



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 348 536**

⑮ Int. Cl.:

**A61K 31/55** (2006.01)

⑫

### TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **03781492 .8**

⑯ Fecha de presentación : **29.10.2003**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1585524**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **19.10.2005**

⑭ Título: **Uso de endoperóxidos para el tratamiento de infecciones causadas por flaviviridae, incluyendo el virus de la hepatitis C, de la diarrea viral bovina y de la fiebre porcina clásica.**

⑩ Prioridad: **31.10.2002 US 422683 P**

⑬ Titular/es: **KEMIN FOODS, L.C.**  
**2100 Maury Street, Box 70**  
**Des Moines, Iowa 50301-0070, US**

⑮ Fecha de publicación de la mención BOP: **09.12.2010**

⑰ Inventor/es: **Vandenkerckhove, Jan;**  
**Peys, Eric;**  
**Sas, Benedikt;**  
**Neyts, Johan, y**  
**Van Hemel, Johan**

⑮ Fecha de la publicación del folleto de la patente: **09.12.2010**

⑰ Agente: **Zea Checa, Bernabé**

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

**Descripción**Antecedentes de la invención

- [0001]** La invención se refiere generalmente al uso de lactonas sesquiterpénicas en el tratamiento de infecciones causadas por *Flaviviridae* y, más específicamente, al 5 uso de endoperóxidos de lactonas sesquiterpénicas para tratar infecciones por hepatitis C, fiebre amarilla, fiebre del dengue, diarrea viral bovina y fiebre la peste porcina clásica.
- [0002]** La infección crónica por hepatitis C es un problema de salud pública importante que afecta a 180 millones de personas en todo el mundo (3% de la 10 población), incluyendo 4 millones de personas en los Estados Unidos, y es una causa principal de enfermedad hepática crónica. Se prevé que la infección por VHC continúe aumentando en los Estados Unidos y que haya el triple de personas infectadas para el año 2010. La infección con el virus de la hepatitis C puede conducir a una probabilidad aumentada de desarrollar una enfermedad hepática 15 crónica grave y, en algunos casos, potencialmente mortal, incluyendo insuficiencia hepática y cáncer.
- [0003]** La enfermedad hepática crónica es la décima causa principal de muerte entre adultos en los Estados Unidos, y representa aproximadamente 25.000 20 muertes al año, o aproximadamente el 1% de todas las muertes. Los estudios poblacionales indican que el 40% de las enfermedades hepáticas crónicas están relacionadas con el VHC, dando como resultado una estimación de 8.000-10.000 muertes cada año. Las estimaciones actuales de los costes médicos y de la pérdida 25 de mano de obra de las enfermedades hepáticas crónicas y agudas relacionadas con el VHC son superiores a los 600 millones de dólares anuales, y la enfermedad hepática en fase terminal asociada con el VHC es la indicación más frecuente para el trasplante de hígado en adultos. Debido a que la mayoría de las personas infectadas por VHC tienen edades comprendidas entre los 30 y 49 años, el número 30 de muertes atribuibles a la enfermedad hepática crónica relacionada con el VHC podría aumentar sustancialmente durante los próximos 10-20 años, a medida que este grupo de personas infectadas alcance edades a las que se aparecen típicamente complicaciones de la enfermedad hepática crónica.
- [0004]** El VHC se transmite principalmente a través de exposiciones percutáneas directas importantes o repetidas a sangre. En los Estados Unidos, las dos exposiciones más comunes asociados con la transmisión del VHC son la 35 transfusión sanguínea y el uso de drogas intravenosas. La terapia para la hepatitis

C es un área de la práctica clínica que cambia rápidamente. La terapia de combinación con interferón y ribavirina, un análogo nucleosídico, está autorizada para el tratamiento de pacientes con hepatitis C crónica sin tratamiento previo. Los estudios de pacientes tratados con una combinación de ribavirina e interferón han

5 demostrado un aumento sustancial en los índices de respuesta sostenida, alcanzando el 40%-50% en comparación con los índices de respuesta del 15%-25% con el interferón solamente. La mayoría de los pacientes que reciben interferón experimentan síntomas tipo gripe al principio del tratamiento, pero estos síntomas disminuyen con un tratamiento continuo. Los efectos secundarios posteriores

10 incluyen fatiga, supresión de la médula ósea y efectos neuropsiquiátricos (por ejemplo, apatía, cambios cognitivos, irritabilidad y depresión). La dosificación del interferón debe reducirse en el 10%-40% de los pacientes e interrumpirse en el 5%-15% debido a efectos secundarios graves. La ribavirina puede inducir anemia hemolítica y puede ser problemática para pacientes con anemia, supresión de

15 médula ósea o insuficiencia renal preexistente. En estos pacientes, debería evitarse la terapia de combinación o deberían realizarse intentos para corregir la anemia. La anemia hemolítica causada por la ribavirina también puede ser potencialmente mortal para pacientes con cardiopatía isquémica o vasculopatía cerebral. La ribavirina es teratogénica, y los pacientes de sexo femenino deberían evitar

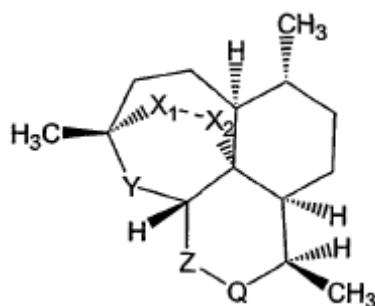
20 quedarse embarazadas durante la terapia. Otros tratamientos, incluyendo corticosteroides, ursodiol y timosina, no han sido eficaces. Altos niveles de hierro en el hígado podrían reducir la eficacia del interferón. Se ha estudiado el uso de una terapia de reducción de hierro (flebotomía o quelación) en combinación con el interferón, pero los resultados no han sido concluyentes ([www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)). Por lo

25 tanto, existe una fuerte necesidad médica de descubrir y desarrollar nuevas moléculas bioactivas que puedan usarse para tratar infecciones por hepatitis C con efectos secundarios menores o reducidos y una mejor eficacia en comparación con tratamientos disponibles en la actualidad.

30 Descripción Resumida de la Invención

**[0005]** Se ha descubierto que las lactonas sesquiterpénicas que tienen la fórmula general:

- 3 -



tienen actividad frente a infecciones causadas por *Flaviviridae*, incluyendo virus de la hepatitis C, de la diarrea viral bovina y de la fiebre porcina clásica. De forma representativa, se describen en esta solicitud lactonas sesquiterpénicas preferidas 5 actualmente, aunque será evidente para los expertos en la materia que otros compuestos de lactonas sesquiterpénicas serán útiles en el tratamiento de infecciones causadas por *Flaviviridae*. También se incluyen sales farmacéuticamente aceptables de estos compuestos.

**[0006]** Las lactonas sesquiterpénicas preferidas son los endoperóxidos de lactonas sesquiterpénicas artemisinina, dihidroartemisinina, artesunato y arteméter.

#### Breve Descripción de los Dibujos

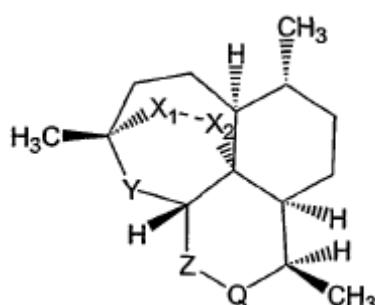
**[0007]** La Fig. 1 es una ilustración de la estructura química de la artemisinina, la dihidroartemisinina, el arteméter y el artesunato.

15

#### Descripción Detallada de las Realizaciones Preferidas

**[0008]** En la presente memoria se describe el efecto antiviral de lactonas sesquiterpénicas y, preferentemente, endoperóxidos de lactonas sesquiterpénicas, tales como artemisinina, dihidroartemisinina, arteméter y artesunato, frente a 20 *Flaviviridae* específicos tales como el virus de la hepatitis C.

**[0009]** Los compuestos sesquiterpénicos preferidos de la presente memoria comprenden compuestos de fórmula:



en la que: X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> se seleccionan de O, S, Se y NH; Y se selecciona de O, S, Se y

NH; Z se selecciona de O, NH, S y Se, y Q se selecciona de CO, CHO<sub>H</sub>, CHOCH<sub>3</sub>, CHOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, CHOC<sub>3</sub>H<sub>7</sub> y CHOCOCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH, y sales farmacéuticamente aceptable de los mismos.

**[0010]** Los compuestos sesquiterpénicos de la invención particularmente preferidos 5 actualmente incluyen artemisinina, en la que X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> son O, Y es O, Z es O y Q es C=O; dihidroartemisinina (artemisinina excepto por que Q es CHO<sub>H</sub>), arteméter (artemisinina excepto por que Q es CHOCH<sub>3</sub>); arteéter (artemisinina excepto por que Q es COC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>); un producto de propilo (artemisinina excepto por que Q es CHOC<sub>3</sub>H<sub>7</sub>) y artesunato (artemisinina excepto por que Q es CHOCOCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH). El compuesto sesquiterpénico de la invención más 10 particularmente preferido actualmente es dihidroartemisinina.

**[0011]** Los endoperóxidos tienen un enlace peroxyo (-O-O-) que en estos productos se cree que es importante para su actividad como antimalárico. La sustitución del enlace peroxyo con un -S-S- (disulfuro) o -Se-Se- (diselenuro) o -N-O- o -NH-NH- 15 (hidrazinas) y las diversas combinaciones de estos enlaces crearán nuevos compuestos que también pueden tener actividad.

**[0012]** Los *Flaviviridae* son una familia importante de patógenos virales de ARN humanos y animales (Rice CM. 1996. *Flaviviridae: the viruses and their replication*. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields virology*. Filadelfia: Lippincott- 20 Raven Publishers. Págs. 931-960). Los tres géneros reconocidos actualmente de los *Flaviviridae* muestran diferencias distintivas en su transmisión, intervalo de hospedador y patogénesis. Son miembros de estos flavivirus clásicos el virus de la fiebre amarilla, el virus del dengue y los pestivirus, tales como el virus de la diarrea viral bovina (BVDV) y el virus de la fiebre porcina clásica (CSFV). El miembro 25 caracterizado más recientemente de esta familia es el patógeno común y exclusivamente humano, virus de la hepatitis C (VHC). Los *Flaviviridae* son virus ARN monocatenarios que tienen ARN de polaridad genómica con sentido (+). Otras familias de virus con ARN con sentido (+) incluyen los *Picornaviridae*, *Togaviridae*, *Caliciviridae* y *Coronaviridae*.

**[0013]** Los compuestos de la invención pueden usarse en su forma nativa o como sales. En casos en los que los compuestos son suficientemente básicos o ácidos para formar sales de bases o ácidos no tóxicas estables, la administración de los compuestos como sales puede ser apropiada. Son ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables sales de adición de ácidos orgánicos formadas con 35 ácidos que forman un anión fisiológico aceptable, por ejemplo, acetato, ascorbato,

benzoato, citrato, etoglutarato, glicerofosfato, malonato, metanosulfonato, succinato y tartarato. También pueden formarse sales inorgánicas adecuadas incluyendo sales de bicarbonato, carbonato, clorhidrato, nitrato y sulfato.

5 **[0014]** Los compuestos de la presente invención pueden administrarse convenientemente en una composición farmacéutica que contiene el compuesto en combinación con un excipiente adecuado, siendo la composición útil para combatir infecciones víricas. Dependiendo de si la preparación se usa para tratar infecciones víricas internas o externas, los compuestos y composiciones de la presente invención pueden administrarse por vía parenteral, tópica, intravaginal, oral o rectal.

10 **[0015]** Para la administración parenteral, pueden prepararse soluciones del compuesto activo o sus sales en agua, opcionalmente mezcladas con un tensioactivo no tóxico. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, triacetina y mezclas de los mismos y en aceites.

15 **[0016]** Pueden determinarse dosificaciones útiles del compuesto comparando su actividad *in vitro*. Se conocen en la técnica métodos para la extrapolación de las dosificaciones eficaces a seres humanos.

20 **[0017]** El compuesto se administra convenientemente en forma de dosificación unitaria; por ejemplo, que contiene de 0,1 a 2000 mg, convenientemente de 100 a 1000 mg, más convenientemente, de 100 a 500 mg de ingrediente activo por forma de dosificación unitaria. La dosis deseada puede presentarse convenientemente en una sola dosis o como dosis divididas administradas a intervalos apropiados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más subdosis al día. La propia subdosis puede dividirse adicionalmente, por ejemplo, en varias administraciones discretas espaciadas de forma poco precisa; tales como inhalaciones múltiples a partir de un 25 insuflador o por aplicación de una pluralidad de gotas en el ojo.

30 **[0018]** Para infecciones internas, las composiciones pueden administrarse por vía oral o por vía parenteral a niveles de dosis, calculados como la base libre, de aproximadamente 1 a 30 mg/kg, preferentemente de 1 a 10 mg/kg de peso corporal de mamífero.

35 **[0019]** El régimen exacto para la administración del compuesto y de las composiciones descritas en la presente memoria dependerá necesariamente de las necesidades del sujeto individual a tratar, del tipo de tratamiento y, por supuesto, del juicio del médico que lo atienda. Los compuestos de la presente invención pueden administrarse a un animal que necesite tratamiento. En la mayoría de los casos, éste será un ser humano, pero el tratamiento de animales de granja y de

compañía también se contempla específicamente como incluido en el alcance de la presente invención.

#### Materiales y Métodos

- 5      **[0020]** La artemisinina se adquirió en Aldrich. Los extractos vegetales brutos de ajenjo (*Artemisia absinthium*) KE-4, ajenjo dulce (*Artemisia annua*) KE-5 y estragón (*Artemisia dracunculus*) KE-6 se obtuvieron de Kemin Industries Inc., Des Moines, Estados Unidos. Para preparar las muestras de KE-4, KE-5 y KE-6 se agitaron 2 g de ajenjo, ajenjo dulce o estragón secado y molido durante 8 horas a temperatura  
10     ambiente con 200 ml de hexano p.a. Después, la suspensión se filtró a través de un filtro de vidrio G3 y se evaporó a presión reducida. El residuo oscuro restante se usó para las exploraciones biológicas. Se adquirió arteméter, dihidroartemisinina y artesunato en Dafra Pharma. Los compuestos se exploraron frente a diversos virus patógenos, tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), virus herpes  
15     simple (HSV), virus vaccinia (VV), virus varicela-zóster (VZV) y el citomegalovirus humano (CMV). Para todos los virus excepto para el CMV, se determinó la CE<sub>50</sub> (concentración de compuesto eficaz necesaria para inhibir el 50% el efecto citopático inducido por HIV en cultivos celulares CEM humanos, el efecto citopático inducido por HSV y VV en cultivos celulares E<sub>6</sub>SM de fibroblastos embrionarios  
20     humanos y la formación de placas inducida por VZV en cultivos celulares de pulmón embrionario humano (HEL)). Para la determinación de la actividad antiviral, expresada en CI<sub>50</sub>, contra CMV, se infectaron células fibroblásticas de pulmón embrionario humano (HEL) en microplacas de 96 pocillos con 20 UFP de virus/pocillo.  
25     **[0021]** Después de 2 horas de incubación a 37°C, las células infectadas se llenaron con 0,1 ml de medio que contenía diluciones en serie del compuesto de ensayo. El día 7, las placas se contaron microscópicamente después de la tinción de las células con solución de Giemsa. La concentración antiviral mínima se expresó como la dosis necesaria para inhibir el 50% la formación de placas inducida por virus.  
30  
35     **[0022]** Los compuestos también se exploraron frente a *Flaviviridae*. Debido al hecho de que no existe ningún análisis *in vitro* adecuado para la exploración frente a VHC, se decidió explorarlos frente al virus de la diarrea viral bovina (BVDV) ya que comparte muchas similitudes con el virus de la hepatitis C (Frolov I, McBride S y Rice CM. Cis-acting RNA elements required for replication of bovine viral diarrhea

virus-hepatitis C virus 5' non-translated region chimeras. RNA 4, 1418-1435 (1998)). Se han realizado exploraciones adicionales de arteméter frente a diferentes cepas de BVDV.

- [0023]** Los compuestos también se inspeccionaron para determinar su actividad antitumoral a través de la proliferación de células de leucemia murina (L1210/0), células de carcinoma mamario murino (FM3A) y células linfocíticas T humanas (Molt4/C8, CEM/0). La mejor actividad antiviral observada contra CMV y VZV era del KE-6. En menor medida, la artemisinina mostraba actividad antiviral contra HSV-2 y VV.

10

### Resultados y Discusión

**[0024]** En un primer conjunto de exploraciones (Tabla 1), se inspeccionó la actividad antiviral de la artemisinina y de algunos extractos brutos de *Artemisia* (KE-4, KE-5 y KE-6) frente a HIV -1, HIV-2, HSV-1, HSV-2, VV, CMV y VZV.

15

Tabla 1 – Resultados de exploraciones frente a HIV-1, HIV-2, HSV-1, HSV-2, VV, CMV y VZV.

Compuesto	<sup>a</sup> CE50 (μg/ml)										
	HIV-1 (III <sub>B</sub> ) (CEM)	HIV-2 (ROD) (CEM)	HSV-1 (KOS) (E <sub>6</sub> SM)	HSV-2 (G) (E <sub>6</sub> SM)	VV (E <sub>6</sub> SM)	CMV Davis (HEL)	CMV AD-169 (HEL)	VZV (HEL)	VZV (HEL)		
										OKA	YS
Artemisinina	>20	>20	>400	240	240	>50	>50	>50	>50	OKA	YS
KE-4	>20	>20	>80	>80	>80	>50	>50	>50	>50		
KE-5	>100	>100	>240	>80	>80	>50	>50	>50	>50		
KE-6	>20	>20	>80	>80	>80	10	33	17	30		

<sup>a</sup>50% Concentración eficaz o concentración de compuesto necesaria para inhibir el 50% el efecto citopático inducido por HIV en cultivos celulares CEM de linfocitos humanos, el efecto citopático inducido por HSV y VV en cultivos celulares E<sub>6</sub>SM de fibroblastos embrionarios humanos y la formación de placas inducida por CMV y VZV en cultivos celulares HEL de pulmón embrionario humano.

- [0025]** Se realizó una segunda exploración antiviral (Tabla 2) para inspeccionar la actividad frente al virus de la diarrea viral bovina (BVDV - cepa Pe515) en células de riñón bovino (MDBK).

**Tabla 2 – Resultados de exploraciones frente a BVDV en células MDBK**

Compuesto	CE <sub>50</sub> (μg/ml) BVDV	MTC (μg/ml) MDBK
Artesunato	0,07	0,4
Arteméter	0,3	>100
Artemisinina	0,4	>100
Dihidroartemisinina	0,05	0,4
KE 4	>100	>100
KE 5	>100	>100
KE 6	>100	100

- [0026]** Se evaluó la actividad antiviral usando la cepa Pe515 de BVDV en células MDBK. Se determinó tanto la actividad antiviral como la citotoxicidad por medio del 5 método MTS. La CE<sub>50</sub> es la concentración necesaria para reducir el 50% el efecto citopático inducido por virus. La MTC (concentración tóxica mínima) se definió como la concentración que causaba una reducción >=20% en el metabolismo celular.
- [0027]** La MTC no se alcanzó a la mayor concentración (100 μg/ml) para células MDBK cuando se trataron con arteméter, artemisinina, KE 4 y KE 5. En este 10 ensayo, se observó una fuerte actividad de los endoperóxidos artemisinina, dihidroartemisinina, arteméter y artesunato contra BVDV, un *Flaviviridae*, mientras que la toxicidad celular continuó siendo baja. Por lo tanto, estos productos podían adoptarse como un posible tratamiento para infecciones causadas por *Flaviviridae*.
- [0028]** El arteméter se exploró frente a diferentes cepas de BVDV, así como frente 15 a BDV (virus de la enfermedad de la frontera) (Tabla 3).

**Tabla 3 – Resultados de la exploración de arteméter frente a BVDV y BDV**

Arteméter	100 μg/ml	20 μg/ml	4 μg/ml	800 ng/ml	160 ng/ml	32 ng/ml	6,4 ng/ml	1,28 ng/ml	0,512 ng/ml	0,256 ng/ml
Sin infectar	Tóxico	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BVDV II ncp	Tóxico	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
BVDV I cp	Tóxico	+	+	+	+	++	++	++	++	++
BVDV I ncp	Tóxico	+	+	+	++	+++	+++	+++	+++	+++
BDV	Tóxico	+	+	+	++	++	++	++	++	++

+++ Todas las células son positivas  
+++- 50% de las células son positivas  
++/- 10% de las células son positivas  
BVDV Virus de la diarrea viral bovina  
BDV Virus de la enfermedad de la frontera  
cp Cepa citopatogénica  
ncp Cepa no citopatogénica

**[0029]** Especialmente contra BVDVI cp, la cepa de BVDV que más se parece al VHC, el efecto del arteméter puede observarse claramente. El producto tiene una  $CE_{90} = 0,16 \mu\text{g/ml}$ . Se descubrió que la concentración tóxica en estos experimentos 5 era de aproximadamente  $100 \mu\text{g/ml}$ . También contra el BDV podía observarse un efecto ( $CE_{90} = 0,8 \mu\text{g/ml}$ ).

**[0030]** La artemisinina y los extractos brutos de *Artemisia* (KE-4, KE-5 y KE-6) se exploraron frente a las líneas celulares tumorales L1210/0, FM3A/0, Molt4/C8 y CEM/0, pero no pudo encontrarse ninguna actividad interesante.

10

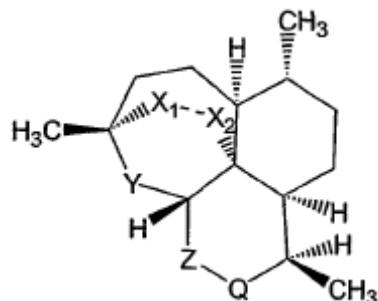
#### Conclusión

**[0031]** En las primeras exploraciones frente a virus ADN y retrovirus no se pudo observar ninguna actividad antiviral significativa. En las segundas exploraciones frente al BVDV (virus ARN) se indicó claramente una fuerte actividad antiviral de la 15 artemisinina, el artesunato, el arteméter y la dihidroartemisinina. Estos productos, todos endoperóxidos, mostraban una actividad significativamente mejor frente al BVDV en comparación con los extractos brutos de *Artemisia* ensayados. Puesto que el BVDV y el VHC tienen muchas similitudes, la artemisinina, el arteméter, el artesunato, la dihidroartemisinina y probablemente otros peróxidos pueden tener 20 propiedades antivirales potentes y selectivas frente al VHC.

**[0032]** Aunque la invención se ha descrito con respecto a una realización preferida de la misma, también debe entenderse que no debe limitarse tanto puesto que pueden realizarse cambios y modificaciones en la misma que se incluyen en el alcance total deseado de esta invención, como se define por las reivindicaciones 25 adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de un sesquiterpeno que tiene la fórmula:



- 5 en la que:

X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> se seleccionan del grupo que consiste en O, S, Se y N;

Y se selecciona del grupo que consiste en O, S, Se y N;

Z se selecciona del grupo que consiste en O, NH, S y Se, y

- 10 Q se selecciona del grupo que consiste en CO, CHO<sub>H</sub>, CHOCH<sub>3</sub>, CHOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>, CHOC<sub>3</sub>H<sub>7</sub> y CHOCOCCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>COOH,

y las sales farmacéuticamente aceptables del mismo, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de infecciones causadas por virus ARN con sentido (+).

- 15 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la infección está causada por *Flaviviridae* sp.

3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó la reivindicación 2, en el que el sesquiterpeno es un endoperóxido.

20

4. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el sesquiterpeno se selecciona del grupo que consiste en artemisinina y análogos de artemisinina.

- 25 5. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la infección es hepatitis C.

6. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la infección es diarrea viral bovina o fiebre porcina clásica.

30



**REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN**

*Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.*

**Literatura diferente de patentes citadas en la descripción**

10

- Flaviviridae: the viruses and their replication. Rice CM. Fields virology. Lippincott-Raven Publishers, 1996, 931-960 [0012]
- Frolov I ; McBride S ; Rice CM. Cis-acting RNA elements required for replication of bovine viral diarrhea virus-hepatitis C virus 5' non-translated region chimeras. *RNA*, 1998, vol. 4, 1418-1435 [0022]