapeptide substrate anthranilyl-D(d)EVP-Nva[C(O)-O]-AMY(3-NO₂)TW-OH (SEQ ID No.13) was used to assess the mechanism of inhibition and
- 30 the inhibition constants of the compound (IV) against HCV NS3-NS4A proteases. It was cleaved between the norvaline and the alanine residues. The substrate working solution was prepared in DMSO at the concentration of 200 μM from the substrate

3/10

stock solution (2 mM in DMSO stored at -20°C). The final substrate concentration in the assay varied from 0.25 to 8 µM. The inhibition constant (K_i) for compound (IV) was determined using a steady-state velocity method (Morrisson *et al.* 1985). The protease activity was determined by monitoring the fluorescence change associated with the cleavage of the internally quenched fluorogenic substrate using a SLM-AMINCO® 8100 spectrofluorometer (emission at 325 nm and excitation at 420 nm). The cleavage reaction was monitored in the presence of 0.25 to 8 µM of substrate, 0.3 nM of HCV 1a or 1b NS3-NS4A heterodimer protein and various concentrations of the test compound IV in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.25M sodium citrate, 0.01% n-dodecyl-β-D-maltoside, 1 mM TCEP. The steady-state analysis of inhibition of the HCV genotype 1a and 1b NS3-NS4A heterodimer proteases were performed using the Dixon and Cornish-Bowden graphical methods. In the Dixon graphical method, the reciprocal velocity $1/V$ is plotted against the test compound concentration at several substrate concentrations (S). In the Cornish-Bowden graphical method, the ratio S/V is plotted against the test compound concentration at several S concentrations. For both methods, the points lie on a straight line at each S value. For a competitive test compound, the Dixon plot displays lines at different S values intersecting at a single point, while the Cornish-Bowden plot displays parallel lines at different S values. The K_i was estimated by fitting the data to the equation describing competitive binding:

$$V = \frac{k_{cat} \cdot [E] \cdot [S]}{K_m \cdot (1 + [I]/K_i) + [S]}$$

Inhibition of HCV NS3 proteases

The activity of HCV genotype 1a, 1b, 2b, 2a-c and 3a NS3/NS4A heterodimer proteases was determined in the presence of compound (IV) using the *in vitro* enzymatic fluorogenic assay. The IC_{50} curves were analyzed individually by the SAS NLIN procedure. For HCV 1a NS3-NS4A protease, an average IC_{50} value of 4.3 nM was obtained from the analysis of two batches of compound (IV). An average IC_{50} value of 3.4 nM was obtained from the analysis of two batches of compound (IV) in the presence of HCV 1b NS3-NS4A protease.

46A

TABLE 1**IC₅₀ of different NS3 protease inhibitors in HCV of different genotypes**

compound	HCV-1a	HCV-1b	HCV-3a	HCV-2a-c	HCV-2b
II	7.8 nM	8.9 nM	360 nM	680 nM	1000 nM
III	4.1 nM	4.2 nM	190 nM	480 nM	510 nM
IV	4.3 nM	3.4 nM	280 nM	200 nM	280 nM
V	23 nM	10 nM	930 nM	1800 nM	3000 nM

n/d= not done

Figures 3A and 3B illustrate the IC₅₀ curves of compound (IV) against HCV 1a and
 5 1b NS3-NS4A proteases, respectively.

Compound (IV) was found to be a competitive test compound of HCV genotype 1a
 and 1b NS3-NS4A proteases following fitting of the data to the equation describing
 competitive binding with GraFit and also from the Dixon and Cornish-Bowden
 10 graphical methods. For both HCV genotype enzymes, the Dixon plot showed that
 the lines at different S values were intersecting at a single point, while the Cornish-
 Bowden plot showed parallel lines at various S values. A K_i of 0.30 nM was obtained
 for compound (IV) from steady-state velocity analysis with the HCV genotype 1a
 NS3-NS4A protease, while a K_i of 0.66 nM was obtained with the HCV genotype 1b
 15 NS3-NS4A protease, K_i's of 90 nM, 86 nM and 83 nM with HCV genotype 3a, 2a-c
 and 2b respectively. Figures 4 and 5 are the Dixon and Cornish-Bowden plots of
 compound (IV) against the HCV genotype 1a and 1b NS3-NS4A, proteases
 respectively.

20 Example 2 – Inhibition of HCV Replicon 1a and/or 1b

Cell-based HCV 1a and 1b RNA replicon assays

HCV RNA replication was demonstrated in HCV 1a and 1b replicon-containing, Huh-
 7-derived cell lines developed at Boehringer Ingelheim (Canada) Ltd., R & D (WO
 02/052015). These cells were used to establish a sensitive HCV RNA replication
 25 cell-based assay for testing candidate test compounds.

Huh7 cells that stably maintain a subgenomic HCV replicon were established as
 previously described (Lohman *et al.* 1999; WO 02/052015). The cells were seeded

Into a 96 well cell culture cluster at 1×10^4 cells per well in DMEM complemented with 10% FBS, PenStrep (Life Technologies) and $1 \mu\text{g/mL}$ Geneticin. Cells were incubated in a 5% CO_2 incubator at 37°C until addition of various concentrations of the test compound.

5

The test compound was prepared for use in the assay as follows. The test compound in 100% DMSO was added diluted in assay Medium for a final DMSO concentration of 0.5% and the solution was sonicated for 15 min and filtered through a $0.22 \mu\text{m}$ Millipore Filter Unit. Serial dilutions of the test compounds were prepared using Assay Medium (containing 0.5% DMSO).

10

Cell culture medium was aspirated from the 96-well plate containing the cells and the appropriate dilution of test compound in assay medium was transferred to independent wells of the cell culture plate which was incubated at 37° with 5% CO_2 .

15

Following a 3 day-incubation period, the cells were washed with PBS and total cellular RNA was extracted with the RNeasy Mini Kit[®] and Qias shredder[®] from Qiagen. RNA from each well was eluted in $50 \mu\text{L}$ of H_2O . RNA was quantified by optical density at 260 nm on the Cary 1E[®] UV-Visible spectrophotometer. The HCV RNA replicon copy number was evaluated by real-time RT-PCR with the ABI Prism[®] 7700 Sequence Detection System. The TAQMAN EZ[®] RT-PCR kit provides a system for the detection and analysis of RNA. Direct detection of the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) product with no downstream processing was accomplished by monitoring the increase in fluorescence of a dye-labeled DNA probe. The nucleotide sequence of both primers and probe was located in the 5' region of the HCV genome. The replicon copy number was then evaluated using a standard curve made with known amounts of replicon copy (supplemented with 50 ng of wild type Huh-7 RNA) assayed in the same reaction mix. The following thermal cycle parameters were used for the RT-PCR reaction on the ABI Prism[®] 7700 Sequence Detection System. Conditions were optimized for HCV detection. Quantification is based on the threshold cycle, where the amplification plot crosses a defined fluorescence threshold. Comparison of the threshold cycles provides a highly sensitive measure of relative template concentration in different samples. Monitoring during early cycles, when PCR fidelity is at its highest, provides precise data for accurate quantification. The relative

35

template concentration can be converted to real numbers by using the standard curve of HCV with known number of copy.

EC₅₀ Curve Fitting with NLIN Procedure of SAS

- 5 The level of inhibition (% inhibition) of each well containing test compound was calculated with the following equation (CN = HCV Replicon copy number):

$$\% \cdot inhibition = \left(\frac{CN \cdot control - CN \cdot well}{CN \cdot control} \right) * 100.$$

- 10 The calculated % inhibition values were then used to determine EC₅₀, slope factor (n) and maximum inhibition (I_{max}) by the non-linear regression routine NLIN procedure of SAS using the following equation:

$$\% \cdot inhibition = \frac{I_{max} \times [inhibitor]^n}{[inhibitor]^n + EC_{50}^n}.$$

TABLE 2

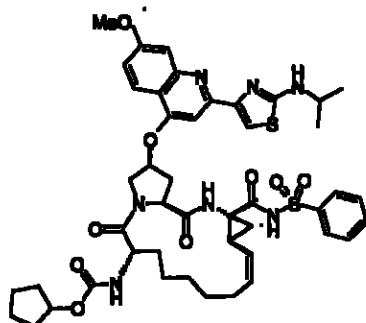
- 15 EC₅₀ (nM) of different NS3 protease inhibitors in HCV of different genotypes

compound	HCV replicon 1a	HCV replicon 1b
II	34	27
III	4.5	4.7
IV	2.1	1.0
V	76	39
VI	2.2	3.0
VII	3.2	3.3
VIII	0.7	1.1

- 20 In HCV replicon cell-based assays, compound (IV) showed a dose-dependent inhibition of HCV RNA replication with EC₅₀s of 2.1 nM and 1 nM using HCV replicon-containing cells of genotype 1a and 1b, respectively. Cytotoxicity was not observed at concentrations higher than 1000 nM. These results indicate that compounds II, III, IV, VI, VII and VIII are potent and specific inhibitors of cell-based HCV RNA replication. Compound V is a compound from a different class but which is related in structure, and also active against NS3 protease but less potent. This

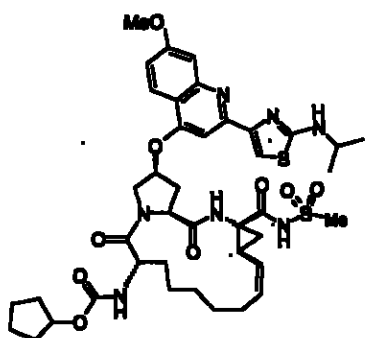
compound will be used later on as a control to compare inhibitory activity levels.

Compounds VI, VII and VIII have the following structures:

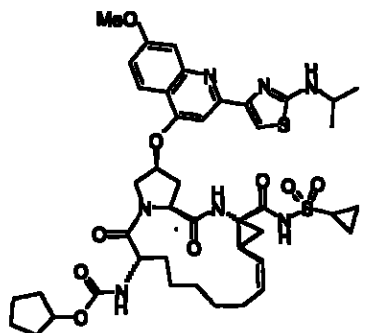


compound (VI)

5



compound (VII)



compound (VIII)

10 **Example 3 – Inhibition of GBV-B NS3/4A protease by compounds II, III and IV**
Cloning of GBV-B NS3/NS4A protease

The full length GBV-B NS3/NS4A protease gene was isolated from infected tamarin serum. Total RNA was isolated from the serum using QIAGEN® viral RNA extraction kit according to standard protocol. The selection of primers for the reverse
15 transcriptase and the PCR reactions were selected based on the published sequence (Muerhoff, A.S et al. 1995) and GeneBank accession number U22304

sp 45

(forward: 5'CGCATATGGCACCTTTTACGCTGCAGTGTC3' (SEQ ID No.14);
reverse: 5'CGCGCGCTCGAGACACTCCTCCACGATTTCTTC3' (SEQ ID No.15)).

The amplified RT-PCR product was cloned into the polyhistidine tag-containing pET-29 plasmid between the NdeI and XhoI sites in frame with the polyhistidine tag. This
5 construct produced a recombinant protein with a poly His tag at its C-terminus. The plasmid was transformed into BL21 DE3 pLysS for protein expression.

The *E. coli* clone pGBV-B was grown in LB medium to a cell density (OD_{600}) of 0.6 at which time IPTG was added at a concentration of 0.2 mM. The induction was done
10 at 23 °C for a period of 4 hours. The GBV-B NS3/NS4A-His protein was purified according to the procedure described by Zhong *et al.*, 1999. The soluble fraction was purified on a Pharmacia® Hi-Trap Ni²⁺-chelating affinity column using a 50 to 400 mM imidazole gradient. This step was followed by chromatography of the protein preparation on a Superdex® 200 gel filtration column. The concentration of the
15 protein preparation was determined by Bradford protein assay.

In vitro GBV-B NS3 protease assay

The decapeptide substrate used to assess inhibition of the protease activity of GBV-B NS3-NS4A heterodimer protein was Ac-DED(EDANS)EE-Abu[C(O)-O]
20 ASK(DABCYL)-NH₂ (SEQ ID No. 16). This substrate is cleaved between the aminobutyric (Abu) and the alanine residues and products of the reaction were analyzed by HPLC. The protease activity was assayed in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.25M sodium citrate, 0.01% n-dodecyl- β -D-maltoside, 1 mM TCEP. The assay was performed in a Microfluor®2 White U-Bottom Microtiter® plate. 5 μ M of the
25 substrate and various concentrations of the test compounds were incubated with 0.4 nM of GBV-B NS3-NS4A heterodimer protein for 2 hours at 23°C under gentle agitation. The final DMSO content did not exceed 5.25%. The reaction was terminated by the addition of a 1M 2-[N-morpholino]ethanesulfonic acid solution at pH 5.8. For quantification, the cleavage products and the substrate were separated
30 by HPLC on a Perkin-Elmer® 3x3CR C8 column. The separation was accomplished by initially eluting at 3.5 mL/min with an aqueous solution containing 0.05% phosphoric acid and 3 mM SDS. A 0 to 45% acetonitrile linear gradient in 0.05% phosphoric acid was then applied for 10 minutes. The absorbance was monitored at 210 nm.

35

2/5
A6

The assay was conducted in the presence of the test compounds II, III, IV and V. The IC_{50} obtained for each test compound in the presence of GBV-B NS3-4A protein is indicated in Table 3.

TABLE 3

Compounds	IC_{50} (μ M) GBV-B
compound (II)	36.5
compound (III)	31
compound (IV)	16
compound (V)	63

5 Compound V is a compound from a different class which is related in structure and also active against NS3 protease but less active than compounds II, III and IV. This compound was included to demonstrate that the ranking of the activity of compounds II, III and IV was maintained between HCV and GBV-B.

10 Inhibition of GBV-B replication in tamarin hepatocytes in culture

Hepatocytes isolated from uninfected tamarins were maintained in culture in defined medium for several days. The cell culture model was as described by Beames *et al.* 2000. Three days after plating, the cells were infected with GBV-B-containing plasma. After viral adsorption, the virus was removed and the cells were incubated in
15 the presence and absence of candidate test compounds at a concentration of 10 μ M. The cells were harvested 7 days post infection. The levels of GBV-B RNA were quantitated from total cellular RNA by a real-time PCR assay using a primer-probe combination that recognized a portion of the GBV-B capsid gene (Beames *et al.* 2000).

20

Despite lower IC_{50} obtained in the enzymatic assay, the results illustrated in Figure 6, show that more than a 3-log reduction in the viral RNA levels was observed when the cells were incubated in the presence of compound III and a 2-log reduction in the presence of compound V (when the results were expressed as g.e. (genome equivalents)/ μ g RNA). The results obtained with this more representative viral
25 replication assay demonstrate that these compounds are effective antivirals to reduce GBV-B virus production.

48
A7

Example 4 - Sequence Comparison of NS3 proteases within the *Flaviviridae* family

The sequences of proteases from other viruses of the *flaviviridae* family of viruses were obtained from a BLAST analysis (Altschul et al.1997) NCBI followed by the taxonomy report. The search for protease sequences was done using specific criteria that would retrieve all *flaviviridae* sequences with similarity to HCV protease excluding HCV sequences themselves. When possible an "NP_" sequence from NCBI was used to represent a particular group of related viruses since these "NP_" sequences are "Reference" sequences (RefSeq). Furthermore, when not known, the NS3 N-terminal and C-terminal ends for the proteases were determined from similarity with HCV NS3 protease.

Sequence alignments of proteases for the six HCV strains against the different groups of viruses were performed using ALIGNX (VectorNTI[®]) based on CLUSTALW (Thompson, JD, et al., 1994).

From these alignments, the percentage of similarity was calculated between all individual sequences and expressed in Tables 4-8. The similarity was based on the following grouping of amino acids; [ILVM], [FWY], [KR], [DE], [GA], [NQ], [ST].

Table 4 represents identities and similarities between several genotypes and subtypes of HCV. One can see that identities range between 70% and 89% whereas similarities range between 77% and 95% demonstrating that the NS3 protease is highly conserved among HCV. Also, from the amino acid sequence alignment of NS3 protease domain of various representative HCV genotypes (Figure 2) and location of the conserved residues on the three dimensional structure (Figure 8), one can see that the residues at the active site are highly conserved among HCV genotypes and subtypes.

Table 5 is an analysis of the similarity between GB viruses NS3 protease and HCV NS3 protease domains. Similarities range between 43 and 49%, whereas similarities between HCV and pestivirus NS3 domains range from 25 and 30% (Table 6). Similarities between HCV and dengue virus range also around 30% (Table 7), as well as the similarity between HCV and Flavivirus (Table 8).

2/20

In contrast, Table 9 shows that the similarities between the NS3 protease domain of HCV and the protease of Human Cytomegalovirus (HCMV) revolves around 20%. HCMV is a virus of the Herpes viridae and has a serine protease that has a different catalytic triad from Flaviviridae proteases. The HCMV virus protease is therefore not
5 considered to be similar to Flaviviridae NS3 proteases. This contrast will be illustrated further when comparison is made of the similarities between the amino acid in contact with our inhibitors in Flaviviridae and HCMV.

Example 5 - Three-Dimensional Structural Crystal Studies

10 In order to analyze further the similarities between Flaviviridae, a crystal structure was obtained of the HCV NS3 protease complexed with an inhibitor, and the amino acids directly in contact with the inhibitor were analyzed in other Flaviviridae to assess degrees of similarity of these important contact points.

15 A co-crystal of the HCV NS3 protease-NS4A peptide complexed with macrocyclic compound (II) was obtained that diffracted X-rays to 2.75 Å resolution. The macrocyclic compound II was found at the NS3 protease active site and was clearly defined in the difference electron density. This structure reveals molecular details of how the test compound interacts with the active site and provides additional insight
20 into the mechanism of inhibition of the HCV NS3 protease.

The structure of the NS3 protease complex with the test compound II (Figure 8) better defines the binding site of the present substrate-based test compound series. From this structure of the co-complex, the residues directly in contact with the test
25 compound i.e. within 3 Å (H57, G137, S139, A156 and A157) are indicative of the active site, as predicted by the competitive mode of inhibition, and by the conservation at this site among representative sequences of HCV genotypes and various subtypes.

30 Other residues in contact within 4Å of the test compound are listed in Table 10. Comparison analysis reveals that these amino acids are highly conserved among Flaviviridae ranging between 59% and 76%. Conservation of these residues among Flaviviridae is indicative that inhibitors of the HCV NS3 protease would also inhibit
35 other members of the Flaviviridae family of viruses. In contrast, the level of similarity of the HCMV protease catalytic site and the contact points of Table 10 is in the same

23/9

range as the similarity for the whole protease (~20%) once again illustrating the fact that other serine protease from non-Flaviviridae are not targeted by the compounds of formula (I).

- 5 Other structural studies performed between HCV and dengue virus protease domains have shown that all six strands of the C-terminal domain inhibitor binding site are strongly conserved and of comparable length. Superposition of 68 α carbon atoms of the C-terminal domain of Den2 protease (residues 87-167) and HCV including most of the residues in Table 10 (residues 69-189) yields a r.m.s. deviation
10 of 0.8Å. (Murthy *et al.*, 1999).

Discussion

- Viruses within the *Flaviviridae* family possess a number of similarities (Figure 1) despite a relatively low overall sequence homology among its members (Tables 4-8).
15 In particular, the NS3 protein contains sequences with similarity to the protease and the nucleoside triphosphate-binding helicase of pestiviruses and flaviviruses. The HCV NS3 protease domain shares a sequence similarity of about 77-95% among HCV genotypes (Figure 1) and a sequence similarity of about 25-50% with other members of the *Flaviviridae* family (Tables 4-8). In addition, the genomic
20 organization and structure of GBV-B and HCV are similar despite the fact that the sequence homology between the polyprotein sequences of GBV-B and HCV is about 25 to 30%. This low similarity is however trumped by the fact that residues that come in contact with the inhibitor are highly conserved within the protease domain of *Flaviviridae*, a strong indication that this family of compounds would also
25 bind to other *Flaviviridae*. The activity of compound IV obtained against GBV-B is a positive demonstration of that hypothesis.

- With respect to the three dimensional structure, the available atomic co-ordinates of the various crystallized HCV and Dengue NS3 proteases showed an overall
30 architecture that is characteristic of the trypsin-like fold. Many studies have now firmly established that the N-terminal portion of the NS3 region encodes a serine protease that has a very specific and pivotal role in viral polyprotein processing within *Flaviviridae*.

- 35 All results produced in the above experiments tend to support the contention that the

compounds of formula (I) are active against members of the Flaviviridae family of viruses:

- 6 related compounds have been shown to be active against HCV 1b and have similar activity against HCV 1a (Table 2);
- 5 • 3 of these compounds were also tested against HCV 3a, 2a-c and 2b and also found to be active (Table 1);
- these 3 same compounds were tested in the enzymatic assay against GBV-B and found to be active (Table 3);
- 10 • 1 of these compounds was tested in cell culture against replication of GBV-B in tamarin cells and found to be active (Figure 6);
- 1 of these compounds demonstrates a mode of binding that is situated in a region highly conserved between all members of Flaviviridae (Figure 8);
- studies have demonstrated strong functional and structural similarity between HCV and Dengue virus NS3 proteases.

15

Given all similarities of viruses within the Flaviviridae family of viruses, it seems highly likely that the compounds of Formula (I) are effective against members of the Flaviviridae family of viruses, and more particularly, effective against the pathogenic members of the *Flaviviridae* family.

20

REFERENCES

- Altschul S.F. *et al.* 1997, Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402
- Ausubel *et al.* 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, New York
- Beames, B. *et al.* 2000, J. Virol., 74, 11764-11772
- 25 - Butkiewicz, N. *et al.* 2000, J. Virol., 74, 4291-4301
- Kim J.L. *et al.* 1996, Cell;87:343-355.
- Lin, C. *et al.* 1995, J. Virol. 69, 4373-4380
- Lohmann *et al.* 1999, Science 285, 110
- Love R. A. *et al.* 1996 Cell 87, 331-342
- 30 - Morrison, J.F. and Stone, S.R. 1985, Mol. Cell. Biophys. 2, 347-368
- Muerhoff, A.S. *et al.* 1995 J. Virol.69, 5621-5630
- Murthy, H. M. *et al.* 1999, J. Biol. Chem. 274(9), 5573-5580
- Remington, 1995, The Science and Practice of Pharmacy
- Ryan, M. D. *et al.* 1998 J. Gen. Virol. 79, 947-959
- 35 - Sambrook *et al.* 1989, Molecular Cloning- A Laboratory Manual, Cold Spring

51

Harbor Labs

- Scarselli, E., *et al.* 1997, J. Virol. 71, 4985-4989
- Steinkulor, C. *et al.* 1996, J. Biol. Chem. 271, 6367-6373.
- Thompson, *et al.* 1994, Nucleic Acids Res. 22: 4673- 4680
- 5 - Zhong, W. *et al.* 1999, Virology 261, 216-226

TABLE 4 - IDENTITIES AND SIMILARITIES BETWEEN NS3 PROTEASE

	1_1a	1_1b	2_2a	2_2b	3_3a	3_10a	4_4a	5_5a	6_6a	6_11a
1_1a		I = 88% S = 93%	I = 70% S = 81%	I = 71% S = 80%	I = 76% S = 84%	I = 72% S = 82%	I = 81% S = 86%	I = 80% S = 90%	I = 81% S = 88%	I = 79% S = 88%
1_1b			I = 72% S = 82%	I = 72% S = 82%	I = 79% S = 87%	I = 76% S = 86%	I = 83% S = 88%	I = 80% S = 91%	I = 82% S = 90%	I = 81% S = 90%
2_2a				I = 87% S = 93%	I = 74% S = 81%	I = 71% S = 81%	I = 72% S = 82%	I = 71% S = 82%	I = 74% S = 84%	I = 74% S = 84%
2_2b					I = 76% S = 78%	I = 89% S = 77%	I = 72% S = 81%	I = 71% S = 81%	I = 73% S = 83%	I = 71% S = 82%
3_3a						I = 89% S = 93%	I = 73% S = 82%	I = 76% S = 83%	I = 79% S = 87%	I = 78% S = 83%
3_10a							I = 76% S = 82%	I = 76% S = 83%	I = 77% S = 83%	I = 73% S = 82%
4_4a								I = 79% S = 89%	I = 79% S = 86%	I = 74% S = 83%
5_5a									I = 82% S = 89%	I = 78% S = 87%
6_6a										I = 80% S = 88%

Similarity score was obtained defining the following amino acid similarity:
[LVA], [WV], [DK], [DE], [EA], [EQ], [ET]

domains (180aa) of the different HCV genotypes and subtypes

5/3
53

TABLE 5 - % SIMILARITY OF HCV NS3 PROTEASE DOMAIN (181 AA) WITH GB NS3**PROTEASES FROM THE FLAVIVIRIDAE FAMILY**

	GBV-B NP_056931	HepG NP_043570	GBV-A NP_045010	GBV-C NP_059446
1a AF271632	45	49	44	48
1b D90208	46	49	45	48
2a D00944	44	48	45	47
2b D10988	46	47	45	46
3a D17763	44	45	43	45
10a D63821	43	45	45	46
4a Y11604	44	46	45	45
5a Y13184	46	48	44	46
6a Y12083	45	47	46	46
11a D63822	44	49	45	48

Matrix: [ILVM], [FWY], [KR], [DE], [GA], [NQ], [ST]

TABLE 6 - % SIMILARITY OF HCV NS3 PROTEASE DOMAIN (181 AA) WITH PESTIVIRUSES**NS3 PROTEASES FROM THE FLAVIVIRIDAE FAMILY**

	Pest1 1 NP_040937	BVDV2 NP_044731	Pest1 2 NP_075354	Pest1 3 NP_620062
1a AF271632	28	28	28	28
1b D90208	28	28	28	28
2a D00944	26	26	26	26
2b D10988	26	25	26	26
3a D17763	29	28	28	28
10a D63821	28	27	28	28
4a Y11604	28	28	28	28
5a Y13184	29	29	29	29
6a Y12083	30	29	29	29
11a D63822	29	28	29	29

BVDV-2= Bovine viral Diarrhea virus

**TABLE 7 - % SIMILARITY OF HCV NS3 PROTEASE DOMAIN (181 AA) WITH MOSQUITO-BORNE
FLAVIVIRUS NS3 PROTEASES FROM THE FLAVIVIRIDAE FAMILY**

	Dengue 1 NP_059433	Dengue 2 NP_056776	Dengue 3 NP_040961	Dengue 4 NP_073286
1a AF271632	26	27	28	29
1b D90208	29	29	30	31
2a D00944	27	29	28	28
2b D10988	29	29	29	29
3a D17763	27	29	29	29
10a D63821	28	29	30	29
4a Y11604	27	27	28	30
5a Y13184	29	30	31	30
6a Y12083	29	30	30	31
11a D63822	29	29	30	30

TABLE 8 - % SIMILARITY OF HCV NS3 PROTEASE DOMAIN (181 AA) WITH FLAVIVIRUS NS3 PROTEASES FROM THE FLAVIVIRIDAE FAMILY

	WNV NP 041724	JEV NP 059434	Kunjin POLG KUNJM	YFV NP 041726	MVEV NP 051124
1a AF271632	29	30	29	29	30
1b D90208	29	31	30	29	31
2a D00944	28	28	28	28	28
2b D10988	29	30	29	30	30
3a D17763	27	27	27	28	28
10a D63821	27	27	27	28	27
4a Y11604	28	29	29	29	30
5a Y13184	29	30	30	30	30
6a Y12083	29	30	30	28	30
11a D63822	28	29	28	29	29

WVN= West Nile virus
JEV= Japanese encephalitis virus
Kunjin= Kunjin virus
YFV= Yellow Fever virus
MVEV= Murray Valley encephalitis virus

56

**TABLE 9 - % SIMILARITY OF HCV PROTEASE DOMAIN (181 AA) WITH HUMAN
CYTOMEGALOVIRUS PROTEASE DOMAIN (256 AA)**

	HCMV protease
1a AF271632	20
1b D90208	20
2a D00944	21
2b D10988	20
3a D17783	18
10a D63821	18
4a Y11804	19
5a Y13184	19
6a Y12083	19
11a D63822	19

TABLE 10 - AMINO ACID DIFFERENCES IN THE NS3 PROTEASE INHIBITOR BINDING DOMAIN AMONG VIRUSES OF THE (WITHIN 4 Å OF THE INHIBITOR) FLAVIVIRIDAE FAMILY

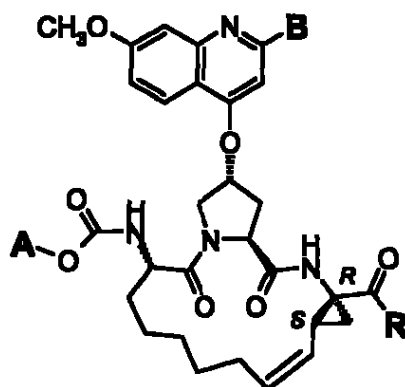
HCV40_1b	56	57	79	81	123	132	135	138	137	138	139	154	155	156	157	158	168	%
	Y	H	D	D	R	V,I	L	K	G	S	S	F	R	A	A	V	D	Sim
HCV			E₂₀		T₆	L₄₈											Q₉	88-
All genotypes					K₁	L₂₈											E₁	100
(140)																		
GBV _a	F/Y	H	A/S	D	K/Y	V/L/M	F/A	R/K	G	S	S	L/F	V/T	S/A	V/A	L/R	R	59
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	=	=	=	=	+	+	76 _a
PEST1	D	H	M	D	T	L	L	K	G	W	S	V	K	V	G	G	K	53
	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Flavivirus /	W	H	K	D	P/N/L	L	K/S	P	G	T	S	Y	G	N	G	V	A	50
Mosquito-borne	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
(Dengue)																		
Flavivirus	W	H	K	D	P/N/	L	P	X	G	T	S	Y	G	N	G	V	A	50
mosquito-borne	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Herpesvirus	V	R	V	E	T	G	A	V	D	A	S	S	V	D	A	L	R	23
HCMV	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

HCV40_1b Sequence of a HCV 1b isolate that was used as reference for this analysis
n number of HCV sequences of all genotypes that was used in the study
A_n number of HCV sequences containing this modification
% Sim % similarity
+ Similarity according to Matrix [ILVM], [FWY] [KRL] [DE] [GAL] [NQL] [ST]
= Similarities that are unique for the GBV-B member of the GBV group
GBV_a The aa in bold are the residue found for GBV-B NS3 protease
b % similarity for GBV-B

5/20

WE CLAIM:

1. Use of a compound of Formula (I):



Formula (I)

wherein A is selected from: C₁ to C₆ alkyl and C₃ to C₆ cycloalkyl; B is selected from: phenyl or thiazolyl, both of which optionally substituted with a group selected from NH(R¹) and NH(CO)R¹, wherein R¹ is C₁ to C₆ alkyl; and R is OH or a sulfonamide

group of the formula -NHSO₂-R² wherein R² is -(C₁₋₆)alkyl, -(C₃₋₇)cycloalkyl or {-(C₁₋₆)alkyl-(C₃₋₆)cycloalkyl}, which are all optionally substituted from 1 to 3 times with halo, cyano, nitro, O-(C₁₋₆)alkyl, amido, amino or phenyl, or R² is C₆ or C₁₀ aryl which is optionally substituted from 1 to 3 times with halo, cyano, nitro, (C₁₋₆)alkyl, O-(C₁₋₆)alkyl, amido, amino or phenyl;

or a pharmaceutically acceptable salt thereof;

for the preparation of a medicament for the treatment of *Flaviviridae* viral infection in a mammal.

2. The use according to claim 1, wherein A of Formula (I) is a branched C₄ to C₆ alkyl or C₄ to C₆ cycloalkyl group; B of Formula (I) is phenyl or a thiazole substituted at position 2 with NH(R¹) or NH(CO) R¹ in which R¹ is a C₁ to C₄ alkyl; and R is OH or a sulfonamide group of formula -NHSO₂-R² wherein R² is -(C₁₋₆)alkyl, -(C₃₋₆)cycloalkyl, both optionally substituted 1 or 2 times with halo or phenyl, or R² is C₆ aryl optionally substituted from 1 or 2 times with halo or (C₁₋₆)alkyl.
3. The use according to claim 1 or 2, wherein A is cyclopentyl or *tert*-butyl; B is a thiazole substituted at position 2 with NH(R¹) or NH(CO) R¹ in which R¹ is a C₁ to C₄ alkyl; and R is OH or a sulfonamide group wherein R² is methyl, cyclopropyl or phenyl.
4. The use according to any one of claims 1 to 3, wherein said compound is a

59
58

compound of formula (I) wherein R is OH.

6. The use according to any one of claim 1 to 3, wherein R is a sulfonamide group of formula $\text{-NHSO}_2\text{-R}^2$ wherein R^2 is $\text{-(C}_{1-6}\text{)}_{\text{alkyl}}$, $\text{-(C}_{3-6}\text{)}_{\text{cycloalkyl}}$, both optionally substituted 1 or 2 times with halo or phenyl, or R^2 is C_6 aryl optionally substituted from 1 or 2 times with halo or $\text{(C}_{1-6}\text{)}_{\text{alkyl}}$.
6. The use according to any one of claim 1 to 3, wherein A is cyclopentyl; B is a thiazole substituted at its 2 position with $\text{NHCH(CH}_3\text{)}_2$; and R is OH or a sulfonamide group wherein R^2 is methyl, cyclopropyl or phenyl.
7. The use according to any one of claims 1 to 5, wherein said mammal is a human, and said *Flaviviridae* is selected from the group consisting of Yellow Fever virus, West Nile virus, Dengue fever virus, Japanese Encephalitis virus, GB virus A or C and Hepatitis G virus.
8. The use according to any one of claims 1 to 5, wherein said mammal is a cattle, and said *Flaviviridae* is selected from BVDV, border disease virus.
9. The use according to any one of claims 1 to 5, wherein said mammal is a pig, and said *Flaviviridae* is Classical Swine Fever Virus.
10. The use according to claim 5, wherein said mammal is a human, and said *Flaviviridae* is hepatitis C virus.
11. The use according to claim 6, wherein said mammal is a human, and said *Flaviviridae* is selected from the group consisting of Yellow Fever virus, West Nile virus, Dengue fever virus, Japanese Encephalitis virus, GB virus A or C and Hepatitis G virus.
12. The use according to claim 6, wherein said mammal is a cattle, and said *Flaviviridae* is selected from BVDV, border disease virus.
13. The use according to claim 6, wherein said mammal is a pig, and said *Flaviviridae* is Classical Swine Fever Virus.
14. The use according to any one of claims 1 to 9, wherein said *Flaviviridae* virus comprises an NS3 protease comprising amino acid residues selected from: H57, G137, S139, A156 and A157.
15. An article of manufacture comprising packaging material contained within which is a composition effective to inhibit a virus of the *Flaviviridae* family and the packaging material comprises a label which indicates that the composition can be used to treat infection by a virus of the *Flaviviridae* family and, wherein said composition comprises a compound of Formula (I) as defined in claim 1.

58

FIGURE 1

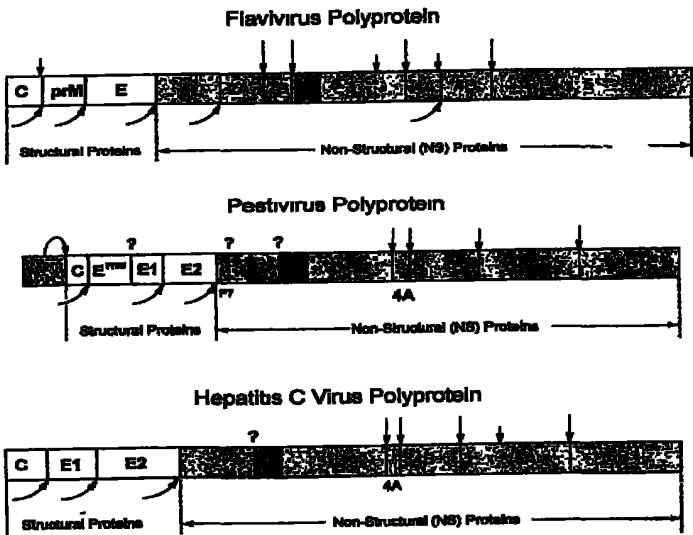
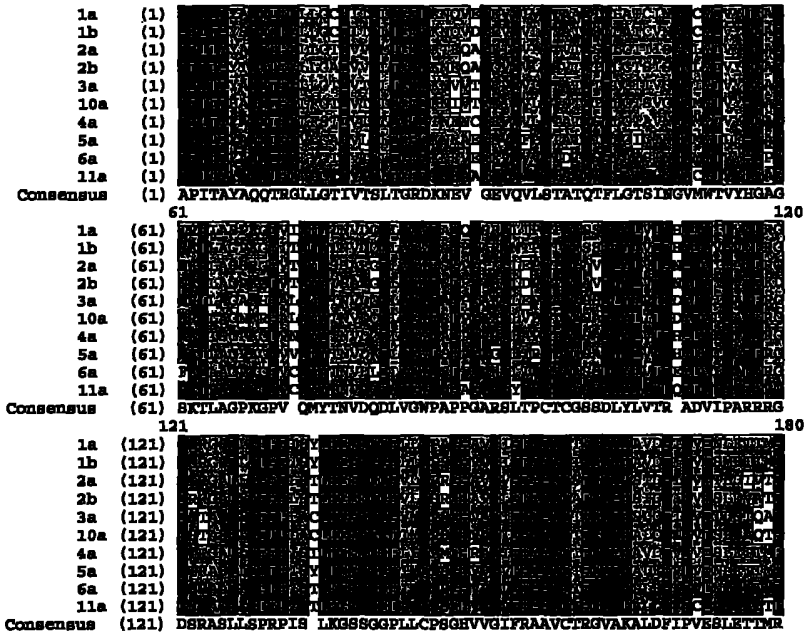


FIGURE 2

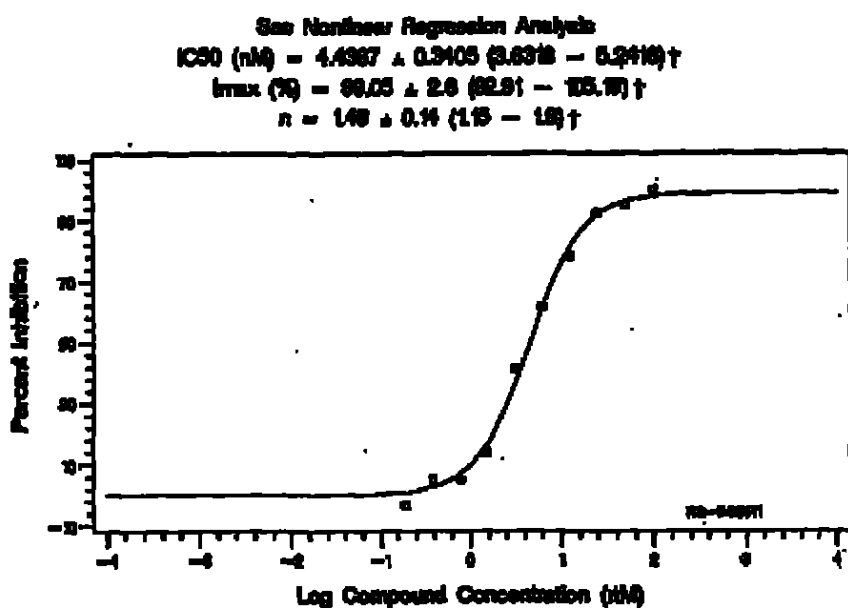


51
62

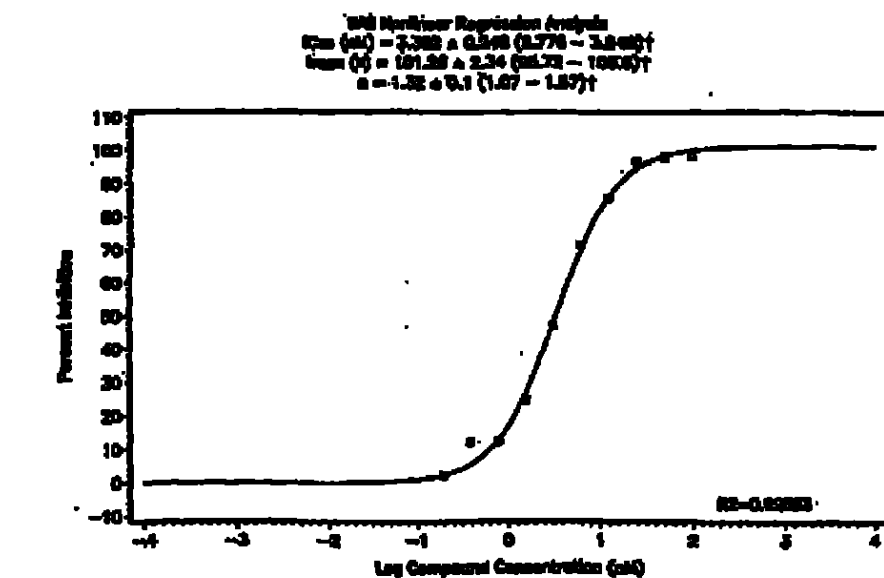
FIGURE 3

Representative IC_{50} curves of compound (IV) against HCV genotype 1a (A), and 1b (B) NS3-NS4A proteases

A.



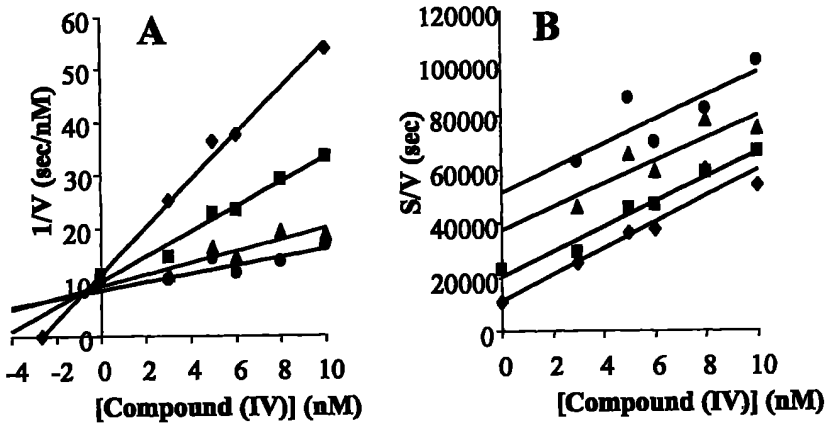
B.



9/2

FIGURE 4

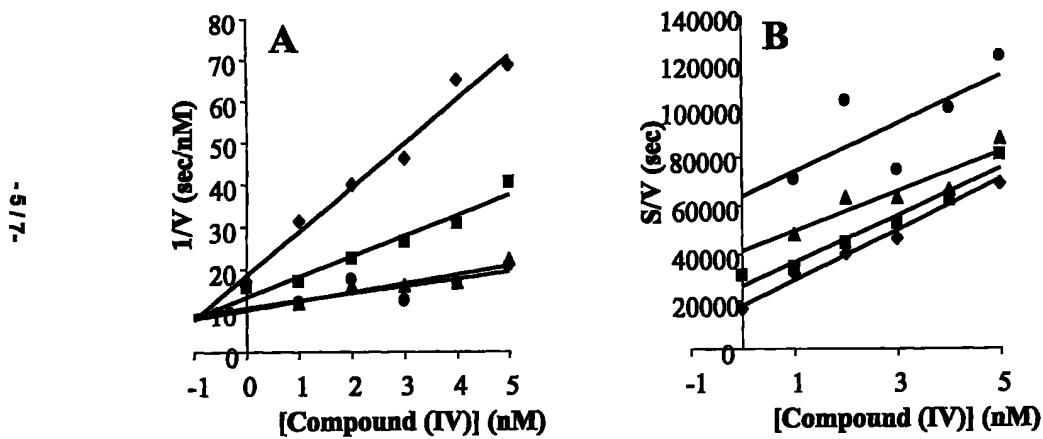
Dixon plot (A) and Cornish-Bowden plot (B) analyses of the inhibition of HCV 1a NS3-NS4A protease by compound (IV) at substrate concentrations of 1 (v), 2 (v), 4 (σ) and 6 (λ) μM showing a competitive mechanism of inhibition



- 4 / 7 -

FIGURE 5

Dixon plot (A) and Cornish-Bowden plot (B) analyses of the inhibition of HCV 1b NS3-NS4A protease by compound (IV) at substrate concentrations of 1 ($\circ$), 2 (∇), 4 ($\square$) and 6 (Δ) μ M showing a competitive mechanism of inhibition



8/4/05

FIGURE 6

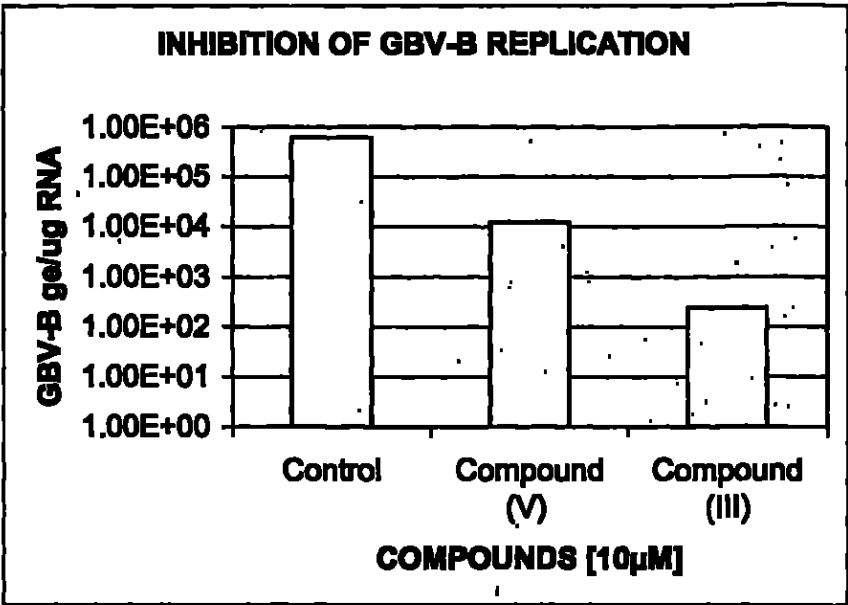
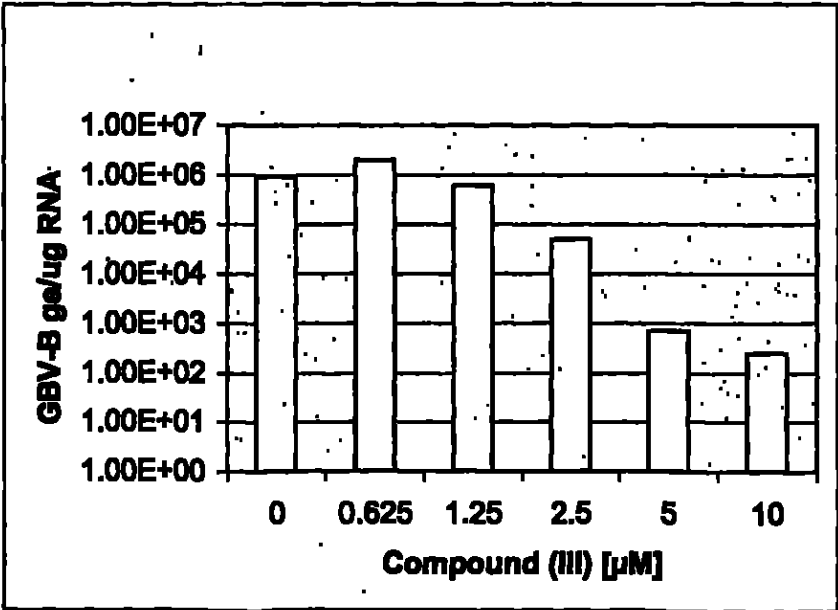
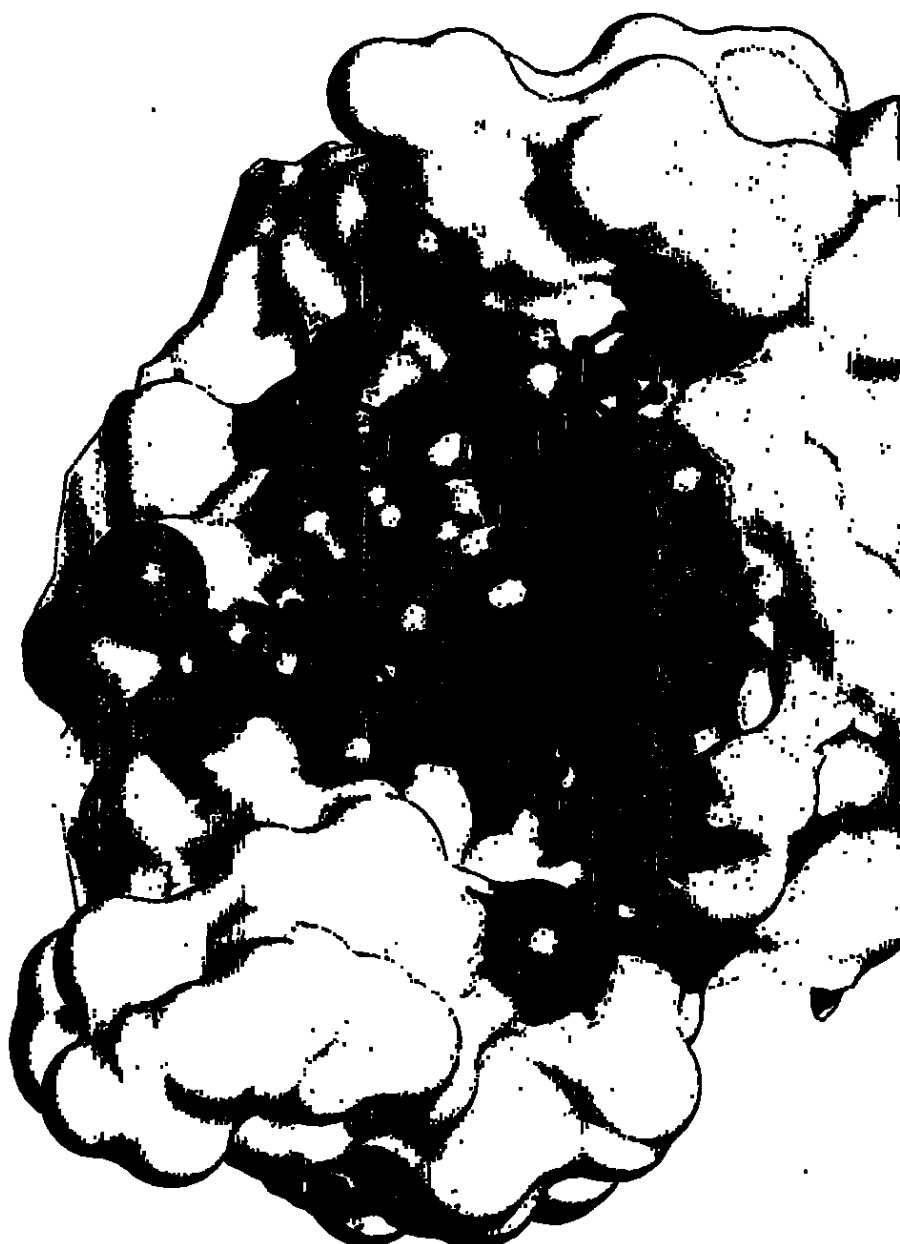


FIGURE 7



66

FIGURE 8



SEQUENCE LISTING

- 5 <110> Boehringer Ingelheim International GmbH
 <120> Composition for the Treatment of Infection by Flaviviridae
 Viruses
- 10 <130> 13/118
 <140> US 60/442,769
 <141> 2003-01-27
- 15 <150> US 60/421,900
 <151> 2002-10-29
 <160> 16
- 20 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- 25 <210> 1
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
- 30 <220>
 <223> Primer
- <400> 1
 ctggatccg gggcccatca cggcctac 28
- 35 <210> 2
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
- 40 <220>
 <223> primer
- <400> 2
 ctctctagat cagcactctt ccatttcacg gaa 33
- 45 <210> 3
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
- 50 <220>
 <223> primer
- 55 <400> 3
 ctctctagat cagcactctt ccatttcacg gaactc 36

68
62

<210> 4
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 5
 <220>
 <223> primer
 <400> 4
 10 ctcggatccg ggcgccatca cggcctactc ccaa 34
 <210> 5
 <211> 16
 15 <212> PRT
 <213> HCV peptide
 <400> 5
 20 Pro Asp Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu Cys
 1 5 10 15
 <210> 6
 <211> 28
 25 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> primer
 30
 <400> 6
 ctcggatccg gctcccatca ctgcttac 28
 <210> 7
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 40 <220>
 <223> primer
 <400> 7
 45 gacgcgtcga cgcggcgcgt cagcactctt ccatttcact gaa 43
 <210> 8
 <211> 31
 <212> DNA
 50 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> primer
 55 <400> 8
 ctcggatccg gccccgatca cagcatacgc c 31

~~68~~
69

<210> 9
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 5
 <220>
 <223> primer
 <400> 9
 10 caccgctcga gtcagcattc ttccatctca tcatattgtt g 41
 <210> 10
 <211> 11
 15 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Asp at position 1 is linked to anthranilyl
 20 <223> Xaa at position 6 is aminobutyric acid [C(O)-O]
 <223> Xaa at position 9 is (3-nitro)tyrosine
 25 <400> 10
 Asp Asp Ile Val Pro Xaa Ala Met Xaa Thr Trp
 1 5 10
 30 <210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 35 <220>
 <223> Xaa at position 6 is aminobutyric acid
 <400> 11
 Asp Asp Ile Val Pro Xaa Ala Met Tyr Thr Trp
 40 1 5 10
 <210> 12
 <211> 12
 45 <212> PRT
 <213> HCV Peptide
 <400> 12
 Asp Asp Ile Val Pro Cys Ser Met Ser Tyr Thr Trp
 50 1 5 10

<210> 13
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 5
 <220>
 <223> Xaa is at position 1 is anthranilyl-Asp
 <223> Xaa at position 2 is (d)Glu
 10
 <223> Xaa at position 6 is norvaline[C(O)-O]
 <223> Xaa at position 9 is (3-nitro)tyrosine
 15
 <400> 13
 Xaa Xaa Ile Val Pro Xaa Ala Met Xaa Thr Trp
 1 5 10
 20
 <210> 14
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 25
 <220>
 <223> primer
 <400> 14
 cgcataatggc acctttttacg ctgcagtgtc 30
 30
 <210> 15
 <211> 33
 <212> DNA
 35
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> primer
 40
 <400> 15
 cgcgcgctcg agacactcct ccacgatttc ttc 33
 45
 <210> 16
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 50
 <223> Xaa at position 1 is acetylated-Asp
 <223> Xaa at position 3 is Asp (EDANS)
 <223> Xaa at position 6 is amino butyric acid [C(O)-O]
 55
 <223> Xaa at position 9 is Lys[DABCYL]
 <400> 16
 Xaa Glu Xaa Glu Glu Xaa Ala Ser Xaa
 60 1 5

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 13/118WO	FOR FURTHER ACTION see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, Item 5 below.	
International application No. PCT/CA 03/01634	International filing date (day/month/year) 24/10/2003	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 29/10/2002
Applicant BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 4 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

b. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing:

☒ contained in the international application in written form.

☒ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☐ the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☐ the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box I).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box II).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No.

☒ as suggested by the applicant.

☐ because the applicant failed to suggest a figure.

☐ because this figure better characterizes the invention.

1
☐ None of the figures.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/CA 03/01634

7/22

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K5/08 A61K38/05 A61K38/06 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)

IPC 7 C07K A61K

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.
P,X	WO 03 066103 A (BOEHRINGER INGELHEIM PHARMA) 14 August 2003 (2003-08-14) claims 1,33	1-6,10, 14,15
P,X	WO 03 053349 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 3 July 2003 (2003-07-03) claims	1-6,10, 14,15
P,X	WO 03 064455 A (BOEHRINGER INGELHEIM CA LTD ; GORYS VIDA J (CA); LLINAS-BRUNET MONT) 7 August 2003 (2003-08-07) claims 1,10	1-6,10, 15
X	WO 00 59929 A (BOEHRINGER INGELHEIM CA LTD ; GOUDREAU NATHALIE (CA); GHIRO ELISE ()) 12 October 2000 (2000-10-12)	1-6,10, 14,15
Y	claims 45,54	1-15
	-/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in 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

10 March 2004

Date of mailing of the International search report

29/03/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentkan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tlx 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Beranová, P

PCT/CA 03/01634

22
73

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	BÜCHEN-OSMOND, C.: "00.026. Flaviridae" DATABASE UNIVERSAL VIRUS DATABASE , 'Online! 2003, pages 1-3, XP002273068 Columbia University, Oracle, AZ, USA Retrieved from the Internet: <URL:www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/26 000000.htm> 'retrieved on 2004-03-10!	1-15
Y	-& BÜCHEN-OSMOND, C.: "00.026.0.01. Flavivirus" DATABASE UNIVERSAL VIRUS DATABASE , 'Online! 2003, pages 1-6, XP002274022 Columbia University, Oracle, AZ, USA Retrieved from the Internet: <URL:www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/00 .026.0.01.htm> 'retrieved on 2004-03-10!	1-15
Y	-& BÜCHEN-OSMOND, C.: "00.026.0.02. Pestivirus" DATABASE UNIVERSAL VIRUS DATABASE , 'Online! 2003, pages 1-4, XP002274023 Columbia University, Oracle, AZ, USA Retrieved from the Internet: <URL:www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/00 .026.0.02.htm> 'retrieved on 2004-03-10!	1-15
Y	-& BÜCHEN-OSMOND, C.: "00.026.0.03. Hepacivirus" DATABASE UNIVERSAL VIRUS DATABASE , 'Online! 2003, pages 1-4, XP002274024 Columbia University, Oracle, AZ, USA Retrieved from the Internet: <URL:www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/00 .026.03.htm> 'retrieved on 2004-03-10!	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/CA 03/01634

23
74

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03066103	A	14-08-2003	WO 03066103 A1	14-08-2003
			US 2003195228 A1	16-10-2003
WO 03053349	A	03-07-2003	WO 03053349 A2	03-07-2003
			US 2004038872 A1	26-02-2004
WO 03064455	A	07-08-2003	CA 2369711 A1	30-07-2003
			WO 03064455 A2	07-08-2003
			US 2003181363 A1	25-09-2003
			US 2003224977 A1	04-12-2003
WO 0059929	A	12-10-2000	AU 3548000 A	23-10-2000
			BG 105970 A	31-05-2002
			BR 0009599 A	15-01-2002
			WO 0059929 A1	12-10-2000
			CA 2367127 A1	12-10-2000
			CN 1346365 T	24-04-2002
			CZ 20013467 A3	12-06-2002
			EE 200100516 A	16-12-2002
			EP 1169339 A1	09-01-2002
			HR 20010720 A1	31-12-2002
			HU 0300121 A2	28-06-2003
			ID 30459 A	06-12-2001
			JP 2002542160 T	10-12-2002
			NO 20014857 A	31-10-2001
			PL 350855 A1	10-02-2003
			SK 14072001 A3	05-03-2002
			TR 200102878 T2	21-01-2002
			US 2004002448 A1	01-01-2004
			US 6608027 B1	19-08-2003

24 75

PCT REQUEST

13/118WO

Original (for SUBMISSION) - printed on 18.10.2003 08:47:04 AM

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	PCT / CA 03 / 01634
0-3	International Filing Date	24 OCTOBER 2003 24.10.03
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	RO/CA
0-4	Form - PCT/ROH81 PCT Request	
0-4-1	Prepared using	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.07.2003)
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	Canadian Patent Office (RO/CA)
0-7	Applicant's or agent's file reference	13/118WO
I	Title of Invention	COMPOSITION FOR THE TREATMENT OF INFECTION BY FLAVIVIRIDAE VIRUSES
II	Applicant	
II-1	This person is:	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH
II-5	Address:	Binger Strasse 173 D-55216 Ingelheim Germany
II-6	State of nationality	DE
II-7	State of residence	DE
II-8	Telephone No.	011 49 6132 77 2326
II-9	Facsimile No.	011 49 6132 77 3000
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is:	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	LANARRE, Daniel
III-1-5	Address:	2100 Cunard Street Laval, Québec H7S 2G5 Canada
III-1-6	State of nationality	CA
III-1-7	State of residence	CA
III-1-8	Telephone No.	(450) 682-4640
III-1-9	Facsimile No.	(450) 682-8434

III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is:	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	LAGACE, Lisette
III-2-5	Address:	2100 Cunard Street Laval, Québec H7S 2G5 Canada
III-2-6	State of nationality	CA
III-2-7	State of residence	CA
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence This person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	BERNIER, Louise, G.
IV-1-2	Address:	Boehringer Ingelheim (Canada) Ltd. 2100 Cunard Street Laval, Québec H7S 2G5 Canada
IV-1-3	Telephone No.	(450) 682-4640
IV-1-4	Facsimile No.	(450) 682-8434
IV-1-5	e-mail	lbernier@lav.boehringer-ingelheim.ca
V	Designation of States	
V-1	Regional Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	AP: GE GM KE LS MW ME SD SL SZ TE UG ZM EW and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT EP: AT BE BG CH LI CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL PT RO SE SI SK TR and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR NE SN TD TG and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT

V-2	National Patent (other kinds of protection or treatment, if any, are specified between parentheses after the designation(s) concerned)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BE CA CH LI 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 KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MY NI NO NZ OM PG PH PL PT RO RU SC SD SE SG SK SL SY TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VC VN YE ZA ZN ZW CS
V-4	Precautionary Designation Statement In addition to the designations made under items V-1, V-2 and V-3, the applicant also makes under Rule 4.8(b) all designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) of the State(s) indicated under item V-4 below. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 16 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit.	
V-6	Exclusion(s) from precautionary designations	NONE
VI-1	Priority claim of earlier national application	
VI-1-1	Filing date	29 October 2002 (29.10.2002)
VI-1-2	Number	60/421,900
VI-1-3	Country	US
VI-2	Priority claim of earlier national application	
VI-2-1	Filing date	27 January 2003 (27.01.2003)
VI-2-2	Number	60/442,769
VI-2-3	Country	US
VII-1	International Searching Authority Chosen	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)
VIII	Declarations	Number of declarations
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-

44 DELETED PCT/CA

18.10.2003

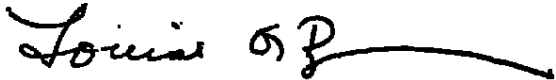
PCT / CA 03 / 01634

4/4

PCT REQUEST

13/118WO

Original (for SUBMISSION) - printed on 18.10.2003 08:47:04 AM

IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	4	-
IX-2	Description (excluding sequence listing part)	39	-
IX-3	Claims	2	-
IX-4	Abstract	1	EEABST00.TXT
IX-5	Drawings	7	-
IX-7a	Sub-total number of sheets	53	
IX-6	Sequence listing part of description	4	-
IX-7	TOTAL	57	
	Accompanying items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-13	Priority document(s)	Item(s) VI-1, VI-2	-
IX-17	PCT-EASY data PAPER OF AMBASSY 4	- ✓	Diskette
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract	1	
IX-20	Language of filing of the international application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative		
X-1-1	Name (LAST, First)	BERNIER, Louise, G.	

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	24 OCTOBER 2003 24.10.03
10-2	Drawings:	✓
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/EP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

78/29

PCT (ANNEX - FEE CALCULATION SHEET)

13/118WO

Original (for SUBMISSION) - printed on 16.10.2003 08:47:04 AM

(This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application)

0	For receiving Office use only			
0-1	International Application No.	POT / CA 03 / 01634		
0-2	Date stamp of the receiving Office	24 OCTOBER 2003 24.10.03		
0-4	Form - PCT/RO/101 (Annex) PCT Fee Calculation Sheet			
0-4-1	Prepared using	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.07.2003)		
0-8	Applicant's or agent's file reference	13/118WO		
2	Applicant	BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH, et al.		
12	Calculation of prescribed fees	fee amount/multiplier	Total amounts (CAD)	
12-1	Transmittal fee T	⇒	200	
12-2-1	Search fee S	⇒	1,552	
12-2-2	International search to be carried out by	EP		
12-3	International fee			
	Basic fee			
	(first 30 sheets) b1	730		
12-4	Remaining sheets	27		
12-5	Additional amount (A)	17		
12-6	Total additional amount b2	459		
12-7	b1 + b2 = B	1,189		
12-8	Designation fees			
	Number of designations contained in international application	98		
12-9	Number of designation fees payable (maximum 5)	5		
12-10	Amount of designation fee (D)	157		
12-11	Total designation fees	785		
12-12	PCT-EASY fee reduction R	-224		
12-13	Total international fee (B+D-R) I	⇒	1,750	
12-17	TOTAL FEES PAYABLE (T+S+H+P)	⇒	3,502	
12-18	Mode of payment	authorization to charge deposit account		
12-20	Deposit account instructions			
	The receiving Office:	Canadian Patent Office (RO/CA)		
12-20-1	Authorization to charge the total fees indicated above.	✓		
12-20-2	Authorization to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above.	✓		
12-20-3	Authorization to charge the fee for priority document.	✓		
12-21	Deposit account No.	cc1127		
12-22	Date	16 October 2003 (16.10.2003)		

2/10

PCT / CA 03 / 01634

2/2

PCT (ANNEX - FEE CALCULATION SHEET)

13/118WO

Original (for SUBMISSION) - printed on 18.10.2003 08:47:04 AM

12-23	Name and signature	BERNIER, Louise, G. <i>Louise G. 12</i>
-------	--------------------	--

VALIDATION LOG AND REMARKS

13-2-7	Validation messages Contents	Yellow! The power of attorney or a copy of the general power of attorney will need to be furnished unless all applicants sign the request form.
13-2-8	Validation messages Payment	Green? Please ensure that you have a valid deposit account with the receiving Office selected.

81

PCT/CA03/01634

PATENT COOPERATION TREATY

PATENT DEPARTMENT

JAN 5 2004

Agent
**NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT**

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

BERNIER, Louise, G.
Boehringer Ingelheim (Canada) Ltd.
2100 Cunard Street
Laval, Québec H7S 2G5
Canada

Scanned / sent to GmbH
Scanned / sent to BPI (full and)
ENF due April 29 / 05

Date of mailing (day/month/year) 02 December 2003 (02.12.03)	
Applicant's or agent's file reference 13/118WO	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/CA03/01634	International filing date (day/month/year) 24 October 2003 (24.10.03)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 29 October 2002 (29.10.02)
Applicant BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH et al	

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(a) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
29 Octo 2002 (29.10.02)	60/421,900	US	26 Nove 2003 (26.11.03)
27 Janu 2003 (27.01.03)	60/442,789	US	26 Nove 2003 (26.11.03)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No. (41-22) 338.88.85	Authorized officer Catherine TOLU (Fax 338-8995) Telephone No. (41-22) 338 9050
--	---

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

BERNIER, Louise, G.
Boehringer Ingelheim (Canada) Ltd
2100 Cunard Street
Laval, Québec H7S 2G5
CANADA

Scanned / sent to GmbH

~~Scanned / sent to BIP (with encl.)~~

COPY EMP due: Apr 129/2005

IMPORTANT NOTICE

Priority date (day/month/year)
29 October 2002 (29.10.2002)

BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH et al

- It is the applicant's sole responsibility to monitor all these time limits.**

Athina Nickitas-Etienne

PATENT DEPARTMENT

PATENT COOPERATION TREATY

JUL 08 2004

Agent: _____

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Rule 61.3)

From the INTERNATIONAL BUREAU
SCHUPO updated
Scanned / sent to BIP (with end)

To:

ENP due:

April 29 / 2005

BERNIER, Louise, G.
Boehringer Ingelheim (Canada) Ltd.
2100 Cunard Street
Laval, Québec H7S 2G5
Canada

ENP due:

Scanned / sent to BIP (with end)

Scanned / sent to BIP (with end)

SCHUPO updated

IMPORTANT INFORMATION

Date of mailing (day/month/year) 30 June 2004 (30.06.2004)		
Applicant's or agent's file reference 13/118WO		
International application No. PCT/CA2003/001634	International filing date (day/month/year) 24 October 2003 (24.10.2003)	Priority date (day/month/year) 29 October 2002 (29.10.2002)
Applicant BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH et al		

1. The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:

EP : AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE,
SI, SK, TR

National : BG, CA, CN, DE, IL, JP, KP, KR, MN, NO, PL, RO, RU, SK, US

2. The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:

AP : GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

National : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BR, BY, BZ, CH, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC,

EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IN, IS, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV,

MA, MD, MG, MK, MW, MX, MZ, NI, NZ, OM, PG, PH, PT, SC, SD, SE, SG, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT,

TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

3. The applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if prescribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary examination report (Article 39(3)(b) and Rule 74.1).

Some offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. For detailed information about the applicable time limits and the acts to be performed upon entry into the national phase before a particular Office, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The entry into the European regional phase is postponed until 31 months from the priority date for all States designated for the purposes of obtaining a European patent.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 338.89.95

Authorized officer:

Sophie Chamot (Fax 338-8995)

Telephone No. (41-22) 338 8061

The demand must be filed directly with the competent International Preliminary Examining Authority or, if two or more Authorities are competent, with the one chosen by the applicant. The full name or two-letter code of that Authority may be indicated by the applicant on the line below:

IPEA/ _____

PCT

CHAPTER II

DEMAND

under Article 31 of the Patent Cooperation Treaty:
The undersigned requests that the international application specified below be the subject of international preliminary examination according to the Patent Cooperation Treaty.

For International Preliminary Examining Authority use only		
Identification of IPEA		Date of receipt of DEMAND
Box No. I IDENTIFICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION		Applicant's or agent's file reference 13/118WO
International application No. PCT/CA03/01634	International filing date (day/month/year) 24/10/2003	(Earliest) Priority date (day/month/year) 29/10/2002
Title of invention COMPOSITION FOR THE TREATMENT OF INFECTION BY FLAVIVIRIDAE VIRUSES		
Box No. II APPLICANT(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.) BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GmbH Binger Strasse 173 D-55218 Ingelheim GERMANY		Telephone No. 011 49 6132 77 2326
		Facsimile No. 011 49 6132 77 3000
		Teleprinter No.
		Applicant's registration No. with the Office
State (that is, country) of nationality: DE		State (that is, country) of residence: DE
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.) LAMARRE, Daniel 2100 Cunard Street Laval, Québec H7S 2G5 CANADA		
State (that is, country) of nationality: CA		State (that is, country) of residence: CA
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.) LAGACÉ, Lisette 2100 Cunard Street Laval, Québec H7S 2G5 CANADA		
State (that is, country) of nationality: CA		State (that is, country) of residence: CA
☐ Further applicants are indicated on a continuation sheet.		

Box No. III AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCEThe following person is ☒ agent ☐ common representativeand ☒ has been appointed earlier and represents the applicant(s) also for international preliminary examination.☐ is hereby appointed and any earlier appointment of (an) agent(s)/common representative is hereby revoked.☐ is hereby appointed, specifically for the procedure before the International Preliminary Examining Authority, in addition to the agent(s)/common representative appointed earlier.Name and address: *(Family name followed by given names; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)*BERNIER, Louise, G.
c/o BOEHRINGER INGELHEIM (CANADA) LTD.
2100 Cunard Street
Laval, Québec H7S 2G5
CANADA

Telephone No.

(450) 882-4840

Facsimile No.

(450) 882-8434

Teleprinter No.

Agent's registration No. with the Office

☐ Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.**Box No. IV BASIS FOR INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION**

Statement concerning amendments:

1. The applicant wishes the international preliminary examination to start on the basis of:

☒ the international application as originally filedthe description ☒ as originally filed☐ as amended under Article 34the claims ☒ as originally filed☐ as amended under Article 19 (together with any accompanying statement)☐ as amended under Article 34the drawings ☒ as originally filed☐ as amended under Article 342. ☐ The applicant wishes any amendment to the claims under Article 19 to be considered as reversed.3. ☐ The applicant wishes the start of the international preliminary examination to be postponed until the expiration of the applicable time limit under Rule 69.1(d).4. ☐ The applicant expressly wishes the international preliminary examination to start earlier than at the expiration of the applicable time limit under Rule 54bis.1(a).

* Where no check-box is marked, international preliminary examination will start on the basis of the international application as originally filed or, where a copy of amendments to the claims under Article 19 and/or amendments of the international application under Article 34 are received by the International Preliminary Examining Authority before it has begun to draw up a written opinion or the international preliminary examination report, as so amended.

Language for the purposes of international preliminary examination: English

☒ which is the language in which the international application was filed.☐ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search.☐ which is the language of publication of the international application.☐ which is the language of the translation (to be) furnished for the purposes of international preliminary examination.**Box No. V ELECTION OF STATES**

The filing of this demand constitutes the election of all Contracting States which are designated and are bound by Chapter II of the PCT.

Box No. VI CHECK LIST

The demand is accompanied by the following elements, in the language referred to in Box No. IV, for the purposes of international preliminary examination:

- | | | |
|--|---|--------|
| 1. translation of international application | : | sheets |
| 2. amendments under Article 34 | : | sheets |
| 3. copy (or, where required, translation) of amendments under Article 19 | : | sheets |
| 4. copy (or, where required, translation) of statement under Article 19 | : | sheets |
| 5. letter | : | sheets |
| 6. other (specify) | : | sheets |

For International Preliminary Examining Authority use only
received not received

- | | |
|--------------------------|--------------------------|
| ☐ | ☐ |
| ☐ | ☐ |
| ☐ | ☐ |
| ☐ | ☐ |
| ☐ | ☐ |
| ☐ | ☐ |

The demand is also accompanied by the item(s) marked below:

- | | |
|--|--|
| 1. ☒ fee calculation sheet | 5. ☐ statement explaining lack of signature |
| 2. ☐ original separate power of attorney | 6. ☐ sequence listing in computer readable form |
| 3. ☐ original general power of attorney | 7. ☐ tables in computer readable form related to a sequence listing |
| 4. ☐ copy of general power of attorney; reference number, if any: | 8. ☐ other (specify): |

Box No. VII 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 demand).

Victoria Heppell

Ogilvy Renault

Victoria Heppell, registration no. 11270, for Louise G. Bernier

For International Preliminary Examining Authority use only

1. Date of actual receipt of DEMAND:

2. Adjusted date of receipt of demand due to CORRECTIONS under Rule 60.1(b):

3. ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of 19 months from the priority date and item 4 or 5, below, does not apply.
☐ The applicant has been informed accordingly.
4. ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the time limit of 19 months from the priority date as extended by virtue of Rule 80.5.
5. ☐ Although the date of receipt of the demand is after the expiration of 19 months from the priority date, the delay in arrival is EXCUSED pursuant to Rule 82.

6. ☐ The date of receipt of the demand is AFTER the expiration of the time limit under Rule 54bis.1(a) and item 7 or 8, below, does not apply.
7. ☐ The date of receipt of the demand is WITHIN the time limit under Rule 54bis.1(a) as extended by virtue of Rule 80.5.
8. ☐ Although the date of receipt of the demand is after the expiration of the time limit under Rule 54bis.1(a), the delay in arrival is EXCUSED pursuant to Rule 82.

For International Bureau use only

Demand received from IPEA on:

PCT

CHAPTER II

FEE CALCULATION SHEET

Annex to the Demand

International application No. PCT/CA03/01634 Applicant's or agent's file reference 13/118WO Applicant BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GmbH CALCULATION OF PRESCRIBED FEES 1. Preliminary examination fee 1530.00 P 2. Handling fee (<i>Applicants from certain States are entitled to a reduction of 75% of the handling fee. Where the applicant is (or all applicants are) so entitled, the amount to be entered at H is 25% of the handling fee.</i>) 129.00 H 3. Total of prescribed fees Add the amounts entered at P and H and enter total in the TOTAL box 1659.00 TOTAL	For International Preliminary Examining Authority use only Date stamp of the IPEA								
MODE OF PAYMENT <table style="width: 100%;"> <tr> <td>☐ authorization to charge deposit account with the IPEA (see below)</td> <td>☐ cash</td> </tr> <tr> <td>☐ cheque</td> <td>☐ revenue stamps</td> </tr> <tr> <td>☐ postal money order</td> <td>☐ coupons</td> </tr> <tr> <td>☒ bank draft</td> <td>☐ other (specify):</td> </tr> </table>		☐ authorization to charge deposit account with the IPEA (see below)	☐ cash	☐ cheque	☐ revenue stamps	☐ postal money order	☐ coupons	☒ bank draft	☐ other (specify):
☐ authorization to charge deposit account with the IPEA (see below)	☐ cash								
☐ cheque	☐ revenue stamps								
☐ postal money order	☐ coupons								
☒ bank draft	☐ other (specify):								
AUTHORIZATION TO CHARGE (OR CREDIT) DEPOSIT ACCOUNT <i>(This mode of payment may not be available at all IPEAs)</i> <table style="width: 100%;"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> ☐ Authorization to charge the total fees indicated above. ☐ <i>(This check-box may be marked only if the conditions for deposit accounts of the IPEA so permit)</i> Authorization to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above. </td> <td style="vertical-align: top;"> IPEA/ _____ Deposit Account No.: _____ Date: _____ Name: _____ Signature: _____ </td> </tr> </table>		☐ Authorization to charge the total fees indicated above. ☐ <i>(This check-box may be marked only if the conditions for deposit accounts of the IPEA so permit)</i> Authorization to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above.	IPEA/ _____ Deposit Account No.: _____ Date: _____ Name: _____ Signature: _____						
☐ Authorization to charge the total fees indicated above. ☐ <i>(This check-box may be marked only if the conditions for deposit accounts of the IPEA so permit)</i> Authorization to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above.	IPEA/ _____ Deposit Account No.: _____ Date: _____ Name: _____ Signature: _____								

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

PATENT DEPARTMENT

SEP 17 2004

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

(Rationalized Report according to the Notice of the President of the EPO published in the OJ11/2001)

Applicant's or agent's file reference 13/118WO	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/CA03/01634	International filing date (day/month/year) 24/10/2003	Priority date (day/month/year) 29/10/2002
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K5/08		SCHUPO updated Scanned / sent to GmbH Scanned / sent to BIPI (with encl.)
Applicant BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH		ENP due: March 19/2005

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 2 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consists of a total of _____ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 26/05/2004	Date of completion of this report 09/09/2004
Name and mailing address of the IPEA/  European Patent Office, Oltsehiner Str. 103 D-10969 Berlin - Germany Tel.: (+49-30) 25901-0 Fax: (+49-30) 25901-840	Authorized officer DE BUNDEL E R J Tel. (+49-89) 2399 2828



**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/CA03/01634

89

I. Basis of the report

The basis of this international preliminary examination is the application as originally filed.

V. Reasoned statement under Rule 66.2(a)(II) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability

In light of the documents cited in the international search report, it is considered that the invention as defined in at least some of the claims does not appear to meet the criteria mentioned in Article 33(1) PCT, i.e. does not appear to be novel and/or to involve an inventive step (see international search report, in particular the documents cited X and/or Y and corresponding claim references).

Traducción

9990

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES
PCT
INFORME DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL
(Artículo 36 y Regla 70 del PCT)

Referencia del expediente del agente o solicitante 13/118WO	PARA ACTUACIONES ADICIONALES Ver notificación de Transmisión del Reporte de Examen Preliminar (Formato PCT/IPEA416)	
Solicitud Internacional No. PCT/CA03/01834	Fecha de presentación Internacional (día/mes/año) 24/10/2003	Fecha de prioridad (día/mes/año) 29/10/2002
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC C07K 5/08		
Solicitante BOEHRINGER INGELHEIM INTERNACIONAL GMBH		

- Este informe de examen preliminar internacional ha sido preparado por esta Administración encargada del Examen Preliminar Internacional y se envía al solicitante en concordancia con el artículo 36.
- Este INFORME consta de una total de 2 hojas, incluyendo la portada
☐ Este informe también se acompaña de ANEXOS, esto es documentos de la descripción, reivindicaciones y/o dibujos que han sido corregidos y que son la base de este informe y/o documentos que contienen rectificaciones realizadas ante esta Administración (Ver Regla 70.16 y Sección 607 de las Instrucciones Administrativas según el PCT)

Estos anexos constan de un total de ____ hojas.

- Este informe contiene indicaciones relativas a los siguientes aspectos:

- | | | |
|------|-------------------------------------|--|
| I | ☒ | Fundamentos del Informe |
| II | ☐ | Prioridad |
| III | ☐ | No se establece concepto relativo a la novedad, nivel inventivo y aplicación industrial |
| IV | ☐ | Carencia de unidad de la invención |
| V | ☒ | Declaración razonada según el artículo 35(2), en relación con la novedad, nivel inventivo o aplicación industrial; citaciones y explicaciones que soportan dicha declaración |
| VI | ☐ | Ciertos documentos citados |
| VII | ☐ | Ciertos defectos de la solicitud internacional |
| VIII | ☐ | Ciertas observaciones respecto a la solicitud internacional |

Fecha de presentación de la demanda 26/05/2004	Fecha de terminación de este reporte 09/09/2004
Nombre y dirección de correo de la autoridad encargada del examen preliminar Oficina Europea de Patentes D-80298 Munich Tel. +49 89 23699 - 0 Tx: 523858 apmu d Fax: +49 89 23699 - 4485	Funcionario Autorizado DE BUNDEL E R J Teléfono No.

Formato PCT/IPEA/408 (portada) (julio 1998)

98
91

I. Base del Informe

La base del presente examen preliminar internacional es la solicitud como originalmente se presentó.

V. Declaración motivada según el Artículo 35(2) en cuanto a la novedad, el nivel inventivo y la aplicación industrial; citas y explicaciones que apoyan esta declaración.

A la luz de los documentos citados en el informe de búsqueda internacional, se considera que la invención tal y como se encuentra definida en por lo menos algunas de las reivindicaciones no parece cumplir con los criterios mencionados en el Artículo 33(1) del PCT, es decir que no parece ser novedosa y/o alcanzar el nivel inventivo (ver informe de búsqueda internacional, en particular los documentos citados X y/o Y y las correspondientes reivindicaciones citadas).

9/av

COMPOSICIÓN PARA EL TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR VIRUS
FLAVIVIRIDAE

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se refiere a compuestos, composiciones, uso y procedimiento para el tratamiento de una infección viral por *Flaviviridae* en un mamífero. Más particularmente, la presente invención se refiere al uso y a un procedimiento de tratamiento que comprende la administración de un compuesto seleccionado de una familia de compuestos de péptidos macrocíclicos.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- La familia de virus *Flaviviridae* está incluida en los virus de cadena de RNA positiva comprendiendo un número de virus humanos patogénicos tales como virus del género hepacivirus, que incluyen hepatitis C, virus del género flavivirus, 15 que incluyen virus de la fiebre del dengue, virus de la encefalitis, virus del Nilo Oeste y virus de la fiebre amarilla, y virus del género pestivirus, que incluyen el virus de la diarrea bovina y el virus de la enfermedad de la frontera, todos los cuales son patógenos animales. Los virus más recientemente descubiertos, virus de la hepatitis G virus (HGV) y virus de la hepatitis GB (GBV-A, B, C), se 20 considera también provisionalmente que son miembros de la familia *Flaviviridae* que pertenecen a un género distinto.

- Los virus del dengue, miembros de la familia de los *Flaviviridae* se transmiten por mosquitos. Hay cuatro serotipos que causan enfermedades humanas extendidas, 25 una de las cuales causa fiebre hemorrágica del dengue, y aproximadamente el 40% de la población que vive en regiones tropicales y subtropicales está en riesgo de infección. Del millón de casos de fiebre hemorrágica por año, aproximadamente el 5% son fatales. Actualmente no hay ninguna vacuna efectiva del fármaco antiviral para proteger contra las enfermedades del dengue.

30

- Los pestivirus tales como el virus de la diarrea bovina (BVDV), el virus de la peste porcina clásica (CSFV) y el virus de la enfermedad de la frontera (BDV) comprenden un grupo de patógenos animales económicamente importantes que afectan al ganado vacuno, cerdos y ovejas. Estos virus RNA de sentido positivo 35 se clasifican como un género separado en la familia *Flaviviridae*.

Los virus GB se han clasificado como miembros de la familia *Flaviviridae*, pero no

93
92

se han asignado a un género en particular en base al análisis de las secuencias genómicas. Estos virus RNA, además de infectar humanos, pueden causar hepatitis de resolución aguda en tamarinos infectados experimentalmente.

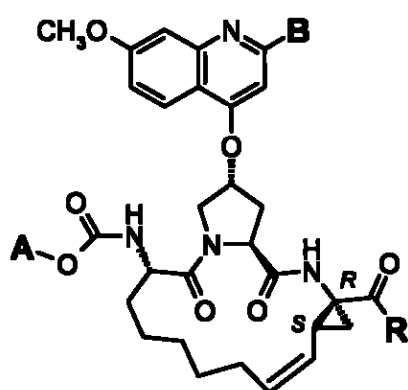
- 5 Los virus dentro de la familia *Flaviviridae* poseen un número de similitudes a pesar de una homología de secuencia general relativamente baja entre sus miembros. El genoma de estos virus es un RNA de cadena simple ($\approx$ 10 kilobases de longitud) que tiene una fase de lectura simple abierta (ORF). El ORF codifica una poliproteína de aproximadamente 3000 aminoácidos que contienen proteínas
- 10 estructurales en su extremo 5' y proteínas no estructurales (NS) en su extremo 3'. La poliproteína se procesa proteolíticamente tanto por virus como por las proteínas codificadas del hospedador en polipéptidos maduros, las cuales son como sigue para HCV: $\text{NH}_2\text{-}\{\text{C-E1-E2-P7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B}\}\text{-COOH}$. La proteína del core o nucleocápsida (C) y las dos glucoproteínas de la
- 15 envoltura (E1 y E2) representan las proteínas estructurales constitutivas de los viriones. Estas proteínas estructurales se siguen por las proteínas no estructurales (NS), al menos algunas de las cuales se piensa que son esenciales para la replicación viral del RNA.
- 20 Las actividades enzimáticas se han adscrito a varias de estas proteínas NS. En particular, la proteína NS3 contiene secuencias similares a la serina proteasa y la helicasa de unión a nucleósido trifosfato de pestivirus y flavivirus. El análisis de los alineamientos de secuencia han predicho la existencia de un dominio serina proteasa similar a tripsina en la región N-terminal de los flavi-, pesti-, hepaci- y
- 25 GB-virus. Las similitudes de secuencia entre dominios proteolíticos NS3 de los virus *Flaviviridae* están bien establecidas (Ryan MD y col. 1998). El dominio proteasa NS3 del HCV comparte una similitud de secuencia de aproximadamente el 77-90% entre los genotipos HCV y una similitud de secuencia de aproximadamente el 25-50% con otros miembros de la familia *Flaviviridae*. Con
- 30 respecto a la estructura tridimensional, las coordenadas atómicas disponibles de las diversas proteasas cristalizadas de HCV y dengue NS3 muestran una arquitectura general que es característica del pliegue relativo a tripsina (Klm y col. 1996, Love y col. 1996; Murthy y col.1999). Muchos estudios han establecido ahora firmemente que la parte N-terminal de la región NS3 codifica
- 35 una serina proteasa que tiene un papel muy específico y de crucial importancia en el procesamiento de la poliproteína en *Flaviviridae*. En hepacivirus, pestivirus y

virus GB, la poliproteína procesadora muestra un requerimiento de la parte final de la proteína NS4A. La proteína NS4A actúa como un cofactor que potencia la eficiencia de escisión de la proteasa NS3 (Lin y col., 1995; Kim y col., 1996; Steinkuler et al., 1996). En flavivirus, este requerimiento para potenciar la actividad de la proteasa NS3 se proporciona por la parte inicial de la proteína NSB2n. La organización y estructura genómica de GBV-B y HCV son similares a pesar del hecho de que la homología de secuencia entre las secuencias de poliproteínas de GBV-B y HCV es de aproximadamente 25-30%.

10 Dadas las similitudes aparentes de virus dentro de la familia de virus *Flaviviridae*, sería deseable desarrollar agentes terapéuticos efectivos contra los virus de *Flaviviridae*, y más particularmente efectivos contra los miembros patógenos de la familia *Flaviviridae*.

15 SUMARIO DE LA INVENCION

De acuerdo con ello, en un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición anti-virus *Flaviviridae* que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable en combinación con un compuesto de fórmula (I):



Fórmula (I)

en la que,

A se selecciona de: alquilo C₁ - C₆ y cicloalquilo C₃ - C₆; y B se selecciona de: fenilo o tiazolilo, ambos de los cuales están opcionalmente sustituidos con un grupo seleccionado de NH(R¹) y NH(CO)R¹, en los que R¹ es alquilo C₁ - C₆; R es OH o un derivado de sulfonamida, o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para

tratar un mamífero infectado con un virus de la familia *Flaviviridae* que comprende administrar al mamífero infectado una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable en combinación con una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I) como se define
5 anteriormente.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de tratar un mamífero infectado con un virus de la familia *Flaviviridae* en el que una composición farmacéutica que comprende una cantidad farmacéuticamente
10 aceptable en combinación con una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I) como se define anteriormente se coadministra con al menos un agente adicional seleccionado de: un agente antiviral, un agente inmunomodulador, un inhibidor del HCV, un inhibidor del VIH, un inhibidor del HAV y un inhibidor del HBV; al mamífero infectado.

15 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para tratar o prevenir una infección de un mamífero causada por un virus de la familia *Flaviviridae* que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable en combinación con una cantidad terapéuticamente efectiva de un
20 compuesto de fórmula (I) y al menos un agente adicional seleccionado de: un agente antiviral, un agente inmunomodulador, un inhibidor del HCV, un inhibidor del VIH, y un inhibidor del HAV y un inhibidor del HBV.

En un quinto aspecto de la presente invención, se proporciona el uso de un
25 compuesto de Fórmula (I) como se define anteriormente, para la elaboración de un medicamento para el tratamiento de infección viral por *Flaviviridae*.

En un sexto aspecto de la presente invención, se proporciona un artículo de elaboración que comprende empaquetar el material contenido con el cual es una
30 composición efectiva para inhibir un virus de la familia *Flaviviridae* y el material empaquetado comprende una etiqueta la cual indica que la composición se puede usar para tratar infección con un virus de la familia *Flaviviridae* y, en el que dicha composición comprende un compuesto de fórmula (I) como se define anteriormente.

35 Mientras no se vinculen con cualquier modo de acción particular, la familia de péptidos macrocíclica representada generalmente por la fórmula (I) como se

expone anteriormente se cree que interactúa en un sitio de unión a sustrato conservado en el dominio proteasa NS3. Los estudios de estructura cristalina confirman que los compuestos macrocíclicos presentes interactúan en el sitio de unión a sustrato con el dominio NS3 del HCV, una región que se conserva
5 funcionalmente entre los virus *Flaviviridae*.

Otros objetos, ventajas y características de la presente invención llegarán a ser más patentes en la lectura de la siguiente descripción no restrictiva de las realizaciones preferidas con referencia a las figuras y tablas acompañantes en las
10 cuales:

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS TABLAS

Las tablas 4-8 proporcionan una comparación de similitud de secuencia entre miembros de la familia *Flaviviridae*.

15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 proporciona una comparación de poliproteínas o virus que pertenecen a la familia *Flaviviridae* (tomada de: Ryan y col., 1998, J. Gen. Virology 79, 947-959);

20 la figura 2 es una comparación de secuencia del dominio de la proteasa NS3 entre los genotipos y subtipos de HCV;

las figuras 3A-B son las curvas IC₅₀ de un compuesto macrocíclico de acuerdo con la fórmula (I) frente al genotipo de las proteasas NS3-NS4A de HCV 1a y 1b, respectivamente;

25 las figuras 4A-B son los gráficos de Dixon y Cornish-Bowden del péptido macrocíclico de la figura 3 frente a las proteasas NS3-NS4A del genotipo 1a de HCV;

las figuras 5A-B son los gráficos de Dixon y Cornish-Bowden del péptido macrocíclico de la figura 3 frente a las proteasas NS3-NS4A del genotipo 1b de
30 HCV;

la figura 6 ilustra la inhibición de la replicación de GBV-B por péptidos macrocíclicos de acuerdo a la replicación por péptidos macrocíclicos de acuerdo a la fórmula (I) en los hepatocitos de tamarino en cultivo;

la figura 7 ilustra gráficamente la inhibición dependiendo de dosis de la replicación
35 GBV-B mediante el péptido macrocíclico III de la figura 6; y

la figura 8 ilustra la estructura cristalina tridimensional de la estructura del péptido NS3-NS4A del HCV formando un complejo con un péptido macrocíclico de

9697

acuerdo con la fórmula (I).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

- 5 A no ser que se defina otra cosa, los términos científicos y tecnológicos y la nomenclatura usada en el presente documento tiene el mismo significado que se entiende comúnmente por una persona de habilidad ordinaria en la técnica a la cual pertenece la invención. Generalmente, los procedimientos para el cultivo de células, infección, procedimientos de biología molecular y similares son
10 procedimientos comunes usados en la técnica. Tales técnicas estándar se pueden encontrar en manuales de referencia tales como por ejemplo Sambrook y col. (1989) y Ausubel y col. (1994).

- El término "*Flaviviridae*" como se usa en el presente documento para designar una
15 familia viral significa que comprende virus del género hepacivirus, tales como la hepatitis C, virus del género flavivirus, tales como los virus de la fiebre del dengue, los virus de la encefalitis, los virus el Nilo Oeste y los virus de la fiebre amarilla, y virus del género pestivirus, tales como el virus de la diarrea bovina y el virus de la enfermedad de la frontera. El virus de la hepatitis G (HGV) y el virus de la
20 hepatitis GB se incluyen también en esta familia viral aunque los géneros de estos virus no se han determinado aún. Además, todos los subtipos y genotipos de los virus anteriormente mencionados están también comprendidos dentro de la familia *Flaviviridae*, incluyendo por ejemplo, HCV 1a, HCV1b, HCV 2a-c, HCV 3a-b, HCV 4a, HCV 5 y HCV 6a,h,d & k, igual que GBV-A, B & C.

- 25 El término "mamífero" como se usa en el presente documento está significando que comprende humanos, igual que mamíferos no humanos los cuales son susceptibles a la infección por un virus *Flaviviridae* incluyendo animales domésticos, tales como vacas, cerdos, caballos, perros y gatos, y ovejas.

- 30 Con respecto a los compuestos de fórmula (I) administrados en el tratamiento de la infección con *Flaviviridae*, el término "alquilo (C_{1-6})" o " $C_1 - C_6$ " como se usa en el presente documento, bien solo o bien en combinación con otro sustituyente, significa sustituyentes alquilo de cadena lineal o ramificada acíclicos que
35 contienen de uno a seis átomos de carbono e incluyen, por ejemplo, metilol, etilol, propilo, isopropilo, butilo, *terc*-butilo, hexilo, 1-metiletilo, 1-metilpropilo, 2-metilpropilo, 1,1-dimetiletilo.

El término "cicloalquilo C₃₋₆" como se usa en el presente documento, bien solo o bien en combinación con otro sustituyente, significa un sustituyente cicloalquilo que contiene de tres a seis átomos de carbono e incluye ciclopropilo, ciclobutilo, 5 ciclopentilo, y ciclohexilo.

El término "sal farmacéuticamente aceptable" significa una sal de un compuesto de formula (I) el cual es, dentro de la panorámica del juicio medico mediante sonda, adecuado para uso en contacto con los tejidos de humanos y animales 10 inferiores sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica, y similares, proporcionales con una relación razonable beneficio/riesgo, generalmente soluble o dispersable en agua o aceite, y efectiva para su uso deseado. El término incluye sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables y sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables. Listas de sales adecuadas se 15 encuentran, por ejemplo, en S.M. Birge y col. J. Pharm. Sci., 1977, 66, pp. 1-19.

El término "sal de adición ácida farmacéuticamente aceptable" quiere decir aquellas sales las cuales retienen la efectividad y las propiedades de las bases libres y las cuales no son desagradables biológicamente o de otro modo, 20 formadas con ácidos inorgánicos tales como ácidos inorgánicos tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido yodhídrico, ácido sulfúrico, ácido sulfámico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares, y ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético, ácido adípico, ácido algnico, ácido ascórbico, ácido aspártico, ácido benzenosulfónico, ácido benzoico, ácido 25 2-acetoxibenzoico, ácido butírico, ácido canfórico, ácido canforsulfónico, ácido cinnámico, ácido cítrico, ácido diglucónico, ácido etanosulfónico, ácido glutámico, ácido glicólico, ácido glucerofosfórico, ácido hemisúlfico, ácido heptanoico, ácido hexanoico, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido 2-hidroxietanosulfónico (ácido isetiónico), ácido láctico, ácido maleico, ácido hidroximaleico, ácido málico, ácido 30 malónico, ácido mandélico, ácido mesitilenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido naftalenosulfónico, ácido nicotínico, 2-naftalenosulfonico, ácido oxálico, ácido pamoico, ácido pectínico, ácido fenilacético, ácido 3-fenilpropiónico, ácido pícrico, ácido pivalico, ácido propiónico, ácido pirúvico, ácido salicílico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido sulfanílico, ácido tartárico, ácido p- 35 toluenosulfónico, ácido undecanoico, y similares.

El término "sal de adición básica farmacéuticamente aceptable" quiere decir

98
99

aquellas sales las cuales retienen la efectividad biológica y las propiedades de los ácidos libres y las cuales no son indeseables biológicamente o de ninguna otra forma, formadas con bases inorgánicas tales como amoníaco o hidróxido, carbonato, o bicarbonato de amonio o un catión metálico tal como sodio, potasio, litio, calcio, magnesio, hierro, cinc, cobre, manganeso, aluminio, y similares. Se prefieren particularmente las sales de amonio, potasio, sodio, calcio, y magnesio. Sales derivadas de bases no tóxicas farmacéuticamente aceptables incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias, compuestos amina cuaternarios, incluyendo aminas sustituidas que se dan en la naturaleza y resinas intercambiadoras de iones básicas, tales como metilamina, dimetilamina, trimetilamina, etilamina, dietilamina, trietilamina, isopropilamina, tripropilamina, tributilamina, etanolamina, dietanolamina, 2-dimetilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, dicitclohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, hidrabamina, colina, betaína, etilenediamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperazina, piperidina, N-etilpiperidina, compuestos tetrametilamonio, compuestos tetraetilamonio, piridina, N,N-dimetilanilina, N-metilpiperidina, N-metilmorfolina, dicitclohexilamina, dibencilamina, N,N-dibenzilfenetilamina, 1-efenamina, N,N'-dibenciletilenodiamina, resinas poliamina, y similares. Las bases no tóxicas particularmente preferidas son isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetilamina, dicitclohexilamina, colina, y cafeína.

El término "derivado sulfonamida" como se usa en el presente documento significa un grupo sulfonamida de la fórmula $\text{-NHSO}_2\text{-R}^2$ en el que R^2 es -alquil(C_{1-8}), -cicloalquil(C_{3-7}) o {-alquil(C_{1-8})-cicloalquil(C_{3-8})}, los cuales se sustituyen opcionalmente de 1 a 3 veces con halo, ciano, nitro, O-alquil(C_{1-8}), amido, amino o fenilo, o R^2 es arilo C_6 o C_{10} el cual se sustituye opcionalmente de 1 a 3 veces con halo, ciano, nitro, alquilo(C_{1-8}), O- alquilo(C_{1-8}), amido, amino o fenilo.

El término "agente antiviral" como se usa en el presente documento quiere decir un agente (compuesto o biológico) que es efectivo para inhibir la formación y/o replicación de un virus en un mamífero. Esto incluye agentes que interfieren bien con mecanismos del hospedador o bien con mecanismos virales necesarios para la formación y/o replicación de un virus en un mamífero. Los agentes antivirales incluyen, por ejemplo, ribavirina, amantadina, VX-497 (merimepodib, Vertex Pharmaceuticals), VX-498 (Vertex Pharmaceuticals), levovirina, viramidina, Ceplene (maxamina), XTL-001 y XTL-002 (XTL Biopharmaceuticals).

El término "agente inmunomodulatorio" según se usa en el presente documento significa aquellos agentes (compuestos o biológicos) que son efectivos en incrementar o potenciar la respuesta del sistema inmune en un mamífero. Los agentes inmunomodulatorios incluyen, por ejemplo, interferones de clase I (tales como interferones α -, β - y omega, tau-interferones, interferones consenso y asialointerferones), interferones de clase II (tales como interferones- γ) e interferones pegilados.

El término "inhibidor de la proteasa NS3 del HCV" como se usa en el presente documento quiere decir un agente (compuesto o biológico) que es efectivo para inhibir la función de la proteasa NS3 del HCV en un mamífero. Los inhibidores de proteasa NS3 del HCV incluyen, por ejemplo, aquellos compuestos descritos en los documentos WO 99/07733, WO 99/07734, WO 00/09558, WO 00/09543 o WO 00/59929, WO 03/064416; WO 03/064455; WO 03/064456 y el candidato Vertex candidato en fase de predesarrollo se identifica como VX-950.

El término "HCV inhibidor" como se usa en el presente documento quiere decir un agente (compuesto o biológico) que es efectivo para inhibir la formación y/o replicación de HCV en un mamífero. Esto incluye agentes que interfieren bien con mecanismos del hospedador o bien con mecanismos virales del HCV necesarios para la formación y/o replicación del HCV en un mamífero. Los inhibidores de HCV incluyen, por ejemplo, agentes que inhiben una diana seleccionada de: proteasa NS3, helicasa NS3, polimerasa HCV, proteasa NS2/3 o IRES. Ejemplos específicos de inhibidores de HCV incluyen ISIS-14803 (ISIS Pharmaceuticals).

El término "inhibidor de polimerasa del HCV" como se usa en el presente documento quiere decir un agente (compuesto o biológico) que es efectivo para inhibir la función de una polimerasa del HCV en un mamífero. Esto incluye, por ejemplo, inhibidores de la polimerasa de NS5B en HCV. Los inhibidores de polimerasa del HCV incluyen no-nucleósidos, por ejemplo, aquellos compuestos descritos en los documentos:

- WO 03/010140 (Boehringer Ingelheim),
- WO 03/010141 (Boehringer Ingelheim),
- WO 03/007945 (Boehringer Ingelheim),
- WO 02/100846 A1 y WO 02/100851 A2 (ambos Shire),
- WO 01/85172 A1 y WO 02/098424 A1 (ambos GSK),
- WO 00/06529 y WO 02/06246 A1 (ambos Merck),

196
101

- WO 01/47883 y WO 03/000254 (ambos Japan Tobacco) y
- EP 1 256 628 A2 (Agouron).

Además otros inhibidores de polimerasa del HCV incluyen también análogos de nucleósidos, por ejemplo, aquellos compuestos descritos en los documentos:

- 5
- WO 01/90121 A2 (Idenix),
 - WO 02/069903 A2 (Biocryst Pharmaceuticals Inc.), y
 - WO 02/057287 A2 y WO 02/057425 A2 (ambos Merck/Isis).

Ejemplos específicos de inhibidores de una polimerasa HCV, incluyen JTK-002/003, JTK-109 (Japan Tobacco), y NM283 (Idenix).

10

El término "inhibidor del VIH" como se usa en el presente documento quiere decir un agente (compuesto o biológico) que es efectivo para inhibir la formación y/o replicación del VIH en un mamífero. Esto incluye agentes que interfieren bien con los mecanismos del hospedador o bien con los mecanismos virales necesarios para la formación y/o replicación del VIH en un mamífero. Los inhibidores del VIH incluyen, por ejemplo, inhibidores nucleosídicos, inhibidores no-nucleosídicos, inhibidores de proteasa, inhibidores de fusión e inhibidores de integrasa.

20 El término "inhibidor del HAV" como se usa en el presente documento quiere decir un agente (compuesto o biológico) que es efectivo para inhibir la formación y/o replicación del HAV en un mamífero. Esto incluye agentes que interfieren bien con los mecanismos del hospedador o bien con los mecanismos virales necesarios para la formación y/o replicación del HAV en un mamífero. Los inhibidores del HAV incluyen vacunas contra la hepatitis A, por ejemplo, Havrix® (GlaxoSmithKline), VAQTA® (Merck) y Avaxim® (Aventis Pasteur).

30 El término "inhibidor del HBV" como se usa en el presente documento quiere decir un agente (compuesto o biológico) que es efectivo para inhibir la formación y/o replicación del HBV en un mamífero. Esto incluye agentes que interfieren bien con los mecanismos del hospedador o bien con los mecanismos virales necesarios para la formación y/o replicación del HBV en un mamífero. Los inhibidores del HBV incluyen, por ejemplo, agentes que inhiben la DNA polimerasa viral del HBV o las vacunas contra el HBV. Ejemplos específicos de inhibidores del HBV incluyen lamivudina (Epivir-HBV®), adefovir-dipivoxil, entecavir, FTC (Coviracil®), DAPD (DXG), L-FMAU (Clevudina®), AM365 (Amrad), Ldt (telbivudina), monoval-LdC (valtorcitabine), ACH-126,443 (L-Fd4C) (Achillion), MCC478 (Eli Lilly), Racivir (RCV), Fluoro-L y D nucleósidos, Robustaflavone, ICN

102

2001-3 (ICN), Bam 205 (Novelos), XTL-001 (XTL), imino-azúcares (nonil-DNJ) (Synergy), HepBzyme; y productos inmunomoduladores tales como: interferón alfa 2b, HE2000 (Hollis-Eden), Theradigm (Epimmune), EHT899 (Enzo Biochem), timosin alfa-1 (Zadaxin®), vacuna de DNA contra el HBV (PowderJect), vacuna de
5 DNA contra el HBV (Jefferon Center), antígeno del HBV (OraGen), BayHep B® (Bayer), Nabi-HB® (Nabi) y anti-hepatitis B (Cangene); y productos de vacuna contra el HBV tales como los siguientes: Engerix B, Recombivax HB, GenHevac B, Hepacare, Bio-Hep B, TwinRix, Comvax, Hexavac.

- 10 El término "interferón de clase I" como se usa en el presente documento quiere decir un interferón seleccionado de un grupo de interferones que se unen todos al receptor tipo I. Esto incluye tanto interferones de clase I producidos naturalmente como interferones de clase I producidos sintéticamente. Ejemplos de interferones de clase I incluyen α -, β -, δ -, omega-interferones, tau-interferones, interferones
15 consenso, asialo-interferones.

El término "interferón de clase II" como se usa en el presente documento quiere decir un interferón seleccionado de un grupo de interferones que se unen todos al receptor tipo II. Ejemplos de interferones de clase II incluyen γ -interferones.

- 20 Además, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" como se usa en el presente documento con respecto a compuestos de fórmula I quiere decir una cantidad del compuesto la cual es efectiva para tratar una infección viral con *Flaviviridae*, es decir para inhibir o al menos reducir la replicación viral, mientras
25 no sea una cantidad que sea tóxica para un mamífero que se esté tratando o una cantidad que pueda por el contrario causar efectos adversos significativos en un mamífero.

- El término "transportador" se usa para hacer referencia a compuestos o mezclas de compuestos para combinación con los presentes compuestos terapéuticos los cuales facilitan la administración de los mismos y/o potencian función de los compuestos terapéuticos para inhibir un virus de la familia *Flaviviridae* incluyendo, por ejemplo, diluyentes, excipientes, coadyuvantes y vehículos. Estabilizadores, colorantes, aromatizantes, agentes antimicrobianos, y similares se pueden combinar
30 también con el compuesto terapéutico. Además, en algunos casos, el pH de la formulación se puede ajustar con ácidos farmacéuticamente aceptables, bases o tampones para potenciar la estabilidad del compuesto formulado o su forma en
35

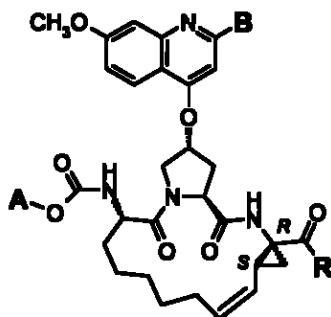
102
103

desarrollo. Otros aditivos adecuados incluyen aquellos con los cuales alguien experto en la técnica estaría familiarizado con que funcionen para incrementar las características de la presente combinación mientras no afectan adversamente su función. Se puede hacer referencia al documento "Remington's Pharmaceutical Sciences", 17^a Ed., Mack Publishing Company, Easton, Penn., 1985, para transportadores que serían adecuados para mezclar con los presentes compuestos terapéuticos. El término "farmacéuticamente aceptable" como se usa en el presente documento con respecto a un compuesto transportador está significando indicar que el transportador es adecuado para administración a un mamífero, es decir es no tóxico y no causa ningún efecto adverso cuando se usa en cantidades apropiadas para funcionar como un transportador.

Realizaciones Preferidas

Composición anti-virus *Flaviviridae*

En una primera realización de la presente invención, se proporciona una composición eficaz para tratar un mamífero infectado con un virus de la familia *Flaviviridae*. La composición comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable en combinación con un compuesto de fórmula (I):



Fórmula (I)

en el que,
A se selecciona de: alquilo C₁ - C₈ y cicloalquilo C₃ - C₆; y B se selecciona de: fenilo o tiazolilo, los cuales ambos se sustituyen opcionalmente con un grupo seleccionado de NH(R¹) y NH(CO)R¹, en los que R¹ es alquilo C₁ - C₈; R es OH o un derivado de sulfonamida, o
una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

En una realización, A de fórmula (I) es un grupo ramificado alquilo C₄ - C₈ o cicloalquilo C₄ - C₆. En una realización preferida, A es ciclopentilo o *tert*-butilo.

En otra realización, B de fórmula (I) es fenilo o un tiazol sustituido en la posición

104

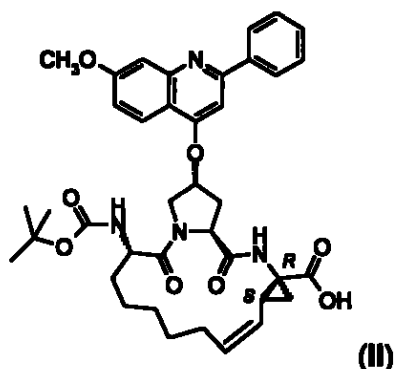
2 con $\text{NH}(\text{R}^1)$ o $\text{NH}(\text{CO}) \text{R}^1$ en los cuales R^1 es un alquilo $\text{C}_1 - \text{C}_4$. En una realización preferida, B es un tiazol sustituido en la posición 2 con $\text{NH}(\text{R}^1)$ o $\text{NH}(\text{CO}) \text{R}^1$ en el cual R^1 es un alquilo $\text{C}_1 - \text{C}_4$. Más preferiblemente, B es 4-tiazol sustituido en la posición 2 con $\text{NH}(\text{CO})\text{CH}_3$ o con $\text{NHCH}(\text{CH}_3)_2$.

5

En una realización preferida adicional, R de fórmula (I) es OH o un grupo sulfonamida de fórmula $-\text{NHSO}_2-\text{R}^2$ en la que R^2 es -alquil(C_{1-8}), -cicloalquil(C_{3-8}), ambos sustituidos opcionalmente 1 ó 2 veces con halo o fenilo, o R^2 es arilo C_6 sustituido opcionalmente 1 ó 2 veces con halo o alquilo(C_{1-8}). Más preferiblemente, R es OH o un grupo sulfonamida en el que R^2 es metilo, ciclopropilo o fenilo.

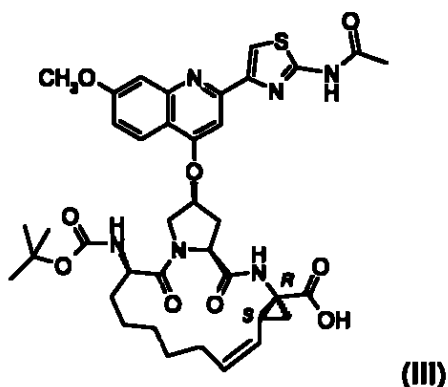
En una realización más preferida, la presente invención se lleva a cabo con un compuesto de fórmula (I) en el cual A es *tert*-butilo y B es fenilo como se expone a continuación en la fórmula del compuesto (II):

15



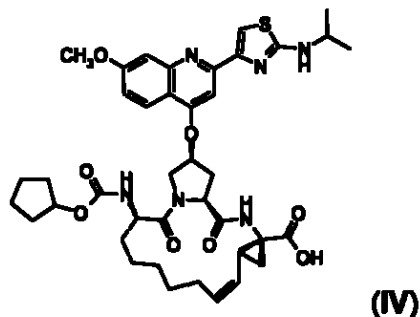
En otra realización más preferida realización, la presente invención se lleva a cabo con un compuesto de fórmula (I) en el cual A es *tert*-butilo y B es 4-tiazol sustituido en su posición 2 con $\text{NH}(\text{CO})\text{CH}_3$ como se expone a continuación en la fórmula del compuesto (III):

20

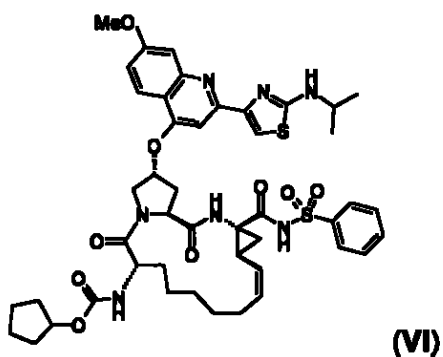


19/1/16

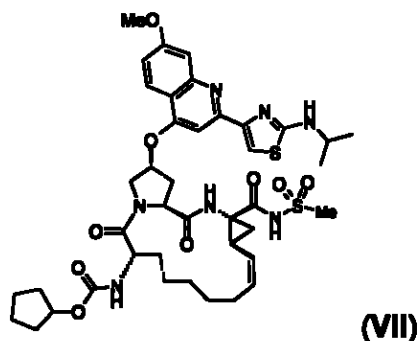
En una realización más preferida, la presente invención se lleva a cabo con un compuesto de fórmula (I) en el cual A es ciclopentilo y B es 4-tiazol sustituido en su posición 2 con NHCH(CH₃)₂ como se expone a continuación en la fórmula del
5 compuesto (IV):



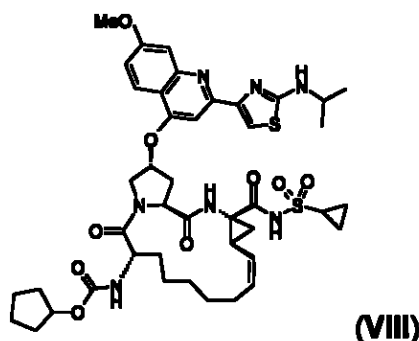
En una realización más preferida, la presente invención se lleva a cabo con un compuesto de fórmula (I) en el cual A es ciclopentilo, B es 4-tiazol sustituido en su posición 2 con NHCH(CH₃)₂, y R es un grupo sulfonamida en el que R² es fenilo como se expone a continuación en la fórmula del compuesto (VI):
10



En una realización más preferida, la presente invención se lleva a cabo con un compuesto de fórmula (I) en el cual A es ciclopentilo, B es 4-tiazol sustituido en su posición 2 con NHCH(CH₃)₂, y R es un grupo sulfonamida en el que R² es metilo como se expone a continuación en la fórmula del compuesto (VII):
15



En una realización más preferida, la presente invención se lleva a cabo con un compuesto de fórmula (I) en el cual A es ciclopentilo, B es 4-tiazol sustituido en su posición 2 con NHCH(CH₃)₂, y R es un grupo sulfonamida en el que R² es ciclopropilo como se expone a continuación en la fórmula del compuesto (VIII):



Procedimiento de Tratamiento

En un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para tratar un mamífero infectado con un virus de la familia *Flaviviridae* que comprende administrar a un mamífero infectado una composición farmacéutica que comprende un transportador farmacéuticamente aceptable en combinación con una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto que tiene fórmula (I), (II), (III), (IV), (VI), (VII) o (VIII) como se definen anteriormente.

De acuerdo con el procedimiento de la presente invención, una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto de fórmula (I), (II), (III), (IV), (VI), (VII) o (VIII) se administra a un mamífero infectado con un virus *Flaviviridae*. Para ser terapéuticamente efectiva, se administra al mamífero infectado una dosificación de entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal por día, preferiblemente entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal por día del compuesto. Típicamente, el procedimiento implicará administración del compuesto de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 veces

167
196

por día o alternativamente, como una infusión continua. Tal administración se puede usar como una terapia aguda o crónica.

Como apreciará alguien experto en la técnica, se pueden requerir las dosis inferiores o superiores que aquellas enumeradas anteriormente. La dosificación específica y los regímenes de tratamiento dependerán de una diversidad de factores, incluyendo la actividad del compuesto específico empleado, la edad, peso corporal, estado de salud general, sexo y dieta del mamífero infectado, el tiempo de administración, la velocidad de excreción, la severidad y el curso de la infección, la predisposición del paciente a la infección y el juicio del médico que trata. Generalmente, el tratamiento se inicia con pequeñas dosificaciones sustancialmente menores que la dosis óptima del péptido. De ahí en adelante, la dosificación se incrementa mediante incrementos pequeños hasta que se alcanza el efecto óptimo bajo las circunstancias. En general, el compuesto se administra más deseablemente a un nivel de concentración que generalmente proporcionará un efecto terapéutico sin causar ningún efecto secundario dañino o deletéreo.

La administración del compuesto terapéutico en el tratamiento de la infección viral con *Flaviviridae* puede ser mediante una cualquiera de varias vías que incluyen administración oralmente, parenteralmente o por medio de un reservorio implantado. El término "parenteral" como se usa en el presente documento incluye técnicas de inyección o infusión subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intra-articular, intrasinovial, intraesternal, intratecal, e intralesional. Se prefieren la administración oral o la administración mediante inyección. Las formas de dosificación oralmente aceptables incluyen, pero no se limitan a, cápsulas, comprimidos, y suspensiones y disoluciones acuosas.

Como se expuso anteriormente, el compuesto de fórmula (I), (II), (III), (IV), (VI), (VII) o (VIII) se administra en combinación con uno o más transportadores farmacéuticamente aceptables. La naturaleza del/de los transportador(es) variará, por supuesto, con la forma de dosificación. De acuerdo con ello, en el caso de los comprimidos para uso oral, los transportadores los cuales se usan comúnmente incluyen lactosa y almidón de maíz. Los agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, se añaden también típicamente. Para la administración oral en una forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando las suspensiones acuosas se administran oralmente, el ingrediente activo se combina con agentes emulsificadores y de suspensión. Si

19/00

se desea, se pueden añadir ciertos agentes edulcorantes y/o aromatizantes y/o colorantes. Las preparaciones inyectables que incluyen suspensiones acuosas u oleaginosas, se formulan de acuerdo a técnicas conocidas en la técnica que usan agentes dispersantes o humectantes adecuados tales como Tween 80 y agentes de suspensión.

- La cantidad del presente compuesto terapéutico que se combina con los materiales transportadores para producir una forma de dosificación única variará dependiendo del hospedador tratado y el modo de administración en particular.
- 10 Una preparación típica contendrá de aproximadamente un 5% a aproximadamente un 95% de compuesto terapéutico (*p/p*). Preferiblemente, tales preparaciones contendrán de aproximadamente un 20% a aproximadamente un 80% de compuesto terapéutico.
- 15 En otro aspecto, una terapia de combinación se contempla en la que el compuesto de fórmula (I), (II), (III), (IV), (VI), (VII) o (VIII), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, se co-administra con a menos un agente adicional seleccionado de: un agente antiviral, un agente inmunomodulador, un inhibidor del HCV, un inhibidor del VIH, un inhibidor del HAV, un inhibidor del
- 20 HBV, y un agente terapéutico efectivo para tratar los síntomas de la infección viral. Ejemplos de tales agentes se conocen bien por aquellos expertos en la técnica. Estos agentes adicionales se pueden combinar con los compuestos de la invención para crear una forma de dosificación farmacéutica única. Alternativamente estos agentes adicionales se pueden administrar
- 25 separadamente al paciente infectado como parte de una forma de dosificación múltiple, por ejemplo, usando un kit. Tales agentes adicionales se pueden administrar al paciente antes de, concurrentemente con, o tras la administración del compuesto terapéutico de fórmula (I), (II), (III), (IV), (VI), (VII) o (VIII), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 30 Cuando se utiliza una terapia de combinación, tanto el presente compuesto como los agentes terapéuticos y/o profilácticos estarían presentes a niveles de dosificación de entre aproximadamente 10 - 100%, y más preferiblemente entre aproximadamente 10 - 80% de la dosificación administrada normalmente en un
- 35 régimen de monoterapia.

Artículo de Fabricación

En un aspecto adicional de la presente invención, se proporciona un artículo de fabricación que comprende material de empaquetamiento contenido en el cual está una composición efectiva para tratar un mamífero infectado con un virus de la familia *Flaviviridae* y el material de empaquetado comprende una etiqueta la cual indica que la composición se puede usar para tratar infección mediante un virus de la familia *Flaviviridae*, en el que dicha composición comprende un compuesto de fórmula (I), (II), (III), (IV), (VI), (VII) o (VIII) como se definen anteriormente.

Virus *Flaviviridae*

Particularmente, las diferentes realizaciones de la presente invención se pueden referir a distintos virus, particularmente virus los cuales son patógenos en mamíferos. Preferiblemente, los compuestos de composiciones anteriormente mencionados se pueden usar para el tratamiento de los virus del género hepacivirus, tales como Hepatitis C. Los ejemplos preferidos de los virus HCV se seleccionan de los genotipos: 1, 2, 3, 4, 5, y 6. Los ejemplos más preferidos de los virus HCV se seleccionan de los genotipos: 2, 3, 4, 5, y 6. Preferiblemente, los virus HCV se seleccionan de los subtipos: HCV 1a, HCV1b, HCV 2a-c, HCV 3a-b, HCV 4a, HCV 5 y HCV 6a,h,d y k. Más preferiblemente, los virus HCV se seleccionan de los subtipos: HCV 1a, HCV 2a-c, HCV 3a-b, HCV 4a, HCV 5 y HCV 6a,h,d y k.

Alternativamente, los compuestos de la invención pueden estar dirigidos contra virus del género flavivirus, tales como los virus de la fiebre del dengue, virus de la encefalitis japonesa, virus del Nilo Oeste y virus de la fiebre amarilla. Preferiblemente, la invención se refiere al tratamiento de la enfermedad viral en un humanos causada por el virus del dengue. Preferiblemente, la invención se refiere al tratamiento de la enfermedad viral en un humano causada por el virus de la encefalitis japonesa. Alternativamente, la invención se refiere al tratamiento de la enfermedad viral en un humano causada por el virus de la fiebre amarilla. Alternativamente, la invención se refiere al tratamiento de la enfermedad viral en un humano causada por el virus del Nilo Oeste.

Además, la invención se puede referir al tratamiento de la enfermedad viral causada por virus del género pestivirus, tales como el virus de la diarrea bovina (BVDV), el virus de la peste porcina clásica (CSFV) y el virus de la enfermedad de la frontera (BDV). Preferiblemente, la invención se refiere al tratamiento de las enfermedades virales en el ganado causadas por BVDV. Alternativamente, la

Invención se refiere al tratamiento de las enfermedades virales en cerdos causadas por CSFV. Alternativamente, la invención se dirige al tratamiento de las enfermedades virales en ovejas causadas por BDV.

- 5 Además, los virus GB también se pueden tratar con la composición de la presente invención. Incluidos en esta familia viral están el virus de la hepatitis G (HGV) y el virus de la hepatitis GB. Los ejemplos preferidos se seleccionan de: GBV-A, B y C. Preferiblemente, la invención se refiere al tratamiento de la enfermedad viral en un humano causada por GBV-C. Alternativamente, la invención se refiere al
- 10 tratamiento de la enfermedad viral en un humano causada por GBV-A. Alternativamente, la invención se refiere al tratamiento de la enfermedad viral en un humano causada por HGV.

- Se ejemplifican realizaciones de la presente invención mediante los siguientes
- 15 ejemplos específicos los cuales no son para constituirse como límites.

EJEMPLOS

Las abreviaturas usadas en los ejemplos incluyen:

- Abu: ácido aminobutírico; DABCYL: ácido 4-((4-(dimetilamino)fenil) azo)benzoico;
- 20 DMEM: Medio Eagle Modificado de Dulbecco; DMSO: dimetilsulfóxido; EDANS: ácido 5-((2-aminoetil)amino)naftaleno-1-sulfónico; HPLC: cromatografía líquida de alta resolución; IPTG: isopropil-b-D-tiogalactósido; LB: Luria-Bertoni (como en caldo LB); Nva: norvalina; PenStrep: penicilina/estreptomicina; PCR: reacción en cadena de la polimerasa; r.m.s.: raíz cuadrada media; RT-PCR: reacción en
- 25 cadena de la polimerasa en tiempo real; y TCEP: clorhidrato de tris(2-carboxietil)fosfina.

Síntesis de Compuestos de Fórmula (I)

- Los compuestos de Fórmula (I) se prepararon usando el protocolo destacado en
- 30 detalle en el documento WO 00/059929, publicado el 12 de octubre de 2000. En particular, se hace referencia a la página 89, ejemplo 34C para la preparación del compuesto compuesto (IV).

- Ejemplo 1 – Inhibición de proteasas NS3-NS4A HCV de diferentes genotipos por compuestos II, III y IV**
- 35

NS3/4A del HCV 1a y 1b

Para la producción de la proteína heterodímera NS3-NS4A del genotipo 1b del

HCV, un cDNA de longitud completa del HCV se clonó mediante RT-PCR usando RNA extraído del suero de un individuo infectado por HCV de genotipo 1b (proporcionado por el Dr. Bernard Willems, Hôpital St-Luc, Montreal, Canadá). La región de DNA que codifica la proteína heterodímera NS3-NS4A se amplificó
5 mediante PCR (cebador directo: 'CTCGGATCCGGCGCCCATCACGGCCTAC3' (Seq ID N°.1) ; cebador inverso: 5'CTCTCTAGATCAGCACTCTTCCATTTCAT CGAA3') (Seq ID N°.2)) del cDNA del HCV de longitud completa y se subclonó en el vector de expresión baculovirus pFastBac™ HTa (Gibco/BRL). Para el genotipo 1a del HCV, el DNA que codifica la proteína heterodimérica NS3-NS4A se
10 amplificó mediante PCR (cebador directo: 5'CTCTCTAGATCAGCACTCTTCCATTTCATCGAACTC3' (Seq ID N°.3); cebador inverso: 5'CTCGGATCCGGCGCCCATCACGGCCTACTCCCAA3' (Seq ID N°.4)) de la cepa H77 del genotipo 1a del HCV (proporcionado por ViroPharma Inc., Exton, PA, US) y subclonado como se describe anteriormente. La clonación en el
15 vector de expresión baculovirus FastBac™ HTa generó una proteína recombinante de fusión que contiene 28 residuos N-terminales adicionales que comprenden una etiqueta de hexahistidina y un sitio de escisión de proteasa rTEV. El sistema de expresión baculovirus Bac-to-Bac™ (Gibco/BRL) se usó para producir el baculovirus recombinante para la expresión de proteínas.

20 Su proteasa heterodímera etiquetada NS3-NS4A se expresó infectando las células de insecto *Sf21* (Invitrogen) a una densidad de 10^5 células/ml con el baculovirus recombinante a una multiplicidad de infección de 0,1-0,2 a 27°C. El cultivo infectado se recogió de 48 a 64 horas más tarde mediante centrifugación a
25 4°C. El sedimento celular se homogenizó en 50 mM de fosfato de sodio, pH 7,5, 40% glicerol (p/v), β -mercaptoetanol 2mM. La proteasa heterodímera His-NS3-NS4A se extrajo después del lisado celular con NP-40 al 1,5%, Tritón X-100 al 0,5%, NaCl 0,5M, y un tratamiento con DNasa. Después de ultracentrifugación (100.000xg durante 30 minutos a 4°C), el extracto soluble se diluyó 4-veces en
30 fosfato sódico 50 mM, pH 7,5, NaCl 0,5 M y cargado en una columna Pharmacia Hi-Trap Ni^{+2} -quelante. La proteína heterodimérica His-NS3-NS4A se eluyó usando un gradiente de imidazol a 50 - 400 mM preparado en fosfato sódico 50 mM, pH 7,5, glicerol al 10% (p/v), NP-40 al 0,1%, NaCl 0,5 M. Se verificó la co-purificación del complejo proteico maduro NS3 y NS4A mediante análisis de
35 bandas Western de las proteínas purificadas que usan un antisuero anti-NS3 y un antisuero anti-NS4A producidos en nuestro laboratorio. El dominio de proteasa NS3 purificado y el péptido $\text{H}_2\text{N-PDREVLYREFDEMEEC-OH}$ (Seq ID N°. 5) se

5

NS3/4A del HCV 2b y 3a

10

Ensayo de Proteasa NS3 del HCV *In Vitro*

35

113

sustrato se escinde entre los residuos de aminobutírico (Abu) y los residuos de alanina. La secuencia DDIVPAbu-AMYTW (Seq ID N°.11) se deriva de la secuencia DDIVPC-SMSYTW (Seq ID N°.12) que corresponde al sitio de escisión natural NS5A/NS5B. La introducción del residuo aminobutírico en la posición P1 resultó en un decrecimiento significativo del producto de inhibición N-terminal mientras que la delección del residuo de serina en la posición P3 incrementó la eficiencia de desactivación interna. La actividad proteasa se ensayó en Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, citrato de sodio 0,25 M, n-dodecil-β-D-maltosido al 0.01%, TCEP 1 mM. El ensayo se llevó a cabo en una placa Microfluor®2 White U-Bottom Microtiter®. Se incubaron 5 μM del sustrato y se incubaron diversas concentraciones del compuesto prueba con 1,5 nM de proteína heterodímera NS3-NS4A del HCV 1a o 1b durante 45 minutos a 23°C bajo agitación suave. El contenido final de DMSO no excedió del 5,25%. La reacción se terminó mediante la adición de una disolución de ácido 2-[N-morfolino]etansulfónico 1 M a pH 5,8.

La fluorescencia se controló usando el lector BMG POLARstar Galaxy de placa de 96 pocillos con un filtro de excitación de 320 nm, y un filtro de emisión de 405 nm. El nivel de inhibición (% inhibición) de cada pocillo conteniendo compuesto prueba se calculó con la siguiente ecuación (FU = unidad de fluorescencia):

$$\% \cdot \text{inhibición} = \left(1 - \left[\frac{FU \cdot \text{pocillo} - FU \cdot \text{blanco}}{FU \cdot \text{control} - FU \cdot \text{blanco}} \right] \right) \cdot 100.$$

Los valores de porcentaje de inhibición calculados se usaron después para determinar CI_{50} , el factor pendiente (n) y la inhibición máxima (I_{max}) mediante la el procedimiento de rutina de regresión no lineal NLIN de SAS usando la siguiente ecuación:

$$\% \cdot \text{inhibición} = \frac{I_{max} \times [\text{inhibidor}]^n}{[\text{inhibidor}]^n + CI_{50}^n}.$$

Determinación de la constante de inhibición (KI) y modo de inhibición

El sustrato depsipéptido fluorogénico antranilil-D(d)EIVP-Nva[C(O)-O] AMY(3-NO₂)TW-OH (Seq ID N°.13) se usó para valorar el mecanismo de inhibición y las constantes de inhibición del compuesto (IV) frente a las proteasas NS3-NS4A del HCV. Se escindió entre los residuos de norvalina y los de alanina. La disolución de trabajo de sustrato se preparó en DMSO a la concentración de 200 μM a partir de la disolución de reserva de sustrato (2 mM en DMSO almacenada a -20°C). El

la concentración final de sustrato en el ensayo variaba de 0,25 a 8 μ M. La constante de inhibición (K_i) para el compuesto (IV) se determinó usando un procedimiento de velocidad en el estado estacionario (Morrisson y col. 1985). La actividad proteasa se determinó controlando el cambio de fluorescencia asociado con la escisión del sustrato fluorogénico desactivado internamente usando un espectrofluorofotómetro SLM-AMINCO® 8100 (emisión a 325 nm y excitación a 420 nm). La reacción de escisión se controló en presencia de 0,25 - 8 μ M de sustrato, 0,3 nM de la proteína heterodímera NS3-NS4A del HCV 1a o 1b y diversas concentraciones del compuesto prueba IV en Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, citrato de sodio 0,25 M, n-dodecil- β -D-maltosido al 0,01%, TCEP 1 mM. Los análisis en el estado estacionario de la inhibición de las proteasas heterodímeras NS3-NS4A del genotipo 1a y del genotipo 1b del HCV se llevaron a cabo usando los procedimientos gráficos de Dixon y Cornish-Bowden. En el procedimiento gráfico de Dixon, la velocidad recíproca $1/V$ se traza frente a la concentración del compuesto prueba a varias concentraciones de sustrato (S). En el procedimiento gráfico de Cornish-Bowden, la razón S/V se traza frente a la concentración del compuesto prueba a varias concentraciones S . Para ambos procedimientos, los puntos se hallan en una línea recta en cada valor de S . Para un compuesto prueba competitivo, el gráfico de Dixon muestra líneas a diferentes valores de S que intersectan en un único punto, mientras el gráfico de Cornish-Bowden muestra líneas paralelas a diferentes valores de S . El K_i se estimó adecuando los datos a la ecuación que describe la unión competitiva:

$$V = \frac{k_{cat} \cdot [E] \cdot [S]}{K_m \cdot (1 + [I]/K_i) + [S]}$$

25 Inhibición de proteasas NS3 del HCV

La actividad de las proteasas NS3/NS4A heterodímeras de los genotipos 1a, 1b, 2b, 2a-c y 3a del HCV se determinó en presencia del compuesto (IV) usando el ensayo fluorogénico enzimático *in vitro*. Las curvas CI_{50} se analizaron individualmente mediante el procedimientos SAS NLIN. Para la proteasa NS3-NS4A del HCV 1a, se obtuvo del análisis de dos lotes del compuesto (IV) un valor promedio de CI_{50} de 4,3 nM. Un valor promedio de CI_{50} de 3,4 nM se obtuvo del análisis de dos lotes del compuesto (IV) en presencia de la proteasa NS3-NS4A del HCV 1b.

115

TABLA 1

CI₅₀ de diferentes inhibidores de proteasa NS3 en HCV de diferentes genotipos

compuesto	HCV-1a	HCV-1b	HCV-3a	HCV-2a-c	HCV-2b
II	7,8 nM	8,9 nM	360 nM	680 nM	1000 nM
III	4,1 nM	4,2 nM	190 nM	490 nM	510 nM
IV	4,3 nM	3,4 nM	280 nM	200 nM	280 nM
V	23 nM	10 nM	930 nM	1800 nM	3000 nM

n/d= no hecho

Las figuras 3A y 3B ilustran las curvas CI₅₀ del compuesto (IV) frente a las proteasas NS3-NS4A del HCV 1a y 1b, respectivamente.

Se encontró que el compuesto (IV) es un compuesto prueba competitivo de las proteasas NS3-NS4A del genotipo 1a y del genotipo 1b del HCV tras la adecuación de los datos a la ecuación que describe la unión competitiva con GraFit y también de los procedimientos gráficos de Dixon y Cornish-Bowden. Para ambas enzimas de genotipos del HCV, el gráfico de Dixon mostró que las líneas a diferentes valores de S están intersectando en un único punto, mientras el gráfico de Cornish-Bowden muestra líneas paralelas a diferentes valores de S. Se obtuvo una K_i de 0,30 nM para el compuesto (IV) del análisis de velocidad del estado estacionario con la proteasa NS3-NS4A del genotipo 1a del HCV, mientras que se obtuvo una K_i de 0,66 nM con la proteasa NS3-NS4A del genotipo 1b del HCV, K_i de 90 nM, 86 nM y 83 nM con el genotipo 3a, el genotipo 2a-c y el genotipo 2b del HCV respectivamente. Las figuras 4 y 5 son los gráficos de Dixon y de Cornish-Bowden del compuesto (IV) frente a las proteasas NS3-NS4A del genotipo 1a y el genotipo 1b del HCV, respectivamente.

Ejemplo 2 – Inhibición del replicón 1a y/o 1b del HCV

Ensayos de replicón de RNA del HCV 1a y 1b basados en células

La replicación del RNA del HCV se manifestó en HCV 1a y 1b que contiene replicón, las líneas celulares derivadas de Huh-7 se desarrollaron en Boehringer Ingelheim (Canadá) Ltd., R & D (documento WO 02/052015). Estas células se usan para establecer un ensayo basado en células de replicación de RNA de HCV sensible a los compuestos prueba candidatos a análisis.

Las células Huh7 que mantienen de forma estable un replicón subgenómico del HCV se establecieron como se describe previamente (Lohman y col. 1999;

116

documento WO 02/052015). Las células se sembraron en un grupo de 96 pocillos de cultivo celular a 1×10^4 células por pocillo en DMEM complementado con FBS al 10%, penstrep (Life Technologies) y geneticina $1 \mu\text{g/ml}$. Las células se incubaron en una incubadora con atmósfera con CO_2 al 5% a 37°C hasta la
5 adición de diversas concentraciones del compuesto prueba.

El compuesto prueba se preparó para usar en el ensayo como sigue. El compuesto prueba en DMSO al 100% se añadió diluido en un medio de ensayo para una concentración final de DMSO del 0,5% y la disolución se sonicó durante
10 15 minutos y se filtró a través de una Unidad de Filtro Millipore de $0,22 \mu\text{M}$. Las diluciones seriadas de los compuestos prueba se prepararon usando medio de ensayo (que contiene DMSO al 0,5%).

El medio de cultivo celular se aspiró de la placa de 96 pocillos conteniendo las
15 células, y la dilución apropiada del compuesto prueba en medio de ensayo se transfirió a los pocillos independientes de la placa de cultivo celular los cuales se incubaron a 37° con CO_2 al 5%.

Tras un periodo de incubación de 3 días, las células se lavaron con PBS y se
20 extrajo el RNA celular total con el RNeasy Mini Kit[®] y Qias shredder[®] de Qiagen. El RNA de cada pocillo se eluyó en $50 \mu\text{L}$ de H_2O . Se cuantificó el RNA mediante la densidad óptica a 260 nm en el espectrofotómetro de ultravioleta-visible Cary 1E[®]. El número de copias del replicón de RNA del HCV se evaluó mediante RT-PCR en tiempo real con el sistema de detección de secuencia ABI Prism[®] 7700. El kit
25 TAQMAN EZ[®] RT-PCR proporciona un sistema para la detección y análisis de RNA. La detección directa del producto de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) de transcripción inversa con ningún procedimiento posterior se lleva a cabo controlando el incremento en fluorescencia de una sonda de DNA marcada con tinción. La secuencia de nucleótidos de ambos cebadores y la
30 sonda se localiza en la región 5' del genoma del HCV. El número de copias del replicón se evaluó después usando una curva estándar hecha con cantidades conocidas de copia del replicón (suplementada con 50 ng de RNA de Huh-7 RNA tipo salvaje) sometidas a ensayo en la misma mezcla de reacción. Los siguientes parámetros de ciclo térmico se usaron para la reacción RT-PCR en el sistema de
35 detección de secuencia ABI Prism[®] 7700. Las condiciones se optimizaron para la detección del HCV. La cuantificación se basa en el ciclo de umbral, donde el gráfico de la amplificación cruza un umbral de fluorescencia definido. La

comparación de los ciclos de umbral proporciona una medida altamente sensible de la concentración modelo relativa en diferentes muestras. El control durante los primeros ciclos, cuando la fidelidad de la PCR está en su punto más alto, proporciona datos precisos para la identificación segura. La concentración
5 modelo relativa se puede convertir a números reales usando la curva estándar del HCV con número de copias conocido.

Adecuación a la curva de CE₅₀ con Procedimientos NLIN de SAS

El nivel de inhibición (porcentaje de inhibición) de cada pocillo que contiene
10 compuesto prueba se calculó con la siguiente ecuación (CN = número de copias de replicón del HCV):

$$\% \cdot \text{inhibición} = \left(\frac{CN \cdot \text{control} - CN \cdot \text{pocillo}}{CN \cdot \text{control}} \right) * 100.$$

15 Los valores de porcentaje de inhibición se usaron después para determinar CE₅₀, factor de pendiente (n) e inhibición máxima (I_{max}) mediante el procedimiento de SAS de rutina de regresión no lineal NLIN usando la siguiente ecuación:

$$\% \cdot \text{inhibición} = \frac{I_{\text{max}} \times [\text{inhibidor}]^n}{[\text{inhibidor}]^n + CE_{50}^n}.$$

TABLA 2

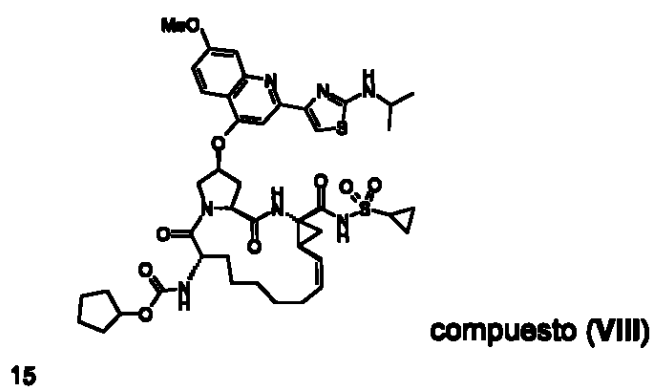
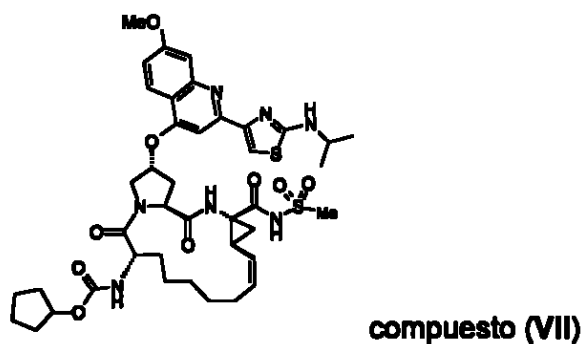
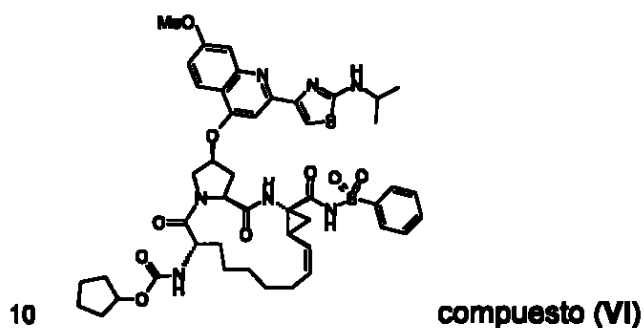
20 **CE₅₀ (nM) de diferentes inhibidores de proteasa NS3 en HCV de diferentes genotipos**

compuesto	HCV replicón 1a	HCV replicón 1b
II	34	27
III	4,5	4,7
IV	2,1	1,0
V	76	39
VI	2,2	3,0
VII	3,2	3,3
VIII	0,7	1,1

En ensayos basados en células del replicón del HCV, el compuesto (IV) mostró una inhibición dependiente de dosis de replicación de RNA del HCV con CE₅₀ de
25 2,1 nM y 1 nM usando células que contenían replicón del genotipo 1a y el

genotipo 1b del HCV, respectivamente. No se observó citotoxicidad a concentraciones mayores de 1000 nM. Estos resultados indican que los compuestos II, III, IV, VI, VII y VIII son inhibidores potentes y específicos de replicación de RNA del HCV basada en células. El compuesto V es un compuesto de una clase diferente pero el cual está relacionado en estructura, y es también activo frente a la proteasa NS3 pero menos potente. Este compuesto se usará más tarde como un control para comparar niveles de actividad inhibitoria.

Los compuestos VI, VII y VIII tienen las siguientes estructuras:



Ejemplo 3 – Inhibición de proteasa NS3/4A del GBV-B por compuestos II, III y IV

119

Clonación de proteasa NS3/NS4A del GBV-B

Se aisló el gen de proteasa NS3/NS4A del GBV-B en su longitud completa de suero de tamarino. El RNA total se aisló del suero usando el kit de extracción de RNA viral de Qiagen® de acuerdo con protocolo estándar. La selección de los
5 cebadores de la transcriptasa reversa y las reacciones de PCR se seleccionaron en base a la secuencia publicada (Muerhoff, A.S y col. 1995) y número de acceso del Banco de Genes U22304 (directa: 5'CGCATATGGCACCTTTTACGCTGCAGTGTC3' (Seq ID N°.14); inversa: 5'CGCGCGCTCGAGACACTCCTCCACGATTCTTC3' (Seq ID N°.15)). El
10 producto RT-PCR amplificado se clonó en el plásmido que contiene etiqueta de polihistidina pET-29 entre los sitios NdeI y XhoI en fase con la etiqueta de polihistidina. Este constructo produce una proteína recombinante con una etiqueta de polihistidina en su extremo C-terminal. El plásmido se transformó en BL21 DE3 pLysS para la expresión de la proteína.

15 El clon pGBV-B de *E. coli* se cultivó en medio LB hasta una densidad celular (DO_{600}) de 0,6 momento en el cual se añadió IPTG a una concentración de 0,2 mM. La inducción se hizo a 23°C durante un periodo de 4 horas. La proteína NS3/NS4A-His del GBV-B se purificó de acuerdo al procedimiento descrito por
20 Zhong y col., 1999. La fracción soluble se purificó en una columna de afinidad quelante de Ni^{2+} de Pharmacia® Hi-Trap usando un gradiente de imidazol de 50 a 400 mM. Esta etapa se siguió por cromatografía de la preparación de proteína en una columna de filtración de gel Superdex® 200. La concentración de la preparación de proteínas se determinó mediante el ensayo de proteínas Bradford.

Ensayo de la proteasa NS3 del GBV-B *in vitro*

El sustrato depsipéptido usado para valorar la inhibición de la actividad proteasa de la proteína heterodímera NS3-NS4A del GBV-B fue Ac-DED(EDANS)EE-
30 Abu[C(O)-O] ASK(DABCYL)-NH₂ (Seq ID N°. 16). Este sustrato se escinde entre los residuos aminobutírico (Abu) y los residuos de alanina y los productos de la reacción se analizaron por HPLC. La actividad proteasa se ensayó en Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, citrato de sodio 0,25 M, 0,01%, TCEP 1 mM. El ensayo se llevó a cabo en una placa Microfluor®2 White U-Bottom Microtiter®. 5 µM del sustrato y
diversas concentraciones de los compuestos prueba se incubaron con 0,4 nM de
35 la proteína heterodímera NS3-NS4A del GBV-B durante 2 horas a 23°C bajo agitación suave. El contenido final de DMSO no excederá el 5,25%. La reacción se terminará mediante la adición de una disolución de ácido 2-[N-

19
120

morfolino]etanosulfónico 1 M a pH 5,8. Para la cuantificación, los productos de escisión y el sustrato se separaron mediante HPLC en una columna Perkin-Elmer® 3x3CR C8. La separación se llevó a cabo eluyendo inicialmente a 3,5 ml/min con una disolución acuosa que contenía ácido fosfórico al 0,05% y SDS 3 mM. Se aplicó después durante 10 minutos un gradiente lineal 0 - 45% de acetonitrilo en ácido fosfórico al 0,05%. La absorbancia se controló a 210 nm.

El ensayo se llevó a cabo en presencia de los compuestos prueba II, III, IV y V. El CI_{50} obtenido para cada compuesto prueba en presencia de proteína NS3-4A del GBV-B se indica en Tabla 3.

TABLA 3

Compuestos	CI_{50} (μM) GBV-B
compuesto (II)	36,5
compuesto (III)	31
compuesto (IV)	16
compuesto (V)	63

El compuesto V es un compuesto de una clase distinta el cual está relacionado en su estructura y es también activo contra la proteasa NS3, pero menos activo que los compuestos II, III y IV. Este compuesto se incluyó para demostrar que el grado de actividad de los compuestos II, III y IV se mantuvo entre HCV y GBV-B.

Inhibición de la replicación de GBV-B en hepatocitos de tamarino en cultivo

Los hepatocitos aislados de tamarinos no infectados se mantuvo en cultivo en medio definido durante varios días. El modelo de cultivo celular fue como se describe en Beames y col. 2000. Tres días después de plaquear, las células se infectaron con plasma que contenía GBV-B. Después de la adsorción viral, los virus se eliminaron y las células se incubaron en presencia y ausencia de compuestos prueba candidatos a una concentración de 10 μM . Las células se recogieron 7 días después de la infección. Los niveles de RNA de GBV-B se cuantificaron a partir del RNA celular total por un ensayo de PCR en tiempo real que usa una combinación cebador-sonda que reconoce una parte del gen de la cápsida del GBV-B (Beames y col. 2000).

A pesar del CI_{50} inferior obtenido en el ensayo enzimático, los resultados

170
121

ilustrados en la figura 6, muestran que se observó una reducción en los niveles de RNA viral de más de 3 a nivel logarítmico cuando las células se incubaron en presencia del compuesto III y una reducción de 2 a nivel logarítmico en presencia del compuesto V (cuando los resultados se expresaron como g.e. (equivalentes de genoma)/µg de RNA). Los resultados obtenidos con este ensayo de replicación viral más representativo demuestran que estos compuestos son antivirales efectivos para reducir la producción de virus GBV-B.

Ejemplo 4 – Comparación de secuencias de proteasas NS3 en la familia *Flaviviridae*

Se obtuvieron las secuencias de proteasas de otros virus de la familia de virus *Flaviviridae* a partir de un análisis BLAST (Altschul y col.1997) NCBI seguido por la notificación de taxonomía. La búsqueda de secuencias de proteasa se hizo usando criterios específicos que recuperan todas las secuencias de *Flaviviridae* secuencias con similitud a la proteasa de HCV excluyendo las propias secuencias del HCV. Cuando fue posible se usó una secuencia "NP_" de NCBI para representar un grupo particular de virus relacionados ya que estas secuencias "NP_" son secuencias "de referencia" (RefSeq). Además, cuando no se conocían, los extremos N-terminal y C-terminal NS3 para las proteasas se determinaron a partir de la similitud con la proteasa NS3 del HCV.

Los alineamientos de secuencia de proteasas para las seis cepas del HCV contra los diferentes grupos de virus se llevaron a cabo usando ALIGNX (VectorNTI[®]) basado en CLUSTALW (Thompson, JD, y col., 1994).

A partir de estos alineamientos, el porcentaje de similitud se calculó entre todas las secuencias individuales y se expresó en las tablas 4-8. La similitud se basó en los siguientes grupos de aminoácidos; [ILVM], [FWY], [KR], [DE], [GA], [NQ], [ST].

La tabla 4 representa identidades y similitudes entre varios genotipos y subtipos del HCV. Alguien puede ver que las identidades varían entre 70% - 89% mientras que las similitudes varían entre 77% - 95% demostrando que la proteasa NS3 se conserva altamente entre los HCV. Además, a partir del alineamiento de secuencia de aminoácidos del dominio proteasa NS3 de diversos genotipos de HCV representativos (figura 2) y la localización de los residuos conservados en la estructura tridimensional (figura 8), alguien puede ver que los residuos en el sitio activo se conservan altamente entre genotipos y subtipos de HCV.

12/1
122

La tabla 5 es un análisis de las similitudes entre los dominios de la proteasa NS3 del virus GB y de la proteasa del virus HCV. Las similitudes varían entre 43 - 49%, mientras que las similitudes entre los dominios de NS3 entre el HCV y los pestivirus varían del 25 al 30% (tabla 6). Las similitudes entre el HCV y el virus del dengue varían también alrededor del 30% (tabla 7), igual que la similitud entre el HCV y los Flavivirus (tabla 8).

En contraste, la tabla 9 muestra que las similitudes entre el dominio de la proteasa NS3 de HCV y la proteasa del citomegalovirus humano (HCMV) gira alrededor del 20%. El HCMV es un virus de los herpes virus y tiene una serina proteasa que tiene una tríada catalítica diferente de las proteasas *Flaviviridae*. La proteasa del virus HCMV no se considera por lo tanto que es similar a las proteasas NS3 de *Flaviviridae*. Este contraste se ilustrará adicionalmente cuando se hace comparación de las similitudes entre el aminoácido en contacto con nuestros inhibidores en *Flaviviridae* y HCMV.

Ejemplo 5 – Estudios del cristal estructural tridimensional

Para analizar adicionalmente las similitudes entre *Flaviviridae*, se obtuvo una estructura cristalina de la proteasa NS3 del HCV formando un complejo con un inhibidor, y los aminoácidos directamente en contacto con el inhibidor se analizaron en otros *Flaviviridae* para valorar los grados de similitud de estos importantes puntos de contacto.

Se obtuvo un co-cristal de la proteasa NS3-péptido NS4A formando un complejo con el compuesto macrocíclico (II) que produjo difracción en los rayos X a una resolución de 2,75 Å. El compuesto macrocíclico II se encontró en el sitio activo de la proteasa NS3 y se definió claramente en la diferencia de densidad de electrones. Esta estructura revela detalles moleculares de como el compuesto prueba interacciona con el sitio activo y proporciona entendimiento adicional en el mecanismo de inhibición de la proteasa NS3 del HCV.

La estructura del complejo de la proteasa NS3 con el compuesto prueba II (figura 8) define mejor el sitio de unión de las presentes series de compuestos prueba basados en sustrato. A partir de esta estructura del co-complejo, los residuos directamente en contacto con el compuesto prueba es decir dentro de 3 Å (H57,

122
123

G137, S139, A156 y A157) son indicativos del sitio activo, como se predice mediante el modo competitivo de inhibición, y por la conservación entre secuencias representativas de genotipos y varios subtipos de HCV en este sitio.

- 5 Otros residuos en contacto dentro de 4 Å del compuesto prueba se enumeran en la tabla 10. Los análisis de comparación revelan que estos aminoácidos se conservan altamente entre *Flaviviridae* variando entre un 59% y un 76%. La conservación de estos residuos entre *Flaviviridae* es indicativa de que los inhibidores de la proteasa NS3 del HCV inhibirían también otros miembros de la
- 10 familia de virus *Flaviviridae*. En contraste, el nivel de similitud del sitio catalítico de la proteasa del HCMV y los puntos de contacto de la tabla 10 están en el mismo intervalo que la similitud para la proteasa entera ($\approx 20\%$) ilustrando una vez más el hecho de que otra serina proteasa no de *Flaviviridae* no es diana de los compuestos de fórmula (I).
- 15
- Otros estudios estructurales llevados a cabo entre los dominios de proteasa del HCV y el virus del dengue han mostrado que todas las seis cadenas del sitio de unión del inhibidor del dominio C-terminal están fuertemente conservadas y son de longitud comparable. La superposición de 68 átomos de carbono α del dominio
- 20 C-terminal de la proteasa Den2 (residuos 87-167) y del HCV incluyendo la mayoría de los residuos en la tabla 10 (residuos 69-189) produce desviación a.r.m.s. de 0,9 Å. (Murthy y col., 1999).

Discusión

- 25 Los virus dentro de la familia *Flaviviridae* poseen un número de similitudes (figura 1) a pesar de una homología de secuencia general relativamente baja entre sus miembros (tablas 4-8). En particular, la proteína NS3 contiene secuencias con similitud a la proteasa y la helicasa de unión a nucleósido trifosfato de pestivirus y flavivirus. El dominio de la proteasa NS3 del HCV comparte una similitud de
- 30 secuencia de aproximadamente 77-95% entre los genotipos del HCV (figura 1) y una similitud de secuencia de aproximadamente 25-50% con otros miembros de la familia *Flaviviridae* (tablas 4-8). Además, la organización y estructura genómicas del GBV-B y el HCV son similares a pesar del hecho de que la homología de secuencia entre las secuencias de poliproteína del GBV-B y el HCV es de
- 35 aproximadamente 25 - 30%. Esta baja similitud está sin embargo superada por el

hecho de que los residuos que vienen en contacto con el inhibidor están altamente conservados en el dominio proteasa de *Flaviviridae*, una fuerte indicación de que esta familia de compuestos se uniría también a otros *Flaviviridae*. La actividad del compuesto compuesto IV obtenido contra GBV-B es una demostración positiva de esa hipótesis.

Con respecto a la estructura tridimensional, los coordinados atómicos disponibles de las diversas proteasas NS3 cristalizadas de NHV y dengue mostraron una arquitectura general que es característica del pliegue similar a tripsina. Muchos estudios han establecido ahora firmemente que la parte N-terminal de la región NS3 codifica una serina proteasa que tiene un papel muy específico y de vital importancia en el procesamiento de las poliproteínas dentro de *Flaviviridae*.

Todos los resultados producidos en los experimentos anteriores tienden a sostener el punto de vista de que los compuestos de fórmula (I) son activos contra miembros de la familia de virus *Flaviviridae*:

- 6 compuestos relacionados han mostrado ser activos contra el HCV 1b y tienen actividad similar contra el HCV 1a (tabla 2);
- 3 de estos compuestos se probaron también contra los HCV 3a, 2a-c y 2b y se encontró también que son activos (tabla 1);
- estos 3 mismos compuestos se probaron en el ensayo enzimático contra el GBV-B y se halló que son activos (tabla 3);
- 1 de estos compuestos se probó en cultivo celular contra la replicación de GBV-B en células de tamarino y se halló que es activo (figura 6);
- 1 de estos compuestos manifestó un modo de unión que se sitúa en una región altamente conservada entre todos los miembros de *Flaviviridae* (figura 8);
- estudios han demostrado fuerte similitud estructural y funcional entre las proteasas NS3 del HCV y el virus del dengue.

Dadas todas las similitudes de virus dentro de la familia de virus *Flaviviridae*, parece altamente probable que los compuestos de fórmula (I) son efectivos contra miembros de la familia de virus *Flaviviridae*, y más particularmente, efectivos contra los miembros patógenos de la familia *Flaviviridae*.

REFERENCIAS

- Altschul S.F. y col. 1997, Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402

175
124

- Ausubel y col. 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, Nueva York
- Beames, B. y col. 2000, J. Virol., 74, 11764-11772
- Butriewicz, N. y col. 2000, J. Virol., 74, 4291-4301
- Kim JL, y col. 1996, Cell;87:343-355.
- 5 - Lin, C. y col. 1995, J. Virol. 69, 4373-4380
- Lohmann y col. 1999, Science 285, 110
- Love R. A. y col. 1996 Cell 87, 331-342
- Morrison, J.F. y Stone, S.R. 1985, Mol. Cell. Biophys. 2, 347-368
- Muerhoff, A.S. y col. 1995 J. Virol.69, 5621-5630
- 10 - Murthy, H. M. y col. 1999, J. Biol. Chem. 274(9), 5573-5580
- Remington, 1995, The Science and Practice of Pharmacy
- Ryan, M. D. y col. 1998 J. Gen. Virol. 79, 947-959
- Sambrook y col. 1989, Molecular Cloning- A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Labs
- 15 - Scarselli, E., y col. 1997, J. Virol. 71, 4985-4989
- Steinkuler, C. y col. 1996, J. Biol. Chem. 271, 6367-6373.
- Thompson, y col. 1994, Nucleic Acids Res. 22: 4673- 4680
- Zhong, W. y col. 1999, Virology 261, 216-226

TABLA 4 - IDENTIDADES Y SIMILITUDES ENTRE PROTEASAS NS3

	1_1a	1_1b	2_3a	2_3b	3_3a	3_10a	4_4a	5_3a	6_6a	6_11a
1_1a		I = 88% S = 95%	I = 70% S = 81%	I = 71% S = 80%	I = 76% S = 84%	I = 72% S = 82%	I = 81% S = 86%	I = 80% S = 90%	I = 81% S = 88%	I = 79% S = 88%
1_1b			I = 71% S = 82%	I = 72% S = 82%	I = 79% S = 87%	I = 76% S = 85%	I = 83% S = 88%	I = 80% S = 91%	I = 82% S = 90%	I = 81% S = 90%
2_3a				I = 67% S = 95%	I = 74% S = 81%	I = 71% S = 81%	I = 72% S = 82%	I = 71% S = 82%	I = 74% S = 88%	I = 74% S = 88%
2_3b					I = 70% S = 78%	I = 69% S = 77%	I = 72% S = 81%	I = 71% S = 81%	I = 73% S = 82%	I = 71% S = 82%
3_3a						I = 89% S = 93%	I = 73% S = 82%	I = 76% S = 83%	I = 79% S = 87%	I = 73% S = 83%
3_10a							I = 73% S = 82%	I = 76% S = 82%	I = 77% S = 85%	I = 73% S = 82%
4_4a								I = 79% S = 85%	I = 79% S = 86%	I = 76% S = 83%
5_3a									I = 82% S = 89%	I = 78% S = 87%
6_6a										I = 80% S = 88%

Se obtuvo similitud de secuencias definiendo la siguiente similitud de aminoácidos [LYS], [FWY] [DK] [DE], [QA] [NQ],

dominios (180 aminoácidos) de los diferentes genotipos y subtipos

126

126
127

**TABLA 5 - PORCENTAJE DE SIMILITUD DEL DOMINIO PROTEASA NS3 DEL HCV (181 AA)
CON PROTEASAS GBNS3 DE LA FAMILIA FLAVIVIRIDAE**

	GBV-B NP_05693 1	HepG NP_04357 0	GBV-A NP_04501 0	GBV-C NP_05944 6
1a AF271632	45	49	44	48
1b D90208	46	49	45	48
2a D00944	44	48	45	47
2b D10988	46	47	45	46
3a D17763	44	45	43	45
10a D63821	43	45	45	46
4a Y11604	44	46	45	45
5a Y13184	46	48	44	46
6a Y12083	45	47	46	46
11a D63822	44	49	45	48

Matriz: [ILVM], [FWY], [KR], [DE], [GA], [NQ], [ST]

128
125

**TABLA 6 - PORCENTAJE DE SIMILITUD DEL DOMINIO PROTEASA NS3 DEL HCV (181 AA)
CON PROTEASAS NS3 DE PESTIVIRUS NS3 DE LA FAMILIA FLAVIVIRIDAE**

	Pesti 1 NP_04093 7	BVDV2 NP_04473 1	Pesti 2 NP_07535 4	Pesti 3 NP_62006 2
1a AF271632	28	28	28	28
1b D90208	28	28	28	28
2a D00944	26	26	26	26
2b D10988	26	25	26	26
3a D17763	29	28	28	28
10a D63821	28	27	28	28
4a Y11604	28	28	28	28
5a Y13184	29	29	29	29
6a Y12083	30	29	29	29
11a D63822	29	28	29	29

BVDV-2= virus de la diarrea viral bovina

179
128

**TABLA 7 - PORCENTAJE DE SIMILITUD DEL DOMINIO PROTEASA NS3 DEL HCV (181 AA)
CON PROTEASAS NS3 DEL FLAVIVIRUS LLEVADO POR MOSQUITO DE LA FAMILIA
FLAVIVIRIDAE**

	Dengue 1 NP_059433	Dengue 2 NP_056776	Dengue 3 NP_040961	Dengue 4 NP_073286
1a AF271632	26	27	28	29
1b D90208	29	29	30	31
2a D00944	27	29	28	28
2b D10988	29	29	29	29
3a D17763	27	29	29	29
10a D63821	28	29	30	29
4a Y11604	27	27	28	30
5a Y13184	29	30	31	30
6a Y12083	29	30	30	31
11a D63822	29	29	30	30

TABLA 6 - PORCENTAJE DE SIMILITUD DEL DOMINIO PROTEASA NS3 DEL HCV (181 AA) CON PROTEASAS NS3 DEL FLAVIVIRUS DE LA FAMILIA FLAVIVIRIDAE

	WNV NP_041724	JEV NP_059434	Kunjin POLG_KUNJM	YFV NP_041726	MVEV NP_051124
1a AF271632	29	30	29	29	30
1b D90208	29	31	30	29	31
2a D00944	28	28	28	28	28
2b D10988	29	30	29	30	30
3a D17763	27	27	27	28	28
10a D63821	27	27	27	28	27
4a Y11604	28	29	29	29	30
5a Y13184	29	30	30	30	30

138

6a Y12083	29	30	30	28	30
11a D63822	28	29	28	29	29

- WVN= virus del Nilo Oeste
JEV= virus de la encefalitis japonesa
Kunjn= virus Kunjin
YFV= virus de la fiebre amarilla
5 MVEV= virus de la encefalitis del valle Murray

[Handwritten signature]

34
132

TABLA 9 – PORCENTAJE DE SIMILITUD DEL DOMINIO PROTEASA DEL HCV (181 AA) CON EL DOMINIO PROTEASA DEL CITOMEGALOVIRUS HUMANO (256 AA)

	proteasa del HCMV
1a AF271632	20
1b D90208	20
2a D00944	21
2b D10988	20
3a D17763	18
10a D63821	18
4a Y11604	19
5a Y13184	19
6a Y12083	19
11a D63822	19

TABLA 10 – DIFERENCIAS DE AMINOÁCIDOS EN EL DOMINIO DE UNIÓN A INHIBIDOR DE LA PROTEASA NS3 ENTRE VIRUS DE LA FAMILIA FLAVIVIRIDAE (DENTRO DE LOS 4 Å DEL INHIBIDOR)

HCV40_1b	56	57	79	81	123	132	135	136	137	138	139	154	155	156	157	158	168	%
	Y	H	D	D	R	V,I	L	K	G	S	S	F	R	A	A	V	D	Sim
Todos los genotipos del HCV (140)			E ₂₀		T ₆ K ₁	L ₄₈ L ₂₆											Q ₆ E ₄	88- 100
GBV _e	F/Y +	H +	A/S	D +	K/Y +	V/L/M +	F/A	R/K +	G +	S +	S +	L/F =	V/T	S/A =	V/A =	L/R +	R	59 76 _b
PESTI	D	H +	M	D +	T	L +	L +	K +	G +	W	S +	V	K +	V	G +	G	K	53
Flavivirus / llevado por mosquito (Dengue)	W +	H +	K	D +	P/N/L	L +	K/S	P	G +	T +	S +	Y +	G	N	G +	V +	A	59
Flavivirus llevado por mosquito	W +	H +	K	D +	P/N/	L +	P	X	G +	T +	S +	Y +	G	N	G +	V +	A	59
Herpesvirus HCMV	V	R	V	E +	T	G	A	V	D	A	S +	S	V	D	A +	L +	R	23

- 42 -

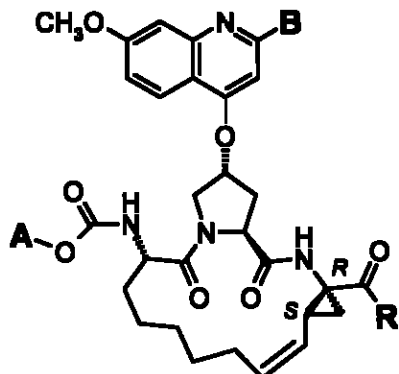
[Handwritten signature]

HCV40_1b	Secuencia de un aislado de HCV 1b que se usó como referencia para este análisis
n	número de secuencias de todos los genotipos de HCV que se usan en el estudio
A _n	número de secuencias de que contienen esta modificación
% Sim	% de similitud
+	Similitud de acuerdo con la matriz [ILVM], [FWY], [KR], [DE], [GA], [NQ], [ST]
=	Similitudes que son únicas para el miembro GBV-B del grupo GBV
GBV _a	el aminoácido marcado es el residuo encontrado para la proteasa NS3 del GBV-B
b	porcentaje de similitud para GBV-B

138
135

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto de fórmula (I):



Fórmula (I)

5 en la que,

A se selecciona de: alquilo C₁ - C₈ y cicloalquilo C₃ - C₆; y B se selecciona de: fenilo o tiazolilo, ambos de los cuales están opcionalmente sustituidos con un grupo seleccionado de NH(R¹) y NH(CO)R¹, en los que R¹ es alquilo C₁ - C₈; R es OH o grupo sulfonamida de la fórmula -NHSO₂-R² en el que R² es -alquil(C₁₋₈), -cicloalquil(C₃₋₇) o {-alquil(C₁₋₈)-cicloalquil(C₃₋₈)}, los cuales se sustituyen opcionalmente de 1 a 3 veces con halo, ciano, nitro, O-alquil(C₁₋₈), amido, amino o fenilo, o R² es arilo C₆ o C₁₀ el cual se sustituye opcionalmente de 1 a 3 veces con halo, ciano, nitro, alquilo(C₁₋₈), O-alquilo(C₁₋₈), amido, amino o fenilo;

10 o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma;

15 para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la infección viral con *Flaviviridae* en un mamífero.

2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que A de fórmula (I) es un grupo ramificado alquilo C₄ - C₈ o cicloalquilo C₄ - C₆; B de fórmula (I) es fenilo o un tiazol sustituido en la posición 2 con NH(R¹) o NH(CO) R¹ en el cual R¹ es un alquilo C₁ - C₄; y R es OH o un grupo sulfonamida de formula -NHSO₂-R² en el que R² es -alquil(C₁₋₈), -cicloalquil(C₃₋₈), tanto opcionalmente sustituido 1 ó 2 veces con halo como con fenilo, o R² es arilo C₆ opcionalmente sustituido desde 1 ó 2 veces con halo o alquilo(C₁₋₈).

20

25

3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que A es ciclopentilo o *terc*-butilo; B es un tiazol sustituido en la posición 2 con NH(R¹) o NH(CO) R¹ en el cual R¹ es un alquilo C₁ - C₄; y R es OH o un grupo sulfonamida en el

136

que R^2 es metilo, ciclopropilo o fenilo.

4. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho compuesto es un compuesto de fórmula (I) en el que R es OH.
5
5. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que R es un grupo sulfonamida de formula $-NH\text{SO}_2-R^2$ en el que R^2 es -alquil(C_{1-6}), -cicloalquil(C_{3-6}), ambos opcionalmente sustituidos 1 ó 2 veces con halo o fenilo, o R^2 es arilo C_6 opcionalmente sustituido desde 1 ó 2 veces con halo o alquilo(C_{1-6}).
10
6. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que A es ciclopentilo; B es un tiazol sustituido en su posición 2 con $NHCH(CH_3)_2$; y R es OH o un grupo sulfonamida en el que R^2 es metilo, ciclopropilo o fenilo.
15
7. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho mamífero es un humano, y dicho *Flaviviridae* se selecciona del grupo constituido por virus de la fiebre amarilla, virus del Nilo Oeste, virus de la fiebre del dengue, virus de la encefalitis japonesa, virus GB A o C y virus de la hepatitis G.
20
8. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho mamífero es un bóvido doméstico, y dicho *Flaviviridae* se selecciona del BVDV, virus de la enfermedad de la frontera.
25
9. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho mamífero es un cerdo, y dicho *Flaviviridae* es la peste porcina clásica.
30
10. El uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicho mamífero es un humano, y dicho *Flaviviridae* es virus de la hepatitis C.
11. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho mamífero es un humano, y dicho *Flaviviridae* se selecciona del grupo constituido por virus de la fiebre amarilla, virus del Nilo Oeste, virus de la fiebre del dengue, virus de la encefalitis japonesa, virus GB A o C y virus de la hepatitis G.
35

136
(31)

12. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho mamífero es un bóvido doméstico, y dicho *Flaviviridae* se selecciona del BVDV, virus de la enfermedad de la frontera.
- 5
13. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicho mamífero es un cerdo, y dicho *Flaviviridae* es la peste porcina clásica.
14. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho virus *Flaviviridae* comprende una proteasa NS3 que comprende
- 10 residuos de aminoácidos seleccionados de: H57, G137, S139, A156 y A157.
15. Un artículo de fabricación que comprende empaquetar el material contenido en el cual está una composición efectiva para inhibir un virus de la familia *Flaviviridae* y el material de empaquetamiento comprende una etiqueta la cual
- 15 indica que la composición se puede usar para tratar infección por un virus de la familia *Flaviviridae* y, en el que dicha composición comprende un compuesto de fórmula (I) como se define en la reivindicación 1.

20

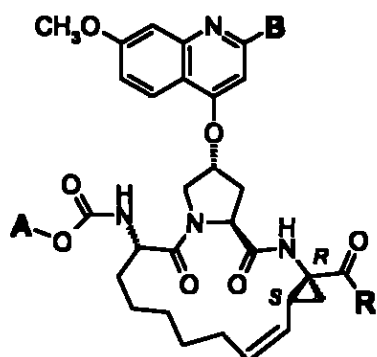
25

30

COLO 09255-841-016-0
PRP/WPCL9255/ID-000315

RESUMEN

5 Las composiciones, el uso, el artículo de fabricación y el procedimiento para el tratamiento de un mamífero infectado con un virus de la familia *Flaviviridae* se proporciona comprendiendo la administración al mamífero infectado de un compuesto que tiene la fórmula I:



Fórmula (I)

10 en el que,

A se selecciona de: alquilo C₁ - C₆ y cicloalquilo C₃ - C₆; y B se selecciona de: fenilo o tiazolilo, ambas de las cuales están opcionalmente sustituidas con un grupo seleccionado de NH(R¹) y NH(CO)R¹, en el que R¹ es alquilo C₁ - C₆; R es OH o un derivado de sulfonamida; o

15 una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

20

25

139
~~138~~

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Boehringer Ingelheim International GmbH

<120> Composición para el tratamiento de infección por los virus *Flaviviridae*

<130> 13/118

<140> US 60/442,769

<141> 2003-01-27

<150> US 60/421,900

<151> 2002-10-29

<160> 16

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 28

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 1

ctcggatccg	gcgcccatca	cggcctac	28
------------	------------	----------	----

<210> 2

<211> 33

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 2

ctctctagat cagcactctt ccatttcac	gaa	33
---------------------------------	-----	----

<210> 3

<211> 36

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 3

ctctctagat cagcactctt ccatttcac	gaactc	36
---------------------------------	--------	----

<210> 4
<211> 34
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 4
ctcggatccg gcgcccata cggcctactc ccaa 34

<210> 5
<211> 16
<212> PRT
<213> péptido de HCV

<400> 5
Pro Asp Arg Glu Val Leu Tyr Arg Glu Phe Asp Glu Met Glu Glu
1 5 10 15
Cys

<210> 6
<211> 28
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 6
ctcggatccg gctcccatta ctgcttac 28

<210> 7
<211> 43
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 7
gacgcgtcga cgcggccgct cagcactctt ccatttcact gaa 43

<210> 8
<211> 31
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

141
~~140~~

<400> 8
ctcggatcgg gccccgatca cagcatatcg c 31

<210> 9
<211> 41
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador

<400> 9
caccgctcga gtcagcattc ttccatctca tcatattggt g 41

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Asp en la posición 1 está unido a antranililo

<223> Xaa en la posición 6 es ácido aminobutírico [C(O)-O]

<223> Xaa en la posición 9 es (3-nitro)tirosina

<400> 10
Asp Asp Ile Val Pro Xaa Ala Met Xaa Thr Trp
1 5 10

<210> 11
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Xaa en la posición 6 es ácido aminobutírico

<400> 11
Asp Asp Ile Val Pro Xaa Ala Met Tyr Thr Trp
1 5 10

<210> 12
<211> 12
<212> PRT
<213> Péptido de HCV

<400> 12
Asp Asp Ile Val Pro Cys Ser Met Ser Tyr Thr Trp

142
147

1	5	10
<210> 13		
<211> 11		
<212> PRT		
<213> Secuencia artificial		
<220>		
<223> Xaa en la posición 1 es antranilil-Asp		
<223> Xaa en la posición 2 es (d)Glu		
<223> Xaa en la posición 6 es norvalina[C(O)-O]		
<223> Xaa en la posición 9 es (3-nitro)tirosina		
<400> 13		
Xaa	Xaa	Ile Val Pro Xaa Ala Met Xaa Thr Trp
1	5	10
<210> 14		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> Secuencia artificial		
<220>		
<223> cebador		
<400> 14		
cgcatatggc accttttacg ctgcagtgtc		30
<210> 15		
<211> 33		
<212> DNA		
<213> Secuencia artificial		
<220>		
<223> cebador		
<400> 15		
cgcgcgctcg agacactcct ccacgatttc ttc		33
<210> 16		
<211> 9		
<212> PRT		
<213> Secuencia artificial		
<220>		
<223> Xaa en la posición 1 es Asp acetilado		
<223> Xaa en la posición 3 es Asp (EDANS)		

143
~~142~~

<223> Xaa en la posición 6 es ácido aminobutírico [C(O)-O]

<223> Xaa en la posición 9 es Lys[DABCYL]

<400> 16

Xaa Glu Xaa Glu Glu Xaa Ala Ser Xaa
1 5

FIGURA 1

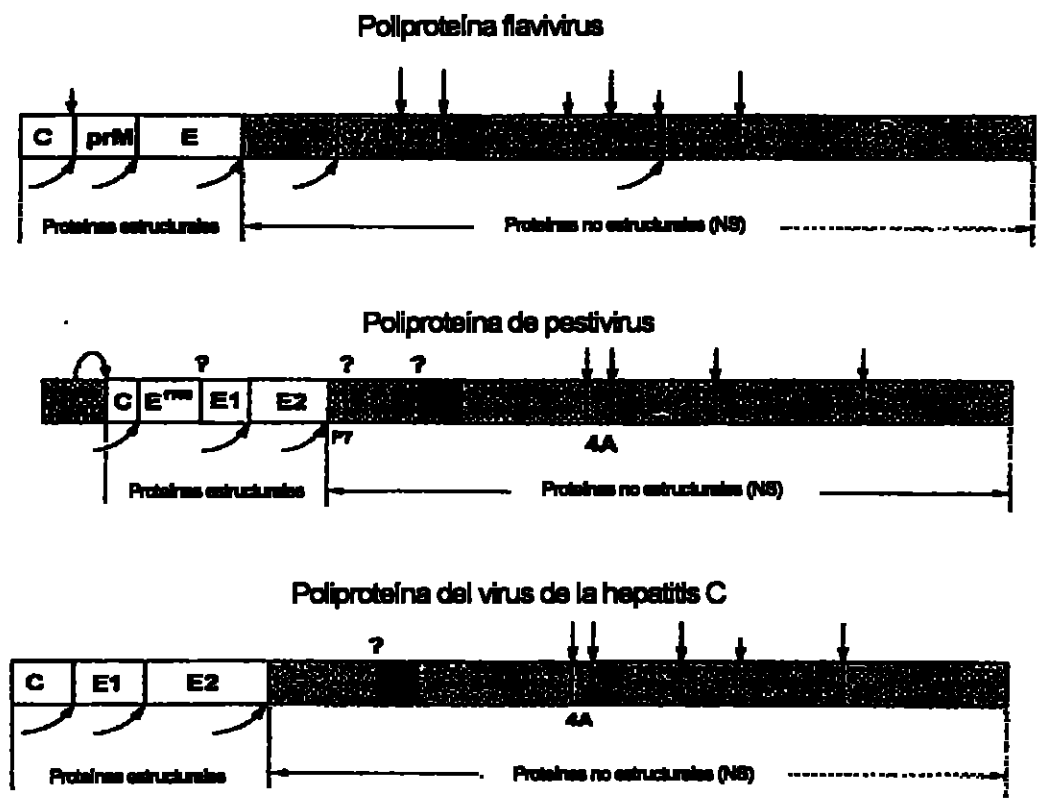


FIGURA 2

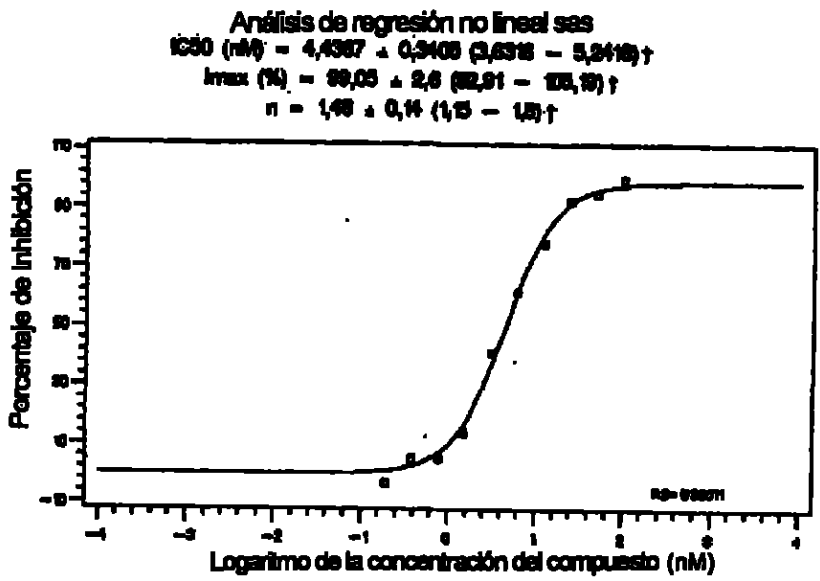
1a	(1)	APITAYQOTRQAGC	11	FOR	KNQ	EV	TV	EA	AI	AKCLIN	CT	TV	AG
1b	(1)	APITAYQOTRQAGC	11	FOR	KNQ	EV	TV	EA	AI	AKCLIN	CT	TV	AG
2a	(1)	APITAYQOTRQAGC	11	FOR	KNQ	EV	TV	EA	AI	AKCLIN	CT	TV	AG
2b	(1)	APITAYQOTRQAGC	11	FOR	KNQ	EV	TV	EA	AI	AKCLIN	CT	TV	AG
3a	(1)	APITAYQOTRQAGC	11	FOR	KNQ	EV	TV	EA	AI	AKCLIN	CT	TV	AG
10a	(1)	APITAYQOTRQAGC	11	FOR	KNQ	EV	TV	EA	AI	AKCLIN	CT	TV	AG
4a	(1)	APITAYQOTRQAGC	11	FOR	KNQ	EV	TV	EA	AI	AKCLIN	CT	TV	AG
5a	(1)	APITAYQOTRQAGC	11	FOR	KNQ	EV	TV	EA	AI	AKCLIN	CT	TV	AG
6a	(1)	APITAYQOTRQAGC	11	FOR	KNQ	EV	TV	EA	AI	AKCLIN	CT	TV	AG
11a	(1)	APITAYQOTRQAGC	11	FOR	KNQ	EV	TV	EA	AI	AKCLIN	CT	TV	AG
Consenso	(1)	APITAYQOTRQAGC	11	FOR	KNQ	EV	TV	EA	AI	AKCLIN	CT	TV	AG
61													120
2a	(41)	APITAYQOTRQAGC	11	FOR	KNQ	EV	TV	EA	AI	AKCLIN	CT	TV	AG
1b	(41)	APITAYQOTRQAGC	11	FOR	KNQ	EV	TV	EA	AI	AKCLIN	CT	TV	AG
2a	(41)	APITAYQOTRQAGC	11	FOR	KNQ	EV	TV	EA	AI	AKCLIN	CT	TV	AG
3b	(41)	APITAYQOTRQAGC	11	FOR	KNQ	EV	TV	EA	AI	AKCLIN	CT	TV	AG
3a	(41)	APITAYQOTRQAGC	11	FOR	KNQ	EV	TV	EA	AI	AKCLIN	CT	TV	AG
10a	(41)	APITAYQOTRQAGC	11	FOR	KNQ	EV	TV	EA	AI	AKCLIN	CT	TV	AG
4a	(41)	APITAYQOTRQAGC	11	FOR	KNQ	EV	TV	EA	AI	AKCLIN	CT	TV	AG
5a	(41)	APITAYQOTRQAGC	11	FOR	KNQ	EV	TV	EA	AI	AKCLIN	CT	TV	AG
6a	(41)	APITAYQOTRQAGC	11	FOR	KNQ	EV	TV	EA	AI	AKCLIN	CT	TV	AG
11a	(41)	APITAYQOTRQAGC	11	FOR	KNQ	EV	TV	EA	AI	AKCLIN	CT	TV	AG
Consenso	(41)	APITAYQOTRQAGC	11	FOR	KNQ	EV	TV	EA	AI	AKCLIN	CT	TV	AG
121													180
1a	(121)	APITAYQOTRQAGC	11	FOR	KNQ	EV	TV	EA	AI	AKCLIN	CT	TV	AG
1b	(121)	APITAYQOTRQAGC	11	FOR	KNQ	EV	TV	EA	AI	AKCLIN	CT	TV	AG
2a	(121)	APITAYQOTRQAGC	11	FOR	KNQ	EV	TV	EA	AI	AKCLIN	CT	TV	AG
2b	(121)	APITAYQOTRQAGC	11	FOR	KNQ	EV	TV	EA	AI	AKCLIN	CT	TV	AG
3a	(121)	APITAYQOTRQAGC	11	FOR	KNQ	EV	TV	EA	AI	AKCLIN	CT	TV	AG
10a	(121)	APITAYQOTRQAGC	11	FOR	KNQ	EV	TV	EA	AI	AKCLIN	CT	TV	AG
4a	(121)	APITAYQOTRQAGC	11	FOR	KNQ	EV	TV	EA	AI	AKCLIN	CT	TV	AG
5a	(121)	APITAYQOTRQAGC	11	FOR	KNQ	EV	TV	EA	AI	AKCLIN	CT	TV	AG
6a	(121)	APITAYQOTRQAGC	11	FOR	KNQ	EV	TV	EA	AI	AKCLIN	CT	TV	AG
11a	(121)	APITAYQOTRQAGC	11	FOR	KNQ	EV	TV	EA	AI	AKCLIN	CT	TV	AG
Consenso	(121)	APITAYQOTRQAGC	11	FOR	KNQ	EV	TV	EA	AI	AKCLIN	CT	TV	AG

17

145

FIGURA 3
Curvas representativas CI_{50} de compuesto (IV) frente a las proteasas NS3-NS4A del genotipo 1a (A) e 1b (B) del HCV

A.



B.

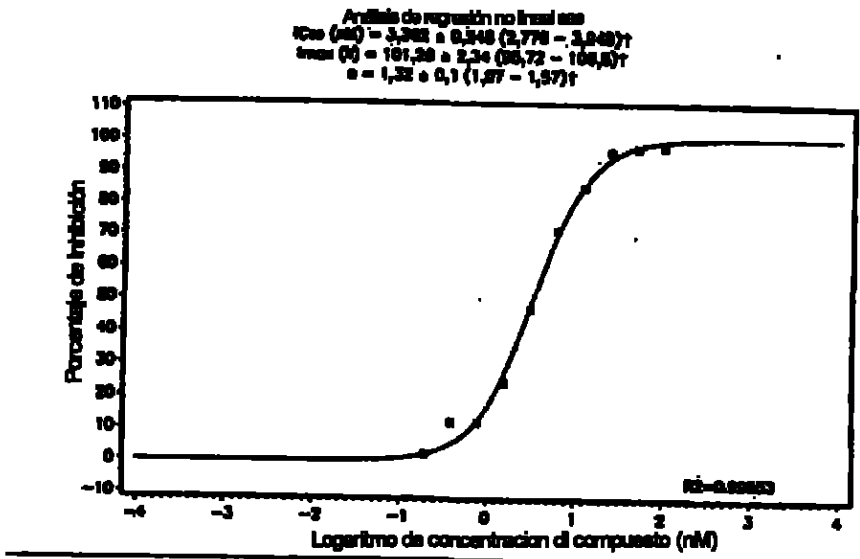
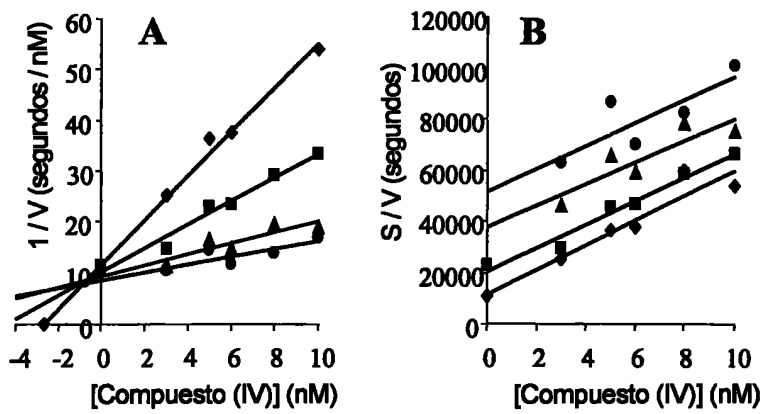


FIGURA 4

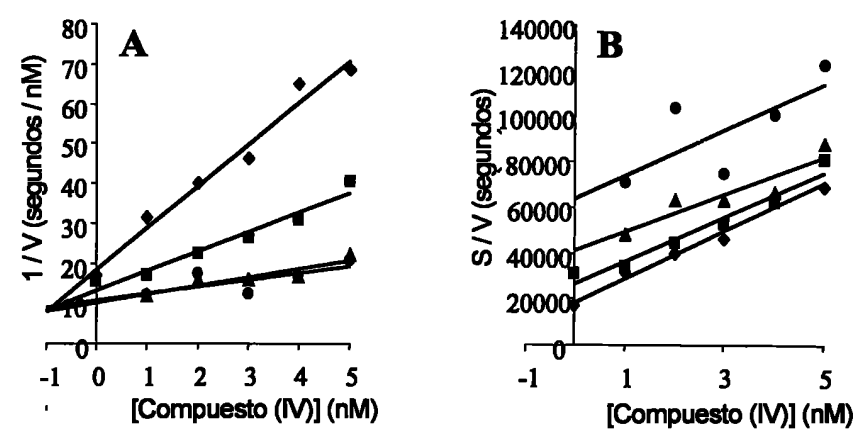
Análisis del gráfico de Dixon (A) y del gráfico de Cornish-Bowden (B) de la inhibición de la proteasa NS3-NS4A del HCV 1a mediante compuesto (IV) a concentraciones de sustrato de 1 (v), 2 (v), 4 (σ) y 6 (λ) μM que muestran un mecanismo competitivo de inhibición



147

FIGURA 5

Análisis del gráfico de Dixon (A) y del gráfico de Cornish-Bowden (B) de la inhibición de la proteasa NS3-NS4A del HCV 1b mediante compuesto (IV) a concentraciones de sustrato de 1 (v), 2 (v), 4 (σ) y 6 (λ) μM que muestran un mecanismo competitivo de inhibición



[Handwritten signature]

FIGURA 6

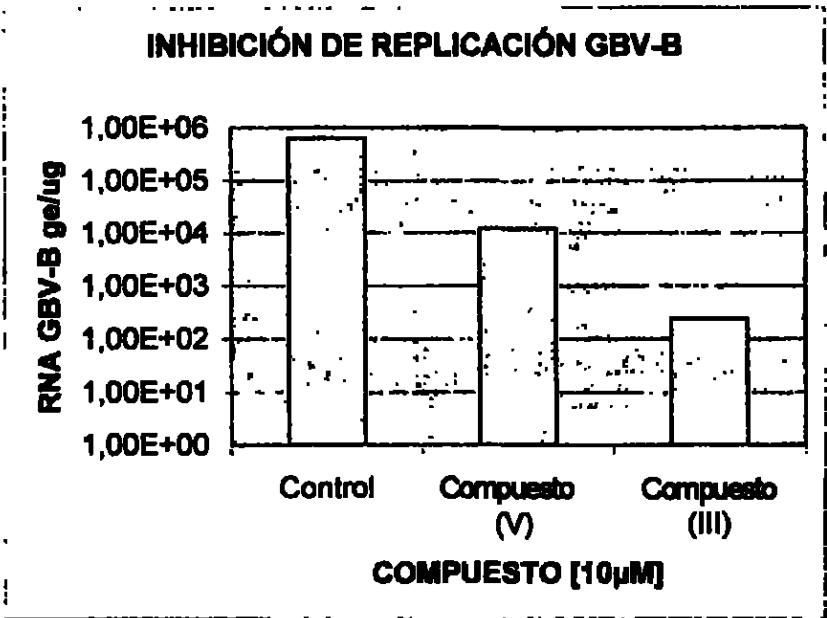


FIGURA 7

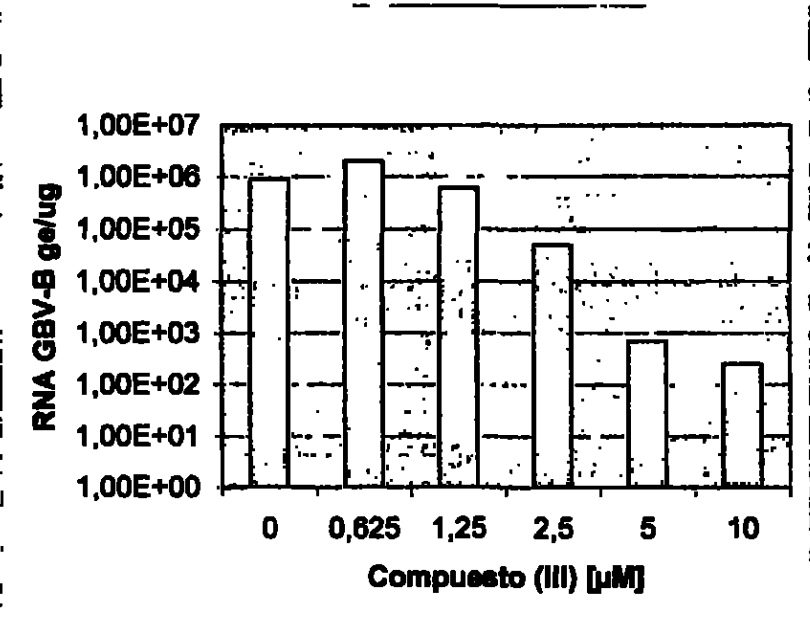
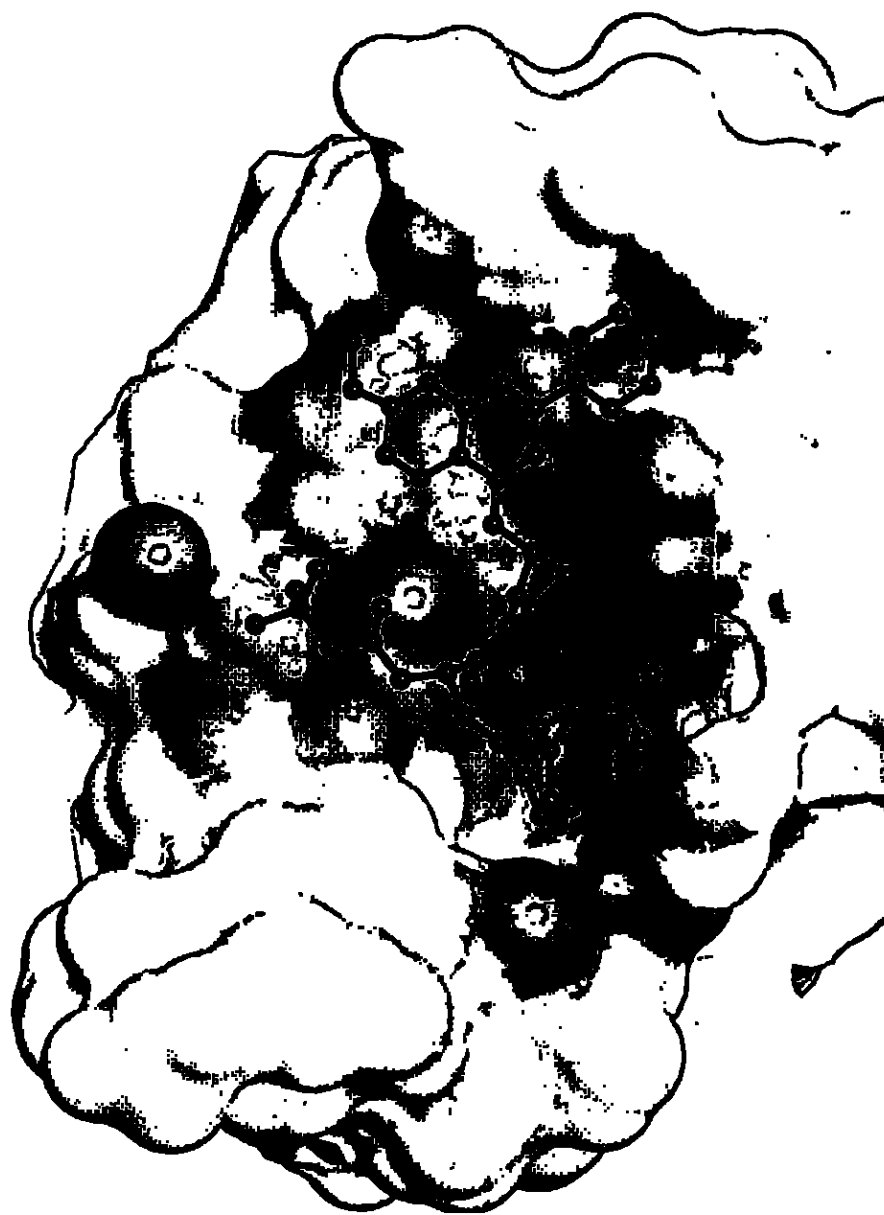


FIGURA 8



Expediente No		No de Folio
Item	No de unidades	
1	CD	
2	DVD	
3	REVISTA	
4	LIBRO	
5	PERIODICO	
6	DISQUETES	
7	SOBRE DE MANILA	
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA	
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO	
10	OTROS:	

Observaciones: Arte final

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Folios: 151
Radicacion : 05051554 00000000
Fecha (RND): 2005-05-26 16:41:13
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NDCI 411 PRESENTM
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

MIT : 800174089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 34,757
FECHA : MAYO 11 DE 2005

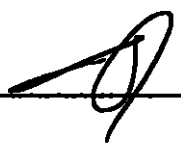
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	40117919	11/05/2005	68,388,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
		TOTAL :	\$ 443,000.00

SOM: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

~~066-10987-841-003-7~~
COLD 09255-841-016-0

152153

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación: 02051554 00000000 Folios: 151
Fecha (AÑO) 2005-05-26 16:41:13
Trámite: 011 PCT-PATENT 379 FASE HACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 0020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
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 se 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 grafica o fotografica 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 solicita el registro de un Esquema de trazado	()	()	
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	()	()	
- Representación grafica del esquema de trazado	()	()	
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()	
COMPLETA	()	INCOMPLETA	()

Firma Responsable 

Fecha *mayo 26 de 2005*

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Folio 153

2020
Bogotá DC

Doctor(a)
EMILIO FERRERO
Apoderado(a) y/o Representante
BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH

REFERENCIA:	Radicación No.	05 51554
	Solicitud Internacional	PCT/CA2003/001634
	Fecha límite inicio fase Nacional	29 - 05 - 2005
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	416
	Oficio No.	882
	Folios	001

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC : 12 A60. 2005

ALIX CESPEDÉS DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

Al contestar favor indique el número de radicación consignado en el sticker

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 Pisos 2, 5, 7 y 10
Commutador: 3 820840 Fax: 3 505220
Sede CAN: Tr. 40A No. 38-50 3153265 al 69
Fax: 3 505220. Línea 9600-910 163
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia

155.



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RADICACIÓN EXPEDIENTE No.05-051554

EL EXTRACTO DE LA PRESENTE SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

PCT FUE PUBLICADO EN LA GACETA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL No 557

DE FECHA 31 DE OCTUBRE DEL 2005, EL TERMINO HABIL SEÑALADO POR

LA LEY EXPIRA EL 27 DE ENERO DEL 2006

NOTA: Dentro del plazo de los seis (6) meses siguientes a partir de la fecha de publicación en la gaceta de Propiedad Industrial, deberá solicitar y cancelar el examen de patentabilidad so pena de que la solicitud caiga en abandono, de acuerdo con lo establecido en el Artículo 44 de la Decisión 486/2000.

SE PRESENTARON OPOSICIONES POR PARTE DE TERCEROS.

SI ☐ ☐

NO ☐ ☒ ☐

Bogotá D.C., Noviembre de 2006