

REGÍMENES DE DOSIS PARA TRATAMIENTO DE INFECCIÓN DE DENGUE

REFERENCIA CRUZADA CON SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta solicitud reclama el beneficio de la Solicitud Provisional de EE.UU. No. 63/346,274 presentada el 26 de mayo de 2022; Solicitud Provisional de EE.UU. No. 63/414,812 presentada el 10 de octubre de 2022; y Solicitud Provisional de EE.UU. No. 63/427,359 presentada el 22 de noviembre de 2022. Estas solicitudes se incorporan por referencia para todos los propósitos.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona composiciones terapéuticas ventajosas, combinaciones y usos de las mismas para el tratamiento o profilaxis de la infección de virus del dengue.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La fiebre del dengue es causada por cuatro virus relacionados, conocidos como serotipos 1 a 4 del virus del dengue. Los virus del dengue (DENV, por sus siglas en inglés) son miembros del género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*. Son virus envueltos con un genoma de ARN de sentido positivo de 11 kb que codifica diez proteínas. Estas proteínas son la proteína de membrana (M), la proteína de envoltura (E), la proteína de la cápside (C) y las proteínas no estructurales (NS). Las proteínas NS son NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS5B y NS5. Estas proteínas se traducen como una poliproteína individual la cual es escindida por proteasas en las proteínas individuales. La proteína NS5 es la más grande de las proteínas no estructurales y actúa como la polimerasa de ARN dependiente de ARN viral, así como una ARN 2'-O-metiltransferasa. La actividad de la polimerasa de ARN dependiente del ARN (RdRp) es responsable de la replicación del genoma viral.

El dengue es endémico de los trópicos, incluyendo el Mediterráneo Oriental, las Américas, el Sudeste Asiático, el Pacífico Occidental y África. A medida que ha aumentado el área de distribución de los mosquitos *Aedes* la cual transmiten el dengue, se han observado nuevos casos en áreas en donde nunca antes se había visto. Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos han informado brotes recientes de dengue adquirido localmente en Hawái (2015), Florida (2013, 2020) y Texas (2013) (<https://www.cdc.gov/Dengue/areaswithrisk/in-the-us.html>). Los mosquitos que transmiten el dengue ahora son comunes en gran parte del sureste de los Estados Unidos (Rivera y otros, 2020. Travel-associated and Locally Acquired Dengue Cases – United States, 2010-2017. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 69:149-154).

Aunque la distribución de los serotipos individuales del dengue fue limitada de manera geográfica previamente, a medida que la enfermedad se ha extendido alrededor del mundo, la distribución de los serotipos se ha vuelto más generalizada (*Nature* Scitable "Dengue Viruses"). Esto es particularmente preocupante debido a que si una persona se infecta con un serotipo y luego se infecta con un segundo, tiene un mayor riesgo de sufrir Dengue grave. El Dengue Grave (o fiebre hemorrágica del Dengue) se acompaña de pérdida grave de plasma, hemorragia grave, shock y deterioro orgánico. Si no se trata, el Dengue grave tiene una tasa de mortalidad del 13% (*Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades*, Dengue para Proveedores de Atención Médica, Presentación Clínica, actualizado el 13 de abril de 2023).

Además de la propagación geográfica de los brotes de Dengue, los brotes recientes han sido más graves. En todo el mundo, la incidencia se ha multiplicado por 8 desde el año 2000. No solamente ha aumentado la frecuencia de brotes, sino también la magnitud. La Organización Mundial de la Salud estima que la mitad de la población mundial está en riesgo de infección y cada año se registran cientos de millones de infecciones (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/Dengue-and-severe-Dengue>). También se reportan casi medio millón de casos de Dengue grave. La mayoría de las personas en riesgo de contraer Dengue son niños (Aranda C y otros, 2018. Vigilancia de arbovirus: primera detección del virus del Dengue en mosquitos *Aedes albopictus* locales en Europa, Cataluña, España, 2015. *Euro Surveill* 23, Wilder-Smith y otros, 2014. El brote de dengue de 2012 en Madeira: exploración de los orígenes. *Euro Surveill* 19:20718).

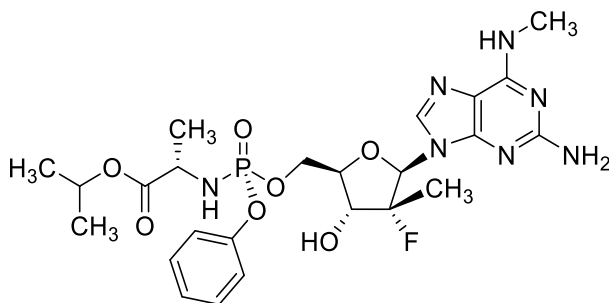
Se han desarrollado vacunas contra el Dengue, pero presentan varios inconvenientes. El más significativo es un fenómeno conocido como mejora dependiente de anticuerpos (ADE, por sus siglas en inglés). La única vacuna autorizada, Dengvaxia, ofrece una protección incompleta (<https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/first-fda-approved-vaccine-prevention-dengue-disease-endemic-regions>) y desigual contra diferentes serotipos, con únicamente un 50% de protección contra DENV1, y menos para DENV2 (Sabchareon y otros 2012. Eficacia protectora de la vacuna tetravalente CYD recombinante, viva atenuada contra el Dengue en niños escolares tailandeses: un ensayo aleatorizado y controlado de fase 2b. *Lancet* 380:1559-67; Villar y otros, 2015. Eficacia de una vacuna tetravalente contra el Dengue en niños de América Latina. *N Engl J Med*. 372:113-23). Por lo tanto, la vacunación puede promover la ADE y, en consecuencia, la infección grave en personas que no han estado expuestas al Dengue (Aguilar y otros, 2016. The Impact of Newly Licensed Dengue Vaccine in Endemic Countries. *PLoS Negl Trop Dis*. 10:e0005179). De esa forma, está restringida a personas de 9 a 16 años de edad que hayan tenido al menos una infección previa documentada por el virus del Dengue. A pesar de la importancia actual y creciente del virus del Dengue como una amenaza mundial para la salud, aún no se ha logrado el desarrollo de una vacuna pan-Dengue segura y efectiva.

De esa forma, una posible estrategia para combatir el Dengue en todo el mundo son los fármacos, por ejemplo, un antiviral de acción directa (DAA, por sus siglas en inglés). Desafortunadamente, no existen DAA aprobados por fiebre de Dengue. En el DENV, la polimerasa viral es la proteína no estructural NS5 (Karuna y otros, 2020. Un Profármaco Cíclico de Fosforamidato de 2'-Desoxi-2'-Fluoro-2'C-Metilguanosina para el tratamiento de infección de Virus de Dengue. Agentes Antimicrobianos Chemother 64). Aunque la RdRp de DENV ha sido el objetivo de muchos DAA en investigación, incluyendo muchos análogos de nucleósidos/nucleótidos (Troost y otros, 2020. Avances recientes en el desarrollo de fármacos antivirales contra el virus del Dengue. Curr Opin Virol 43:9-21), hasta la fecha únicamente un nucleósido, el análogo de citosina balapiravir ha sido probado clínicamente (Karuna y otros, 2020. Un Profármaco Fosfoamidato Cíclico De 2'-Desoxi-2'-Fluoro-2'C-Metilguanosina para el Tratamiento de Infección de Virus de Dengue. Agentes Antimicrobianos Chemother 64; Nguyen y otros, 2013. Un ensayo aleatorizado, doble ciego y controlado por placebo de balapiravir, un inhibidor de polimerasa, en pacientes adultos con Dengue. J Infect Dis. 207:1442-50). Desafortunadamente, no se observaron diferencias entre el tratamiento compuesto y placebo en con respecto a la respuesta antiviral, el perfil de citocina y el tiempo hasta la desaparición de la fiebre (Nguyen y otros, 2013. Un ensayo aleatorio, doble ciego y controlado por placebo de balapiravir, un inhibidor de la polimerasa, en pacientes adultos con Dengue. J Infect Dis 207:1442-50.).

Otros compuestos que se dirigen a NS5 u otras proteínas virales han sido reportados en la literatura. En 2017, Janssen describió una serie de compuestos los cuales se unen a la proteína NS3 (WO 2017/167951). En 2020, el laboratorio de Manfroni describió piridobenzotiazolonas las cuales inhiben NS5 (Cannalire, R. y otros las Piridobenzotiazolonas Ejercen una Potente Actividad Antidengue al Obstaculizar Múltiples Funciones de la Polimerasa NS5, *ACS Med Chem Lett*, 2020 11, 773-782). Otras publicaciones que describen inhibidores de Dengue incluyen pero no están limitadas a Moquin y otros NITD-688, un inhibidor de pan-serotipo de la proteína NS4B del virus del Dengue, muestra farmacocinética y eficacia favorables en modelos de animales preclínicos. *Science Translational Medicine*, 2021, 13, 579; Kaptein, S. y otros. Un inhibidor de pan-serotipo de virus del Dengue dirigido a la interacción NS3-NS4B. *Nature*, 2021, 598, 504-509; Shimizu, H. y otros. Descubrimiento de un inhibidor de molécula pequeña dirigido al ARN de polimerasa dependiente de NS5 ARN del virus del Dengue. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019, 13, e0007894; Yin, Z. y otros. Un inhibidor de nucleósido de adenosina del virus del Dengue, *PNAS*, 2009, 106, 20435-20439; Putra, H. y otros. Identificación de compuestos de productos naturales como inhibidores de NS5 RDRP para el serotipo de virus del Dengue 1 a 4 a través de análisis *in silico*. *AIP Conference Proceedings* 2020, 2237; Wang, Q.-Y. y otros. Un Inhibidor de Entrada de Virus del Dengue de Molécula Pequeña. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53, 1823-1831; de Oliveira, L. y otros. La pequeña molécula AZD6244 inhibe la replicación del virus del Dengue in vitro y protege contra desafíos letales en un modelo de ratón. 2020,

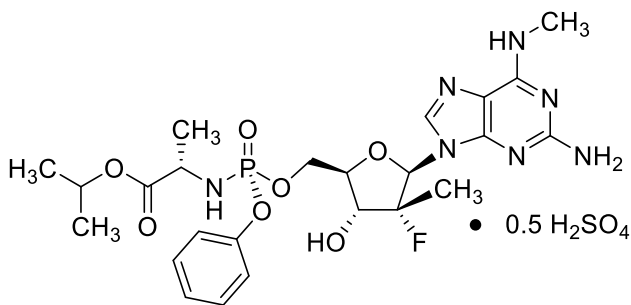
Archives of Virology, doi:10.1007/s00705-020-04524-7; y Celegato, M. y otros. Inhibidor de Moléculas Pequeñas de la interacción de NS3-NS5 de Flaviviral con Actividad de Amplio Espectro y Eficacia *In Vivo*, *Quimioterapia Antimicrobiana*, 2022 14(1) e03097-22.

- Los compuestos antivirales específicos que tratan ciertos virus de ARN incluyen el
- 5 Compuesto 1 y el Compuesto 2. La base libre, Compuesto 1, se describe, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. No. 9,828,410.



Compuesto 1

- El Compuesto 2, descrito en la Patente de EE.UU. No. 10,519,186, es la sal de
- 10 hemisulfato de ((R)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-(metilamino)-9H-purina-9-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforil)-L-alaninato de isopropilo y se describió en particular para el tratamiento de una infección viral tal como el virus de la hepatitis C. También se ha reportado el Compuesto 2 como activo contra el SARS-CoV2, el agente causante de la infección por COVID19 (ver, por ejemplo, la Patente de EE.UU. No. 10,874,687). El diastereómero S-fósforo del compuesto 2
- 15 se encuentra actualmente en ensayos clínicos en humanos para el tratamiento de HCV y COVID19.



Compuesto 2

- En la Patente de EE.UU. No. 10,946,033, Atea Pharmaceuticals, Inc. describió el uso del Compuesto 1 o Compuesto 2 generalmente para el tratamiento de *Flavivirus*, con datos de actividad
- 20 contra la fiebre amarilla, Dengue (serotipo 2), virus del Nilo Occidental y el virus de Zika.

A pesar de estas descripciones, ha resultado difícil tratar de manera efectiva el dengue debido a los problemas complejos descritos anteriormente. Sigue existiendo una fuerte necesidad médica de determinar el protocolo adecuado para el tratamiento del Dengue que sea seguro, efectivo y bien tolerado.

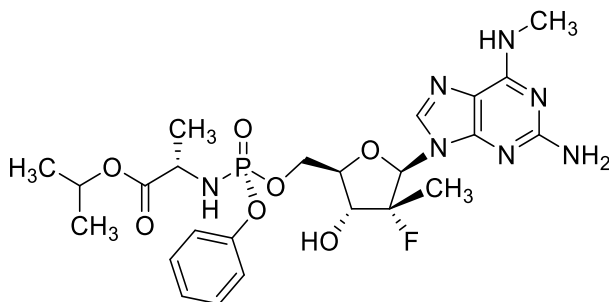
Por lo tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar regímenes ventajosos para tratar infecciones de Dengue. Otro objetivo de la presente invención es proporcionar nuevos métodos de fabricación del Compuesto 1 y Compuesto 2, el cual es el diastereómero R de fósforo.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

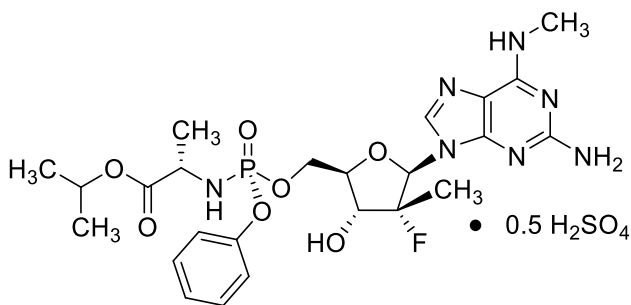
Se ha descubierto inesperadamente que el Compuesto 1 o Compuesto 2 (y en donde el Compuesto 1 puede ser una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) en una dosis alta (es decir, al menos aproximadamente 700 mg o 750 mg, y más generalmente 700 a 1000 mg por dosis (que se puede administrar en una, dos o tres formas de dosificación separadas para mayor comodidad) dos, tres o más veces al día) es ventajoso para el tratamiento del virus del Dengue, cuando se administra a un huésped, tal como un humano, que necesita el mismo. En modalidades típicas, se proporcionan el Compuesto 1 o Compuesto 2 en una o más composiciones farmacéuticas para alcanzar esta cantidad efectiva.

Además, se ha descubierto que el Compuesto 1 o Compuesto 2 también son activos contra los serotipos 1, 3 y 4 del Dengue. Con este nuevo descubrimiento, se confirma que el Compuesto 1 y Compuesto 2 en los regímenes de dosis altas descritos aquí poseen potencia contra todos los serotipos del virus del Dengue (serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus del Dengue).



20

Compuesto 1 (AT-281)



Compuesto 2 (AT-752)

El término "Compuesto 1" como se usa en la especificación puede referirse a la base libre o a una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. El compuesto 1 es ((R)-(((2R,3R,4R,5R)-5-

(2-amino-6-(metilamino)-9H-purina-9-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il) metoxi)(fenoxi)fosforil)-L-alaninato de isopropilo.

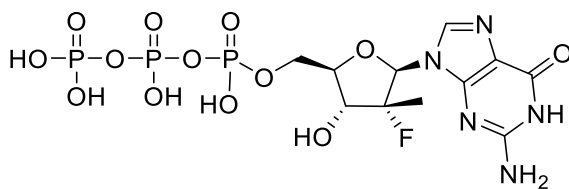
También se ha descubierto que el compuesto 1 (y su Compuesto 2 de sal de hemisulfato) tienen un mecanismo de acción dual ventajoso. El metabolito activo es un inhibidor del dominio de polimerasa de ARN dependiente de ARN (RdRp) de la proteína viral NS5, así como un inhibidor del dominio 2'-O-metiltransferasa (MTasa) de NS5. Ambas funciones de la proteína NS5 son requeridas para replicación. La inhibición de dos funciones de proteína clave involucradas en la replicación de ARN disminuye la posibilidad de que se forme un mutante resistente.

Como se discutió en el Ejemplo 2 y se muestra en el Cuadro 1 y Figura 2, se ha descubierto que el Compuesto 1 (AT-281) exhibe potencia *in vitro* contra los cuatro serotipos del Dengue, que incluye serotipo 1 ($EC_{50}=0.57 \mu M$), serotipo 2 ($EC_{50} < 7 \mu M$ en múltiples cepas), serotipo 3 ($EC_{50} < 1.5 \mu M$ en cepas múltiples) y serotipo 4 ($EC_{50} < 1.2 \mu M$ en cepas múltiples). La actividad pan-serotipo es ventajosa debido a que minimiza el riesgo de Dengue grave y reduce o elimina la necesidad de realizar pruebas de serotipo antes de la administración del compuesto.

Alternativamente, el Compuesto 1 puede utilizarse en forma de base libre o como cualquier sal farmacéuticamente aceptable deseada en el régimen de dosis alta descrita aquí. El Compuesto 2, la sal de hemisulfato del Compuesto 1, es una forma ventajosa del Compuesto 1 con propiedades *in vivo* mejoradas. Por ejemplo, el Compuesto 2 es efectivo *in vivo* en un modelo de ratón de infección por Dengue (cepa de virus D2Y98P) como se describe en el Ejemplo 18. El uso del Compuesto 2, por ejemplo, proporciona una diferencia significativa en viremia observada en los días 6 y 8 posteriores a la infección (pi) en la sangre mostrada en la Figura 8A y en el bazo que se muestra en la Figura 8B. Además, se observaron efectos significativos en la prevención de la pérdida de peso mostrada en la Figura 9A y el deterioro de la puntuación de salud mostrada en la Figura 9B en los Días 3 a 8 pi que fueron observados con relación a los animales tratados por control de portador. De manera importante, hubo una prolongación significativamente alta de supervivencia, mostrada en la Figura 10, que da fe a la eficacia del Compuesto 2 contra el virus del Dengue, o en el Compuesto 1 alternativo como una base libre o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.

En ciertos aspectos, el Compuesto 2 o Compuesto 1 (como una base libre o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma) se administra a un paciente, típicamente en el régimen de dosis alta aquí descrito, en donde el paciente tiene múltiples flavivirus y en donde uno de los flavivirus es Dengue, por ejemplo, un paciente con serotipo de Dengue 1, 2, 3 o 4 y otro flavivirus. El Compuesto 1 (AT-281) ha mostrado efectos potentes en reducción del valor viral contra 11 cepas diferentes de 7 flavivirus probados *in vitro* en 3 tipos de células diferentes con un rango de concentraciones para lograr una inhibición del 50% del efecto citopático inducido por virus (CPE, por sus siglas en inglés) de 0.21 a 1.41 μM (Cuadro 1 y Figura 2).

Como se describió en el Ejemplo 10 y se mostró en la Figura 1, el metabolito activo del Compuesto 2 o Compuesto 1 (Compuesto 5) actúa como un análogo de GTP y se incorpora al ARN por la polimerasa de ARN dependiente de NS5 ARN (RdRp), al terminar inmediatamente la síntesis.



5

Compuesto 5 (AT-9010)

La eficiencia de terminación de cadena del Compuesto 5 se midió en ensayos de incorporación de nucleótidos competitivos utilizando los cuatro serotipos de DENV. El Compuesto 5 se incorporó al ARN de 9 a 12 veces menos en comparación con trifosfato de guanosina de sustrato nativo (es decir, por cada aproximadamente 7 a 8 GTP incorporados, se incorporará un AT-9010). En comparación, el trifosfato de sofosbuvir se incorpora al ARN menos de 1 vez por cada 100 incorporaciones de UTP (trifosfato de uridina nativa). Los datos del ensayo de discriminación se proporcionan a continuación.

Preferencia	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4
GTP > AT-9010	7.7 ± 0.5	9.3 ± 0.1	11.6 ± 1.3	11.2 ± 0.7
GTP > AT-9002	19.4 ± 2.8	18.2 ± 0.2	17.5 ± 1.5	41.5 ± 7.3
UTP > SOF-TP	>100	>100	>100	>100

El Compuesto 5 (y de esa forma el Compuesto 1 y Compuesto 2) también es un inhibidor del dominio 2'-O-metiltransferasa (MTasa) de NS5 de virus del Dengue. El dominio MTasa es responsable de tapar el extremo 2' del ARN viral replicado. La tapa de ARN mitiga la respuesta inmunitaria huésped al ARN viral. La inhibición del dominio MTasa es un segundo mecanismo de acción para el Compuesto 5.

La unión del compuesto 5 para el dominio de MTasa se midió en un ensayo de cambio térmico. El Compuesto 5 estabilizó el dominio MTasa de DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4 casi dos veces más que el inhibidor de MTasa sinefungina reportado previamente ($1.9 \pm 0.1^\circ\text{C}$ para sinefungina comparada con $3.8 \pm 0.1^\circ\text{C}$ para el Compuesto 5).

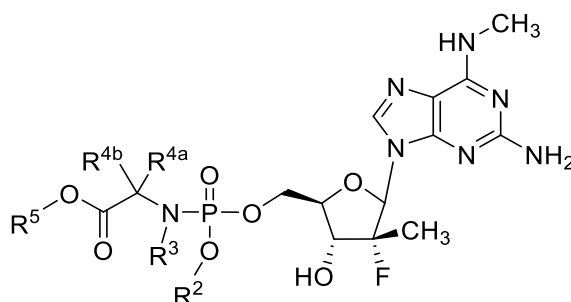
Además, el Compuesto 5 estabilizó de manera más efectiva el dominio de RdRp que el trifosfato de guanosina de sustrato nativo ($5.6 \pm 0.1^\circ\text{C}$ para el Compuesto 5 comparado con $4.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$ para GTP), en donde la sinefungina estabilizó de manera insignificante el dominio RdRp ($0.1^\circ\text{C} \pm 0.1^\circ\text{C}$).

Al confirmar la actividad del Compuesto 5 contra el dominio MTasa, se midió una EC_{50} de $29.6 \pm 2 \mu\text{M}$ en un ensayo de unión por filtro. Como se ha mostrado previamente que el Compuesto 5 alcanza cientos de concentraciones micromolares en células (Good, S. y otros Evaluación preclínica

de AT-527, un nuevo profármaco de nucleótido de guanosina con potente actividad pangenotípica contra el virus de hepatitis C, *PLoS ONE* 15(1): e0227104), una IC_{50} de 29.6 μ M indica que el Compuesto 5 es un inhibidor efectivo del dominio de MTasa.

Compuesto 5, el metabolito activo del Compuesto 2 y Compuesto 1, de esa forma tiene mecanismos múltiples de acción contra el virus del Dengue. Mecanismos múltiples de acción pueden prevenir la aparición de resistencia, especialmente contra el dominio de MTasa altamente conservado.

En ciertos aspectos de la presente invención, un compuesto de Fórmula I:



10

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo opcionalmente en un portador farmacéuticamente aceptable, se administra en una dosis alta (al menos 700 o 750 mg por dosis, por ejemplo 700 a 1000 mg por dosis (la cual puede proporcionarse en 1, 2, 3 o 4 formas de dosificación separadas para facilitar la deglución), dos, tres o más veces al día) para tratar una infección por el virus del Dengue en un huésped que necesite el mismo, típicamente un humano;

15

en donde:

R_2 es alquilo de 1 a 6 átomos de carbono (incluyendo metilo, etilo, propilo e isopropilo), cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono, arilo, arilo(alquilo de 1 a 4 átomos de carbono)-, heteroarilo, heteroarilo(alquilo de 1 a 4 átomos de carbono)- o heteroalquilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes seleccionados independientemente en cada aparición de R_2 ;

20

R_3 es hidrógeno o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono opcionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes seleccionados independientemente en cada aparición de R_3 ;

25

R_{4a} y R_{4b} se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, arilo(alquilo de 1 a 6 átomos de carbono)-, cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono, cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono(alquilo de 1 a 6 átomos de carbono)-, heteroarilo(alquilo de 1 a 6 átomos de carbono)- y arilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes seleccionados independientemente en cada aparición de R_{4a} ;

30

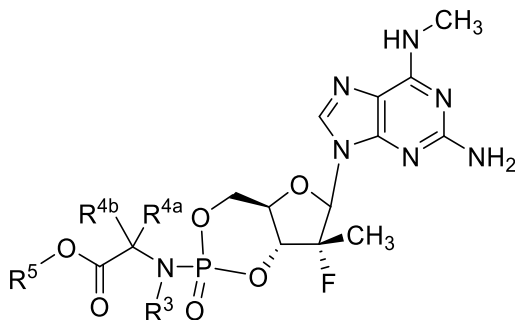
R_5 es hidrógeno, alquilo de 1 a 6 átomos de carbono (incluyendo metilo, etilo, propilo e isopropilo), haloalquilo de 1 a 6 átomos de carbono o cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono y en

una modalidad alternativa, R^5 es arilo(alquilo de 1 a 4 átomos de carbono)-, arilo, heteroarilo o heteroalquilo, opcionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes seleccionados independientemente en cada aparición de R^{55} .

R^{22} , R^{33} , R^{44} y R^{55} se seleccionan independientemente en cada aparición entre
 5 hidrógeno, alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono, alqueno, alquino, F, Cl, Br, I, heterociclo, heterocicloalquilo, haloalcoxi, haloalquilo, $C(O)R^{66}$, $C(O)OR^{66}$, $C(O)N(R^{66})_2$ y ciano;

R^{66} se selecciona independientemente en cada aparición de hidrógeno, alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, arilo(alquilo de 1 a 6 átomos de carbono), cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono, cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono (alquilo de 1 a 6 átomos de carbono),
 10 heteroarilo(alquilo de 1 a 6 átomos de carbono) y arilo.

En ciertos aspectos de la presente invención, un compuesto de Fórmula II:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo opcionalmente en un portador farmacéuticamente
 15 aceptable, se administra en una dosis alta (al menos 700 a 1000, por ejemplo, 700 a 850 mg por dosis dos, tres o más veces al día) para tratar una infección por el virus del Dengue en un huésped que necesite el mismo, típicamente un humano;

en donde:

R^3 es hidrógeno o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono opcionalmente sustituido con 1,
 20 2, 3 o 4 sustituyentes seleccionados independientemente en cada aparición de R^{33} ;

R^{4a} y R^{4b} se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, arilo(alquilo de 1 a 6 átomos de carbono)-, cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono, cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono(alquilo de 1 a 6 átomos de carbono)-, heteroarilo(alquilo de 1 a 6 átomos de carbono)- y arilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con 1, 2, 3 o
 25 4 sustituyentes seleccionados independientemente en cada aparición de R^{44} ;

R^5 es hidrógeno, alquilo de 1 a 6 átomos de carbono (incluyendo metilo, etilo, propilo e isopropilo), haloalquilo de 1 a 6 átomos de carbono o cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono y, en una modalidad alternativa, R^5 es arilo(alquilo de 1 a 4 átomos de carbono)-, arilo, heteroarilo o heteroalquilo, opcionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes seleccionados

independientemente en cada aparición de R^{55} .

R^{22} , R^{33} , R^{44} y R^{55} se seleccionan independientemente en cada aparición de hidrógeno, alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono, alqueno, alquino, F, Cl, Br, I, heterociclo, heterocicloalquilo, haloalcoxi, haloalquilo, $C(O)R^{66}$, $C(O)OR^{66}$, $C(O)N(R^{66})_2$ y ciano;

R^{66} se selecciona independientemente en cada aparición de hidrógeno, alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, arilo(alquilo de 1 a 6 átomos de carbono)-, cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono, cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono(alquilo de 1 a 6 átomos de carbono)-, heteroarilo(alquilo de 1 a 6 átomos de carbono)- y arilo.

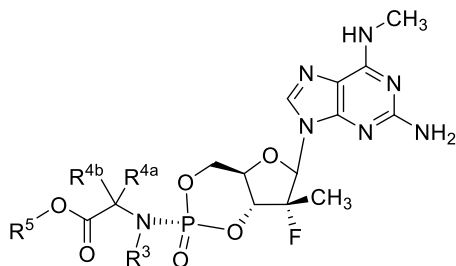
Todos los grupos R pretenden interpretarse en una forma que no incluya redundancia, es decir, como se sabe en la técnica, alquilo no se sustituiría con alquilo; sin embargo, por ejemplo, alcoxi sustituido con alcoxi no es redundante. Arilo sustituido con arilo cae dentro de la definición de arilo en un alcance limitado. Los grupos R no están opcionalmente sustituidos a menos que se indique específicamente en el contexto.

Ejemplos no limitantes de alquilo de 1 a 6 átomos de carbono incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, t-butilo, sec-butilo, isobutilo, $-CH_2C(CH_3)_3$, $-CH(CH_2CH_3)_2$ y $-CH_2CH(CH_2CH_3)_2$. Ejemplos no limitantes de cicloalquilo de 3 a 6 átomos de carbono incluyen ciclopropilo, CH_2 -ciclopropilo, ciclobutilo y CH_2 -ciclobutilo.

Un ejemplo no limitante de arilo(alquilo de 1 a 4 átomos de carbono)- es bencilo.

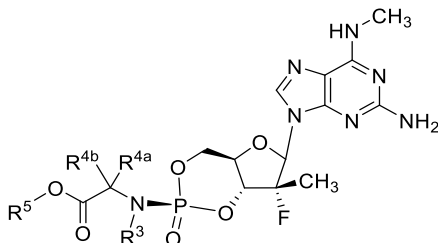
Ejemplos no limitantes de arilo son fenilo y naftilo.

En ciertos aspectos, el compuesto es de la Fórmula IIA:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde todas las variables son como se definen aquí.

En ciertos aspectos, el compuesto es de la Fórmula IIB:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde todas las variables son como se definen aquí.

En ciertos aspectos, un compuesto seleccionado descrito aquí se usa para tratar la infección de virus del Dengue, que puede ser serotipo 1, 3 y/o 4. En algunas modalidades, un compuesto seleccionado aquí descrito se usa para tratar la infección de virus del Dengue, que puede ser serotipo 1, 2, 3 y/o 4, al administrar una dosis de aproximadamente 700 a 1000 mg, por ejemplo, 700 a 850 mg por dosis dos, tres o más veces al día (y en algunas modalidades, 650, 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975 o 1000 miligramos dos o tres veces al día) a un paciente que necesite el mismo. En ciertas modalidades, el Compuesto 1 o Compuesto 2 son administrados en una dosis de aproximadamente 700 a 1000 mg, por ejemplo, al menos aproximadamente 700, 750 u 800 mg por dosis (que puede administrarse en múltiples formas de dosificación sólidas para alcanzar la dosis completa).

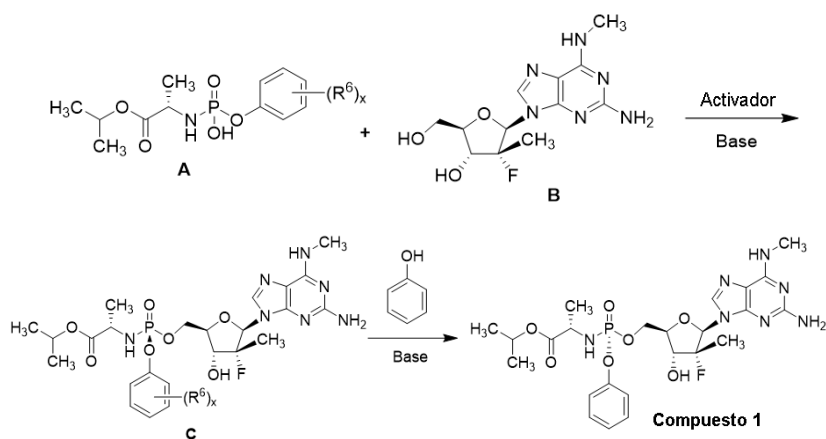
En una modalidad específica, el Compuesto 2 se administra en una dosis de tres formas de dosificación sólidas de 250 mg de peso de base libre para alcanzar una forma de dosificación total de dosificación de 750 mg dos veces al día. En otras modalidades, el Compuesto 2 se administra en dos formas de dosificación sólidas de 375 mg para alcanzar una forma de dosificación total de dosificación de 750 mg dos veces al día.

En ciertas modalidades, el Compuesto 1 o Compuesto 2 se administra dos, tres o cuatro veces al día durante cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez días. En ciertas modalidades, este régimen de tratamiento puede tratar los serotipos de virus del Dengue 1, 3 y/o 4, o incluso 1, 2, 3 y/o 4. Para mayor claridad, a menos que se indique de otra forma, la dosis en miligramos del compuesto activo administrada se basa en el peso de la sal del fosforamidato nucleótido, si se utiliza una sal farmacéuticamente aceptable. Para propósitos de conversión, una dosis de aproximadamente 750 mg del Compuesto 2 corresponde a una dosis de aproximadamente 692 mg del Compuesto 1 (que se encuentra dentro de "aproximadamente 700 mg"), en la forma de base libre.

La presente invención incluye tanto terapias de tratamiento como profilácticas o preventivas. En algunas modalidades, el compuesto inhibidor activo de NS5 RdRp como se describe aquí se administra como un profiláctico a un huésped tal como un humano, de conformidad con los métodos de dosificación alta aquí proporcionados que ha estado expuesto y de esa forma corre el riesgo de contraer una infección del virus del Dengue tal como el virus del Dengue 1, el virus del Dengue 2, el virus del Dengue 3 y/o el virus del Dengue 4. En otra modalidad alternativa, se proporciona un método para prevenir la transmisión que incluye administrar una cantidad efectiva de dosis alta como se describe aquí de uno de los compuestos aquí descritos para un ser humano durante un período de tiempo suficiente antes de la exposición a multitudes que pueden infectarse, incluyendo durante viajes o eventos público o reuniones, incluyendo, por ejemplo, hasta 3, 5, 7, 10, 12, 14 o más

días antes de una situación comunicable.

La presente invención también proporciona un proceso estereoselectivo para una fabricación escalable del Compuesto 1 en donde el diastereómero R_P se produce en forma sustancialmente pura. Una forma sustancialmente pura del diastereómero se refiere típicamente a al menos aproximadamente 90% o más del diastereómero R_P sobre el diastereómero S_P. La reacción de un compuesto de fórmula Intermedia A, Intermedia B y un activador a base de uronio, por ejemplo, hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio (HATU, por sus siglas en inglés), forma preferencialmente el fosforamidato S_P Intermedio C. Un proceso similar se describió en el documento WO 2022/040473A1, asignado a Atea Pharmaceuticals, en donde el producto deseado fue el fosforamidato S_P.



El grupo ariloxi en el fosforamidato del intermedio C se sustituye con uno, dos o tres grupos R⁶ el cual se activan para desplazamiento, por ejemplo, mediante función de captación de electrones. En un segundo paso, el grupo saliente fenoxi activado se desplaza por fenol, invirtiendo la estereoquímica del fósforo para formar el Compuesto 1.

En ciertas modalidades, el diastereómero de fósforo R sustancialmente puro tiene una pureza de aproximadamente 93% o mayor, aproximadamente 95% o mayor, aproximadamente 98% o mayor o incluso aproximadamente 99% o mayor.

En ciertas modalidades, la dosis de 700 mg a 1,000 mg se administra en tres formas de dosificación sólidas a un paciente que necesita el mismo para el tratamiento del Dengue, en donde las formas de dosificación sólidas que totalizan aproximadamente 700 mg a aproximadamente 1,000 mg del compuesto 1 o 2 son administradas dos veces al día (un total de seis píldoras diarias). En ciertas modalidades, las tres formas de dosificación sólidas que totalizan un total de aproximadamente 700 mg a aproximadamente 1000 mg del Compuesto 1 o 2 son administradas durante cuatro, cinco, seis o siete días seguidos. En ciertas modalidades, las tres formas de dosificación sólidas que totalizan un total de aproximadamente 700 mg a aproximadamente 1000 mg del Compuesto 1 o 2 son administradas durante ocho, nueve, diez, once, doce, trece o catorce días seguidos.

En ciertas modalidades, la Composición B se administra durante cuatro, cinco, seis o siete días seguidos. En ciertas modalidades, la Composición A se administra durante ocho, nueve, diez, once, doce, trece o catorce días seguidos.

5 En algunas modalidades, el Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se utiliza en la Composición A o la Composición B.

En ciertas modalidades, el Compuesto 1 o Compuesto 2 se administran dos veces al día en una dosis de al menos aproximadamente 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975 o 1000 mg, en donde el compuesto se administra, a manera de ejemplo ilustrativo, cada 8+/-2 horas.

10 En ciertos aspectos un régimen de dosificación aquí descrito se administra dentro de los cuatro, tres, dos o un día posteriores al inicio de los síntomas. En ciertas modalidades, un régimen de dosificación aquí descrito se administra dentro de las 48 horas posteriores al inicio de los síntomas.

La presente invención incluye las siguientes características:

15 (a) Un régimen de dosificación del Compuesto 1 o Compuesto 2 que comprende administrar al menos aproximadamente 675 a 1000 o 700 a 1000 mg por dosis, tal como 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975 o 1000 mg del Compuesto 1 o Compuesto 2 dos o tres veces al día a un paciente con serotipo de fiebre de Dengue 1, 2, 3 y/o 4.

(b) El tratamiento de serotipo de Dengue 1, 3 o 4 como se describe aquí además.

20 (c) Un régimen de dosificación del Compuesto 1 o Compuesto 2 que comprende administrar al menos aproximadamente 675 a 1000 mg por dosis, tal como 675, 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975 o 1000 mg del Compuesto 1 o Compuesto 2 dos o tres veces al día a un paciente con serotipo de fiebre de Dengue 1, 3 y/o 4.

25 (d) El régimen de dosificación de (a), (b) o (c), en donde el Compuesto 1 o Compuesto 2 se administran en tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o quince días consecutivos.

(e) El régimen de dosificación de (a), (b) o (c) en donde el Compuesto 1 o Compuesto 2 se administran a una dosis de aproximadamente 750 mg tres veces al día durante catorce días.

30 (f) El régimen de dosificación de (a), (b) o (c) en donde el Compuesto 1 o Compuesto 2 se administran a una dosis de aproximadamente 750 mg tres veces al día por peso de la base libre durante cinco días.

(g) El régimen de dosificación de (a) o (b), en donde el Compuesto 1 o Compuesto 2 se administran a una dosis de aproximadamente 1,000 mg en peso de base libre dos veces al día durante cinco, seis o siete días.

35 (h) El régimen de dosificación de cualquiera de (a) a (g) en donde el Compuesto 2 se administra al paciente.

(i) El régimen de dosificación de (h), en donde la dosis de aproximadamente 675 mg a 1,000 mg se administra en tres formas de dosificación sólidas

(j) El régimen de dosificación de cualquiera de (a) a (g) en donde el Compuesto 1 se administra al paciente.

5 (k) Un método para tratar Dengue en un paciente que lo necesita que comprende administrar el Compuesto 1 o Compuesto 2 en un régimen de dosificación de cualquiera de (a) a (j).

(l) El método de (k) en donde el régimen de dosificación comprende administrar una composición farmacéutica que comprende el Compuesto 1 o Compuesto 2.

10 (m) Uso del régimen de dosificación de cualquiera de (a) a (k) en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la fiebre de Dengue.

(n) El uso de (l) o (m) en donde el régimen de dosificación comprende administrar una composición farmacéutica que comprende el Compuesto 1 o Compuesto 2.

(o) Un método para tratar Dengue en un paciente que lo necesita que comprende administrar un compuesto de Fórmula I de conformidad con un protocolo de dosis alta aquí descrito.

15 (p) Un método para tratar Dengue en un paciente que lo necesita, que comprende administrar un compuesto de Fórmula II, Fórmula IIA o Fórmula IIB de conformidad con un protocolo de dosis alta aquí descrito.

(q) Un proceso para la fabricación del Compuesto 1 o 2 que incluye hacer reaccionar un compuesto de la fórmula Intermedia A, Intermedia B y un activador basado en uronio, por ejemplo, hexafluorofosfato de 3-óxido de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio (HATU), en una manera que forma preferentemente el fosforamidato de S_P Intermedio C, como se describió anteriormente, y después, en un segundo paso, el grupo saliente de fenoxi activado es desplazado por fenol, invirtiendo la estereoquímica del fósforo para formar el Compuesto 1 en la configuración diastereomérica de fósforo R.

20

25 (r) El proceso de (q) en donde el diastereómero de fósforo R sustancialmente puro tiene una pureza de aproximadamente 93% de pureza o mayor, aproximadamente 95% de pureza o mayor, aproximadamente 98% de pureza o mayor o incluso aproximadamente 99% de pureza o mayor.

30 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

La Figura 1 ilustra el Compuesto 2 (AT-752) y una vía metabólica hacia el Compuesto 5 de metabolito farmacológicamente activo (AT-9010).

35 La Figura 2 muestra curvas de inhibición dependientes de concentración del Compuesto 1 (AT-281) contra el virus del Dengue-2 (DENV), el Virus del Nilo Occidental (WNV) y el

Virus de la Fiebre Amarilla (YFV). El eje x es la concentración logarítmica del Compuesto 1 (AT-281) y el eje y mide la reducción en el rendimiento viral medido por el% del valor viral. El procedimiento experimental se proporciona en el Ejemplo 2.

La Figura 3 muestra la formación *in vitro* del Compuesto 5 (AT-9010) en células mononucleares de sangre periférica humana. Las PBMC se incubaron con 10 μ M de Compuesto 1 (AT-281) durante 6 h. Luego se eliminó el profármaco y las células se enjuagaron e incubaron durante otras 28 h (fase de lavado). En cada punto temporal, las células (n=3) se recolectaron en MeOH al 60% helado y se analizaron para el Compuesto 5 (AT-9010), el TP intracelular activo, que utiliza un ensayo LC-MS/MS. Los datos se expresan como media +/- SD. El eje x muestra los puntos temporales medidos en horas y el eje y muestra la cantidad de Compuesto 5 (AT-9010) medida en picomoles/ 10^6 células. El procedimiento experimental se proporcionó en el Ejemplo 8.

La Figura 4 muestra una imagen fosforescente de una acrilamida:bisacrilamida al 20% (19:1), gel de secuenciación de urea 7M que indica los resultados de un ensayo de incorporación de nucleótidos que se observa en la incorporación del Compuesto 5 (AT-9010) en presencia y ausencia de GTP. La mitad izquierda del gel muestra el curso temporal del alargamiento del cebador P₁₀ a lo largo de una plantilla de ARN T₂₀ por la proteína NS5 de DENV-2 con ATP, UTP y CTP (100 μ M cada uno) y concentraciones crecientes del Compuesto 5 (AT-9010) (0 – 250 μ M). La mitad derecha del gel muestra el alargamiento en presencia de los cuatro NTP (100 μ M) en competencia con el Compuesto 5 (AT-9010) (100 – 625 μ M). Los productos de incorporación del Compuesto 5 (AT-9010) en las posiciones +5 y +7 se muestran con el punto inferior, mientras que la incorporación del GTP nativo en las mismas posiciones se muestra con el punto superior. El procedimiento experimental se proporcionó en el Ejemplo 10.

La Figura 5 muestra una imagen fosforescente de una acrilamida:bisacrilamida al 20% (19:1), gel de secuenciación de urea 7M que muestra los resultados de un ensayo de incorporación de nucleótidos que se observa en la incorporación del terminador de cadena 3'dGTP en presencia y ausencia de GTP. La mitad izquierda del gel muestra la evolución temporal del alargamiento del cebador P₁₀ a lo largo de una plantilla de ARN T₂₀ por la proteína NS5 de DENV-2 con ATP, UTP y CTP (100 μ M cada uno) y concentraciones crecientes de 3'dGTP (0 – 250 μ M). La mitad derecha del gel muestra el alargamiento en presencia de los cuatro NTP (100 μ M) en competencia con 3'dGTP (100 – 625 μ M). Los productos de incorporación de 3'dGTP en las posiciones +5 y +7 se muestran con el punto inferior, mientras que la incorporación del GTP nativo en las mismas posiciones se muestra con el punto superior. El procedimiento experimental se proporciona en el Ejemplo 10.

La Figura 6A muestra una gráfica de líneas que mide la concentración de plasma del Compuesto 1 (AT-281) y sus metabolitos en ratones después de dosis orales del Compuesto 2 (AT-752). A ratones CD-1 machos se les administraron 420 mg/kg del Compuesto 2 (AT-752). Se

recogieron muestras de sangre hasta 24 horas después de la dosis, se separó el plasma y se analizó para el Compuesto 1 (AT-281), el Compuesto 3 (AT-551) y el Compuesto 6 (AT-273) mediante LC-MS/MS. Los datos se expresan como media $\pm$ SD ($n=3-5$ /punto temporal). El eje x es el tiempo posterior a la dosis medida en horas y el eje y es la concentración de plasma de los metabolitos medidos en nanomoles/mL). El procedimiento experimental se proporciona en el Ejemplo 14.

La Figura 6B muestra una gráfica lineal que mide la concentración plasmática del Compuesto 1 (AT-281) y sus metabolitos en ratas después de dosis orales del Compuesto 2 (AT-752). Se administraron a ratas SD macho 300 mg/kg del Compuesto 2 (AT-752). Se recogieron muestras de sangre hasta 24 horas después de la dosis, se separó el plasma y se analizó para el Compuesto 1 (AT-281), el Compuesto 3 (AT-551) y el Compuesto 6 (AT-273) mediante LC-MS/MS. Los datos se expresan como medios $\pm$ SD ($n=3-5$ /punto temporal). El eje x es el tiempo posterior a la dosis medida en horas y el eje y es la concentración plasmática de los metabolitos medida en nanomoles/mL). El procedimiento experimental se proporcionó en el Ejemplo 14.

La Figura 6C muestra una gráfica de línea que mide la concentración de plasma del Compuesto 1 (AT-281) y sus metabolitos en monos después de dosis orales de AT-752. Se administraron 300 mg/kg del Compuesto 2 (AT-752) a monos cinomólogos machos. Se recolectaron muestras de sangre hasta 24 horas después de la dosis, se separó el plasma y se analizó para el Compuesto 1 (AT-281), el Compuesto 3 (AT-551) y el Compuesto 6 (AT-273) mediante LC-MS/MS. Los datos se expresan como medio $\pm$ SD ($n=3-5$ /punto temporal). El eje x es el tiempo posterior a la dosis medida en horas y el eje y es la concentración de plasma de los metabolitos medida en nanomoles/mL). El procedimiento experimental se proporcionó en el Ejemplo 14.

La Figura 7 muestra los resultados de la formación in vivo del Compuesto 5 (AT-9010) en PBMC después de la administración oral del Compuesto 2 (AT-752) en ratones, ratas y monos. A los ratones y ratas se les administró una dosis oral del Compuesto 1 (AT-281) y se recolectó sangre a las 4 y 12 h (ratones) y a las 24, 48 y 72 h (ratas). A los monos se les administró una dosis oral del Compuesto 2 (AT-752) equivalente al Compuesto 1 (AT-281) a 55 mg/kg y se recolectó sangre a las 12, 24 y 48 h. Se aislaron las PBMC y el Compuesto 5 (AT-9010) se extrajo y cuantificó utilizando LC/MS/MS. Se agruparon las PBMC de ratón de 3 animales por punto temporal; los datos de ratas y monos se expresaron como medio $\pm$ SD ($n=2-3$ por punto temporal). El eje x es el tiempo posterior de dosis medida en horas y el eje y es la concentración del Compuesto 5 (AT-9010) en PBMC medida en picomoles/ 10^6 células. El procedimiento experimental se proporcionó en el Ejemplo 15.

La Figura 8A muestra la viremia en ratones infectados con DENV tratados con el Compuesto 2 (AT-752). Los ratones AG129 desafiados con DENV2 fueron tratados por vía oral con portador (control) o Compuesto 2 (AT-752) (una dosis de carga de 1000 mg/kg 4 h antes del desafío, seguida por dosis BID de 500 mg/kg durante 7 días consecutivos, comenzando 1 h después de la

inoculación). Se recolectaron muestras de sangre los días 4, 6, 7, 8 y 10 posteriores a la infección y se evaluó la carga viral mediante un ensayo de placa. La línea de puntos = límite de detección; los datos se expresan como media $\pm$ SD. $*p < 0,01$ mediante prueba t en cada punto temporal. El eje x representa los días posteriores a la infección medidos en días y el eje y es la cantidad de viremia medida en sangre medida por $\log_{10}$ PFU/mL. El procedimiento experimental se proporcionó en el Ejemplo 18.

La Figura 8B muestra la carga viral del bazo en ratones infectados con DENV tratados con el Compuesto 2 (AT-752). Los ratones AG129 desafiados con DENV2 fueron tratados por vía oral con portador (control) o Compuesto 2 (AT-752) (una dosis de carga de 1000 mg/kg 4 h antes del desafío, seguida por dosis BID de 500 mg/kg durante 7 días consecutivos, comenzando 1 h de inoculación posterior). Se recolectaron muestras de bazo los días 4, 6, 7, 8 y 10 posteriores a la infección y se evaluó la carga viral mediante un ensayo de placa. La línea de puntos = límite de detección; los datos se expresan como media $\pm$ SD. $*p < 0.01$ mediante prueba t en cada punto temporal. El eje x representa los días posteriores a la infección medidos en días y el eje y es la cantidad de virus en el bazo medida en $\log_{10}$ PFU/gramo. El procedimiento experimental se proporcionó en el Ejemplo 18.

La Figura 9A muestra el cambio de peso de los ratones infectados con DENV tratados con el Compuesto 2 (AT-752). Los ratones AG129 desafiados con DENV2 se les administró por vía oral el Portador (control) o Compuesto 2 (AT-752) (una dosis de carga de 1000 mg/kg 4 h antes del desafío, seguido de dosis BID de 500 mg/kg durante 7 días consecutivos comenzando 1 h de inoculación posterior). Los pesos corporales se registraron diariamente durante la duración del estudio. El peso se comparó con el Día 0 (línea de base) y se presentó como cambio porcentual. Los datos se expresaron como media $\pm$ SD. $*p < 0.01$ por prueba t en cada punto temporal. El eje x representa los días posteriores a la infección medidos en días y el eje y son los cambios de peso medidos en porcentaje desde la línea de base. El procedimiento experimental se proporcionó en el Ejemplo 18.

La Figura 9B muestra las puntuaciones de salud de ratones infectados con DENV tratados con el Compuesto 2 (AT-752). Los ratones AG129 desafiados con DENV2 se les administró por vía oral el Portador (control) o Compuesto 2 (AT-752) (una dosis de carga de 1000 mg/kg 4 h antes del desafío, seguida de dosis BID de 500 mg/kg durante 7 días consecutivos comenzando 1 h de inoculación posterior). Las puntuaciones de salud se registraron diariamente durante la duración del estudio. Los datos se expresaron como media $\pm$ SD. $*p < 0.01$ por prueba t en cada punto temporal. El eje x representa los días posteriores a la infección medidos en días y el eje y es la puntuación de salud medida numéricamente con una puntuación más baja que representa una mejor salud. El procedimiento experimental se proporcionó en el Ejemplo 18.

La Figura 10 muestra curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones infectados

con DENV tratados con Compuesto 2 (AT-752). Los ratones AG129 expuestos a DENV2 se les administró el portador (control) o Compuesto 2 (AT-752) (una dosis de carga de 1000 mg/kg 4 h antes del desafío, seguida de dosis BID de 500 mg/kg durante 7 días consecutivos comenzando 1 h de inoculación posterior). El porcentaje de supervivencia se calculó hasta 20 días después de la infección, excluyendo a los ratones sacrificados según lo programado para la recolección de muestras de sangre y bazo. El grupo tratado fue significativamente diferente del control, $p < 0.001$ por la prueba de rango logarítmico de Mantel-Cox. El eje x representa los días posteriores a la infección medidos en días y el eje y es el porcentaje de supervivencia. El procedimiento experimental se proporcionó en el Ejemplo 18.

La Figura 11 es un gráfica de líneas que muestra la concentración de plasma del Compuesto 1 establecida por una dosificación de 750 mg tres veces al día del Compuesto 2. La concentración de plasma se mantiene por encima de la EC_{90} del Compuesto 1 contra el serotipo 2 del Dengue (aproximadamente 200 ng/mL) a través del ciclo de tratamiento. Seis participantes sanos recibieron 13 dosis orales consecutivas de 750 mg del Compuesto 2 cada 8 horas (tres veces al día durante 4 días y una dosis el día 5). Se obtuvieron muestras de plasma para una evaluación farmacocinética intensiva y más de 8 horas después de la primera y onceava dosis, y más de 120 horas después de la última (decimotercera dosis). Se obtuvieron muestras de plasma para concentraciones mínimas antes de cada dosis. Los niveles plasmáticos del Compuesto 6, consideraron un sustituto para el Compuesto 5 de metabolito de trifosfato activo intracelular (Figura 1) se cuantificaron utilizando un método de HPLC-MS/MS validado.

La Figura 12 es un gráfica farmacocinética que muestra la concentración del Compuesto 1 en plasma a lo largo del tiempo. Las dosis probadas son 250 mg, 500 mg, 500 mg con alimentos, 1000 mg, 1000 mg y 1500 mg en pacientes de origen del Este/Sudeste/Sur de Asia. Se tomaron muestras de plasma en puntos temporales predeterminados y se cuantificaron utilizando LC-MS/MS. El análisis de los datos se puede encontrar en el Ejemplo 24, Cuadro 10. La exposición de plasma del Compuesto 1 aumentó en el rango de dosis estudiado en una mayor manera que la proporcional a la dosis. La comida rica en grasas/rica en calorías retrasó la C_{max} del Compuesto 1 pero tuvo un impacto limitado o nulo en la exposición total. En pacientes en ayunas, el Compuesto 1 se absorbió y se eliminó rápidamente.

La Figura 13 es una gráfica farmacocinética que muestra la concentración del Compuesto 3 en plasma a lo largo del tiempo. Las dosis probadas son 250 mg, 500 mg, 500 mg con alimentación, 1000 mg, 1000 mg y 1500 mg en pacientes de origen del Este/Sudeste/Sur de Asia. Se tomaron muestras de plasma en puntos de tiempo predeterminados y se cuantificaron utilizando LC-MS/MS. El análisis de los datos se puede encontrar en el Ejemplo 24, Cuadro 11. Similar al Compuesto 1, la exposición de plasma del Compuesto 3 aumentó en una mayor manera que la proporcional a la

dosis.

La Figura 14 es una gráfica farmacocinética que muestra la concentración del Compuesto 6 en plasma a lo largo del tiempo. Las dosis probadas son 250 mg, 500 mg, 500 mg con alimentación, 1000 mg, 1000 mg y 1500 mg en pacientes de origen del Este/Sudeste/Sur de Asia. Se tomaron muestras de plasma en puntos de tiempo predeterminados y se cuantificaron utilizando LC-MS/MS. El análisis de los datos se puede encontrar en el Ejemplo 24, Cuadro 12. La exposición de plasma del Compuesto 6 aumentó en una menor manera que la proporcional a la dosis en los rangos estudiados. Los niveles de plasma del Compuesto 6 aumentaron lentamente y exhibieron una vida media de eliminación prolongada (media de cohorte de 23 horas). La comida rica en grasas y calorías aumentó ligeramente la exposición del Compuesto 6. Se observó que la depuración renal del Compuesto 6 excedía la tasa de filtración glomerular, lo que sugiere que los procesos de secreción activa están involucrados en la depuración renal de este metabolito.

La Figura 15 es una gráfica farmacocinética que muestra la concentración del Compuesto 7 en plasma a lo largo del tiempo. Las dosis probadas son 250 mg, 500 mg, 500 mg con alimento, 1000 mg, 1000 mg y 1500 mg en pacientes de origen del Este/Sudeste/Sur de Asia. Se tomaron muestras de plasma en puntos de tiempo predeterminados y se cuantificaron utilizando LC-MS/MS. El análisis de los datos se puede encontrar en el Ejemplo 24, Cuadro 13. En todo el rango de dosis estudiado, la exposición plasmática del Compuesto 7 aumentó en una manera dependiente de la dosis. El Compuesto 7 exhibió una fase de eliminación más lenta que los Compuestos 2 o 3. También se observó que la depuración renal del Compuesto 7 era mayor que la tasa de filtración glomerular, lo que sugiere que los procesos de secreción activa están involucrados en la depuración renal de este metabolito.

La Figura 16 muestra la actividad in vitro de AT-281 contra los reporteros DENV1–4, como se describe en el Ejemplo 26. Se añadieron diluciones seriadas de AT-281 y virus modificados con un reportero de nano luciferasa (MOI de 0.1 para DENV-1, DENV-2 y DENV-3; MOI de 0.001 para DENV-4) a placas de 96 pocillos sembradas con 1×10^4 células Huh-7 por pocillo. Después de la incubación durante 48 h, las células se lavaron y los valores de CE50 se determinaron mediante actividades de luciferasa. Los datos se normalizaron a muestras de tratamiento con DMSO que se establecieron al 100%. Las barras de error representan la media $\pm$ SD. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes, cada uno analizado en triplicado.

La Figura 17 muestra experimentos de cambio de estabilidad térmica que muestran el efecto estabilizador de GTP, AT-9010 o Sinefungina sobre las MTasas de serotipo 1 a 4 del DENV, proteína de RdRp y NS5. Las proteínas se expresaron y purificaron como se describe en los Ejemplos 27 a 30. El ensayo de cambio térmico se realizó como se describe en el Ejemplo 31. Los valores son reportados en delta Tm (ΔT_m (°C)) utilizando las proteínas solas como una línea base.

La Figura 18 muestra la base funcional y estructural de la inhibición de la MTasa del DENV por AT-9010. A) Determinación de la dosis-respuesta que utiliza un ensayo vinculante de filtro (FBA, por sus siglas en inglés). Las reacciones se incubaron a 30 °C durante 30 min y la actividad enzimática se determinó utilizando FBA como se describe en el Ejemplo 33. B) La estructura general de la MTasa de DENV3 representada en cintas azules complejas con SAH y AT-9010 representadas como barras. AT-9010 se localiza en el sitio vinculante de Cap. C) Mapa de omisión en 1σ de AT-9010. D) Vista cercana de la vinculación de AT-9010 en el sitio vinculante de GTP. Los residuos interactuantes están etiquetados y se muestran como barras. E) Comparación estructural de la posición de un GTP (rosa) y AT9010 (marrón claro) vinculados en el sitio vinculante de Cap. Las estructuras del sitio vinculante de Cap pertenecen a las MTasas de DENV2 (en rosa - PDB 2P1D)) y DENV3 (en marrón claro) y están conservadas.

La Figura 19A muestra la incorporación e inhibición de AT-9010 durante la reacción de iniciación de novo por NS5 de DENV2, como se describe en el Ejemplo 34. A) Análisis de PAGE de las reacciones de iniciación de novo utilizando una plantilla de 10 nt que corresponde al extremo 3' del genoma (AACAGGUUCU) que resulta en la formación de pppApG, pppApGpA y pppApGpApA a lo largo del tiempo. El GTP se reemplazó por AT9010 o se agregó AT9010 en concentraciones crecientes a las reacciones que contenían 100 μM de GTP. B) Inhibición de la formación de producto de novo por AT-9010 basada en la cuantificación de bandas de producto de cuatro (Mn) o dos (Mg) reacciones independientes; se dan los valores de IC50 correspondientes.

FIG. 19B muestra la discriminación de AT-9010, AT-9002 (2'-metil-GTP) y SOF-TP por NS5 de DENV4 contra sus competidores nucleótidos naturales GTP, GTP y UTP, respectivamente. A) Ensayo de extensión de cebador, como se describe en el Ejemplo 34, que permite la inserción múltiple de ATP, CTP y UTP en la ausencia, presencia de GTP; o la presencia de una mezcla de GTP y AT-9010 como se indica a continuación del autofluorograma del gel. La naturaleza de los nucleótidos Watson-Crick insertados regulares se indican a la derecha del gel. B) Ensayo de extensión de cebador que permite la incorporación de un nucleótido individual GTP, AT-9010, AT-9002, UTP o SOF-TP. La cuantificación de productos de banda de mayor tamaño que la banda G/AT (+5) con relación a la banda G/AT (+5) se midió utilizando un Typhoon FluorImager, y permitió calcular el valor de discriminación. Las tasas de incorporación de AT-901 y AT9002 se comparan con las de GTP y con las de UTP en el caso de SOF-TP. En las Figuras 21A a 21D se reportan resultados similares para otras NS5 de DENV1-3.

La FIG. 20A compara los sitios activos de RdRp de HCV, DENV y SARS-CoV-2. El cocrystal NS5b de HCV con sofosbuvir (PDB: 4WTG) se superpuso sobre NS5 de DENV2 (PDB: 5ZQK). Los procedimientos para el estudio de modelado se describen en el Ejemplo 35. Se representan las cadenas laterales de aminoácidos en la proximidad del motivo D y así como los fosfatos de

nucleótidos. La región del motivo D se muestra para HCV. Los metales A y B se representan con esferas en la proximidad de los aspartatos catalíticos de los motivos A y C, respectivamente.

La Figura 20B La estructura de nsp12 de SARS-CoV-2 y AT-9010 se superpuso sobre NS5 de DENV (PDB: 5ZQK) como se describe en el Ejemplo 35. La cadena lateral del aminoácido lisina del motivo D se muestra para nsp12 de SARS-CoV-2 y para NS5 de DENV, respectivamente. Se representan los aminoácidos esenciales que entran en contacto con los fosfatos de nucleótidos. Un metal B único se representa con una esfera en la proximidad de los aspartatos catalíticos del motivo A y C, respectivamente (Shannon, A. y otros, Un segundo tipo de metiltransferasa de tapa de ARN de guanina N7 en un locus inusual de un genoma de virus de ARN grande, *Nucleic Acids Research*, 2022, 50(19) 11186-11198).

Las Figuras 21A, 21B, 21C y 21D muestran el ensayo de extensión de cebador que permite la incorporación de un nucleótido individual GTP, AT-9010, AT-9002 (2'-metil-GTP), UTP o SOF-TP como se describe en el Ejemplo 34, pero se reportó comparativamente para los 4 serotipos de NS5 de DENV. Las mediciones y cuantificaciones fueron como en la Figura 19B. Las tasas de incorporación para AT-9010 y 2'-metilguanosina trifosfato (AT-9002) se compararon con las de GTP y con las de UTP en el caso de SOF-TP.

La Figura 22 muestra el ensayo de extensión de cebador que permite la incorporación de múltiples nucleótidos AT-9010 con los cuatro NTP o solo UTP, ATP y CTP como se describe en el Ejemplo 34, pero se reportó comparativamente para los 4 serotipos de NS5 de DENV.

La Figura 23 muestra la cuantificación de los geles mostrados en la Figura 21 y la representación gráfica de las tasas de incorporación. Los datos proporcionados en los gráficos se pueden encontrar en la Figura 21 y el procedimiento utilizado para recopilar los datos se puede encontrar en el ejemplo 34. Las tasas de incorporación para AT-9010 y AT9002 se comparan con las de GTP y con las de UTP en el caso de SOF-TP.

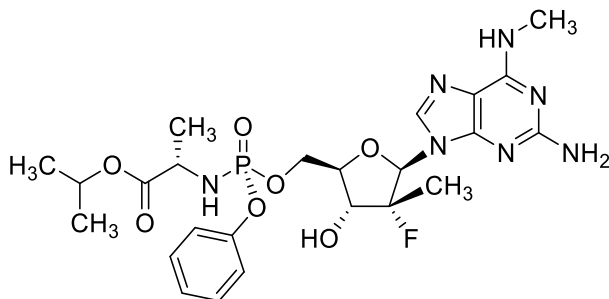
La Figura 24 muestra las estructuras del Compuesto 1 y Compuesto 2.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se ha descubierto inesperadamente que el Compuesto 1 o Compuesto 2 (y en donde el Compuesto 1 puede ser una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) en una dosis alta (es decir, al menos 700 a 1,000 mg por dosis dos, tres o más veces al día) es ventajoso para el tratamiento del virus del Dengue, cuando se administra a un huésped, tal como un ser humano, que lo necesita. En ciertas modalidades, el Compuesto 1 o Compuesto 2 se pueden proporcionar en una composición farmacéutica.

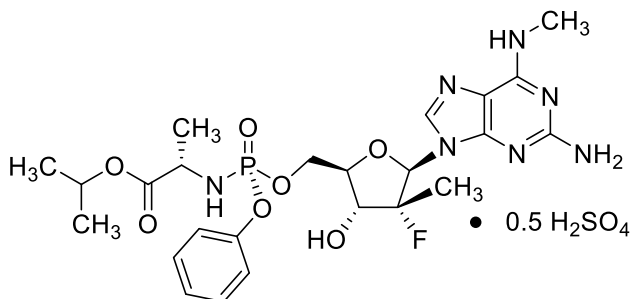
Además, se ha descubierto que el Compuesto 1 o Compuesto 2 también son activos

contra los serotipos 1, 3 y 4 del Dengue. Con este nuevo descubrimiento, se confirma que el Compuesto 1 y Compuesto 2 en los regímenes de dosis alta descritos en este documento poseen potencia contra todos los serotipos del virus del Dengue (serotipos 1, 2, 3 y 4 de virus del Dengue).



5

Compuesto 1 (AT-281)



Compuesto 2 (AT-752)

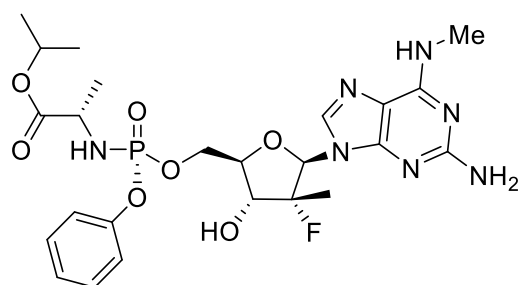
El término "Compuesto 1" tal como se utiliza en la especificación puede referirse a la base libre o a una sal farmacéuticamente aceptable de la misma. El Compuesto 1 es ((R)-(((2R,3R,4R,5R)-5-(2-amino-6-(metilamino)-9H-purina-9-il)-4-fluoro-3-hidroxi-4-metiltetrahidrofuran-2-il)metoxi)(fenoxi)fosforilo)-L-alaninato de isopropilo.

También se ha descubierto que el Compuesto 1 (y su Compuesto 2 de sal de hemisulfato) tienen un mecanismo de acción doble ventajoso. El metabolito activo es un inhibidor del dominio de polimerasa de ARN dependiente de ARN (RdRp) de la proteína viral NS5 así como un inhibidor del dominio de 2'-O-metiltransferasa (MTasa) de NS5. Ambas funciones de la proteína NS5 son requeridas para la replicación. La inhibición de dos funciones de proteína clave involucradas en la replicación de ARN disminuye la posibilidad de que se forme un mutante resistente.

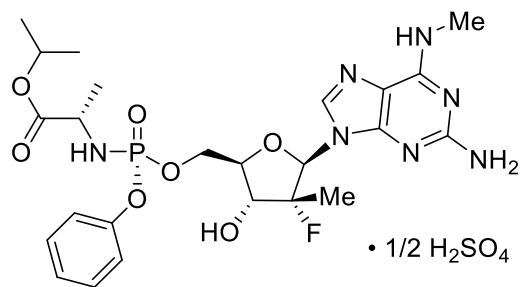
Los Compuestos 1 y 2 tienen un mecanismo de acción doble ventajoso. Esto es un inhibidor del dominio de polimerasa de ARN dependiente de ARN (RdRp) de la proteína viral NS5 así como un inhibidor del dominio 2'-O-metiltransferasa (MTasa) de NS5. Ambas funciones de la proteína NS5 son necesarias para la replicación. La inhibición de dos funciones de proteína clave involucradas en replicación de ARN disminuye la posibilidad de que se forme un mutante resistente.

El Compuesto 2 (AT-752) es la sal de hemisulfato del Compuesto 1 (AT-281), un prótido de fosforamidato que forma el Compuesto 3 de metabolito de L-alanilo (AT-551) como un

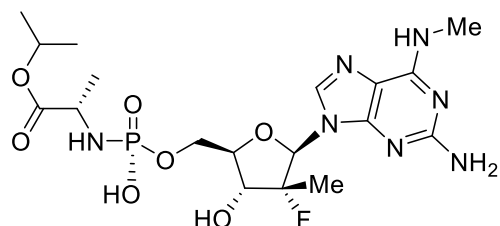
- profármaco intermedio antes de convertirse en el Compuesto 4 de metabolito 5'-monofosfato (MP) (AT-8001) del nucleósido 2'-fluoro-2'-C-metilguanosina (compuesto 6 (AT-273)). El Compuesto 4 (AT-8001) se fosforila después al Compuesto 5 de metabolito activo 5'-trifosfato (TP) (AT-9010). Se ha mostrado que el Compuesto 5 (AT-9010) inhibe de manera selectiva la polimerasa de ARN dependiente de ARN viral (RdRp) de VHC (Good y otros, Evaluación preclínica de AT-527, Un profármaco de nucleótido de guanosina novedoso con potente actividad pan-genotípica contra el virus de la hepatitis C. PLoS One 15: e0227104), y aquí se demuestra que inhibe los serotipos 1, 2, 3 y 4 del Dengue. Un mecanismo es la inhibición de NS5, la RdRp de DENV-2.



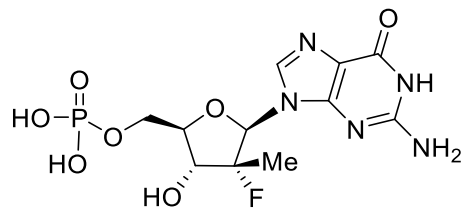
(Compuesto 1) AT-281



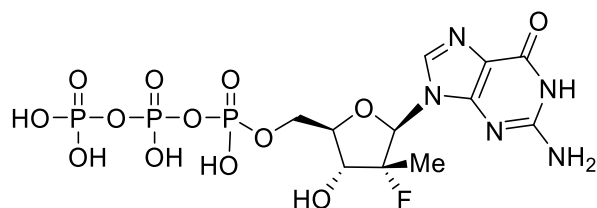
(Compuesto 2) AT-752



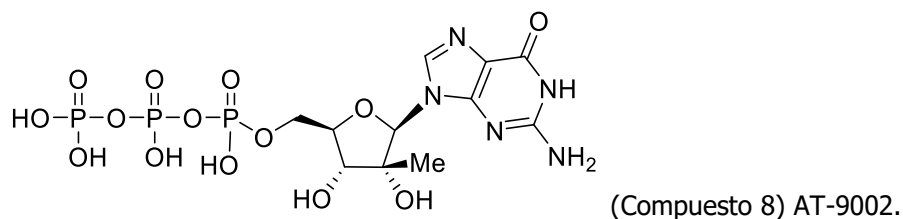
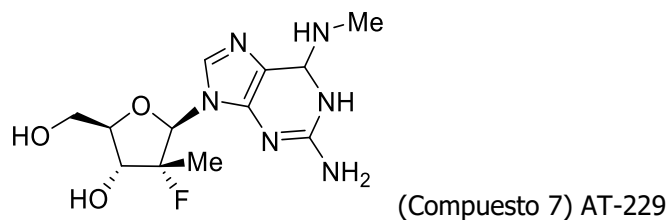
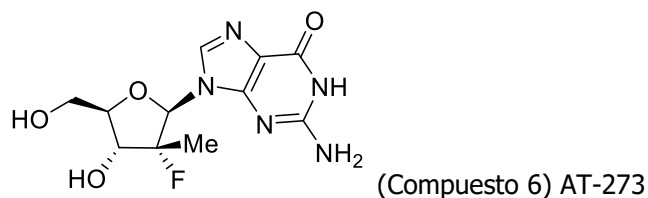
(Compuesto 3) AT-551



(Compuesto 4) AT-8001



(Compuesto 5) AT-9010



En ciertos aspectos, se proporcionan regímenes de dosificación, métodos, composiciones y procesos de fabricación para el tratamiento de un huésped infectado con el virus del Dengue. Por ejemplo, el Compuesto 1 o 2 o la Fórmula I o II se pueden administrarse en una dosis de aproximadamente 700 a 1000 mg, por ejemplo una dosis de 750 mg dos o tres veces al día, sola o en combinación con otro agente anti-ARN viral para tratar al huésped infectado que lo necesite. En ciertas modalidades, es útil administrar una combinación de fármacos que modulen la misma vía o una diferente o inhiban un objetivo diferente en el virus. A medida que el Compuesto 1/2 es un inhibidor de polimerasa, puede ser ventajoso administrar el Compuesto 1/2 a un huésped en combinación con un inhibidor de proteasa o un inhibidor de interacción NS3-NS4B. Alternativamente, el Compuesto 1/2 se puede administrar en combinación con un inhibidor de polimerasa estructuralmente diferente.

El Compuesto 1/2 se puede administrar por vía oral, por ejemplo en forma de píldora o comprimido, y se puede administrar por otra vía que el médico que lo atienda considere apropiada, incluyendo la vía intravenosa, transdérmica, subcutánea, tópica, parenteral u otra vía adecuada.

I. Definiciones

A menos que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos aquí utilizados tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los aquí descritos en la práctica o prueba de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Los materiales, métodos y ejemplos son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

A menos que el contexto lo requiera de otra forma, los términos singulares incluirán

pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. En esta solicitud, el uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. Además, el uso del término "incluyendo", así como otras formas, como "incluye" e "incluido", no son limitantes.

Un "paciente", "huésped" o "sujeto" es un ser humano o un animal no humano que
 5 necesita tratamiento o prevención de una infección de virus del Dengue. Típicamente, el huésped es un humano. Un "paciente" o "huésped" o "sujeto" también se refieren, por ejemplo, a un mamífero, primate (por ejemplo, humano), vaca, oveja, cabra, caballo, perro, gato, conejo, rata, ratón, ave y similares.

El término "profiláctico" o "preventivo" cuando se utilizan se refiere a la administración
 10 de un compuesto inhibidor activo de polimerasa de ARN dependiente de ARN de NS5 (RdRp) para prevenir, reducir la probabilidad de una aparición o una recurrencia de una infección de virus del Dengue tal como el virus del Dengue 2 o el virus del Dengue 3, o para minimizar una nueva infección con relación con la infección que ocurriría sin tal tratamiento o para minimizar la transmisión a otra persona. La presente invención incluye tanto terapias de tratamiento como profilácticas o preventivas.
 15 En algunas modalidades, el compuesto inhibidor de RdRp de NS5 activo se administra a un huésped que ha estado expuesto para y de esa forma corre el riesgo de contraer una infección de virus del Dengue, como virus del Dengue 1, virus del Dengue 2, virus del Dengue 3 o virus del Dengue 4. En otra modalidad alternativa, se proporciona un método para prevenir la transmisión que incluye administrar una cantidad efectiva de uno de los compuestos aquí descritos a humanos durante un
 20 período de tiempo suficiente antes de la exposición a multitudes que pueden infectarse, incluso durante viajes o eventos o reuniones públicas, incluyendo, por ejemplo, hasta 3, 5, 7, 10, 12, 14 o más días antes de una situación contagiosa.

Los términos "coadministrar", "coadministración" o "en combinación" son utilizados para describir la administración de un compuesto de interferencia de RdRp de NS5 en combinación
 25 con al menos otro agente activo antiviral. El momento de la coadministración lo determina mejor el especialista médico que trata al paciente. Esto algunas veces se desea que los agentes sean administrados al mismo tiempo. Alternativamente, los fármacos seleccionados para la terapia de combinación se administran en diferentes momentos al paciente. Por supuesto, cuando hay más de una infección viral u otra infección u otra condición está presente, los presentes compuestos pueden
 30 combinarse con otros agentes para tratar esa otra infección o condición como sea necesario.

Los ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos minerales u orgánicos de residuos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos; y similares. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales y las sales de amonio cuaternario del compuesto principal formado, por
 35 ejemplo, a partir de ácidos inorgánicos u orgánicos que no son excesivamente tóxicos. Por ejemplo,

las sales ácidas incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos tales como clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, sulfámico, fosfórico, nítrico y similares; y las sales preparadas a partir de ácidos orgánicos tales como acético, propiónico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamoico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutámico, benzoico, salicílico, mesílico, esílico, besílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzoico, fumárico, toluenosulfónico, metanosulfónico, etanodisulfónico, oxálico, isetiónico, $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$ en donde n es 0-4, y similares, o utilizando un ácido diferente que produzca el mismo contraión. Se pueden encontrar listas de sales adecuadas adicionales, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania, página 1418 (1985).

El compuesto se puede administrar en cualquier proporción molar de sal que proporcione el resultado deseado. Por ejemplo, el compuesto puede estar provisto de menos de un equivalente molar de un contra ion, tal como en la forma de una sal de hemisulfato. Alternativamente, el compuesto puede estar provisto de más de un equivalente molar de contra ion, como por ejemplo en forma de una sal de disulfato. Los ejemplos no limitantes de proporciones molares del compuesto con respecto al contra ion incluyen 1:0,25, 1:0,5, 1:1 y 1:2.

En ciertas modalidades, el término "aproximadamente" significa más o menos el 5% del valor enlistado. En ciertas modalidades, el término "aproximadamente" significa más o menos el 10% del valor enlistado.

I. Formas de Dosificación Ventajosas del Compuesto 2 para el Tratamiento de Virus del Dengue

Se proporcionan composiciones, métodos y formas de dosificación para el tratamiento de un huésped infectado con Dengue mediante la administración de una cantidad efectiva del Compuesto 1 o Compuesto 2.

En un aspecto de la invención, las composiciones farmacéuticas de conformidad con la presente invención comprenden una alta dosis del virus contra el Dengue del Compuesto 1 o Compuesto 2 como se describe aquí, opcionalmente en combinación con un portador, aditivo o excipiente farmacéuticamente aceptable, además opcionalmente en combinación o alternancia con al menos otro compuesto activo. En una modalidad, la invención incluye una forma de dosificación sólida del compuesto 2 en un portador farmacéuticamente aceptable.

En ciertas modalidades el Compuesto 1 o Compuesto 2 se administran a un paciente que lo necesita en una composición farmacéutica, por ejemplo, Composición A o Composición B.

Composición A

Ingrediente	% p/p	mg/ comprimido
Compuesto 2	38.7%	271.1
Celulosa Microcristalina Silicificada (Prosolv HD 90)	55.3%	386.9

Croscarmelosa Sódica (Ac-Di-Sol)	1.0%	35.0
Estearato de Magnesio	1.00%	7.0
Total	100%	700

Composición B

Ingrediente	% p/p
Intragranular	
Compuesto 2	46.3%
Celulosa Microcristalina Silicificada (Prosolv HD 90)	40.8%
Dióxido de Silicona Coloidal (Aerosil 200)	4.2%
Croscarmelosa Sódica (Ac-Di-Sol)	1.0%
Fumarato de Estearil de Sodio (PRUV)	1.0%
Extragranular	
Celulosa Microcristalina Silicificada (Prosolv HD 90)	5.0%
Dióxido de Silicona Coloidal (Aerosil 200)	0.5%
Croscarmelosa Sódica (Ac-Di-Sol)	0.4%
Fumarato de Estearil de Sodio (PRUV)	0.8%
Total	100.0%

En un aspecto de la invención, las composiciones farmacéuticas de conformidad con la presente invención comprenden una cantidad efectiva de dosis alta contra el Dengue del Compuesto 1 o 2 aquí descritos, opcionalmente en combinación con un portador, aditivo o excipiente farmacéuticamente aceptable, además opcionalmente en combinación con al menos otro agente antiviral, tal como otro agente contra el Dengue.

La invención incluye composiciones farmacéuticas que incluyen una cantidad efectiva para tratar una infección de virus del Dengue del compuesto 1 o 2 de la presente invención o profármaco, en un portador o excipiente farmacéuticamente aceptables. En una modalidad alternativa, la invención incluye composiciones farmacéuticas que incluyen una cantidad efectiva para prevenir una infección del virus del Dengue del Compuesto 1 o 2 de la presente invención o profármaco, en un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Un experto en la técnica reconocerá que una cantidad de dosis alta terapéuticamente efectiva variará con la infección o la afección que se va a tratar, su gravedad, el régimen de tratamiento que se va a emplear, la farmacocinética del agente utilizado, así como el paciente o sujeto (animal o humano) que se va a tratar, y dicha cantidad terapéutica puede ser determinada por el médico o especialista que atiende al paciente.

El Compuesto 1 o 2 de conformidad con la presente invención puede formularse en una mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable. En general, es típico administrar la

composición farmacéutica en forma administrable por vía oral y, en particular, una forma de dosificación sólida tal como una píldora o comprimido. Ciertas formulaciones pueden administrarse por vía parenteral, intravenosa, intramuscular, tópica, transdérmica, bucal, subcutánea, supositorio u otra vía, incluyendo pulverización intranasal. Las formulaciones intravenosas e intramusculares se administran frecuentemente en solución salina estéril. Un experto en la técnica puede modificar las formulaciones para hacerlas más solubles en agua u otro portador; por ejemplo, esto se puede lograr fácilmente mediante modificaciones menores (formulación de sal, esterificación, etc.) que están dentro del experto en la técnica. También está dentro de la habilidad de los rutinarios modificar la vía de administración y el régimen de dosificación del Compuesto 2 con el fin de controlar la farmacocinética de los presentes compuestos para máximo efecto benéfico en pacientes, como se describe aquí en más detalle.

El Compuesto 1 o 2 puede proporcionarse, por ejemplo, para administración oral o parenteral. En ciertas modalidades, el Compuesto 1 o 2 se proporciona en una forma de dosificación sólida, en gel o líquida. En ciertas modalidades, el Compuesto 1 o 2 se proporciona en una forma de dosificación líquida para administración parenteral. En ciertas modalidades, el Compuesto 1 o 2 se proporciona en una forma de dosificación líquida para administración intravenosa. En ciertas modalidades, el Compuesto 1 o 2 se proporciona en una forma de dosificación sólida para administración oral. En ciertas modalidades, el Compuesto 1 o 2 puede proporcionarse como una cápsula blanda o como un comprimido para administración oral.

La cantidad de dosis alta del Compuesto 1 o 2 incluida dentro de la formulación terapéuticamente activa de conformidad con la presente invención se describe aquí en detalle y es una cantidad efectiva para lograr el resultado deseado de conformidad con la presente invención, por ejemplo, para tratar la infección de DENV, reducir la probabilidad de una infección de DENV o la inhibición, reducción y/o abolición del DENV o sus efectos secundarios, incluidos los estados patológicos, condiciones, y/o las complicaciones que se producen de forma secundaria al DENV.

Las dosis aquí descritas se refieren a la cantidad de ingrediente farmacéutico activo en la dosis con el peso agregado por sales farmacéuticamente aceptables, a menos que se indique de otra forma. Por ejemplo, una dosis de 750 mg del Compuesto 2 comprende aproximadamente 692 mg del Compuesto 1 (que cae dentro de "aproximadamente 700 mg") cuando el peso molecular de la sal de hemisulfato se tiene en cuenta en la medición.

En general, una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto 2 en una forma de dosificación farmacéutica puede variar desde aproximadamente 600 mg a aproximadamente 1000 mg, desde aproximadamente 700 mg a aproximadamente 1000 mg, o desde aproximadamente 700 mg a aproximadamente 800 u 850 mg cuando se mide como la base libre. En ciertas modalidades, el Compuesto 1 se administra en el mismo intervalo como la base libre.

En ciertas modalidades, el Compuesto 2 se administra en cantidades de dosis de al menos aproximadamente 650 mg, 700 mg, 750 mg, 800 mg, 850 mg, 900 mg, 950 mg, 1,000 mg, 1,150 mg, 1,200 mg, 1,250 mg, 1,300 mg, 1,350 mg, 1,400 mg, 1,450 mg o 1,500 mg cuando se mide como la base libre dos o tres veces al día. En algunas modalidades, la dosis se proporciona en
5 varias formas de dosificación para reducir el tamaño de la forma de dosificación sólida, como una píldora, un comprimido o una cápsula.

En ciertas modalidades, se administran aproximadamente 700 mg a aproximadamente 800 u 850 mg del Compuesto 1 o 2 una vez, dos veces o tres veces al día (QD). En ciertas modalidades, se administran de aproximadamente 700 mg a aproximadamente 800 mg del Compuesto 1 o 2 una
10 vez, dos veces o tres veces al día (QD). En ciertas modalidades, se administran una vez al día desde aproximadamente 800 mg a aproximadamente 900 mg del Compuesto 2 (QD). En ciertas modalidades, aproximadamente 900 mg a aproximadamente 1,000 mg del Compuesto 2 se administra una vez al día (QD).

En ciertas modalidades, se administran aproximadamente de 700 mg a
15 aproximadamente 800 mg del Compuesto 2 dos veces al día (BID). En ciertas modalidades, se administran aproximadamente de 700 mg a aproximadamente 900 mg del Compuesto 2 dos veces al día (BID). En ciertas realizaciones, se administran aproximadamente de 800 mg a aproximadamente 900 mg del Compuesto 2 dos veces al día (BID). En ciertas modalidades, se administran aproximadamente de 900 mg a aproximadamente 1,000 mg del Compuesto 2 dos veces al día (BID).

En ciertas modalidades, se administran aproximadamente de 600 mg a
20 aproximadamente 700 mg del Compuesto 2 tres veces al día (TID). En ciertas realizaciones, se administran aproximadamente de 700 mg a aproximadamente 800 mg del Compuesto 2 tres veces al día (TID). En ciertas modalidades, se administran aproximadamente de 800 mg a aproximadamente 900 mg del Compuesto 2 tres veces al día (TID). En ciertas modalidades, se administran
25 aproximadamente de 900 mg a aproximadamente 1,000 mg del Compuesto 2 tres veces al día (TID).

En ciertas modalidades, se administran aproximadamente de 700 mg a
aproximadamente 900 mg del Compuesto 2 cuatro veces al día (QID). En ciertas modalidades, se administran aproximadamente de 600 mg a aproximadamente 700 o 750 mg del Compuesto 2 cuatro veces al día (QID). En ciertas modalidades, se administran aproximadamente de 700 mg a
30 aproximadamente 800 mg del Compuesto 2 cuatro veces al día (QID). En ciertas modalidades, se administran aproximadamente de 800 mg a aproximadamente 900 mg del Compuesto 2 tres veces al día (QID). En ciertas modalidades, se administran aproximadamente de 900 mg a aproximadamente 1,000 mg del Compuesto 2 cuatro veces al día (QID).

Para los propósitos de la presente invención, una cantidad profilácticamente o
35 preventiva efectiva de las composiciones de conformidad con la presente invención se encuentra

dentro del mismo rango de concentración de dosis alta como se estableció anteriormente para la cantidad terapéuticamente efectiva y es usualmente la misma que una cantidad terapéuticamente efectiva.

En ciertas modalidades, el virus del Dengue es del serotipo 1, 3 o 4. En ciertas modalidades, el virus del Dengue es del serotipo 1, 3 o 4 y se administran aproximadamente de 700 mg a aproximadamente 1000 mg del Compuesto 1 o 2 una vez al día (QD). En ciertas modalidades, el virus del Dengue es del serotipo 1, 3 o 4 y se administran aproximadamente de 550 mg a aproximadamente 750 mg del Compuesto 2 una vez al día (QD). En ciertas modalidades, el virus del Dengue es del serotipo 1, 3 o 4 y se administran aproximadamente de 600 mg del Compuesto 1 o 2 una vez al día (QD).

En ciertas modalidades, el virus del Dengue es del serotipo 1, 3 o 4 y se administran aproximadamente 500 mg a 800 mg del compuesto 1 o 2 dos veces al día (BID). En ciertas modalidades, el virus del Dengue es del serotipo 1, 3 o 4 y se administran aproximadamente 550 mg a 750 mg del Compuesto 1 o 2 dos veces al día (BID). En ciertas modalidades, el virus del Dengue es del serotipo 1, 3 o 4 y se administran aproximadamente 600 mg del Compuesto 1 o 2 dos veces al día (BID).

En ciertas modalidades, el virus del Dengue es del serotipo 1, 3 o 4 y se administran aproximadamente 500 mg a 800 mg del Compuesto 1 o 2 tres veces al día (TID). En ciertas modalidades, el virus del Dengue es del serotipo 1, 3 o 4 y se administran aproximadamente de 550 mg a aproximadamente 750 mg del Compuesto 1 o 2 tres veces al día (TID). En ciertas modalidades, el virus del Dengue es del serotipo 1, 3 o 4 y se administran aproximadamente 600 mg del Compuesto 1 o 2 tres veces al día (TID).

La administración del Compuesto 1 o 2 puede variar desde continua (goteo intravenoso) hasta varias administraciones orales o intranasales por día (por ejemplo, dos, tres, cuatro o cinco veces al día) o administración transdérmica y puede incluir administración oral, tópica, parenteral, intramuscular, intravenosa, subcutánea, transdérmica (que puede incluir un agente potenciador de la penetración), bucal y de supositorios, entre otras vías de administración. También se pueden utilizar comprimidos orales con cubierta entérica para mejorar la biodisponibilidad de los compuestos para una vía de administración oral. La forma de dosificación más eficaz dependerá de la biodisponibilidad/farmacocinética del agente particular elegido, así como de la gravedad de la enfermedad en el paciente. Las formas de dosificación orales son particularmente preferidas, debido a la facilidad de administración y al posible cumplimiento favorable del paciente.

Para preparar las composiciones farmacéuticas de conformidad con la presente invención, una cantidad terapéuticamente efectiva del Compuesto 1 o 2 de conformidad con la presente invención se puede mezclar íntimamente con un portador farmacéuticamente aceptable de

conformidad con las técnicas de preparación farmacéutica convencionales para producir una dosis. Un portador puede tomar una amplia variedad de formas que dependen de la forma de preparación deseada para la administración, por ejemplo, oral o parenteral. Al preparar composiciones farmacéuticas en forma de dosificación oral, se puede utilizar cualquiera de los excipientes y componentes farmacéuticos habituales. De esa forma, para preparaciones orales líquidas tal como suspensiones, elixires y soluciones, se pueden utilizar portadores y aditivos adecuados que incluyen agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservadores, agentes colorantes y similares. Para preparaciones orales sólidas tal como polvos, comprimidos, cápsulas, y para preparaciones sólidas como supositorios, portadores y aditivos adecuados que incluyen almidones, portadores de azúcar, tal como dextrosa, colector, lactosa y portadores relacionados, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes desintegrantes y similares. Si se desea, los comprimidos o cápsulas pueden tener un recubrimiento entérico o una liberación sostenida mediante técnicas estándar. El uso de estas formas de dosificación puede mejorar significativamente la biodisponibilidad de los compuestos en el paciente.

Para formulaciones parenterales, el portador comprenderá usualmente agua estéril o solución acuosa de cloruro de sodio, aunque también se pueden incluir otros ingredientes, incluyendo aquellos que ayudan a la dispersión. Por supuesto, cuando se va a utilizar agua estéril y se va a mantener estéril, las composiciones y portadores también se deben esterilizar. También se pueden preparar suspensiones inyectables, en cuyo caso se pueden emplear portadores líquidos, agentes de suspensión y similares apropiados.

También se pueden preparar suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a antígenos virales) mediante métodos convencionales para producir portadores farmacéuticamente aceptables. Esto puede ser apropiado para la administración de nucleósidos libres, nucleósidos de acilo/alquilo o formas profármaco de éster de fosfato de los compuestos nucleósidos de conformidad con la presente invención.

En modalidades típicas de conformidad con la presente invención, el Compuesto 1 o 2 y las composiciones descritas se utilizan para tratar, prevenir o retrasar una infección de Dengue o un estado patológico secundario, condición o complicación del Dengue.

Sustitución Isotópica

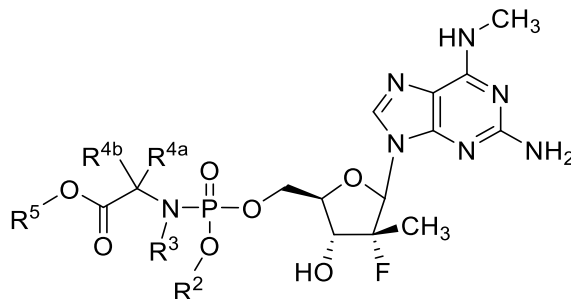
La presente invención incluye compuestos y el uso del Compuesto 1 o Compuesto 2 con sustituciones isotópicas deseadas de átomos en cantidades superiores a la abundancia natural del isótopo, es decir, enriquecidas. Los isótopos son átomos que tienen el mismo número atómico pero diferentes números de masa, es decir, el mismo número de protones pero un número diferente de neutrones. A manera de ejemplo general y sin limitación, los isótopos de hidrógeno, por ejemplo, deuterio (^2H) y tritio (^3H) pueden usarse en cualquier parte de las estructuras descritas.

Alternativamente, o además, pueden usarse isótopos de carbono, por ejemplo, ^{13}C y ^{14}C . Una sustitución isotópica preferida es deuterio por hidrógeno en una o más ubicaciones de la molécula para mejorar el rendimiento del fármaco. El deuterio puede vincularse en una ubicación de ruptura de enlaces durante metabolismo (un efecto isotópico cinético de deuterio α) o siguiente a o cerca del sitio de ruptura de enlaces (un efecto isotópico cinético de deuterio β). Achillion Pharmaceuticals, Inc. (WO/2014/169278 y WO/2014/169280) describe la deuteración de nucleótidos para mejorar su farmacocinética o farmacodinámica, incluso en la posición 5 de la molécula.

La sustitución con isótopos tal como deuterio puede proporcionar ciertas ventajas terapéuticas que resultan de una mayor estabilidad metabólica, como, por ejemplo, aumento de vida media in vivo o requisitos de dosificación reducidos. La sustitución de deuterio por hidrógeno en un sitio de descomposición metabólica puede reducir la tasa de metabolismo o eliminarlo en ese enlace. En cualquier posición del compuesto en la que pueda estar presente un átomo de hidrógeno, el átomo de hidrógeno puede ser cualquier isótopo de hidrógeno, incluidos protio (^1H), deuterio (^2H) y tritio (^3H). De esa forma, al hacer referencia aquí, un compuesto abarca todas las formas isotópicas potenciales a menos que el contexto lo indique claramente de otra forma.

El término análogo "etiquetado isotópicamente" se refiere a un análogo que es un "análogo deuterado", un "análogo etiquetado con ^{13}C " o un "análogo deuterado/etiquetado con ^{13}C ". El término "análogo deuterado" significa un compuesto aquí descrito, en donde un isótopo H, es decir, hidrógeno/protio (^1H), se sustituye por un isótopo H, es decir, deuterio (^2H). La sustitución de deuterio puede ser parcial o completa. La sustitución parcial de deuterio significa que al menos un hidrógeno se sustituye por al menos un deuterio. En ciertas modalidades, el isótopo está enriquecido en un 90, 95 o 99% o más en un isótopo en cualquier ubicación de interés. En algunas modalidades, es deuterio el que está enriquecido en un 90, 95 o 99% en una ubicación deseada. A menos que se indique de otra forma, la deuteración es al menos 80% en la ubicación seleccionada. La deuteración del nucleósido puede ocurrir en cualquier hidrógeno reemplazable que proporciona los resultados deseados.

En ciertos aspectos de la presente invención, un compuesto de Fórmula I:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo opcionalmente en un portador farmacéuticamente aceptable, se administra en una cantidad efectiva de dosis alta como se describe aquí para tratar una

infección de virus del Dengue en un huésped que lo necesita, típicamente un humano;

en donde:

R^2 es alquilo de 1 a 6 átomos de carbono (incluyendo metilo, etilo, propilo e isopropilo), cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono, arilo, arilo(alquilo de 1 a 4 átomos de carbono)-, heteroarilo, heteroarilo(alquilo de 1 a 4 átomos de carbono)- o heteroalquilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes seleccionados independientemente en cada aparición de R^{22} ;

R^3 es hidrógeno o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono opcionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes seleccionados independientemente en cada aparición de R^{33} ;

R^{4a} y R^{4b} se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, arilo(alquilo de 1 a 6 átomos de carbono)-, cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono, cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono(alquilo de 1 a 6 átomos de carbono)-, heteroarilo(alquilo de 1 a 6 átomos de carbono)- y arilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes seleccionados independientemente en cada aparición de R^{44} ;

R^5 es hidrógeno, alquilo de 1 a 6 átomos de carbono (incluyendo metilo, etilo, propilo e isopropilo), haloalquilo de 1 a 6 átomos de carbono o cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono y en una modalidad alternativa, R^5 es arilo(alquilo de 1 a 4 átomos de carbono)-, arilo, heteroarilo o heteroalquilo, opcionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes seleccionados independientemente en cada aparición de R^{55} .

R^{22} , R^{33} , R^{44} y R^{55} se seleccionan independientemente en cada aparición de hidrógeno, alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono, alqueno, alquino, F, Cl, Br, I, heterociclo, heterocicloalquilo, haloalcoxi, haloalquilo, $C(O)R^{66}$, $C(O)OR^{66}$, $C(O)N(R^{66})_2$ y ciano;

R^{66} se selecciona independientemente en cada aparición de hidrógeno, alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, arilo(alquilo de 1 a 6 átomos de carbono)-, cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono, cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono(alquilo de 1 a 6 átomos de carbono)-, heteroarilo(alquilo de 1 a 6 átomos de carbono)- y arilo.

Todos los grupos R deben interpretarse de una forma que no incluya redundancia, es decir, como se sabe en la técnica, alquilo no estaría sustituido con alquilo; sin embargo, por ejemplo, alcoxi sustituido con alcoxi no es redundante. Arilo sustituido con arilo cae dentro de la definición de arilo en un alcance limitado. Los grupos R no están opcionalmente sustituidos a menos que se indique específicamente en el contexto.

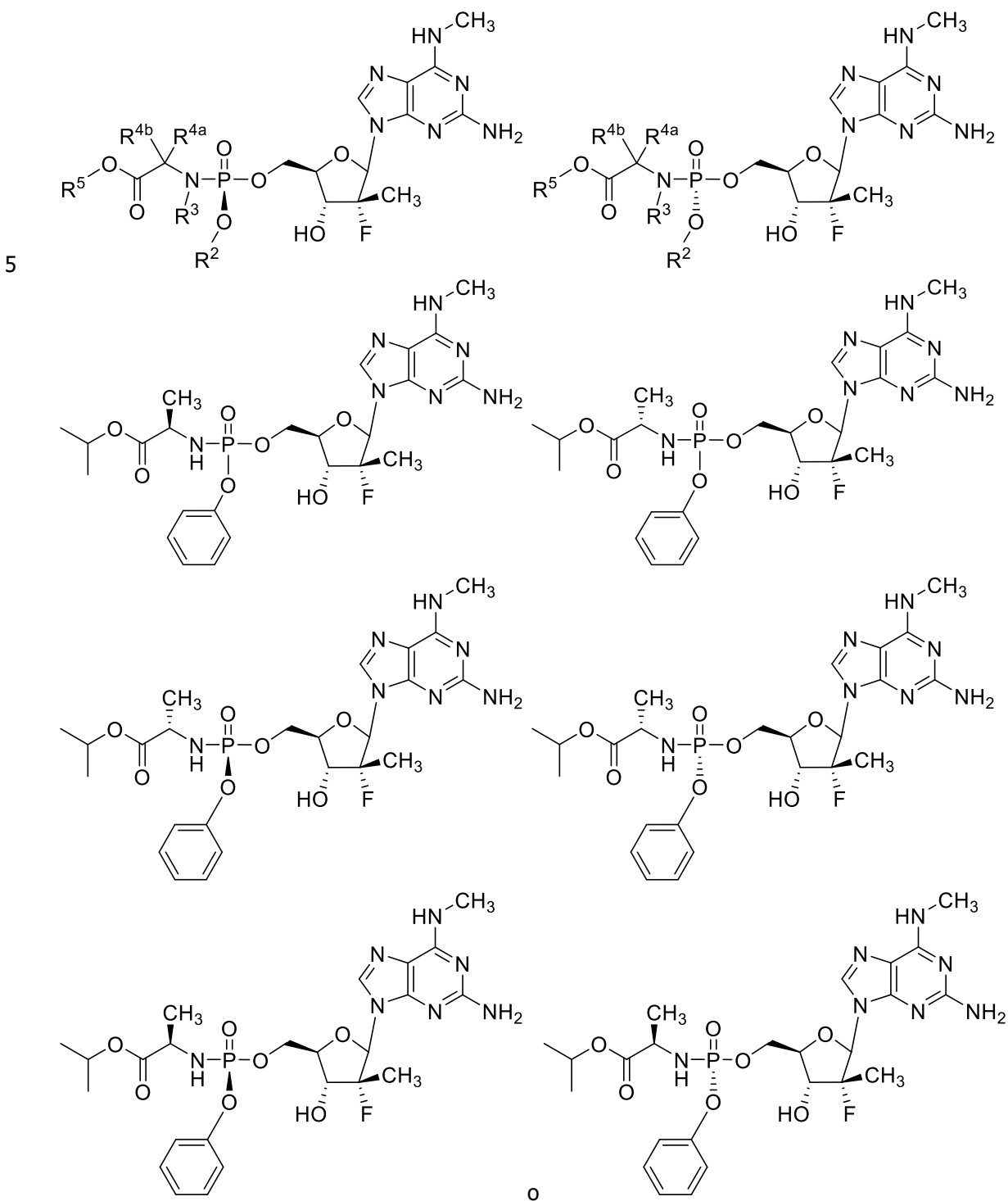
Ejemplos no limitantes de alquilo de 1 a 6 átomos de carbono incluyen metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, t-butilo, sec-butilo, isobutilo, $-CH_2C(CH_3)_3$, $-CH(CH_2CH_3)_2$ y $-CH_2CH(CH_2CH_3)_2$. Ejemplos no limitantes de cicloalquilo de 3 a 6 átomos de carbono incluyen

ciclopropilo, CH₂-ciclopropilo, ciclobutilo y CH₂-ciclobutilo.

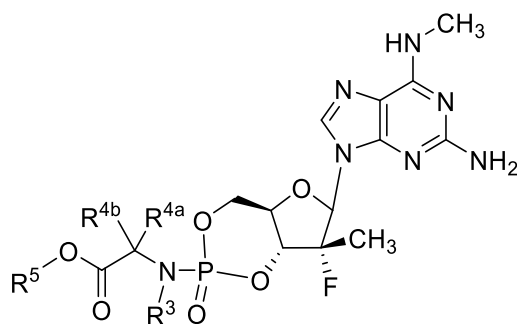
Un ejemplo no limitante de arilo(alquilo de 1 a 4 átomos de carbono)- es bencilo.

Ejemplos no limitantes de arilo son fenilo y naftilo.

En ciertas realizaciones, la Fórmula I es:



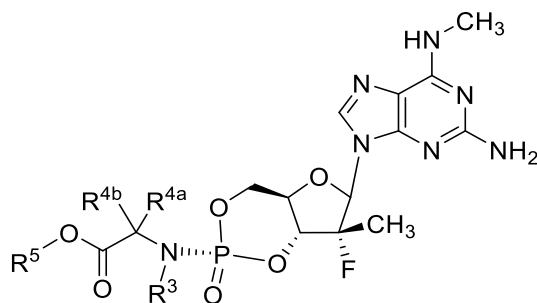
En ciertos aspectos de la presente invención, un compuesto de Fórmula II:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo opcionalmente en un portador farmacéuticamente aceptable, se administra en una cantidad efectiva para tratar una infección de virus del Dengue en un huésped que lo necesita, típicamente un humano; y todas las variables son como se definen aquí.

5

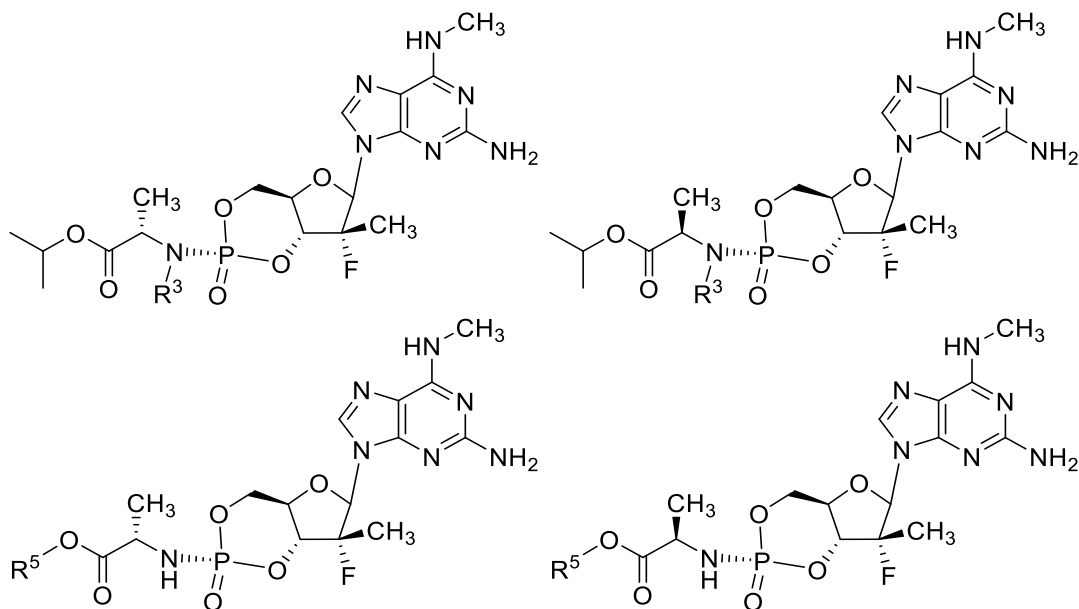
En ciertos aspectos, el compuesto es de la Fórmula IIA:

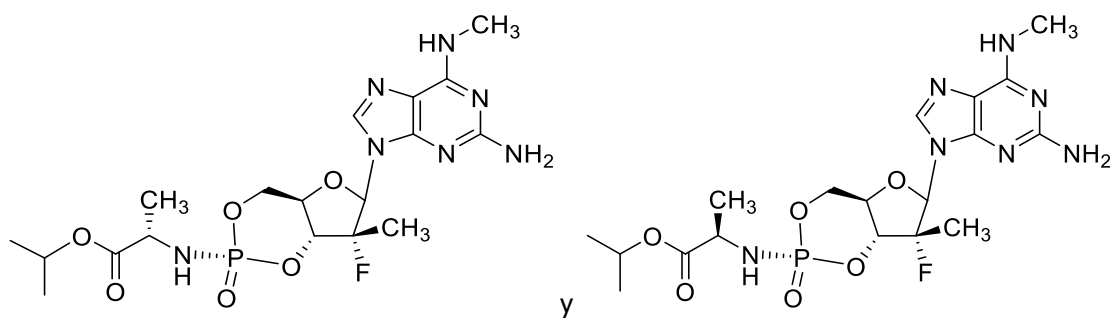


o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde todas las variables son como se definen aquí.

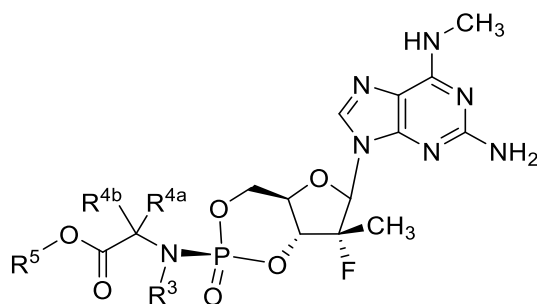
En ciertas modalidades, el compuesto de Fórmula IIA se selecciona de:

10



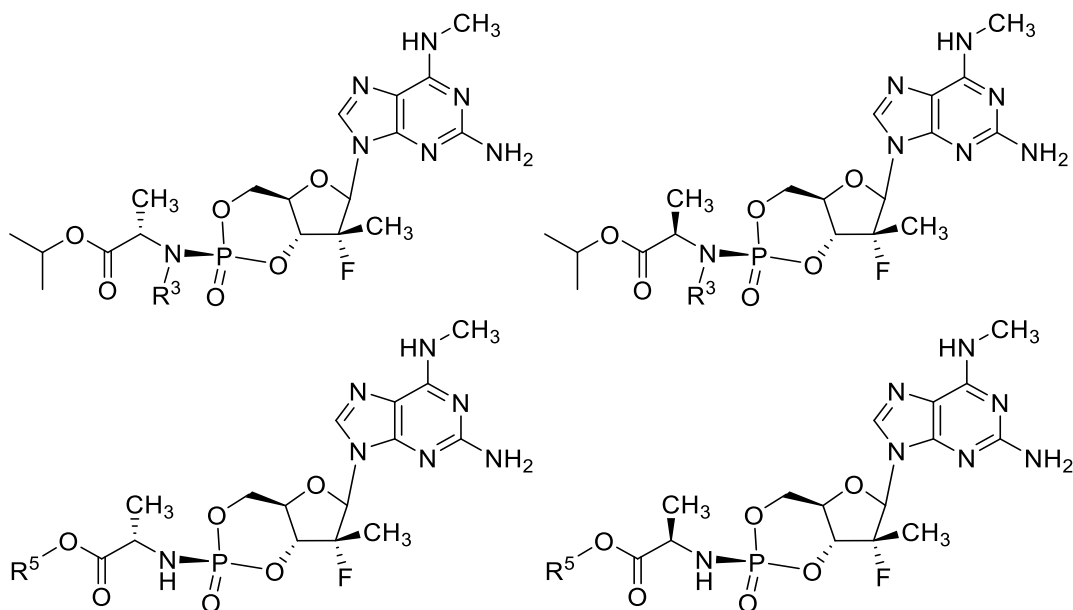


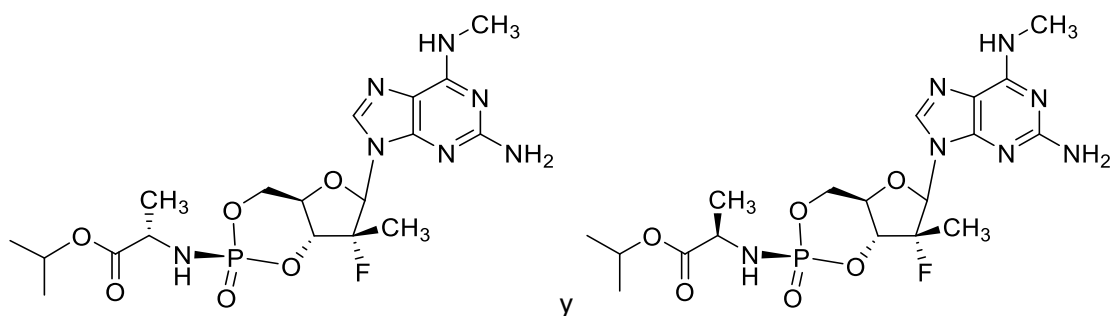
En ciertos aspectos, el compuesto es de la Fórmula IIB:



- 5 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde todas las variables son como se definen aquí.

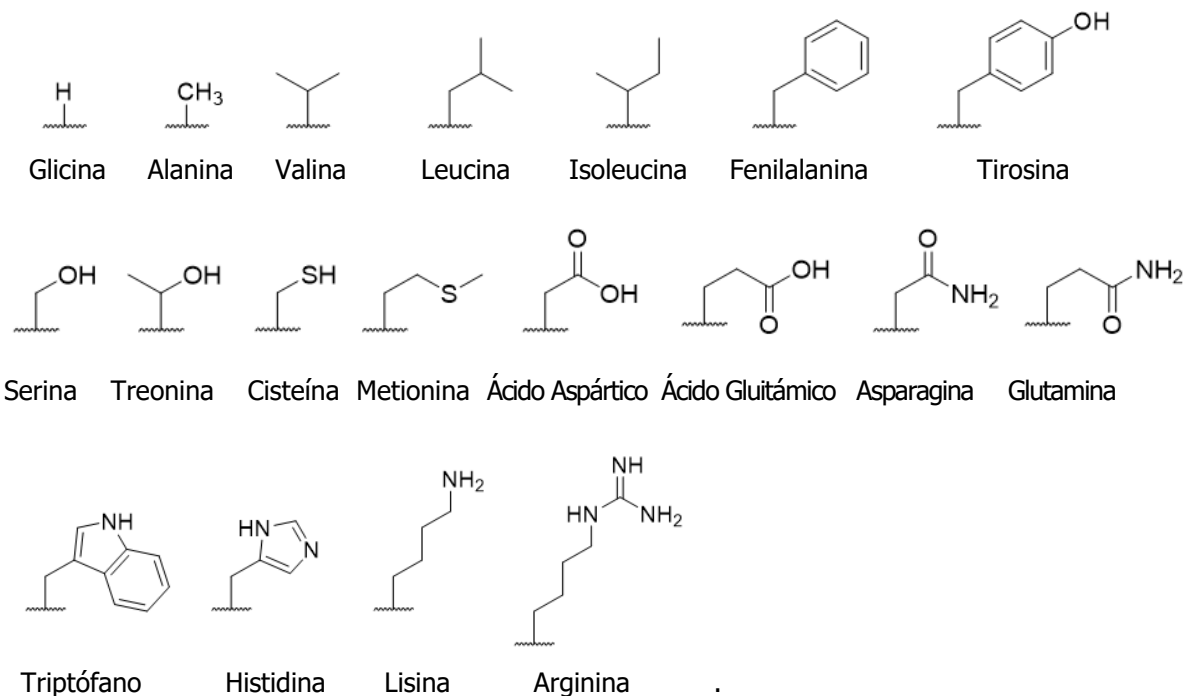
En ciertas modalidades, el compuesto de Fórmula IIB se selecciona de:



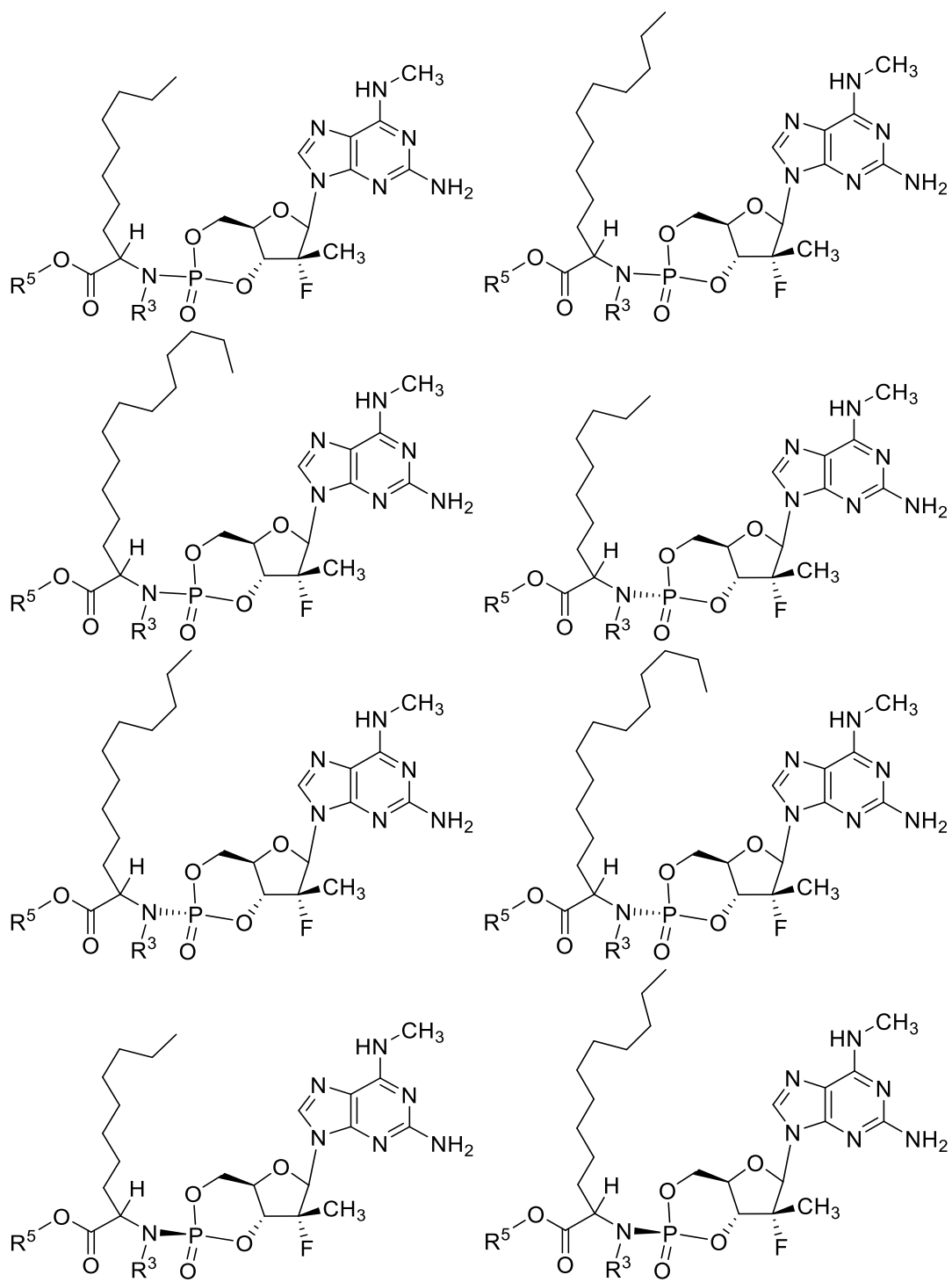


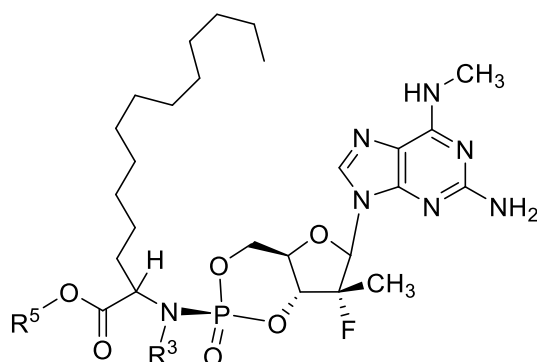
En ciertas modalidades, un compuesto de Fórmula II, Fórmula IIA o Fórmula IIB se utiliza en el tratamiento de una infección de DENV1, DENV2, DENV3 o DENV4.

En ciertas modalidades, R^{4a} se selecciona para que sea la cadena lateral de un aminoácido de origen natural, por ejemplo:



En ciertas modalidades alternativas, la variable R^{4a} de la Fórmula II, IIA o IIB es alquilo de 7 a 15 átomos de carbono, la variable R^{4b} es hidrógeno y todas las demás variables son como se definen aquí. En modalidades alternativas, el compuesto se selecciona de





II. Métodos de tratamiento o profilaxis

Tratamiento, como se usa aquí, se refiere a la administración del Compuesto 1 o Compuesto 2 a un huésped, por ejemplo, un humano que está o puede infectarse con el virus del Dengue.

El término "profiláctico" o preventivo, cuando se usa, se refiere a la administración del Compuesto 1 o 2 para prevenir o reducir la probabilidad de que se produzca el desorden viral. La presente invención incluye tanto terapias de tratamiento como profilácticas o preventivas. En una modalidad, el Compuesto 1 o 2 se administra a un huésped que ha estado expuesto y, por lo tanto, corre el riesgo de infectarse con una infección por un virus del Dengue.

La invención está dirigida a un método de tratamiento o profilaxis de un virus del Dengue, incluyendo formas resistentes a fármacos y resistentes a fármacos múltiples del DENV y estados, condiciones o complicaciones de enfermedad relacionadas. El método comprende administrar a un huésped que lo necesite, normalmente un humano, una cantidad efectiva del Compuesto 1 o 2 como se describe aquí, opcionalmente en combinación con al menos un agente bioactivo adicional, por ejemplo, un agente anti-DENV adicional, además en combinación con un aditivo portador y/o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Incluso en otro aspecto, la presente invención es un método para la prevención o profilaxis de una infección de Dengue o un estado de enfermedad o complicación relacionada o subsiguiente de una infección de Dengue.

(1) En ciertas modalidades, se proporciona un régimen de dosificación para uso en el tratamiento de un huésped humano que lo necesite infectado con un virus del Dengue o para la prevención del virus del Dengue que comprende la administración de aproximadamente 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975, 1000, 1025, 1050, 1075, 1100, 1125, 1150, 1175, 1200, 1225 o 1250 mg del Compuesto 1 o Compuesto 2 dos, tres o cuatro veces al día.

(2) En ciertas modalidades, se proporciona un régimen de dosificación para su uso en el tratamiento de un huésped humano que lo necesite infectado de virus del Dengue o para la prevención de virus del Dengue que comprende la administración de aproximadamente 700, 725, 750,

775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975, 1000, 1025, 1050, 1075, 1100, 1125, 1150, 1175, 1200, 1225 o 1250 mg del Compuesto 1 o 2 dos, tres o cuatro veces al día.

(3) En ciertas modalidades, se proporciona un régimen de dosificación para su uso en el tratamiento de un huésped humano que lo necesite infectado de virus del Dengue o para la
5 prevención del virus del Dengue que comprende la administración de aproximadamente 700, 725, 750, 775, 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975, 1000, 1025, 1050, 1075, 1100, 1125, 1150, 1175, 1200, 1225 o 1250 mg del Compuesto 1 o 2 dos, tres o cuatro veces al día.

(4) Cualquiera de las modalidades (1) a (3) en donde el Compuesto 1 o Compuesto 2 se administran dos veces al día.

10 (5) Cualquiera de las modalidades (1) a (3) en donde el Compuesto 1 o Compuesto 2 se administra tres veces al día.

(6) Cualquiera de las modalidades (1) a (3) en donde el Compuesto 1 o Compuesto 2 se administra cuatro veces al día.

(7) Cualquiera de las modalidades (1) a (6) en donde se administran aproximadamente
15 600 mg del Compuesto 1 o Compuesto 2 en cada dosis al paciente que lo necesita.

(8) Cualquiera de las modalidades (1) a (6) en donde se administran aproximadamente 650 mg del Compuesto 1 o Compuesto 2 en cada dosis al paciente que lo necesita.

(9) Cualquiera de las realizaciones (1) a (6) en donde se administran aproximadamente 700 mg del Compuesto 1 o Compuesto 2 en cada dosis al paciente que lo necesita.

20 (10) Cualquiera de las modalidades (1) a (6) en donde se administran aproximadamente 750 mg del Compuesto 1 o Compuesto 2 en cada dosis al paciente que lo necesita.

(11) Cualquiera de las modalidades (1) a (6) en donde se administran aproximadamente 800 mg del Compuesto 1 o Compuesto 2 en cada dosis al paciente que lo necesita.

(12) Cualquiera de las modalidades (1) a (6) en donde se administran
25 aproximadamente 850 mg del Compuesto 2 o Compuesto 1 en cada dosis al paciente que lo necesita.

(13) Cualquiera de las modalidades (1) a (6) en donde se administran aproximadamente 900 mg del Compuesto 1 o Compuesto 2 en cada dosis al paciente que lo necesita.

(14) Cualquiera de las modalidades (1) a (6) en donde se administran aproximadamente 950 mg del Compuesto 1 o Compuesto 2 en cada dosis al paciente que lo necesita.

30 (15) Cualquiera de las modalidades (1) a (6) en donde se administran aproximadamente 1000 mg del Compuesto 1 o Compuesto 2 en cada dosis al paciente que lo necesita.

(16) Cualquiera de las realizaciones (1) a (15) en donde se administra la Composición

A.

(17) Cualquiera de las modalidades (1) a (15) en donde se administra la Composición

35 B.

- (18) Cualquiera de las modalidades (1) a (17) en donde el Compuesto 1 o Compuesto 2 se administra durante tres días consecutivos.
- (19) Cualquiera de las modalidades (1) a (17) en donde el Compuesto 1 o Compuesto 2 se administra durante cuatro días consecutivos.
- 5 (20) Cualquiera de las modalidades (1) a (17) en donde el Compuesto 1 o Compuesto 2 se administra durante cinco días consecutivos.
- (21) Cualquiera de las modalidades (1) a (17) en donde el Compuesto 1 o Compuesto 2 se administra durante seis días consecutivos.
- 10 (22) Cualquiera de las modalidades (1) a (17) en donde el Compuesto 1 o Compuesto 2 se administra durante siete días consecutivos.
- (23) Cualquiera de las modalidades (1) a (17) en donde el Compuesto 1 o Compuesto 2 se administra durante ocho días consecutivos.
- (24) Cualquiera de las realizaciones (1) a (17) en donde el Compuesto 1 o Compuesto 2 se administra durante nueve días consecutivos.
- 15 (25) Cualquiera de las modalidades (1) a (17) en donde el Compuesto 1 o Compuesto 2 se administra durante diez días consecutivos.
- (26) Cualquiera de las modalidades (1) a (17) en donde el Compuesto 1 o Compuesto 2 se administra durante once días consecutivos.
- (27) Cualquiera de las modalidades (1) a (17) en donde el Compuesto 1 o Compuesto 2 se administra durante doce días consecutivos.
- 20 (28) Cualquiera de las modalidades (1) a (17) en donde el Compuesto 1 o Compuesto 2 se administra durante trece días consecutivos.
- (29) Cualquiera de las modalidades (1) a (17) en donde el Compuesto 1 o Compuesto 2 se administran durante catorce días consecutivos.
- 25 (30) Cualquiera de las modalidades (1) a (29) en donde el método se utiliza de forma profiláctica en un paciente sano para prevenir la infección.
- (31) Cualquiera de las modalidades (1) a (29) en donde el método se utiliza para tratar a un paciente con el virus del dengue.
- (32) Cualquiera de las modalidades (1) a (29) en donde el humano tiene el serotipo 1
- 30 del Dengue.
- (33) Cualquiera de las modalidades (1) a (29) en donde el humano tiene el serotipo 2 del Dengue.
- (34) Cualquiera de las modalidades (1) a (29) en donde el humano tiene el serotipo 3 del Dengue.
- 35 (35) Cualquiera de las realizaciones (1) a (29) en donde el ser humano tiene el serotipo

4 del Dengue.

En una modalidad alternativa, el Compuesto 2 se proporciona como la sal de hemisulfato de un fosforamidato del Compuesto 1 diferente del fosforamidato específico descrito en la ilustración del compuesto, como en la Fórmula I o II. Aquellos expertos en la técnica conocen una amplia gama de fosforamidatos que incluyen varios ésteres y fosfoésteres, cualquier combinación de los cuales pueden utilizarse para proporcionar un compuesto activo como se describe aquí en la forma de una sal de hemisulfato.

VI. Terapia de Combinación y Alternancia

Es bien reconocido que pueden surgir variantes de virus resistentes a fármacos después de un tratamiento prolongado con un agente antiviral. Algunas veces la resistencia a fármacos se produce por mutación de un gen que codifica una enzima utilizada en la replicación viral. La eficacia de un fármaco contra la infección de DENV, puede prolongarse, aumentarse o restaurarse al administrar el compuesto en combinación o alternando con otro, y quizás incluso dos o tres compuestos antivirales más, que inducen una mutación diferente o actúan a través de una trayectoria diferente a la del fármaco principal. Alternativamente, la farmacocinética, la biodistribución, vida media, u otro parámetro del fármaco se pueden alterar mediante tal terapia de combinación (la cual puede incluir una terapia de alternancia si se considera concertada). Dado que el Compuesto 2 y Compuesto 1 descritos son un inhibidor de la polimerasa de NS5, puede ser útil administrar el compuesto a un huésped en combinación con, por ejemplo, un

- (1) Inhibidor de proteasa, tal como un inhibidor de proteasa NS2B-NS3;
- (2) Inhibidor de NS3;
- (3) Inhibidor de interacción NS3-NS4B;
- (4) Inhibidor de NS4B;
- (5) Inhibidor de interacción NS3-NS5;
- (6) Otro inhibidor de la polimerasa de NS5;
- (7) Interferón alfa-2a, que puede estar pegilado o modificado de otra forma, y/o ribavirina;
- (8) Inhibidor no basado en sustrato;
- (9) Inhibidor de helicasa;
- (10) Oligodesoxinucleótido antisentido (S-ODN);
- (11) Aptámero;
- (12) Ribozima resistente a nucleasa;
- (13) iRNA, incluyendo microRNA y SiRNA;
- (14) Anticuerpo, anticuerpo parcial o anticuerpo de dominio contra el virus, o
- (15) Antígeno viral o antígeno parcial que induce una respuesta de anticuerpos del

huésped.

Ejemplos no limitantes de agentes DAA del Dengue que se pueden administrar en combinación con el Compuesto 1 o 2 en dosis alta o la Fórmula I o II de la invención, solos o con múltiples fármacos de estas listas, son:

- 5 (i) inhibidor de proteasa como telaprevir (Incivek®), boceprevir (Victrelis™), simeprevir (Olysio™), paritaprevir (ABT-450), glecaprevir (ABT-493), ritonavir (Norvir), ACH-2684, AZD-7295, BMS-791325, danoprevir, Filibuvir, GS-9256, GS-9451, MK-5172, Setrobuvir, Sovaprevir, Tegobuvir, VX-135, VX-222 y ALS-220;
- (ii) inhibidor de NS3 como suramina, dabrafenib, idelalisib, nintedanib, ivermectina o
- 10 BP13944
- (iii) inhibidores de interacción NS3-NS4B tales como JNJ-1802 y JNJ-A07;
- (iv) inhibidor de NS4B tal como NITD-688 o licorina;
- (v) inhibidores de NS5 como balapiravir;
- (vi) inhibidores de NS5B del VHC tales como AZD-7295, Clemizol, dasabuvir (Exviera),
- 15 ITX-5061, PPI-461, PPI-688, sofosbuvir (Sovaldi®), MK-3682, ABT-333 y MBX-700 y mericibina;
- (vii) Fármacos de combinación antivirales como Harvoni (ledipasvir/sofosbuvir); Viekira Pak (ombitasvir/paritaprevir/ritonavir/dasabuvir); Viekirax (ombitasvir/paritaprevir/ritonavir); G/P (paritaprevir y glecaprevir); Technivie (ombitasvir/paritaprevir/ritonavir) y Eplclusa (sofosbuvir/velpatasvir) y Zepatier (elbasvir y grazoprevir).

20 EJEMPLOS

Ejemplo 1. Líneas celulares, virus y compuestos de prueba.

Las líneas celulares, virus y compuestos aquí descritos se utilizaron para generar los datos presentados en los Ejemplos 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8. Las células Huh-7 (carcinoma de hígado humano; AcceGen Biotechnology, Fairfield, NJ) se mantuvieron en medio de Eagle Modificado de Dulbecco

25 (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, por sus siglas en inglés) y 100 µg/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin (Lonza, Walkersville, MD). Las células Vero 76 (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA) utilizadas para el ensayo de reducción de producción de virus se mantuvieron de manera similar. Las células BHK-21 (riñón de cría de hámster; ATCC, Manassas, VA) se mantuvieron en un Medio Esencial Mínimo con sales de Earle (EMEM) que contienen

30 piruvato de sodio de 1 mM y 25 µg/mL de kanamicina, suplementado con 10% de FBS. Todos los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ y ≥95% de humedad. Las infecciones se realizaron en EMEM suplementado con 5% de FBS y 50 µg/mL de gentamicina.

Los virus del dengue (NGC de DENV-2 y H87 de DENV-3) se obtuvieron de ATCC (Manassas, VA), y DENV-2 utilizado en los ensayos de PBMC de humanos y BHK-21 fue un aislado

35 clínico. Los virus de la encefalitis japonesa (JEV SA-14), Nilo Occidental (WN02 Kern 515), Fiebre

Amarilla (YFV 17D) y Zika (ZIKV MR766) se obtuvieron de la Facultad de Medicina de la Universidad de Texas (Galveston, TX), mientras que los virus Powassan (cepas POWV Spooner y LB) y Usutu (USUV TC-508) fueron del Centro de Referencia Mundial para Virus y Arbovirus Emergentes de la Facultad de Medicina de la Universidad de Texas. Para los estudios que utilizan PBMC humanas frescas, células de un donante masculino individual (Lote LS-88-45477C) se obtuvieron de BioIVT (Westbury, NY) o se aislaron de sangre recolectada de donantes sanos utilizando Ficoll-Paque (Pham y otro, 2008. El Virus de Hepatitis C se replica en los mismos subconjuntos de células inmunes en la hepatitis C crónica y la infección oculta. *Gastroenterology*. 134:812-22, Pham y otros, 2004. Persistencia del virus de Hepatitis C después de la resolución estratégica o inducida por el tratamiento de la hepatitis C. *J Virol* 78:5867-74). Los estudios de DENV-2 en PBMC y células BHK21 fueron completadas en Università degli Studi di Cagliari (Monerrato, Italia). Los otros estudios del virus para eficacia y especificidad se llevaron a cabo en Utah State University (Logan, UT) e ImQuest BioSciences (Frederick, MD). Los protocolos en este último laboratorio para los diferentes virus de ARN y ADN (HVC, HIV-1, influenza A y B, RSV, Rinovirus, Herpes simplex-1 y adenovirus) se han descrito previamente (Good y otros, 2020. Evaluación preclínica de AT-527, un profármaco de nucleótido de guanosina novedoso con potente actividad pan-genotípica contra el virus de hepatitis C. *PLoS One* 15:30227104). El Compuesto 2 (AT-752) y su base libre, el compuesto 1 (AT-281), se sintetizaron mediante un proceso estereoespecífico y, el Compuesto 6 junto con su metabolito de plasma (AT-273), fueron preparados para Atea Pharmaceuticals por Topharman Shanghai Co., Ltd., Shanghai, China. (Compuesto 5 (AT-9010) y los estándares internos de TP utilizados para cuantificar el compuesto 5 (AT-9010) fueron sintetizados por NuBlocks (Oceanside, CA). Las soluciones de existencia se prepararon en DMSO y se almacenaron a -20°C. Plasma congelado, humano y de rata SD (BioreclamationIVT, Westbury, NY) y de mono Cinomologo (Suzhou Xishan, China) se compró para probar la estabilidad del Compuesto 1 (AT-281) a 37°C.

Ejemplo 2. Compuesto 1 inhibe el Virus del Dengue (DENV) y otros flavivirus.

Se evaluó la actividad antiviral del Compuesto 1 (AT-281) contra los flavivirus DENV-2 NGC, DENV-3, JEV, POWV, USUV, WNV, YFV y ZIKV utilizando un ensayo de captación de tinte rojo neutro (descrito en el Ejemplo 3) para determinar inhibición del efecto citopático inducido por virus y compuesto (CPE, por sus siglas en inglés) y que utiliza un ensayo de reducción de rendimiento de virus (VYR, por sus siglas en inglés) (descrito en el Ejemplo 4) como una segunda determinación independiente de la inhibición de la replicación viral. Se infectaron de forma aguda hepatocarcinoma humano (Huh-7), riñón de hámster infante (BHK-21 o células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) con los diferentes virus y se expusieron a diluciones seriadas del fármaco (descritas en el Ejemplo 5). La actividad del Compuesto 1 (AT-281) se midió en células infectadas utilizando el

ensayo de rojo neutro y/o el ensayo de reducción de producción de virus (VYR), para determinar la concentración efectiva requerida para lograr una inhibición del 50% (EC₅₀) del efecto citopático inducido por el virus (CPE), la concentración para reducir la producción de virus en 1 log₁₀ (EC₉₀) y la concentración citotóxica del fármaco para causar la muerte del 50% de las células viables incubadas sin virus (CC₅₀) (ver Cuadro 1). Después de una incubación de 3 a 6 días, la concentración efectiva del Compuesto 1 (AT-281), un profármaco de nucleótido de 2'-fluoro-2'-C-metil guanosina, requerida para lograr una inhibición del 50% (EC₅₀) del efecto citopático inducido por virus (CPE) varió de 0.19 a 1.41 μM (véanse cuadros en la página siguiente).

Cuadro 1A. Actividad antiviral del Compuesto 1 (AT-281) en células infectadas con varios flavivirus

Virus	Cepa	Célula Huesped	EC₅₀^a (μM)	EC₉₀^b (μM)	CC₅₀^c (μM)
Denge-2 (DENV-2)	Nueva Guinea C	Huh-7	0.48	0.64	>170
	aislado clínico	PBMC Humana	0.80	nd	>85
	aislado clínico	BHK-21	1.1	nd	>170
Denge-3 (DENV-3)	H87	Huh-7	0.77	nd	>170
Encefalitis japonesa	SA-14	Huh-7	0.21	nd	>170
Del Nilo Occidental (WNV)	Kern 515, WNo2	Huh-7	1.41	0.43	>170
Fiebre Amarilla (YFV)	YFV 17D	Huh-7	0.31	0.26	>170
Zika	MR766	Huh-7	0.64	nd	>170
Powassan	Spooner	BHK-21	0.29	0.74	>170
	LB	BHK-21	0.64	2.6	>170
Usutu	TC-508	Huh-7	0.19	0.72	>170

^aensayo de rojo neutro

^bensayo de VYR

^cconcentración más alta probada

nd, no determinado

Cuadro 1B. Actividad antiviral del Compuesto 1 (AT-281) en células infectadas con varios serotipos de Dengue

Serotipo	Cepa	Célula Huesped	Lectura^a	EC₅₀ (μM)
DENV-1	WP	Huh-7	Luc	0.57
	WP74	Huh-7	FC	0.15
DENV-2	NGC	Huh-7	NR	0.48
		Huh-7	VYR	0.64 ^a

		Huh-7	Luc	0.30
		BHK-21	CPE	3.82
	Aislado clínico	PBMC	CPE	0.80
		BHK-21	CPE	1.05
		BHK-21	VYR	6.5 ^a
DENV-3	H87	Huh-7	NR	0.77
	VN32	Huh-7	Luc	0.75
	CH4348	Huh-7	FC	1.33
DENV-4	MY01	Huh-7	Luc	0.57
	TVP-360	Huh-7	FC	1.19

^aensayo rojo neutral

Aunque la cinética de crecimiento de diferentes flavivirus puede diferir en el cultivo celular, el Compuesto 1 (AT-281) mostró un efecto potente similar en la reducción del valor viral contra los 7 flavivirus incluyendo 11 cepas diferentes probadas *in vitro* (Cuadro 1A), la actividad antiviral también se mantuvo en los serotipos 1, 2, 3 y 4 del Dengue en todas las cepas probadas (Cuadro 1B). Las curvas de inhibición para DENV, WNV y YFV (Figura 2) demuestran esta consistencia. La concentración del Compuesto 1 (AT-281) requerida para matar el 50% de las células expuestas para fármaco únicamente (CC₅₀) excedió la concentración más alta probada (85 a 170 µM), y el índice de selectividad antiviral (SI; CC₅₀/EC₅₀) varió de >120 a >650. En particular, el Compuesto 1 (AT-281) exhibió una potente actividad anti-DENV serotípica múltiple *in vitro*. En células Huh-7 infectadas con DENV-2 (cepa de Nueva Guinea C), Compuesto 1 (AT-281) redujo el rendimiento del virus infeccioso en un 90% (EC₉₀) a una concentración de 0.64 µM. De manera similar, en PBMC humano y células BHK-21 infectadas con DENV2 (aislado clínico) y en células Huh-7 infectadas con DENV-3 (cepa H87), el Compuesto 1 (AT-281) exhibió valores respectivos de EC₅₀ de 0.60, 0.63 y 0.77 µM en la inhibición de CPE inducida por virus. La SI fue >210 en cada caso.

Para evaluar la especificidad antiviral del Compuesto 1 (AT-281), se incubaron diluciones seriadas con varias líneas de células huésped infectadas con un panel de virus de ADN y ARN diferentes a los flavivirus. La actividad del Compuesto 1 (AT-281) se midió en células infectadas utilizando el ensayo de rojo neutro para determinar la concentración efectiva requerida para inhibir la replicación viral en un 50% (EC₅₀) (descrita en el Ejemplo 3) y la concentración de umbral requerida para obtener un efecto perceptible en 50% de las células incubadas sin virus (CC₅₀). El Compuesto 1 (AT-281) no tuvo actividad contra los virus de ADN probados y solo fue débilmente activo o no activo contra varios virus de ARN (Cuadro 2). Sin embargo, tuvo una alta selectividad (>2,000) hacia el HCV, inhibiendo el virus a niveles nanomolares (Cuadro 2). La citotoxicidad potencial del Compuesto 1 (AT-281) se evaluó en múltiples líneas celulares con valores CC₅₀ resultantes mayores que 100 µM (Cuadro

2, a continuación).

Cuadro 2. Selectividad antiviral del Compuesto 1 (AT-281) contra un panel de virus de ARN y ADN

Virus	Tipo	Célula	EC ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)
Chikungunya	ARN	Huh-7	54.2	>100
Encefalitis equina del Este	ARN	Huh-7	10.2	>100
HCV	ARN	Huh-7	0.05	>100
HIV-1	ARN	CEM-SS	>100	>100
Influenza A y B	ARN	MDCK	>100	>100
Virus respiratorio sincitial	ARN	HEp2	>100	>100
Rinovirus	ARN	H1-HeLa	>100	>100
Fiebre del Valle de Rift	ARN	Huh-7	>100	>100
Adenovirus	ADN	Vero	>100	>100
Herpes simplex-1	ADN	Vero	>100	>100

5 Se demostró una falta adicional de citotoxicidad en cardiomiocitos de células madre pluripotentes inducidas humanas (iPS) (descritos en el Ejemplo 6) y en células progenitoras de médula ósea humana de granulocitos, macrófagos (GM) y eritroides (E) (descritos en el Ejemplo 7). Cuando se incubaron con el Compuesto 1 (AT-281), estas células también tuvieron valores de CC₅₀ mayores que 100 μM, mientras que los compuestos de control positivo tuvieron efectos citotóxicos esperados (valores de CC₅₀ de 7 μM para doxazosina con cardiomiocitos y 2 y 3 μM para AZT en los ensayos de células GM y E, respectivamente). Además, se ha mostrado previamente que el TP activo, Compuesto 5 (AT-9010), no inhibe las actividades enzimáticas *in vitro* de las polimerasas de ADN dependientes del ADN celular humano α, β o γ con valores estimados de IC₅₀ >100 μM, ni es probable que afecte la integridad mitocondrial o inhiba la polimerasa de ARN dirigida por ADN mitocondrial humano (POLRMT; (Good y otros, Evaluación preclínica de AT-527, un profármaco de nucleótido de guanosina novedoso con potente actividad pan-genotípica contra el virus de hepatitis C. PLoS One 15:e0227104).

Ejemplo 3. Ensayo de rojo neutro para medir el 50% de inhibición (EC₅₀) del efecto citopático inducido por virus (CPE).

20 El procedimiento de ensayo de rojo neutro aquí descrito se utilizó para generar los datos marcados como "ensayo de rojo neutro" o "NR" en los Cuadros 1A y 1B del Ejemplo 2. El AT-281 se disolvió en DMSO a una concentración de 10 mg/mL y se diluyó en serie utilizando ocho diluciones semilogarítmicas de manera que la concentración de prueba más alta fuera de 100 μg/mL (172 μM). Cada dilución se agregó a 5 pocillos de una placa de 96 pocillos con células Huh-7 confluentes del 80 a 100%. Se infectaron tres pocillos de cada dilución con el virus y se dejaron dos

pocillos sin infectar como controles de toxicidad. Se infectaron seis pocillos sin tratar como controles del virus y se dejaron seis pocillos sin tratar sin infectar para utilizarlos como controles del virus. Los virus se diluyeron para lograr MOI de aproximadamente 0.001 CCID₅₀ (dosis infecciosa del cultivo celular al 50%) por célula (0.037 y 0.028 CCID₅₀ para la cepa POWV LB y USUV, respectivamente).

5 Las placas se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada que contiene un 5% de CO₂. En el día 3 (ZIKV, EEEV y POWV Spooner), día 4 (CHIKV), día 5 (YFV, RVFV, MERS, POWV LB y USUV) o día 6 (WNV, JEV, DENV-2 NGC y DENV-3) posteriores a la infección, cuando los pocillos de control del virus sin tratar alcanzaron el CPE máximo, las placas se tiñeron con un tinte de rojo neutro durante aproximadamente 2 horas (± 15 minutos). Se eliminó el tinte sobrenadante, los pocillos se enjuagaron

10 con PBS y el tinte incorporado se extrajo en una solución de tampón de citrato de Sorensen/etanol 50:50 por >30 minutos. La densidad óptica se leyó en un espectrofotómetro a 540 nm y se convirtió en porcentaje de controles. Se calcularon las concentraciones del compuesto de prueba necesarias para prevenir la CPE inducida por virus en un 50 % (EC₅₀) y para causar el 50% de muerte celular en ausencia de virus (CC₅₀) (Smee y otros, 2017. Evaluación de tintes de viabilidad celular en ensayos

15 antivirales con virus de ARN que presentan diferentes propiedades citopatógenas. J Virol Methods 246:51-57; Repetto y otros, 2008. Ensayo de captación de rojo neutro para la estimación de la viabilidad celular/citotoxicidad. Nature Protoc 3:1125-1131). El índice selectivo es el CC₅₀ dividido por la EC₅₀ excepto donde se indique. Los valores de índice de selectividad (SI, por sus siglas en inglés) entre 0 y 3.9 indican compuestos inactivos; un SI de 4 a 9.9 indica compuestos mínimamente activos,

20 un SI de 10 a 49.9 indica compuestos moderadamente activos y valores de SI >50 indican compuestos altamente activos. Los compuestos con valores de SI >100 son indistinguibles entre sí.

Ejemplo 4. Ensayo de reducción de la producción de virus para medir la concentración necesaria para reducir la producción de virus en 1 log₁₀ (EC₉₀).

El procedimiento de ensayo de reducción de la producción de virus descrito en este

25 documento se utilizó para generar los datos marcados como "VYR" o "ensayo de VYR" en los Cuadros 1A y 1B del Ejemplo 2. Como se publicó anteriormente (Prichard y otros, 1990. Un ensayo de reducción de producción de virus mediante microtitulación para la evaluación de compuestos antivirales contra el citomegalovirus humano y el virus simple de herpes. J Virol Methods 246:51-57), se sembraron células Vero 76 en placas de 96 pocillos y se cultivaron durante la noche (37°C) para confluencia. Se

30 recogió una muestra del líquido sobrenadante de cada concentración de compuesto en el día 3 (día 4 para POWV y día 7 para USUV) después de la infección (se agruparon 3 pocillos) y se analizó el valor del virus utilizando un ensayo de dilución de punto final estándar CCID₅₀ y cálculos de valor utilizando la ecuación de Reed-Muench (Reed y otros, 1938. Un método simple para estimar los puntos finales del cincuenta por ciento. Am J Hygiene 27:493-497). La concentración del compuesto requerido para

35 reducir la producción de virus en un 90% (EC₉₀) se determinó mediante análisis de regresión.

Ejemplo 5. Infección por DENV-2 y tratamiento de PBMC humanas y células

BHK-21.

El procedimiento de ensayo de PBMC descrito en este documento se utilizó para generar los datos marcados como "PBMC" o "PBMC humanas" en los Cuadros 1A y 1B del Ejemplo 2.

5 El Compuesto 1 (AT-281) se disolvió en DMSO a 100 mM y luego se diluyó en medio de crecimiento hasta concentraciones finales de 100, 20, 4 y 0,8 μ M. Las PBMC se resuspendieron en medio de RPMI 1640 con L-glutamina de 2 mM, FBS al 10%, penicilina de 100 U/ml y estreptomicina de 100 μ g/ml (medio de crecimiento de PBMC) y se sometieron a una activación de 3 días con PHA (5 μ g/ml). Seguida de una infección de 1 h con DENV-2, las células se sembraron en placas de 96 pocillos (1×10^5

10 células/pocillo), en medio de crecimiento de PBMC, ya sea en ausencia o presencia de diluciones seriadas del Compuesto 1 (AT-281). De manera similar, las células BHK-21 se cultivaron hasta la confluencia en placas de 96 pocillos, después el medio de crecimiento se reemplazó con medio de mantenimiento fresco (medio de crecimiento con 1% de FBS inactivado en lugar de 10% de FBS) que contenía Compuesto 1 diluido en serie (AT-281) y DENV-2 a una multiplicidad de infección (MOI, por sus siglas en inglés) de 0.01. Las células no infectadas en presencia del compuesto diluido en serie se utilizaron para evaluar la citotoxicidad de compuestos. Después de una incubación de 3 días a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂, se determinó viabilidad celular mediante el método MTT (Pauwels y otros, 1988. Ensayo colorimétrico rápido y automatizado basado en tetrazolio para la detección de compuestos anti-VIH. J Virol Methods 20:309-21). La concentración efectiva de AT-281

15 requerida para prevenir el efecto citopático inducido por el virus (CPE) por 50% (EC₅₀) y para causar la muerte celular del 50% en ausencia del virus (CC₅₀) se calculó mediante análisis de regresión.

Ejemplo 6. Ensayo de cardiomiocitos para determinar la concentración citotóxica del fármaco para causar la muerte del 50% de células viables incubadas sin virus (CC₅₀).

25 El procedimiento de ensayo de citotoxicidad de cardiomiocitos aquí se utilizó para generar los datos de CC₅₀ del Cuadro 2 del Ejemplo 2. La citotoxicidad se evaluó en cardiomiocitos iPS humanos (Cellular Dynamics; Madison, WI) y en células progenitoras primarias de médula ósea humana (Invitrogen, Grand Island, NY). El mesilato de doxazosina y AZT, utilizados como controles positivos respectivamente, se compraron de Sigma Aldrich. Los cardiomiocitos iPS, en medio de Cellular

30 Dynamics, se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertas previamente con gelatina al 0.1% (Sigma) a 1.5×10^4 células/pocillo en un volumen final de 100 μ L y se incubaron a 37°C en CO₂ al 5% durante 48 h. Las células se lavaron con DPBS y se añadió AT-281 diluido en el mismo medio (100 μ L) a la monocapa en triplicado y se incubó a 37°C en 5% de CO₂ durante 3 días. La viabilidad celular se midió mediante tinción con CellTiter Glo®. El medio se eliminó de las placas de prueba y se reemplazó con

35 medio fresco (100 μ L) y reactivo CellTiter Glo (100 μ L por pocillo) antes de incubar a temperatura

ambiente durante 10 min. Los contenidos de pocillo se transfirieron a una placa blanca de 96 pocillos y se midió la luminiscencia dentro de 15 min en un contador de centelleo líquido Wallac 1450 Microbeta Trilux.

Ejemplo 7. Ensayo de célula progenitora de médula ósea.

5 El procedimiento de ensayo de citotoxicidad de cardiomiocitos aquí descrito se utilizó para confirmar los datos de CC_{50} del Cuadro 2 del Ejemplo 2. Se añadieron células progenitoras de médula ósea suspendidas en medio Dulbecco modificado de Iscove que contiene 15% de FBS inactivado por calor, 10% de medio acondicionado de tumor celular gigante (Bone Marrow Plus, Sigma), 10 ng/ml de IL-6 humana recombinante, 10 ng/ml de IL-3 humana recombinante y 25 ng/ml
10 de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humano recombinante (GM-CSF, R&D systems) y una concentración final de metilcelulosa al 1%, se agregaron a placas de 6 pocillos (1×10^5 células/pocillo) en un volumen de 900 μ L. Se agregó AT-281 (100 μ L) a una concentración de prueba 10 veces superior a la de cada pocillo por triplicado, se incubó a 37°C en 5% de CO_2 durante 14 días y se contaron las colonias (más de 30 células).

Ejemplo 8. Compuesto 1 (AT-281) forma el Compuesto 5 de metabolito activo (AT-9010) en PBMC humanas *in vitro*.

Dado que la infección de virus en la sangre es un componente importante de la fiebre del Dengue, era importante determinar la estabilidad del Compuesto 1 (AT-281) en la sangre y la capacidad de las PBMC de fosforilar el Compuesto 1 (AT-281) para formar el metabolito de trifosfato
20 activo, Compuesto 5 (AT-9010). Se encontró que el Compuesto 2 (AT-752) era estable hasta 120 minutos en plasma de mono cinomólogo y humano (el 98.2% y 93.5% de las respectivas concentraciones iniciales de 2 μ M permanecieron después de 120 minutos de incubación), pero fue altamente inestable en plasma de rata Sprague Dawley (SD) sin fármaco restante en el primer punto temporal (10 minutos de incubación). Se estimó que la vida media ($T_{1/2}$) en plasma de rata a 37°C al
25 ser <3 minutos.

Las PBMC humanas frescas no estimuladas tratadas con 10 μ M del Compuesto 1 (AT-281) (como se describe en el Ejemplo 9) durante hasta 6 h tuvieron un aumento dependiente del tiempo en las concentraciones del Compuesto 5 (AT-9010) sobre toda la fase de exposición y continuaron aumentando después del lavado del fármaco, con una concentración de pico media de
30 1.88 ± 0.01 pmol/ 10^6 células a las 10 h después de inicio de exposición (Figura 3). Cuando se eliminó el Compuesto 1 (AT-281) durante 28 h (fase de lavado), los niveles del Compuesto 5 (AT-901) en las PBMC disminuyó de manera dependiente por tiempo (Figura 3) con un $T_{1/2}$ estimado de 21.6 h.

Ejemplo 9. Formación de Compuesto 5 (AT-9010) *in vitro* en PBMC humanas no estimuladas tratadas con Compuesto 1 (AT-281).

35 Al recibirlas, las PBMC humanas frescas (donante masculino único, Lote LS-88-

45477C) se centrifugaron a $400\times g$ durante 5 min. El sedimento celular resultante se suspendió en 20 ml de medio de crecimiento de PBMC tibio. La densidad celular de la suspensión celular se contó utilizando un contador celular automatizado (Cellometer K2, Nexcelom) después de la tinción con Azul de Tripán y se ajustó a 2×10^6 células viables/ml. La suspensión de PBMC humanas se transfirió a 5 placas tratadas de cultivo de tejidos de 24 pocillos a 0.5 ml/pocillo (1×10^6 células) y se cultivó en una incubadora humidificada mantenida a 37°C y 5% de CO_2 durante 20 a 24 h. Después, se agregó la solución existente del Compuesto 1 (AT-281) a cada pocillo para alcanzar la concentración final de 10 μM , y las células estimuladas se incubaron durante 0, 2, 4 y 6 h a 37°C y una atmósfera del 5% de CO_2 . En cada momento, se procesaron muestras por triplicado para el análisis del Compuesto 5 (AT-9010). Para las muestras de lavado, las PBMC incubadas se recolectaron y centrifugaron a $400\times g$ durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y las células se lavaron con 0.5 ml de medio, se resuspendieron en medio de 0.5 ml y se transfirieron a pocillos individuales de placas de 24 pocillos. Las PBMC humanas se incubaron además en una incubadora humidificada mantenida a 37°C y 5% de CO_2 durante 0, 2, 4, 16, 20, 24 y 28 h adicionales (es decir, 6, 8, 10, 22, 26, 30 y 34 h después del inicio de la exposición de artículo de prueba). En cada punto temporal, se procesaron muestras por triplicado para el análisis del compuesto 5 (AT-9010) como sigue: las muestras se transfirieron a tubos de 2 ml y se centrifugaron a $800\times g$ durante 5 min. Después de aspirar el sobrenadante, cada muestra se agitó en un vórtex después de la adición de 0.1 ml de agua. Después se enfriaron con 0.3 ml de MeOH al 60% helado y se almacenaron a -70°C hasta su análisis mediante LC/MS/MS (Figura 3).

20 **Ejemplo 10. Compuesto 5 (AT-9010) altera el alargamiento de ARN por NS5 de DENV.**

Para confirmar el mecanismo de acción y el objetivo antiviral del Compuesto 5 (AT-9010), se ejecutaron ensayos de incorporación y alargamiento (descritos en el Ejemplo 13) utilizando la proteína NS5 de DENV de longitud completa (descrita en el Ejemplo 11) (serotipo 2) y un par de 25 ARN de cebador-molde anexo que imita el extremo 3' del genoma DENV-2 (descrito en el Ejemplo 12). En la ausencia de GTP, Compuesto 5 (AT-9010) se incorporó fácilmente como un sustituto en la posición +5 del cebador de ARN (Figura 4, lado izquierdo del gel). A pesar de la presencia del siguiente nucleótido correcto (UTP), no se observó ninguna extensión adicional, lo que indica que el Compuesto 5 (AT-9010) causa la terminación de cadena inmediata de síntesis de ARN desconsiderada de la presencia de su grupo 3'OH. En la presencia de los cuatro NTP, el Compuesto 5 (AT-9010) compitió 30 con GTP por incorporación en las posiciones +5 y +7 (Figura 4, lado derecho). De hecho, la incorporación de GTP y Compuesto 5 (AT-9010) en las mismas posiciones se pudo diferenciar en el gel, y se calculó que el factor de discriminación (preferencia por GTP > Compuesto 5 (AT-9010), a juzgar por las intensidades del producto de banda) al ser 12.6 ± 4.3 . La comparación de incorporación 35 con el terminador de cadena obligado 3'-dGTP mostró un perfil equivalente, lo que respalda la

terminación de cadena como el mecanismo de acción del Compuesto 5 (AT-9010) (Figura 5).

Ejemplo 11. Expresión y purificación de proteína NS5 de DENV.

La proteína NS5 de DENV utilizada en el Ejemplo 10 se preparó mediante el procedimiento aquí descrito. La NS5 de DENV de longitud completa (serotipo 2, Nueva Guinea C) se expresó y purificó como se describió previamente (Potisopon y otros, 2017. Selectividad de sustrato de la polimerasa de NS5 del virus del Dengue y el Zka hacia análogos de nucleótidos modificados en 2'. Antiviral Res 140:25-36). De manera breve, el gen que codifica NS5 con una etiqueta 6-His en la N-terminal se expresó a partir de un vector pQE30 en células *E. coli* NEB Express (New England Biolabs, Ipswich, MA) transformadas con pRare2-LacI (Novagen, Madison, WI), e inducidas con IPTG a 50 μ M y 2% de EtOH hasta que el valor de OD₆₀₀ alcanzó 0.6. Las células se lisaron con sonicación y la proteína NS5 se separó utilizando una lechada de resina de afinidad metálica TALON (Clontech, Mountain View, CA) de conformidad con las instrucciones del fabricante, se lavó y se eluyó. Se llevó a cabo una cromatografía de exclusión de tamaño como un segundo paso de purificación, donde la proteína se cargó en una columna Superdex 200 HR 16/20 (GE Healthcare) y se eluyó en un tampón que contiene 50 mM HEPES pH 7.5, 300 mM NaCl, glicerol al 10% y DTT de 1 mM.

Ejemplo 12. Oligonucleótidos y nucleótidos.

Los oligonucleótidos de ARN utilizados en el Ejemplo 10 se prepararon como se describe aquí. Los oligonucleótidos de ARN se adquirieron en Biomers.net (Ulm/Donau, Alemania). Una secuencia de plantilla de 20 nt (T₂₀) correspondiente al extremo 3' del antígeno DENV-2 se anexó a un cebador complementario de 10 nt (P₁₀) que contiene una humedad de 6-FAM fluorescente en el extremo 5'. La anexión se realizó utilizando una relación molar de cebador-plantilla de 1:1.5 en presencia de KCl 110 mM, se incubó a 70°C durante 10 min y se enfrió lentamente a temperatura ambiente. Los NTP se adquirieron en GE Healthcare (Chicago, IL).

Ejemplo 13. Ensayo de incorporación de análogo de nucleótido.

El NS5 de DENV se preincubó con el ARN P₁₀/T₂₀ recocido en un tampón de ensamblaje que contiene HEPES de 20 mM, pH 7.5, 10% de glicerol, MgCl₂ de 5 mM y DTT de 5 mM durante 10 min a 30°C para crear un complejo de alargamiento de ARN activo. Las reacciones se iniciaron al agregar AT-9010 con ya sea los cuatro NTP o solo UTP, ATP y CTP. Las concentraciones finales fueron NS5 de 0.5 μ M, P₁₀/T₂₀ de 0.25 μ M, 100 μ M de cada NTP y entre 10 a 625 μ M de AT-9010, en un tampón final que contiene 20 mM de HEPES, pH 7.5, 15% de glicerol, 5 mM de MgCl₂ y 5 mM de DTT. Las reacciones se extinguieron en los puntos de tiempo indicados en una solución de parada FBD de volumen 2X (formamida, 10 mM EDTA) y se analizaron en acrilamida:bisacrilamida al 20% (19:1), geles de secuenciación de urea 7 M. Los productos de ARN se visualizaron utilizando un Typhoon FluorImager y se analizaron utilizando el software ImageQuant.

Ejemplo 14. Compuesto 2 (AT-752) demuestra una farmacocinética favorable en especies preclínicas.

Las farmacocinéticas de plasma (PK, por sus siglas en inglés) del Compuesto 1 (AT-281) y Compuesto 3 de sus metabolitos (AT-551), el profármaco intermedio, y Compuesto 6 (AT-273), el sustituto de plasma para niveles intracelulares del Compuesto 5 de metabolito de trifosfato activo (AT-9010), se determinaron en ratones CD-1, ratas SD y monos cinomólogos después de dosis orales únicas del Compuesto 2 (AT-752) a 420, 300 y 300 mg/kg, respectivamente (Cuadro 3).

Cuadro 3. Parámetros farmacocinéticos siguiendo administración de una dosis oral única de AT-752

Metabolito	Especies	Dosis (mg/kg)	C _{max} ^a (nmol/mL)	T _{max} ^b (h)	AUC _{0-24h} ^c (nmol*h/mL)
Compuesto 1	Ratón	420	2.6 ± 0.3	0.8 ± 0.3	4.2 ± 0.5
	Rata	300	nd	nd	nd
	Mono	300	3.7 ± 1.5	1.0 ± 0.0	9.5 ± 3.7
Compuesto 3	Ratón	420	45.1 ± 12.0	0.5 ± 0.0	58.7 ± 13.3
	Rata	300	16.5 ± 10.8	1.0 ± 0.0	56.5
	Mono	300	2.0 ± 0.8	2.0 ± 0.0	9.7 ± 2.2
Compuesto 6	Ratón	420	2.3 ± 0.7	4.0 ± 0.0	18.8 ± 6.0
	Rata	300	1.3 ± 0.3	8.0 ± 0.0	22.9
	Mono	300	0.8 ± 0.2	4.0 ± 0.0	7.8 ± 2.4

En roedores, el Compuesto 1 de profármaco original (AT-281) se metabolizó rápidamente con la rápida aparición en plasma de sus metabolitos, Compuesto 3 (AT-551) y Compuesto 6 (AT-273) (Figuras 6A y 6B). Para ratas, la concentración de plasma del Compuesto 1 (AT-281) estuvo por debajo del límite de cuantificación en 1 h (Figura 6B), el punto temporal más temprano medido, el cual es consistente con la inestabilidad metabólica del Compuesto 1 (AT-281) en el plasma de rata reportado anteriormente. En monos, el Compuesto 1 (AT-281) estuvo presente durante más de 4 horas en plasma (Figura 6C), con una C_{max} de 3.7 ± 1.5 nmol/mL en 1 h. El profármaco se convirtió en el Compuesto 3 de metabolitos de plasma intermedios (AT-551) y Compuesto 6 (AT-273), con una PK comparable a los resultados reportados previamente de su congénere AT-511 (Good y otros, Evaluación preclínica de AT-527, Un profármaco de nucleótido de guanosina novedoso con potente actividad pan-genotípica contra el virus de hepatitis C. PLoS One 15:e0227104).

Ejemplo 15. El Compuesto 5 de metabolito activo (AT-9010) se forma en PBMC *in vivo*.

Las concentraciones de Compuesto 5 (AT-9010) en PBMC aislados de ratones y ratas a los que se les administró dosis orales únicas de Compuesto 1 (AT-281) a 50 y 300 mg/kg y monos después de una dosis oral única de Compuesto 2 (AT-752) equivalente a 55 mg/kg de Compuesto 1 (AT-281) se midieron en varios puntos temporales posteriores a la dosis (Figura 7). Después de dosis comparables, se observaron concentraciones similares del Compuesto 5 (AT-9010) en ratones y monos a las 12 h (0.092 y 0.070 ± 0.046 pmol/ 10^6 células). Con una dosis 6 veces mayor, las PBMC de ratas a las 24 h exhibieron de 5 a 6 veces más Compuesto 5 (AT-9010) (0.439 ± 0.218 pmol/ 10^6 células) que los valores de 12 h observados en ratones y monos, lo que sugiere un grado similar de formación de TP activo en las PBMC a través de las tres especies, a pesar de la exposición muy baja al Compuesto 1 (AT-281) en la circulación sistémica de ratas y, en menor medida, ratones. Cuando se administró a los ratones una dosis de carga de 500 mg/kg del Compuesto 1 (AT-281), seguida de una segunda dosis de 250 mg/kg 4 h después, las concentraciones del Compuesto 5 (AT-9010) en las PBMC a las 4 y 12 h después de la segunda dosis fueron de 0.297 y 0.322 pmol/ 10^6 células, respectivamente (no mostrada).

Para probar la tolerabilidad del Compuesto 1 (AT-281) y determinar las concentraciones en estado estacionario del TP activo en las PBMC, se administró a los ratones una dosis de carga de 1000 mg/kg y, comenzando 4 h después, se les administró dos veces al día (con 12 h de diferencia) a 500 mg/kg durante 3 días. Las concentraciones del Compuesto 5 (AT-9010) en PBMC agrupados ($n=3$) 12 h después de la primera y sexta dosis de 500 mg/kg fueron 0.421 y 0.575 pmol/ 10^6 células, respectivamente, mientras que el Compuesto 6 de las concentraciones de plasma (AT-273) fueron 0.67 ± 0.12 y 1.35 ± 0.86 nmol/mL, respectivamente, para los mismos puntos temporales. No se observaron signos clínicos adversos en los ratones, por lo que las dosis múltiples del profármaco fueron bien toleradas.

Ejemplo 16. Bienestar Animal.

Los estudios que utilizaron ratones CD-1, ratas SD y monos cinomólogos en el Ejemplo 17 se llevaron a cabo en WuXi AppTec (Suzhou, China) en estricto cumplimiento de las pautas de AAALAC International, NIH y la República Popular China, Ministerio de Ciencia y Tecnología, "Regulaciones para la Administración de Asuntos Relacionados con Animales Experimentales", 2017. Los protocolos fueron revisados y aprobados por el IACUC de WuXi AppTec antes del inicio del estudio, y todos los animales fueron evaluados por el personal veterinario de WuXi AppTec durante los estudios. Todos los animales se alojaron en habitaciones con temperatura controlada (18 a 26°C), humedad relativa (40 a 70%) y ciclo de luz (12 h de luz artificial y 12 h de oscuridad), con un flujo de aire del 100% . Se les proporcionaron juguetes manipulativos/de enriquecimiento. El estudio con ratones

AG129 descrito en este documento se llevó a cabo en IBT Bioservices (Rockville, MD) en estricto cumplimiento de la Ley de Bienestar Animal del USDA y siguiendo la Política de Cuidado y Uso Humanitario de Animales de Laboratorio del PHS y NIH, y la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, Consejo Nacional de Investigación - ILAR, Revisada en 2011. El estudio se llevó a cabo en total cumplimiento con los protocolos que fueron revisados y aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales (IACUC, por sus siglas en inglés) del IBT antes del inicio del estudio, y los ratones fueron evaluados y monitoreados durante todo el estudio por miembros del personal veterinario del IBT de conformidad con la Política del PHS y el USDA.

Ejemplo 17. Estudios PK y formación *in vivo* del Compuesto 5 (AT-9010) en ratones, ratas y monos.

Se administró a ratones CD-1 machos ingenuos (Shanghai Sippr BK Laboratory Animals Co. Ltd., China) una dosis del Compuesto 2 (AT-752) de 420 mg/kg en 40% de PEG400, 10% de solutol HS15, 50% de tampón de citrato de 100 mM, pH 4.5 (v/v) mediante sonda oral. Se recolectaron muestras de sangre (N=3) a 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 y 24 h posteriores a la dosis, se separó el plasma en EDTA y 1 µL de diclorvos (2 mg/mL; agente estabilizador para prevenir la hidrólisis *in vitro* de la humedad de éster del Compuesto 1 (AT-281) por las esterasas sanguíneas) y se almacenó a -70°C. Las concentraciones del Compuesto 1 (AT-281) y el Compuesto 3 de metabolitos (AT-551) y Compuesto 6 (AT-273) se determinaron en el plasma mediante LC/MS/MS. Para las PBMC, se administró a seis ratones CD-1 machos ingenuos una dosis del Compuesto 2 (AT-752) (a una dosis equivalente al Compuesto 1 (AT-281) de 50 mg/kg) en PEG400 al 60% mediante sonda oral. Se recolectaron muestras de sangre, en grupos de tres, a las 4 y 12 h posteriores a la dosis, se aislaron las PBMC y se midieron las concentraciones del Compuesto 5 (AT-9010) mediante LC/MS/MS.

Se administró por sonda oral a ratas SD macho ingenuas (Beijing Vital River Laboratory Animals Co. Ltd., China) una dosis de AT-752 de 300 mg/kg en 40% de PEG400, 10% de solutol HS15, 50% de tampón de citrato de 100 mM, pH 4.5 (v/v) mediante sonda oral. Se recolectaron muestras de sangre (n=4) 1, 2, 4, 8, 12 y 24 h después de la dosis, se separó el plasma y se almacenó a -70°C. Las concentraciones del Compuesto 1 (AT-281) y los metabolitos del Compuesto 3 (AT-551) y Compuesto 6 (AT-273) se determinaron por LC/MS/MS. Para las PBMC, a nueve ratas SD macho ingenuas se les administró una dosis del Compuesto 2 (AT-752) (en una dosis equivalente al Compuesto 1 (AT-281) de 300 mg/kg) por sonda oral. Se recolectaron muestras de sangre, en grupos de tres, a las 24, 48 y 72 h posteriores a la dosis, se aislaron las PBMC y se determinaron las concentraciones del Compuesto 5 (AT-9010) mediante LC/MS/MS.

Durante el estudio, se alojaron individualmente monos cinomólogos machos ingenuos (Hainan Jingang Laboratory Animal Co. Ltd., China), de al menos 2 kg de peso corporal, en jaulas de malla de acero inoxidable, se les proporcionó acceso ad libitum a agua de RO, se alimentaron dos

veces al día (excepto el día de dosificación, cuando se alimentaron una vez) con ~60 g de Dieta de Mono certificada en cada alimento (Beijing Vital Keao Feed Co., Ltd., Beijing, China) y se les dieron golosinas diarias de fruta fresca. Se les administró (n=5) una dosis del Compuesto 2 (AT-752) a 300 mg/kg en 40% PEG400, 10% solutol HS15, 50% tampón de citrato de 100 mM, pH 4.5 (v/v) por sonda oral, y se recolectaron muestras de sangre (~0.5 mL) a las 1, 2, 4, 8, 12 y 24 h posteriores a la dosis. El plasma se separó en cada punto temporal para las farmacocinéticas y se almacenó a -70°C. Las concentraciones del Compuesto 1 (AT-281) y los metabolitos de Compuesto 3 (AT-551) y Compuesto 6 (AT-273) se determinaron por LC/MS/MS. De manera separada, a tres monos se les administró una dosis oral del Compuesto 2 (AT-752) en forma de polvo en cápsulas a 60 mg/kg (dosis equivalente del Compuesto 2 (AT-281) de 55 mg/kg), y se recolectaron muestras de sangre a las 12, 24 y 48 h posteriores a la dosis. Se aislaron PBMC y se midieron concentraciones del Compuesto 5 (AT-9010) mediante LC/MS/MS. Se observó a todos los animales para detectar signos clínicos inusuales o adversos justo antes e inmediatamente después de la dosificación y antes de cada punto de tiempo de recolección de sangre, sin que se observaran tales signos.

De manera separada, se realizaron dos estudios en ratones con dosis múltiples. Primero, se administró a 9 ratones CD-1 ingenuos el Compuesto 1 (AT-281) en tampón de citrato 100 mM, pH 4.5 por sonda oral a 500 mg/kg para la primera dosis y, 4 h más tarde, 250 mg/kg para la segunda dosis. Se recolectaron muestras de sangre, 3 animales por punto temporal, a las 4 (antes de la segunda dosis), 8 y 16 h después de la primera dosis, y se aislaron las PBMC. En segundo lugar, se administró a 9 ratones CD-1 ingenuos el Compuesto 1 (AT-281) por sonda oral a 1000 mg/kg para la primera dosis, y luego 4 h más tarde, se les administraron dosis dos veces al día con 12 horas de diferencia durante 3 días consecutivos a 500 mg/kg. Se recolectaron muestras de sangre, 3 animales por punto temporal, a las 16 (recibieron una dosis de 500 mg/kg), 40 (recibieron tres dosis de 500 mg/kg) y 76 h después de la primera dosis (recibieron seis dosis de 500 mg/kg), y se aislaron las PBMC. Se determinaron las concentraciones del Compuesto 1 (AT-281) y Compuesto 6 (AT-273) en el plasma, y el Compuesto 5 (AT-9010) en los PBMC mediante LC/MS/MS (descrito en el Ejemplo 21).

Ejemplo 18. Compuesto 2 (AT-752) reduce la viremia y mejora la supervivencia de ratones AG129 después de la infección con DENV2 D2Y98P.

Para probar la eficacia del Compuesto 2 (AT-752) contra la infección de DENV, se inoculó por vía subcutánea a ratones AG129 con DENV-2 D2Y98P, una cepa no adaptada a ratones que sigue una cinética de la enfermedad similar a la descrita en humanos (Tan y otros, 2010. Una cepa del virus del Dengue no adaptada a ratones como nuevo modelo de infección grave por Dengue en ratones AG129. PLoS Negl Trop Dis 4:3672). El profármaco se administró por vía oral como una dosis de carga (1000 mg/kg) 4 h antes del desafío viral, y luego como dosis dos veces al día (BID) (500 mg/kg) durante 7 días consecutivos, comenzando 1 h después de la infección (pi). Viremia y

carga viral en el bazo, los criterios de valoración primarios, se evaluaron los días 4, 6, 7, 8 y 10 pi. La viremia (Figura 8A) en el Compuesto 2 (AT-752) del grupo tratado fue significativamente menor que en el grupo tratado solo con el portador en el día 6 pi ($p=0.000014$ por prueba t) y se eliminó en todos los animales tratados el día 8 pi, mientras que el virus todavía era medible en todos los controles supervivientes ($p=0.0045$ por prueba t). Aunque el tratamiento con el Compuesto 2 (AT-752) redujo la carga viral en el bazo el día 7 pi comparado con el grupo de control (Figura 8B), este cambio no fue estadísticamente diferente entre los grupos. Este resultado es probable debido a que el virus eventualmente se elimina del bazo en este modelo de enfermedad en ratones.

Se evaluaron a los ratones diariamente para el cambio de peso, apariencia, movilidad y estado de alerta, y se los sacrificó cuando se alcanzó una pérdida de peso del 20% o se alcanzó una puntuación de salud >5 . Hubo diferencias notables en el peso corporal entre los grupos tratados y el grupo de control con portador en los días 4 al 8 pi ($p < 0.001$ por prueba t). Ningún ratón tratado con portador sobrevivió más allá del día 8 pi. Los animales tratados con Compuesto 2 (AT-752) tuvieron una pérdida de peso significativamente reducida en comparación con los ratones de control con portador en los días 5, 7 y 8 pi (Figura 9A; $p < 0.001$ por prueba t). Además, los ratones tratados con Compuesto 2 (AT-752) tuvieron puntuaciones de salud significativamente mejores que el grupo de control de portador en el Día 4 a Día 9 pi (Figura 9B; $p < 0.001$ por prueba t). Los datos de mortalidad resultantes, presentados como curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (Figura 10), demuestran que el Compuesto 2 (AT-752) mejoró significativamente la supervivencia de los ratones infectados en comparación con el grupo de control de portador ($p= 0.0004$, prueba de log-rank de Mantel-Cox). Todos los ratones del grupo de control que no fueron sacrificados según lo programado para la recolección de muestras de sangre y bazo murieron o fueron sacrificados entre los días 5 y 8 pi. En contraste, aquellos animales tratados con el Compuesto 2 (AT-752) sobrevivieron entre los días 11 y 18 pi.

25 **Ejemplo 19. Estudio de ratón AG129.**

Las muestras de tejido utilizadas en el Ejemplo 20 se recolectaron de conformidad con el protocolo aquí descrito. Cincuenta y cinco ratones AG129 hembras (inactivados para interferón α , β y γ), de 6 a 8 semanas de edad, se dividieron en dos grupos, con 25 ratones en el Grupo 1 (portador) y 30 ratones en el Grupo 2. En el día 0, todos los ratones fueron desafiados con 1×10^5 PFU de DENV-2 D2Y98P mediante inyección subcutánea. Los animales del grupo 1 recibieron portador [(PEG400 (40%, v/v)/ Solutol HS15 (10%, v/v) /100 mM de tampón de citrato pH 4.5 ± 0.2 (50%, v/v)] por sonda oral dos veces al día durante 7 días consecutivos a partir de 1 h pi. El grupo 2 recibió una dosis única de 1000 mg/kg del compuesto 2 (AT-752), 4 h antes del desafío, seguida por una dosis de 500 mg/kg 1 h después del desafío (pi). La dosificación de BID del compuesto 2 (AT-752) a 500 mg/kg se continuó durante 7 días consecutivos. El protocolo requería que se sacrificaran cinco ratones por grupo

y que se recolectaran sueros terminales y bazos los días 4, 6, 7, 8 y 10 pi. En el día 20 pi, todos los ratones supervivientes del grupo 2 fueron sacrificados para la recolección de sueros terminales y de bazo. Las muestras de suero se almacenaron a -80°C hasta análisis adicional. Las muestras de bazo recolectadas se pesaron y se congelaron rápidamente en una mezcla de etanol/hielo seco y se almacenaron inmediatamente a -80°C . Todas las muestras se procesaron y analizaron para determinar la carga viral mediante un ensayo de placa. Todos los animales fueron monitoreados diariamente para determinar la pérdida de peso, la morbilidad, la mortalidad y el deterioro neurológico. Los ratones que mostraban una enfermedad grave, determinada por una pérdida de peso $>20\%$, una puntuación de salud superior a 5 (calificación de apariencia del pelaje, movilidad y estado de alerta), letargo extremo y/o parálisis, fueron sacrificados y recolectados para obtener sueros terminales y bazos. Cualquier ratón que se encontró muerto, fue recolectado únicamente para la recolección de bazo.

Ejemplo 20. Ensayo de placa para la determinación de carga viral del bazo.

Las muestras de bazo recolectadas de conformidad con el Ejemplo 19 se homogeneizaron en 250 μL de DPBS utilizando un TissueRuptor. A continuación, los homogeneizados se centrifugaron y los sobrenadantes se recolectaron y congelaron inmediatamente en dos alícuotas diferentes hasta que se realizó el ensayo de placa. Los resultados del ensayo de placa se muestran en las Figuras 8A y 8B.

El día anterior al ensayo, se sembraron células Vero a una densidad de 1×10^5 células/pocillo en 1 mL de medio de Hi-FBS al 1% en placas de cultivo de tejidos de 24 pocillos y se incubaron durante la noche a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5%. Al día siguiente, se prepararon diluciones seriadas de 10 veces (10^{-2} a 10^{-5}) de las muestras de suero y bazo para la titulación en triplicado. Se removió el medio de cultivo celular de las células Vero y se añadieron 100 μL de medio MEM suplementado con 2 mM de L-glutamina y 1X Pen/Strep junto con 100 μL de las muestras diluidas. Las células se incubaron durante 1 h a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5%. A continuación, se agregó a las células 1 mL de metilcelulosa al 0.8% que contenía 2% de FBS suplementado con 2 mM de L-glutamina y 1X Pen/Strep sin remover el inóculo y se incubó durante 3 días adicionales a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5% para permitir la formación de placa. Las células se fijaron y permeabilizaron utilizando una mezcla fría de 80% de etanol/20% de metanol durante 30 minutos a -20°C . Se agregaron 200 μL de anticuerpo monoclonal anti-Dengue diluido 1:2000 en leche descremada al 5% a cada pocillo y se incubó durante la noche a 4°C . Los pocillos se lavaron 3 veces con 1xDPBS, se agregaron 200 μL de anticuerpo antirratón de cabra conjugado con HRP a una dilución de 1:2000 en leche desnatada al 5% y los pocillos se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente. Las placas virales se resolvieron y se contaron utilizando un sustrato de peroxidasa insoluble (TrueBlue) y un contador de placas. Los datos de la carga viral del bazo se normalizaron al peso del bazo de cada ratón individual.

Ejemplo 21. Análisis LC-MS/MS del Compuesto 1 (AT-281), Compuesto 3 (AT-551), Compuesto 6 (AT-273) y Compuesto 5 (AT-9010).

Las mediciones farmacocinéticas de las Figuras 11, 12, 13, 14 y 15 se analizaron utilizando LC-MS/MS de conformidad con el protocolo aquí descrito. Las muestras de plasma se prepararon para el análisis de MS al agregar estándares internos y extrayendo con 20 volúmenes de ACN enfriado. Después de agitar en vórtex (800 rpm durante 10 min) y centrifugar (4,000 rpm, 15 min, 4°C), los sobrenadantes (25 µL) se diluyeron con un volumen igual de H₂O, se mezclaron y se centrifugaron de nuevo. Después de agregar estándares internos, las muestras de PBMC (10⁶ células) se lisaron con 300 µL de MeOH/H₂O (70:30, v/v) y 40 mM de acetato de dibutilamonio (DBAA), mezclados por vórtex y centrifugados (12,000 rpm, 15 min, 4°C). Se secaron alícuotas de los sobrenadantes (35 µL) bajo nitrógeno y se reconstituyeron en H₂O, después se mezclaron y se centrifugaron de nuevo. Para medir el Compuesto 1 (AT-281) y los metabolitos de plasma de Compuesto 3 (AT-551) y Compuesto 6 (AT-273), se inyectaron muestras de 4 µL en una columna UPLC Acquity Gemini C18 (50 x 4.6 mm), 5 µm con un espectrómetro de masas Sciex Triple Quad 6500 (iones positivos ESI, modo MRM). Se utilizó un gradiente no lineal binario con fases móviles A (ácido fórmico al 0.1% en agua) y B (ácido fórmico al 0.1% en ACN) para eluir las muestras a 0.8 mL/min, con un tiempo de ejecución de 5 min. Para AT-9010 en células, se inyectaron 8 µL en una columna de UPLC de Acquity BEH C18 (50 x 2.1 mm), 1,7 µm con un espectrómetro de masas API 14000 (iones negativos ESI, modo MRM). Se utilizó un gradiente binario no lineal con fases móviles A (0.001% NH₃·H₂O, 0.18 mM DBAA en H₂O) y B (10 mM N,N-dimetil-hexilamina, 3 mM NH₄OAc en ACN/H₂O (50:50, v/v)) para eluir las muestras a 0.5 mL/min, con un tiempo de ejecución de 3 min. Se utilizaron estándares en 50% MeOH para calibración. Los iones monitoreados fueron m/z 538.2/440.0 (AT-9010), 582.3/330.1 (AT-281), 464.2/165.1 (AT-551) y 300.2/152.2 (AT-273). Se utilizaron los estándares internos (ISS) como se describieron previamente (Good y otros, Evaluación preclínica de AT-527, un profármaco de nucleótido de guanosina novedoso con potente actividad pan-genotípica contra el virus de hepatitis C. PLoS One 15:e02271045) para corregir las variaciones en recuperación.

Ejemplo 22. Análisis de datos farmacocinéticos.

El análisis de datos farmacocinéticos generados de conformidad con el Ejemplo 21 y presentados en las Figuras 11, 12, 13, 14 y 15 se analizaron de conformidad con el procedimiento aquí descrito. Las concentraciones de plasma del Compuesto 1 (AT-281), Compuesto 3 (AT-551) y Compuesto 6 (AT-273) se sometieron a un análisis farmacocinético no compartimental utilizando el software Phoenix WinNonlin (versión 6.3 o superior, Pharsight, Mountain View, CA). Se aplicó la regla trapezoidal lineal/logarítmica en la obtención de los parámetros PK.

Ejemplo 23. Estudio de seguridad en humanos

Se incluyeron hombres y mujeres sanos de 18 a 65 años de edad en cohortes de dosis ascendente individual (SAD, por sus siglas en inglés) y dosis ascendente múltiple (MAD, por sus siglas en inglés) y se los asignó aleatoriamente para recibir el compuesto 2 por vía oral o placebo de conformidad con los Cuadros 4 a 7.

Se realizaron evaluaciones de seguridad que incluyeron eventos adversos, pruebas de laboratorio clínicas estándar, mediciones de signos vitales, electrocardiogramas y exámenes físicos.

Cuadro 4. Pacientes Incluidos en Estudio

	Cohortes de SAD	Cohortes de MAD
Edad Media	28.6	35.3
Género	51.2% masculino, 48.8% femenino	62.5% masculino, 37.5% femenino
Peso (kg)	67.3	74.7

Cuadro 5. Distribución de pacientes entre cohortes en el estudio

Cohortes de SAD	Número de Pacientes	Cohorte de MAD	Número de Pacientes
A/B/C/D/E	31	F/G/H	18
Placebo	10	Placebo	6

Cuadro 6. Esquema de estudio para cohortes de SAD

Cohorte	Dosis (mg)	Administración
A	250	Día 1 (ayuno)
B (Efecto de comida)	500	Día 1 (ayuno); Day 7 (alimentación)*
C	1000	Día 1 (ayuno)
D (Etnico)**	1000	Día 1 (ayuno)
E	1500	Día 1 (ayuno)

*comida de prueba rica en grasas y calorías. **participantes sanos de origen Asiático Meridional, Sudoriental y Oriental.

Cuadro 7. Esquema de estudio para cohortes de MAD

Cohorte	Dosis (mg)	Administración
F	1000	QD x 7 días
G	750	BID x 4 días más una dosis Día 5
H	750	TID x 4 días más una dosis Día 5

El compuesto 2 fue bien tolerado y no se reportaron eventos adversos graves ni

interrupciones del tratamiento debido a eventos adversos. Los eventos adversos no graves fueron de gravedad leve o moderada y se resolvieron al final del estudio (Cuadro 8). Se produjeron casos esporádicos de eventos relacionados con el sistema gastrointestinal, incluyendo vómitos leves a moderados, principalmente con dosis más altas.

5 **Cuadro 8. Eventos adversos en cohortes de TAE informados por más de dos sujetos**

Dosis	Placebo	250	500	500*	1000	1000**	1500	Total
Número de Pacientes	10	6	7	7	6	6	6	41
Dolores de cabeza	1	0	2	4	1	0	2	8
Nausea	0	0	0	1	1	0	1	3
Vómito	0	0	0	0	1	0	2	3

*alimentación; **pacientes de origen Asiático Meridional, Sudoriental y Oriental.

10 **Cuadro 9. Eventos adversos en cohortes de MAD reportados por más de dos sujetos**

Dosis	Placebo	1000 QD	750 BID	750 TID	Total	SAD y MAD Combinados Totales
Número de Pacientes	6	6	6	6	24	65
Dolor de cabeza	1	0	1	0	2	10
Nausea	1	0	1	0	2	5
Vómito	0	0	1	0	1	4

Ejemplo 24. Estudio farmacocinético en cohortes de SAD

Se inscribieron hombres y mujeres sanos de 18 a 65 años de edad en un grupo de dosis única ascendente (SAD) y se los asignó aleatoriamente para recibir el Compuesto 2 oral o placebo de conformidad con los Cuadros 4 a 6.

Se recolectaron muestras de plasma y orina en puntos temporales predeterminados y se cuantificaron para el Compuesto 1 y sus metabolitos Compuestos 3, 6 y 7 utilizando LC-MS/MS. Los análisis farmacocinéticos se realizaron utilizando aproximaciones no compartimentales.

Tras la dosificación oral bajo condiciones de ayuno, el profármaco parental de Compuesto 1 se absorbió y se eliminó rápidamente, seguido de la aparición del Compuesto 3 que también exhibió una exposición transitoria (Cuadros 10 a 14 y Figuras 12 a 15). El metabolito

nucleósido N⁶-metil 2'-metil, 2' fluoro, Compuesto 7 alcanzó subsecuentemente su pico máximo y exhibió una fase de eliminación más lenta (Figura 15). El compuesto 6 apareció más gradualmente en el plasma y mostró una vida media de eliminación prolongada (media de cohorte de hasta 23 horas), lo que refleja una exposición intracelular sostenida del Compuesto 5 de metabolito de trifosfato activo.

5 *Análisis de proporcionalidad de dosis*

La exposición de plasma del compuesto 1 y sus metabolitos aumentó en el rango de dosis estudiado de 250 a 1500 mg. El Compuesto 7 aumentó de manera proporcional a la dosis. El Compuesto 1 y Compuesto 3 aumentaron de manera mayor que proporcional a la dosis, mientras que el Compuesto 6 fue ligeramente menor que proporcional a la dosis.

10 *Efecto de Alimentación*

Una comida rica en grasas y calorías retrasó y disminuyó el nivel máximo del Compuesto 1, Compuesto 3 y Compuesto 7, pero tuvo un impacto limitado o nulo en su exposición total y aumentó ligeramente la exposición plasmática del Compuesto 6.

15 **Cuadro 10. Resumen de los parámetros farmacocinéticos plasmáticos para el Compuesto 1**

Dosis	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (h)	AUC_{Inf} (ng/mL*h)	T_{1/2} (h)	CL_R (L/h)
250 mg	482±131	0.5 (0.5-0.8)	347±64	0.5±0.1	7.5±1.5
500 mg	1230±1110	0.5 (0.5-6.0)	1110±687	0.5±1.0	10.9±5.4
500 mg*	488±303	2.0 (0.5-3.0)	980±716	0.7±0.3	6.6±1.6
Efecto de Alimentación	52.2 (22.1-123.6)		80.2 (38.7-166.2)		
1000 mg	3040±960	0.5 (0.5-0.6)	1915±508	0.5±0.1	11.4±1.7
1000 mg**	3670±1260	0.5 (0.5-0.5)	2730±944	0.5±0.1	9.7±4.2
1500 mg	5050±2080	0.5 (0.5-0.8)	4630±1500	0.6±0.2	8.3±2.2

*alimentación; **pacientes de origen Asiático Meridional, Sudoriental y Oriental.

Cuadro 11. Resumen de los parámetros farmacocinéticos de plasma del Compuesto 3

Dosis	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC _{Inf} (ng/mL*h)	T _{1/2} (h)	CL _R (L/h)
250 mg	89±36	1.0 (0.8-2.0)	302±71	2.1±0.3	2.0±0.3
500 mg	231±155	1.0 (0.8-8.0)	898±437	2.4±0.5	2.1±0.6
500 mg*	154±84	3.1 (3.0-4.0)	737±289	2.3±0.4	2.1±0.4
Efecto de Alimentación	70.5 (42.8-116)		78.3 (61.8-99.2)		
1000 mg	695±468	0.8 (0.5-2.0)	2330±1060	2.2±0.4	2.1±0.6
1000 mg**	895±418	0.9 (0.5-2.0)	3320±1630	2.0±0.3	2.1±0.6
1500 mg	1080±217	1.5 (0.8-2.0)	4100±494	3.2±1.2	1.9±0.4

*alimentación; **pacientes de origen Asiático Meridional, Sudoriental y Oriental.

Cuadro 12. Resumen de los parámetros farmacocinéticos de plasma del Compuesto 6

Dosis	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC _{Inf} (ng/mL*h)	T _{1/2} (h)	CL _R (L/h)
250 mg	91±19	6.0 (3.0-6.0)	1440±280	19.1±10.2	15.8±2.8
500 mg	135±25	4.0 (3.0-8.0)	2390±478	13.9±5.9	16.8±7.6
500 mg*	175±29	6.0 (6.0-8.1)	2990±558	17.3±11.0	13.4±3.3
Efecto de Alimentación	132 (109.8-158.6)		125.6 (111.2-141.8)		
1000 mg	241±71	4.1 (4.0-6.3)	4350±1520	26.2±12.2	17.1±6.5
1000 mg**	240±46	5.0 (3.1-6.0)	3830±519	16.3±3.0	18.7±2.1
1500 mg	283±32	6.0 (3.2-6.1)	5460±1190	21.7±6.2	19.5±4.1

*alimentación; **pacientes de origen Asiático Meridional, Sudoriental y Oriental.

Cuadro 13. Resumen de parámetros farmacocinéticos de plasma del Compuesto 7

Dosis	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC _{Inf} (ng/mL*h)	T _{1/2} (h)	CL _R (L/h)
250 mg	446±121	2.1 (2.0-3.0)	2890±680	16.9±8.6	13.7±1.6
500 mg	765±307	1.0 (0.8-4.0)	5480±1630	15.1±6.2	13.6±5.4
500 mg*	488±324	4.0 (3.0-6.1)	4310±1400	11.2±4.9	12.5±2.8
Efecto de Alimentación	64.9 (43.8-96.2)		78.4 (68.4-89.9)		
1000 mg	1640±474	0.9 (0.8-3.0)	10300±3070	12.4±10.7	14.2±3.8
1000 mg**	2010±489	1.5 (0.8-2.0)	14000±4210	14.7±10.1	13.4±2.5
1500 mg	2030±600	2.0 (1.0-2.0)	16700±3780	12.5±3.8	15.0±2.4

*alimentación; **pacientes de origen Asiático Meridional, Sudoriental y Oriental.

- 5 Los perfiles farmacocinéticos fueron similares entre las cohortes de sujetos del sur/sudeste/este de Asia y en su mayoría Caucásicos, lo que sugiere la ausencia de sensibilidad étnica farmacocinética. Por lo tanto, el Compuesto 2 no requiere ajuste de dosis.

Excreción Urinaria

- 10 Tras la administración oral única del Compuesto 2 a 250 a 1500 mg, la eliminación urinaria fue baja para el Compuesto 1 y Compuesto 3 y fue modesta para el Compuesto 7 y Compuesto 6 (Cuadro 9). La recuperación urinaria total varió de aproximadamente el 20% a aproximadamente el 30% a través de las dosis. La depuración renal de los metabolitos de nucleósidos de Compuesto 6 y Compuesto 7 superó la tasa de filtración glomerular estimada lo que sugiere la participación de la secreción activa en su entorno renal.

15

Cuadro 14. Eliminación urinaria de compuestos seguido de la administración oral individual del Compuesto 2

Nombre del Compuesto	Eliminación Urinaria
Compuesto 1	<3%
Compuesto 3	<1%
Compuesto 6	6.7-8.8%
Compuesto 7	10.7-17.9%

Ejemplo 25. Estudio farmacocinético en cohortes de MAD

- 20 Se inscribieron hombres y mujeres sanos de 18 a 65 años de edad en un grupo de dosis ascendente múltiple (MAD) y se los asignó aleatoriamente para recibir el Compuesto 2 oral o placebo de conformidad con los Cuadros 4 y 7.

Se recolectaron muestras de plasma y orina en puntos temporales predeterminados y se cuantificaron para el Compuesto 1 y sus metabolitos Compuestos 3, 6 y 7 mediante LC-MS/MS. Los análisis farmacocinéticos se realizaron utilizando enfoques no compartimentales.

La exposición de plasma del Compuesto 6 aumentó aproximadamente un 25, 60 y 80% con QD, BID y TID respectivamente debido a su larga vida media de plasma. Esto refleja una rápida acumulación y una exposición intracelular sostenida del metabolito activo de Compuesto 5.

La dosis de 750 mg de TID se dirigió a un rápido aumento de la concentración de plasma del Compuesto 6, excediendo la concentración efectiva del 90% (EC₉₀) del fármaco para inhibir la replicación del virus del dengue in vitro (0.64 µM). Estos niveles se mantuvieron durante el período de tratamiento (Figura 11).

Cuadro 15. Resumen de los parámetros farmacocinéticos de plasma en estado estacionario del Compuesto 1

Compuesto 1	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC _{tau} (ng/mL*h)
1000 mg QD	3810±1670	0.5 (0.5-0.5)	3090±1530
750 mg BID	3490±1280	0.5 (0.5-0.8)	2609±640
750 mg TID	3010±754	0.5 (0.5-1.0)	2540±572

Cuadro 16. Resumen de los parámetros farmacocinéticos de plasma en estado estacionario del Compuesto 3

Compuesto 1	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC _{tau} (ng/mL*h)
1000 mg QD	392±143	1.0 (0.8-2.0)	1650±498
750 mg BID	365±159	1.0 (0.8-2.0)	1330±503
750 mg TID	245±30	1.5 (0.8-2.0)	944±173

Cuadro 17. Resumen de los parámetros farmacocinéticos de plasma en estado estacionario del Compuesto 6

Compuesto 1	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC _{tau} (ng/mL*h)
1000 mg QD	241±56	4.0 (3.0-4.0)	3120±694
750 mg BID	288±58	3.5 (3.0-4.0)	2680±730
750 mg TID	330±98	3.5 (3.0-6.0)	2370±743

Cuadro 18. Resumen de los parámetros farmacocinéticos de plasma en estado estacionario del Compuesto 7

Compuesto 1	C _{max} (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC _{tau} (ng/mL*h)
1000 mg QD	1200 _± 284	0.9 (0.8-2.0)	8290 _± 2290
750 mg BID	1470 _± 404	1.5 (0.8-2.2)	7960 _± 2970
750 mg TID	1600 _± 640	1.5 (1.0-2.0)	22300 _± 14100

En los cuadros 15 a 18, la C_{max} y el AUC_{tau} se representan mediante la media $\pm$ desviación estándar. El T_{max} se representa como la mediana (mínimo-máximo). El AUC_{tau} indica el área bajo la curva de tiempo de concentración de plasma durante el intervalo de dosificación.

Ejemplo 26. Ensayos antivirales

Las transcripciones de los virus del dengue (DENV1 WP, DENV2 NGC, DENV3 VN32, DENV4 MY01) se modificaron con un reportero de nanoluciferasa entre el 5'UTR y el gen de la cápside como se describió previamente (Baker y otros, 2020b, 2020a) para crear virus marcados que sean estables con el paso de cultivos celulares mientras producen una señal de luciferasa robusta después de inoculación para una detección eficiente de actividad antiviral. Se mezclaron ocho diluciones seriales dobles de AT-281 con cada virus reportero (MOI de 0.1 para DENV-1, DENV-2 y DENV-3; MOI de 0.001 para DENV-4) y se añadieron a placas que contenían células Huh-7 (RRID: CVCL 0336) que se sembraron a 1×10^4 células por pocillo en una placa de 96 pocillos el día anterior en medio Eagle Modificado de Dulbecco (Invitrogen, Carlsbad, CA) con suero bovino fetal al 2% (Hyclone, Logan, UT). Las células se lavaron 48 h después de la infección tres veces con solución salina tamponada con fosfato, seguido por la adición de sustrato NanoGlo® diluido 1:100 en Tampón de Ensayo NanoGlo® (Promega, Madison, WI). Las actividades de luciferasa se leyeron mediante un lector de placas BioTek Cytation 5 después de 3 minutos. Los datos se analizaron con el software GraphPad Prism 9. Las actividades de la luciferasa se normalizaron para muestras tratadas con DMSO que se ajustaron al 100%. Las barras de error representan la media $\pm$ DE. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes, cada uno de ellos analizado en triplicado. La actividad antiviral contra los virus analizados se puede encontrar en la Figura 16.

Ejemplo 27. Expresión de los dominios NS5, RdRp y MTasa de DENV

Las proteínas utilizadas en el ensayo de desplazamiento térmico (Ejemplo 31) se prepararon como se describe aquí. Los dominios NS5 y RdRp de DENV de longitud completa utilizados en este estudio se expresaron bajo el control de un promotor T7 en vectores pET28a en células NEB C2566 de Escherichia coli (E. coli) (New England Biolabs) que portan el plásmido pRARE2LacI (Novagen). Las proteínas se expresaron durante la noche a 17°C en TB (con 25 μ g/mL de kanamicina y 17 μ g/mL de cloranfenicol), siguiendo la inducción con 100 μ M de IPTG y 2% de EtOH (%v/v) a una DO600 de 0.8 – 1.

Las MTasas de DENV se expresaron bajo el control de un promotor T7 en vectores pDEST17 en células de Escherichia coli (E. coli) NEB C2566 (New England Biolabs) que portan el plásmido pRARE2LacI (Novagen). Las proteínas se expresaron durante la noche a 17°C en TB (con 100 µg/mL de ampicilina y 17 µg/mL de cloranfenicol), tras la inducción con 200 µM de IPTG y 2 % de EtOH (%v/v) a una DO600 de 0.8 – 1.

Ejemplo 28. Purificación de NS5 de DENV

Las NS5 de DENV utilizadas en el ensayo de desplazamiento térmico (Ejemplo 31) se purificaron como se describe aquí. Las células se rompieron mediante sonicación en hielo en un tampón de lisis (50 mM de NaP pH 8, 1 M de NaCl, 20% de glicerol) suplementado con 1.0 mg/mL de lisozima, 22 µg/mL de DNasa, 1.6 % de igepal, 0.5 mM de TCEP y un cóctel de inhibidores de proteasa completo (COC, por sus siglas en inglés) de Roche. La proteína de la fracción soluble se cargó en resina IMAC a base de cobalto TALON® Superflow™ (Cytiva), se lavó 5 veces con tampón de lisis, 10 veces con tampón de lisis (libre de igepal) antes de la elución con un tampón de lisis suplementado con 250 mM de imidazol y glicina 250 mM. El imidazol se eliminó mediante una diálisis durante la noche en un tampón de diálisis (50 mM de NaP pH 8, 20 % de glicerol, 150 mM de NaCl, 250 mM de glicina y 0.5 mM de TCEP) antes de realizar un último paso de purificación utilizando una columna de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) HiLoad® 16/600 Superdex® de 200 pg en un tampón (10 mM de HEPES pH 8, 300 mM de NaCl, 10 % de glicerol y 0.5 mM de TCEP). La proteína se concentró después a 10 a 15 mg.mL⁻¹ y se almacenó a -80°C después de una última diálisis en el tampón SEC suplementado con 40% de glicerol.

Ejemplo 29. Purificación de dominios RdRp de DENV

Los RdRp de DENV utilizados en el ensayo de desplazamiento térmico (Ejemplo 31) se purificaron como se describe aquí. Las células se rompieron mediante sonicación en hielo en un tampón de lisis (50 mM NaP pH 8, 1 M NaCl, 20% glicerol) suplementado con 1.0 mg/mL de lisozima, 22 µg/mL de DNasa, 1.6 % de igepal, 0.5 mM de TCEP y un cóctel de inhibidor de proteasa completo (COC) de Roche. Las proteínas de la fracción soluble se cargaron en resina IMAC a base de cobalto TALON® Superflow™ (Cytiva), se lavaron 5 veces con tampón de lisis, 10 veces con tampón de lisis (libre de igepal) antes de la elución con un tampón de lisis suplementado con 250 mM de imidazol y 250 mM de glicina. El imidazol se eliminó mediante una diálisis durante la noche en un tampón de diálisis (50 mM de NaP pH 8, 20% de glicerol, 150 mM de NaCl, 250 mM de glicina y 0.5 mM de TCEP) antes de realizar una purificación de último paso utilizando una columna de heparina GE Hi-trap. La proteína entonces se concentró a 10 a 15 mg.mL⁻¹ y se almacenó a -80°C después de una última diálisis en un tampón final que contiene 20 mM de HEPES pH 8, 300 mM de NaCl, 40% de glicerol y 0.5 mM de TCEP.

Ejemplo 30. Purificación de dominios de MTasa de DENV

La MTasa de DENV utilizada en el ensayo de cambio térmico (Ejemplo 31) se purificó como se describe aquí. Las células se rompieron mediante sonicación en hielo en un tampón de lisis (50 mM de HEPES pH 7.5, 10% de glicerol, 500 mM de NaCl y 5 mM de imidazol) suplementado con

5 0.2 mM de benzamidina, 1 mg/ml de lisozima, 22 µg/ml de DNasa y 0.5 mM de TCEP. Las proteínas de la fracción soluble se cargaron en resina IMAC a base de cobalto TALON® Superflow™ (Cytiva) y se lavaron con tampón de lisis (NaCl de 1 M) antes de la elución con 250 mM de imidazol. La proteína se purificó finalmente con un SEC (HiLoad® 16/600 Superdex® 200 pg) en un tampón de 50 mM HEPES pH 8, 300 mM NaCl y 0.5 mM TCEP. La proteína entonces se concentró a 10 a 15 mg.mL⁻¹ y

10 se almacenó a -80°C después de una última diálisis en un tampón final que contiene 20 mM HEPES pH 8, 300 mM NaCl, 40% de glicerol y 0.5 mM TCEP.

Ejemplo 31. Ensayo de desplazamiento térmico

La estabilidad térmica de proteínas de flavivirus y su interacción con compuestos se evaluaron mediante un ensayo de desplazamiento térmico. Las reacciones se realizaron en placas de

15 PCR de 96 pocillos con marco blanco en forma de estrella (ref. 044705) con un volumen final de 20 µL. Con respecto a la NS5 de DENV, polimerasa y MTasa, las mejores condiciones se encontraron al utilizar un tampón que contiene 20 mM de Hepes pH 7.5, 50mM de NaCl, 5mM de DTT, 10% de glicerol y 1 M de sorbitol.

Se dispusieron 0.4 µL de GTP, sinefungina o AT-9010 en la placa (concentración final

20 de 100 µM). Se utilizó agua como un control sin compuesto. Se mezclaron 2 µM de NS5, 2 µM de polimerasa o 6 µM de MTasa en el tampón con 2.5X, 0.75X o 1.5X de tinte respectivamente (concentraciones finales). Se preparó la mezcla de proteína y el kit de cambio térmico de proteína de ThermoFisher (ref. 4461146) y se dispensaron 19.6 µl en cada pocillo.

La placa se selló con una película adhesiva y luego se sometió a una ejecución en un

25 RT-PCR CFX96 (Bio-Rad). El programa comenzó con una fase de equilibrio de 1 min a 20°C, seguida por un gradiente de temperatura de 0.5°C/30 s, desde 20°C hasta 95°C, registrando fluorescencia cada 0.5°C. La fluorescencia se registró utilizando el canal FRET. Cada experimento se realizó por triplicado. Se trazaron curvas y se analizaron para determinar la temperatura de fusión al utiliza la ecuación sigmoidea de Boltzmann con el software GraphPad Prism. La representación gráfica de los

30 datos en el cuadro aa continuación se muestra en la Figura 17.

Cuadro 19. Datos del ensayo de cambio térmico

	$\Delta T_M(^{\circ}\text{C})$	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4
Dominio de MTasa	GTP	4.9 ± 0.1	5.7 ± 0.1	4.1 ± 0.1	4.0 ± 0.1
	Sinefungina	1.9 ± 0.1	2.9 ± 0.1	2.1 ± 0.1	2.8 ± 0.1
	AT-9010	3.8 ± 0.1	4.0 ± 0.1	3.5 ± 0.1	2.9 ± 0.1
	$\Delta T_M(^{\circ}\text{C})$	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4
Dominio de RdRp	GTP	4.5 ± 0.2	2.4 ± 0.1	2.2 ± 0.1	3.3 ± 0.1
	Sinefungina	-0.1 ± 0.1	-0.8 ± 0.1	0.0 ± 0.1	-0.1 ± 0.1
	AT-9010	5.6 ± 0.1	3.8 ± 0.1	3.2 ± 0.1	4.1 ± 0.1
	$\Delta T_M(^{\circ}\text{C})$	DENV1	DENV2	DENV3	DENV4
NS5	GTP	5.8 ± 0.1	5.7 ± 0.1	4.8 ± 0.1	3.9 ± 0.1
	Sinefungina	1.2 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.8 ± 0.1	1.4 ± 0.1
	AT-9010	6.1 ± 0.1	6.0 ± 0.1	5.0 ± 0.1	4.8 ± 0.1

Ejemplo 32. Síntesis del cebador pppApG

Las reacciones se llevaron a cabo en presencia de 2 mM de MnCl_2 o 5 mM de MnCl_2 , las concentraciones óptimas de estos iones catalíticos para la síntesis de ARN por parte de DENV2 RdRp (Selisko y otros, 2006). La discriminación de AT-9010 contra GTP se midió en cuatro reacciones independientes, con resultados similares a los aquellos mostrados en las Figuras 19B y 21A, 21B, 21C y 21D.

Ejemplo 33. Ensayo de actividad de MTasa

La transferencia de metilo tritiado desde $[3\text{H}]\text{-SAM}$ al sustrato de ARN se monitoreó mediante un ensayo de unión al filtro (FBA, por sus siglas en inglés), realizado de conformidad con el método descrito anteriormente (Paesen y otros, 2015). El dominio 2'-O-metiltransferasa recombinante de la proteína no estructural NS5 del serotipo 2 de DENV (DENV NS5 MTasa) correspondiente a los residuos 1 a 296 de NS5 se expresó y purificó como se describió previamente (Egloff y otros, 2002). La FBA se llevó a cabo en una mezcla de reacción [40 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM DTT, 2 μM SAM y 0.1 μM 3H-SAM (Perkin Elmer)] en presencia de 0.7 μM de ARN sintético mGpppAC4 y proteína DENV2 NS5MTasa (500 nM). La enzima se mezcló primero con el compuesto (.5 a 1000 μM) suspendido en agua antes de la adición del sustrato de ARN y SAM y entonces se incubó a 30°C. Las mezclas de reacción se detuvieron después de 30 min mediante su dilución 10 veces en agua helada. Las muestras se transfirieron a una estera de filtro de dietilaminoetilo (DEAE, por sus siglas en inglés) (Perkin Elmer) utilizando un Filtermat Harvester (Packard Instruments). Las esteritas que retenían ARN se lavaron dos

veces con formato de amonio 10 mM pH 8.0, dos veces con agua y una vez con etanol. Se empaparon con líquido de centelleo (Perkin Elmer) y la transferencia de 3H-metilo a los sustratos de ARN se determinó utilizando un contador de centelleo líquido Wallac MicroBeta TriLux (Perkin Elmer). Para las mediciones de IC₅₀, los valores se normalizaron y se ajustaron con Prism (software GraphPad) utilizando la siguiente ecuación: $Y = 100 / (1 + ((X/IC_{50})^{Hillslope}))$. La IC₅₀ se define como la concentración del compuesto inhibidor que causa una reducción del 50% en la actividad enzimática. Las curvas de datos se pueden encontrar en la Figura 18.

Ejemplo 34. Incorporación de análogos de nucleótidos en el ARN

NS5 de DENV se preincubó con el ARN P10/T20 recocido en un tampón de ensamblaje que contiene 20 mM de HEPES, pH 7.5, 10 % de glicerol, 5 mM de MgCl₂ y 5 mM de DTT durante 10 min a 30°C para crear un complejo de alargamiento de ARN activo.

La incorporación de múltiples nucleótidos se probó como sigue y los resultados se muestran en las Figuras 19A, 21, 22 y 23. Las reacciones se iniciaron al agregar AT-9010 con los cuatro NTP o solo UTP, ATP y CTP. Las concentraciones finales fueron 1 µM de NS5, 0.25 µM de P10/T20, 100 µM de cada NTP y entre 10 y 625 µM de AT-9010 en un tampón final que contiene 20 mM de HEPES pH 7.5, 15% de glicerol, 5 mM de MgCl₂ y 5 mM de DTT.

La incorporación de un nucleótido individual se probó de la siguiente manera. Las reacciones se iniciaron al agregar el NTP o análogo correspondiente. Las concentraciones finales fueron 1 µM de NS5, 0.25 µM de P10/T20, 100 µM de NTP o análogo en un tampón final que contiene 20 mM de HEPES pH 7.5, 15% de glicerol, 5 mM de MgCl₂ y 5 mM de DTT.

Las reacciones se extinguieron en los puntos temporales designados en una solución de parada FBD de 3× volúmenes (formamida, 10 mM de EDTA) y se analizaron en geles de secuenciación de urea 7 M con acrilamida-bisacrilamida al 20% (19:1). Los productos de ARN se visualizaron utilizando un Typhoon FluorImager y después se analizaron y cuantificaron utilizando el software ImageQuant.

Ejemplo 35. Estudios cristalográficos y de modelado

Las imágenes cristalográficas producidas por el protocolo descrito en este documento se presentan en las Figuras 20A y 20B. El constructo utilizado para cristalización fue el mismo que se describe en (Barral y otros, 2013) con una etiqueta Hexahistidina-Tiorredoxina escindible en el extremo N de la secuencia de codificación NS5 de DENV3 (región de aminoácidos 1 a 277) en el plásmido pMcox20A. Las células de expresión T7 de E. coli transformadas (New England BioLabs) se cultivaron a 37°C en medio LB suplementado con 100 µg/mL de ampicilina, hasta una OD_{600nm} de 0.6 a 0.8. La expresión de la proteína recombinante se indujo mediante la adición de 100 µM de IPTG y la incubación continuó durante 16 h más a 17°C. Las células se recolectaron mediante centrifugación a 8000 g durante 10 min a 4°C y se almacenaron a -80°C. La purificación de la proteína y la eliminación

de la etiqueta se realizó en condiciones no desnaturalizantes como se describe en (Lantez y otros, 2011) utilizando resina IMAC basada en cobalto TALON® Superflow™ (Cytiva) para cromatografía de afinidad. El paso de cromatografía de exclusión por tamaño final se realizó utilizando una columna Superdex S200 HiLoad 16/60 con un tampón que contiene 20 mM HEPES pH 7.5, 200 mM NaCl, 10% de glicerol y 2 mM DTT.

Las condiciones de cristalización se adaptaron de (Lim y otros, 2011) utilizando el método de difusión de vapor con gota sentada utilizando tampón de cristalización. Todos los cristales se cultivaron a 293.15 K, utilizando una proporción de 1:2 de proteína (10 mg/mL) a solución precipitante (22% PEG 8000, 200 mM NaCl, 20 mM Citrato Trisódico, 100 mM Tris pH 8.5). Los cristales crecieron en 4 días y se remojaron durante la noche con 1 mM de AT-9010 (concentración final). Todos los cristales se crioprotegieron con solución de reserva suplementada con 10% de glicerol y se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido a 100 K.

La recolección de datos y datos de difracción se recolectaron en sincrotrón Soleil. El conjunto de datos nativos originales se recolectaron en Proxima2. El conjunto de datos se procesó y analizó con la caja de herramientas autoPROC (Vonnrhein y otros, 2011). La estructura se resolvió mediante reemplazo molecular utilizando PHASER (McCoy y otros, 2007) y PDB 4CTK como un modelo de referencia. Como se observó anteriormente, la Unidad Asimétrica de cristal está compuesta por 2 cadenas, sin embargo, las manchas de densidad positivas adicionales encontradas en ambas cadenas no son equivalentes. En una cadena, la densidad adicional corresponde a una molécula individual de SAM, mientras que en la otra cadena, la densidad positiva corresponde a una molécula de SAH y una molécula de AT-9010. El modelo se construyó utilizando COOT (Emsley y Cowtan, 2004) y se refinó a 1,90 Å utilizando PHENIX (Adams y otros, 2010). Se verificó la estructura y se confirmó que tenía una buena estereoquímica de conformidad con MOLPROBITY (Chen y otros, 2010). Las estadísticas recolección y refinamiento de datos se enlistan en el Cuadro 21. El análisis estructural y las figuras se realizaron utilizando UCSF CHIMERA (Pettersen y otros, 2004).

Cuadro 20. Conservación e identificación de aminoácidos esenciales en contacto con los fosfatos del nucleótido entrante en las NS5b de HCV de RdRps virales, NS5 de DENV2 y nsp12 de SARS-CoV2.

Contactos de Virus en	HCV	DENV	SARS-CoV-2
α -fosfato	R158	R472	R555
β -fosfato	R48	-	R553*
γ -fosfato	K51, R22, H223	K358	K551*
Residuos de motivo D	-	K689	K798
Otras características	H223 corresponde a Motivo D SARS K621	-	K551 y R553 Motivo único CoV F K621 corresponde a HCV H223

5

Cuadro 21. Parámetros cristalográficos

Solución y refinamiento de estructura

Número de reflexiones, conjunto de trabajo	45347 (4551)
Número de reflexiones, conjunto de prueba (%)	2195 (217), 5.0 %
R_{trabajo}	0.20 (0.27)
R_{libre}	0.24 (0.33)
No. de átomos que no sean H	4589
-Proteína	4162
-Ligando	65
-Agua	362

Desviaciones R.M.S.

-Enlaces (Å)	0.013
-Ángulos (°)	1.21
Factores B promedio (Å ²)	29.38
-Proteína	28.68
-Ligando	41.71
-Agua	35.22

Gráfica de Ramachandran

-Favorecido (%)	98.04
-Permitido (%)	1.96
-Valores atípicos (%)	0.00

516

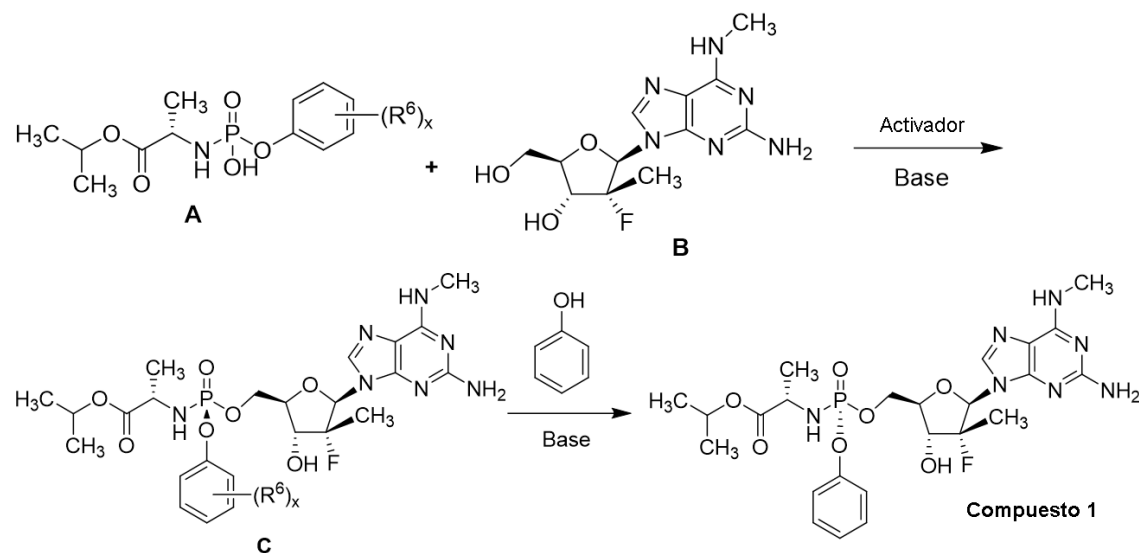
Clashcore	5.21
Código PDB	8BCR

Procesamiento de datos

		DENV3 MTasa complejo con AT-9010 mojado	
5	Longitud de onda (Å)	0.9801	5
	Grupo especial	P 21 21 2	
	– a, b, c (Å)	61.26, 184.13, 52.15	
	– α, β, γ (°)	90.00, 90.00, 90.00	
10	Rango de resolución (Å)	45.38 - 1.9 (1.97 - 1.9)	
	No. Total de reflexiones	583677 (27381)	
	No. de reflexiones únicas	45354 (2284)	
	Completado (%)	96.0 (97.8)	
15	Multiplicidad	12.9 (12.0)	
	I/σ(I)	18.5 (4.7)	
	medios R	0.093 (0.46)	
	mezclaR	0.089 (0.44)	
	R-pim	0.026 (0.13)	
	CC1/2	0.99 (0.94)	
20	Wilson B-factor (Å)	24.6	

Ejemplo 36. Síntesis del Compuesto 1

El compuesto 1 (la forma de base libre del Compuesto 2) puede sintetizarse, por ejemplo, al hacer reaccionar un compuesto de fórmula Intermedia A con Intermedia B y un activador para formar un compuesto de fórmula Intermedia C, que después se hace reaccionar con fenol para formar el Compuesto 1:



en donde R^6 se selecciona independientemente en cada caso entre flúor, cloro, bromo, ciano, haloalquilo como trifluorometilo, difluorometilo, fluorometilo, azido y nitro; y x es 1, 2 o 3.

La reacción de un compuesto de la fórmula Intermedio A, Intermedia B, un activador y una base de trialkilamina forma preferentemente el fosforamidato SP (como se describe en WO 2022/040473A1 asignado a Atea Pharmaceuticals).

Como se utiliza aquí, un "activador" es un reactivo de acoplamiento de péptido basado en uronio, que incluye, entre otros, hexafluorofosfato de 1-[bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio 3-óxido (HATU), hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU), tetrafluoroborato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio (TBTU) y hexafluorofosfato de 1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminoxi)dimetilamino-morfolino-carbenio (COMU).

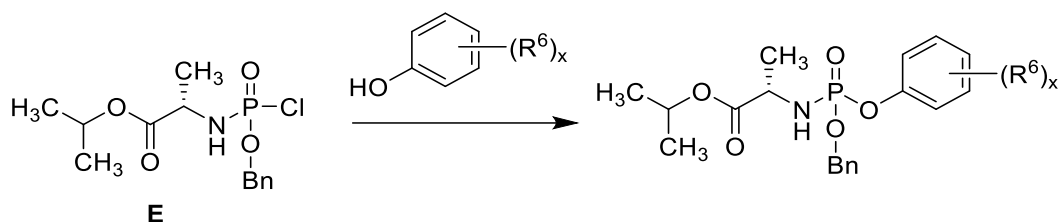
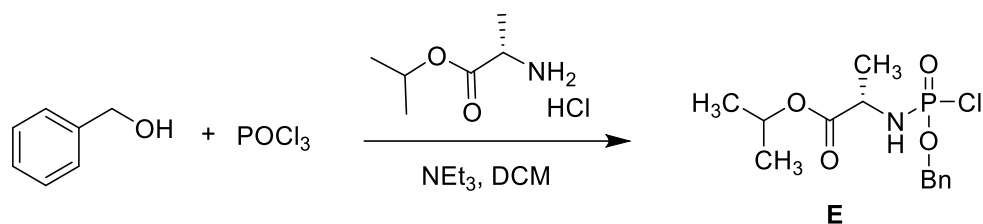
Como se utiliza en el presente documento, una "base de trialkilamina" es una base de amina con tres grupos alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, que incluye, entre otros, trietilamina o diisopropiletilamina.

Como se utiliza aquí, una "base de piridina" es una molécula de piridina opcionalmente sustituida, que incluye, entre otras, piridina, 2,6-dimetilpiridina (lutidina) o 2,4,6-trimetilpiridina (colidina).

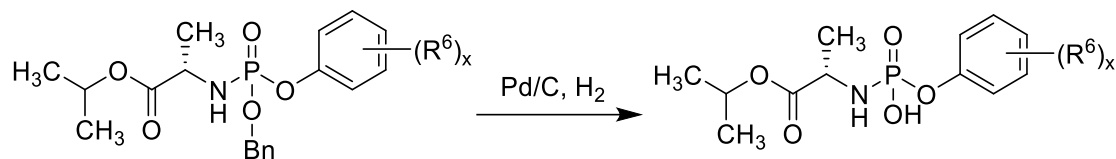
Si el fosforamidato S_P tiene sustituyentes que atraen electrones en el éster arílico (Intermedio C), entonces el compuesto S_P puede además reaccionarse. La estereoquímica del fósforo puede invertirse mediante la reacción del fosforamidato S_P (Intermedio C) con fenol y una base para formar el fosforamidato R_P (Compuesto 1).

5 **Síntesis de Intermedio A**

Intermedio A puede sintetizarse a través de un desplazamiento de pasos múltiples de cloruro de fósforo (Intermedio E) seguido mediante desprotección reductora del grupo protector de bencilo.

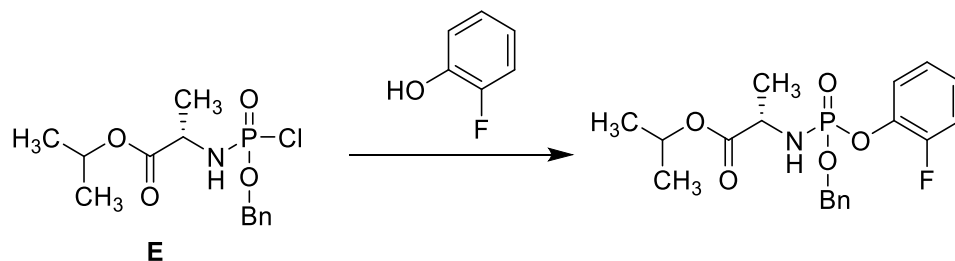


10

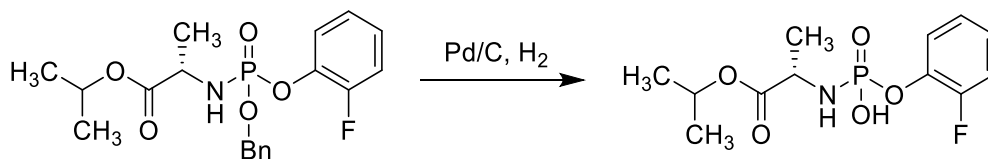


Intermedio A

En ciertas modalidades, el grupo saliente de electrones en el fenol de Intermedio A es un sustituyente orto-fluoro (Intermedio A-1):



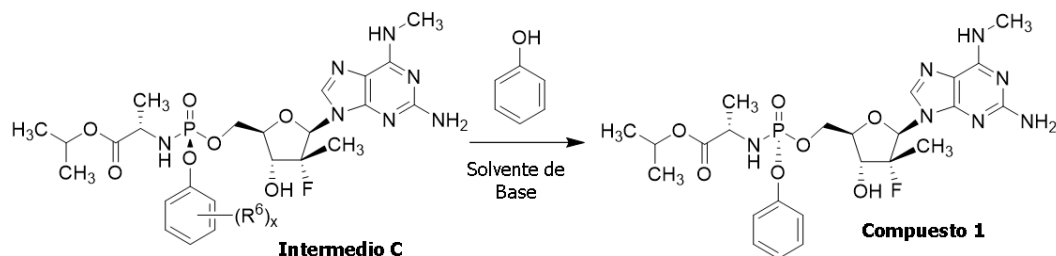
15



Intermedio A-1

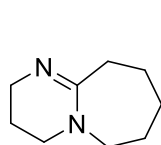
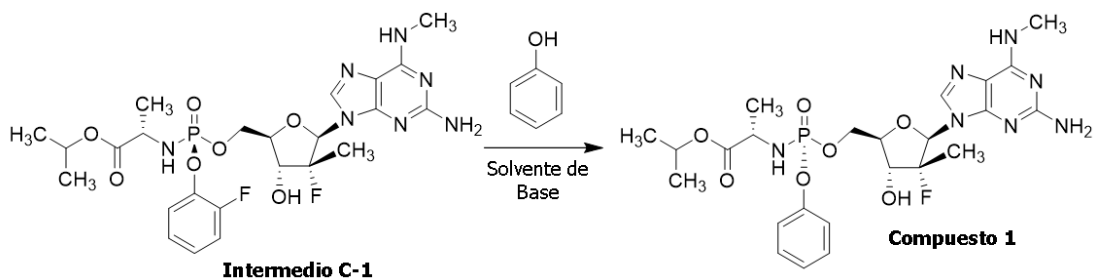
- En ciertas modalidades, el Intermedio A tiene uno o más sustituyentes salientes de electrones en el fenol. Los sustituyentes salientes de electrones incluyen pero no se limitan a flúor, cloro, ciano, azido, nitro, trifluorometilo, difluorometilo, fluorometilo, éster y amida. En ciertas modalidades, el Intermedio A se utiliza en forma de una sal. En ciertas modalidades, el Intermedio A se utiliza como sal de dihidroquinina.

Ejemplo 37. Reacción de Estereoinversión de Fenol

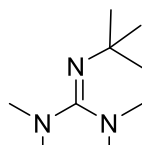


Bases de amina

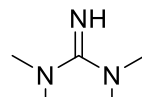
- La reacción del Intermedio C con fenol para formar el Compuesto 1 se puede realizar, por ejemplo, utilizando una base tal como una base de amina, por ejemplo, una base de guanidina. Ejemplos de bases de guanidina son las bases A, B, C, D, E, F, G y J. Las bases A, C, D y J proporcionaron los mayores rendimientos del compuesto 1. El intermedio C-1 se utilizó como sustrato modelo para la reacción.



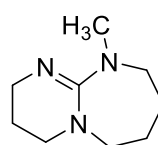
Base A



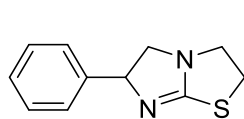
Base B



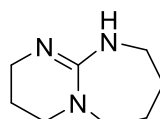
Base C



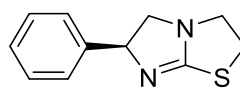
Base D



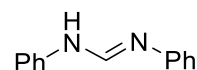
Base E



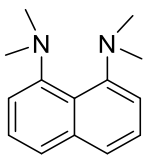
Base F



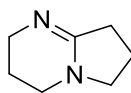
Base G



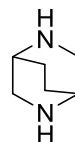
Base H



Base I



Base J



Base K

Cuadro 22. Análisis de Base

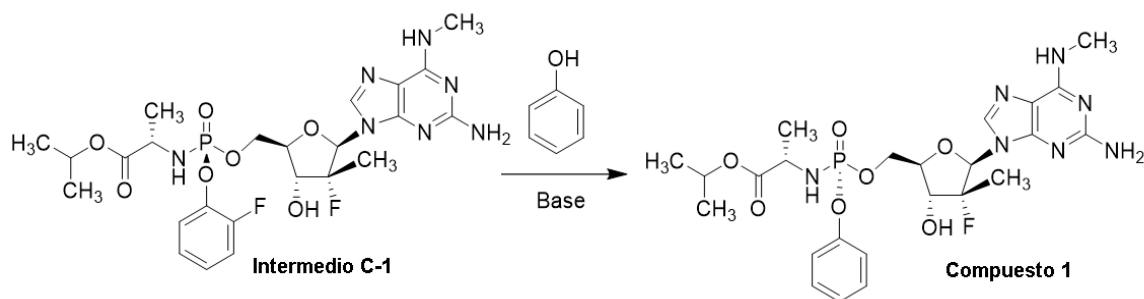
C-1 Intermedio	Fenol	Base	Solvente	Tiempo de Temp. (°C)/	Porcentaje de Área de HPLC de Compuesto 1
0.3 g 1.0 eq.	0.28 g 6.0 eq.	A 0.46g 6.0eq	DMSO 6 mL	20 a 30°C 8 h	53.31
0.3 g 1.0 eq.	0.28 g 6.0 eq.	A 0.46g 6.0eq	DMSO 6 mL	20 a 30°C 21 h	45.53
0.3 g 1.0 eq.	0.28 g 6.0 eq.	B 0.51g 6.0eq	DMSO 6 mL	20 a 30°C 8 h	32.98
0.3 g 1.0 eq.	0.28 g 6.0 eq.	B 0.51g 6.0eq	DMSO 6 mL	20 a 30°C 21 h	16.95
0.3 g 1.0 eq.	0.28 g 6.0 eq.	C 0.35g 6.0eq	DMSO 6 mL	20 a 30°C 8 h	70.06
0.3 g 1.0 eq.	0.28 g 6.0 eq.	C 0.35g 6.0eq	DMSO 6 mL	20 a 30°C 21 h	65.53
0.3 g 1.0 eq.	0.28 g 6.0 eq.	D 0.46g 6.0eq	DMSO 6 mL	20 a 30°C 8 h	43.22
0.3 g 1.0 eq.	0.28 g 6.0 eq.	D 0.46g 6.0eq	DMSO 6 mL	20 a 30°C 21 h	28.66
0.3 g 1.0 eq.	0.28 g 6.0 eq.	E 0.72g 6.0eq	DMSO 6 mL	20 a 30°C 8 h	N.D.
0.3 g 1.0 eq.	0.28 g 6.0 eq.	E 0.72g 6.0eq	DMSO 6 mL	20 a 30°C 21 h	N.D.
0.3 g 1.0 eq.	0.28 g 6.0 eq.	F 0.42g 6.0eq	DMSO 6 mL	20 a 30°C 8 h	4.07
0.3 g 1.0 eq.	0.28 g 6.0 eq.	F 0.42g 6.0eq	DMSO 6 mL	20 a 30°C 21 h	3.18
0.3 g	0.28 g	G	DMSO	20 a 30°C	N.D.

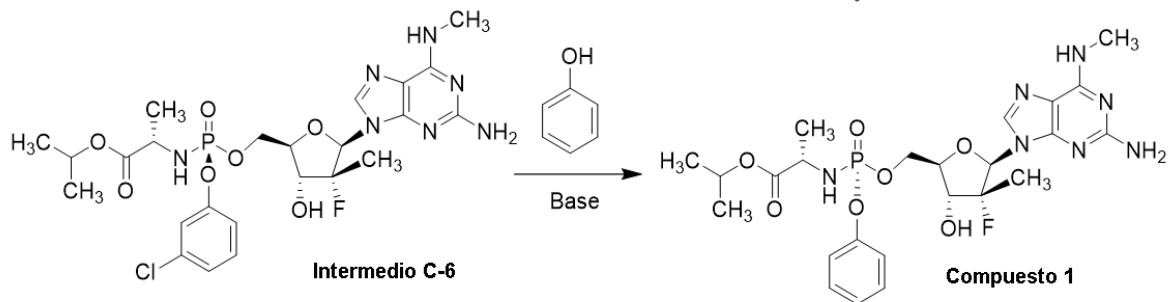
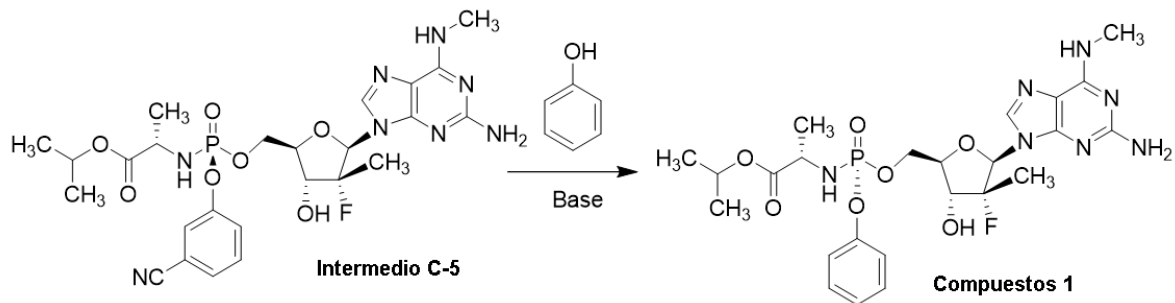
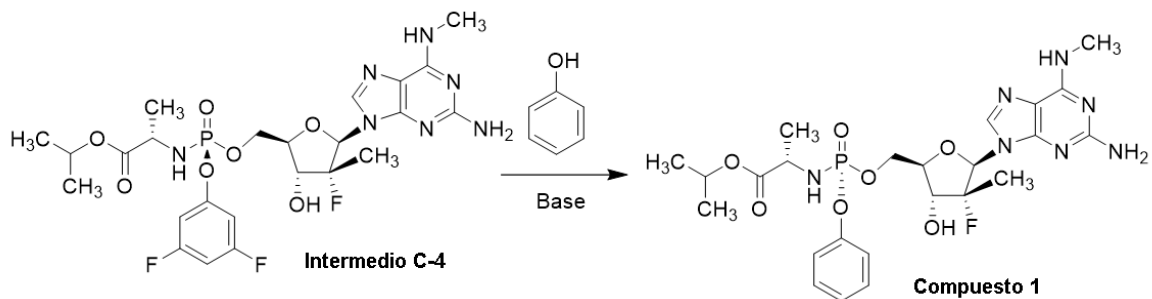
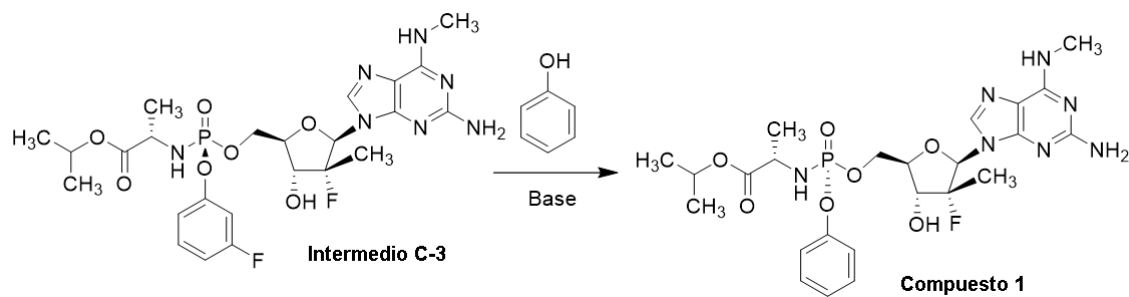
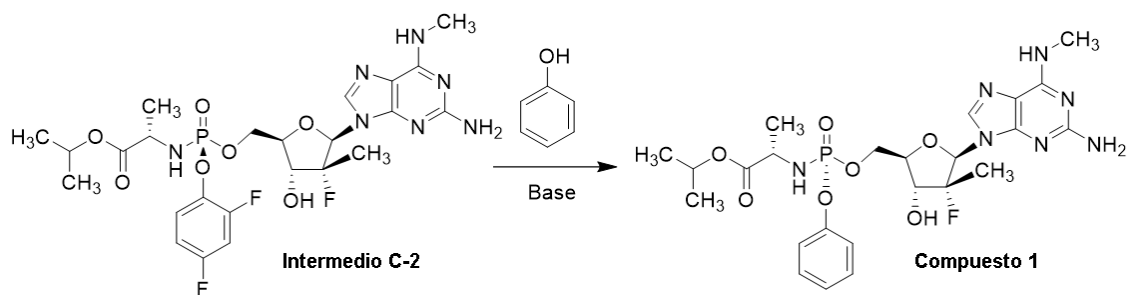
1.0 eq.	6.0 eq.	0.72g 6.0eq	6 mL	8 h	
0.3 g	0.28 g	G	DMSO	20 a 30°C	N.D.
1.0 eq.	6.0 eq.	0.72g 6.0eq	6 mL	21 h	
0.3 g	0.28 g	H	DMSO	20 a 30°C	N.D.
1.0 eq.	6.0 eq.	0.59g 6.0eq	6 mL	8 h	
0.3 g	0.28 g	H	DMSO	20 a 30°C	N.D.
1.0 eq.	6.0 eq.	0.59g 6.0eq	6 mL	21 h	
0.3 g	0.28 g	I	DMSO	20 a 30°C	N.D.
1.0 eq.	6.0 eq.	0.64g 6.0eq	6 mL	8 h	
0.3 g	0.28 g	I	DMSO	20 a 30°C	
1.0 eq.	6.0 eq.	0.64g 6.0eq	6 mL	21 h	0.56
1.0 g	0.94g	A	DMSO	20 a 30°C	
1.0 eq.	6.0 eq.	1.52g 6.0eq	20 mL	8 h	62.1
0.3 g	0.28 g	J	DMSO	20 a 30°C	
1.0 eq.	6.0 eq.	0.37g 6.0eq	6 mL	3 h	28.57
0.3 g	0.28 g	J	DMSO	20 a 30°C	
1.0 eq.	6.0 eq.	0.37g 6.0eq	6 mL	21h	63.63
0.3 g	0.28 g	K	THF	0 a 10°C	
1.0 eq.	6.0 eq.	0.37g 6.0eq	6 mL	8 h	0.30
0.3 g	0.28 g	K	THF	20 a 30°C	
1.0 eq.	6.0 eq.	0.37g 6.0eq	6 mL	21h	2.12

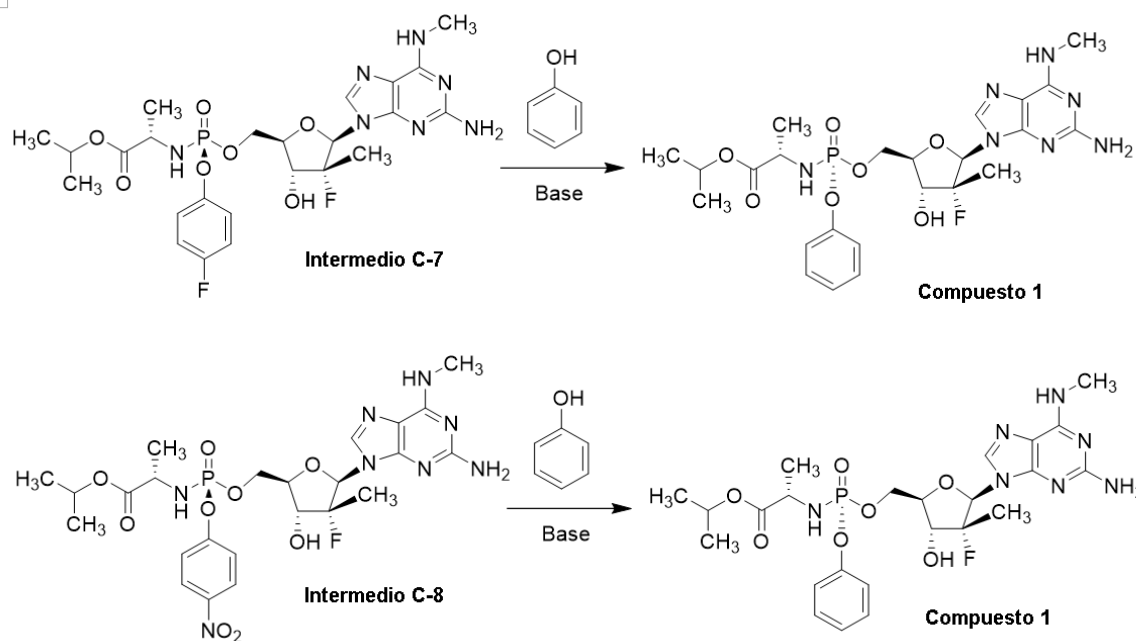
Grupo Saliente de Fenol Activado

En ciertas modalidades, el compuesto 1 se preparó a partir de un fosforamidato S_P intermedio C, como el intermedio C-1, C-2, C-3, C-4, C-5, C-6, C-7 y C-8. Los intermedios C-1 a C-8

5 tienen diferentes grupos atractores de electrones en el fenol. Estos compuestos se pueden hacer reaccionar con fenol y una base para formar el compuesto 1:







5

Cuadro 23. Comparación del grupo saliente

Intermedio	Material Inicial	Fenol	Guanidina	Solvente	Tiempo de Temp. (°C)/	P_R/P_S	Porcentaje de Área de HPLC de Compuesto 1
C-1	0.3 g 1.0 eq.	0.84 g 18.0 eq.	0.23 g 3.0 eq	DMSO 6 mL	20-30/21 h	19.2/1	80.63
C-2	0.50 g 1.0 eq.	0.92 g 12.0 eq.	0.28 g 3.0 eq	DMSO 5 mL	20-30/8 h	9.8/1	53.15
C-3	0.5 g 1.0 eq.	0.94 g 12.0 eq.	0.29 g 3.0 eq	DMSO 10 mL	20-30/21 h	12.5/1	73.76
C-4	0.3 g 1.0 eq.	0.27 g 6.0 eq.	0.34 g 6.0eq	DMSO 6 mL	20-30°C 8 h	11.8/1	55.95
C-5	1 g 1.0 eq.	2.79 g 18.0 eq.	0.57 g 3.0 eq	DMSO 10 mL	20-30/4 h	16.1/1	85.31
C-6	0.25g 1.0 eq.	0.69 g 18.0 eq.	0.14 g 3.0 eq	DMSO 2.5 mL	20-30/21 h	13.5/1	80.13

Cuadro 24. Estudio de Estequiometría con Guanidina

C-1	Fenol	Guanidina	Solvente	Temp. (°C)/Tiempo	P_R/P_S	Porcentaje de Área de HPLC de Compuesto 1
0.3 g 1.0 eq.	0.28 g 6.0 eq.	0.35g 6.0 eq	DMSO 6 mL	20 a 30/8 h	10.5/1	70.06
0.3 g 1.0 eq.	0.28 g 6.0 eq.	0.35g 6.0 eq	DMSO 6 mL	20 a 30/21 h	5.9/1	65.53
0.3 g 1.0 eq.	0.56 g 12.0 eq.	0.23g 3.0 eq	DMSO 6 mL	20 a 30/8 h	28.7/1	69.86
0.3 g 1.0 eq.	0.56 g 12.0 eq.	0.23g 3.0eq	DMSO 6 mL	20 a 30/21 h	13.4/1	79.97
0.3 g 1.0 eq.	0.84 g 18.0 eq.	0.23g 3.0eq	DMSO 6 mL	20 a 30/8 h	43.7/1	64.26
0.3 g 1.0 eq.	0.84 g 18.0 eq.	0.23g 3.0eq	DMSO 6 mL	20 a 30/21 h	19.2/1	80.63

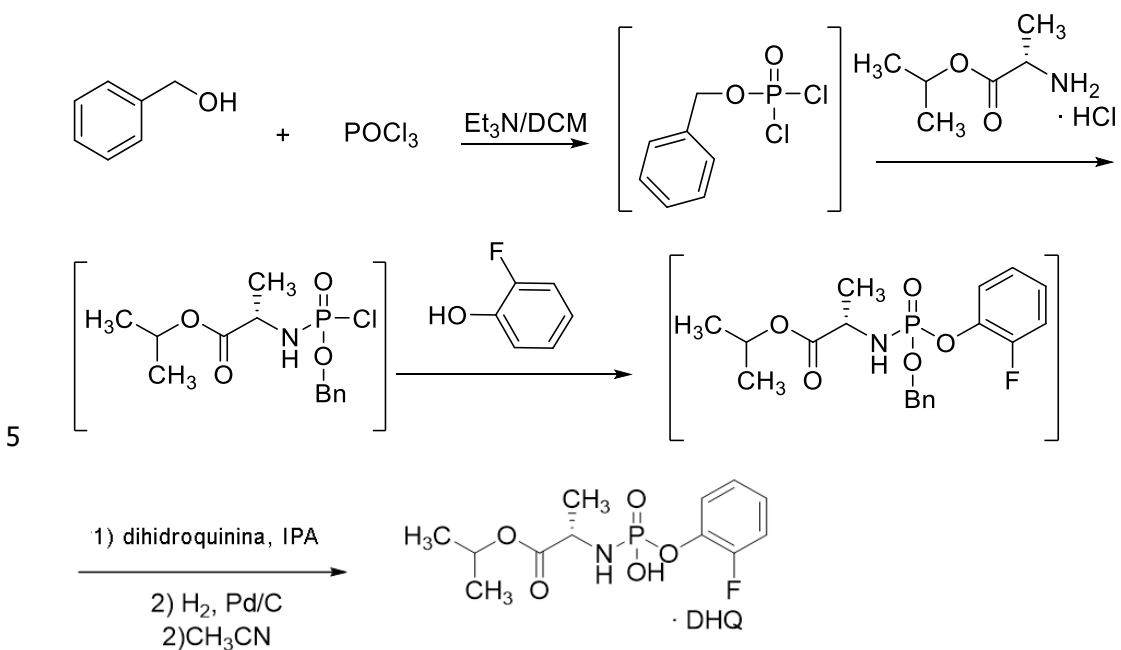
Cuadro 25. Estudio de Estequiometría con Tetrametil guanidina

Equivalentes de Fenol	Equivalentes de Tetrametil guanidina	Temperatura (°C)	Volúmenes de Solvente (1:1 DMSO/ACN)	Tiempo	P_R/P_S	Porcentaje de Área de HPLC de Compuesto 1
22	2.25	30	10	6.5h	31.4/1	69.42
				21h	13.2/1	80.11
15	3.31	30	10	6.5h	10.1/1	77.64
				21h	4.64/1	68.32
15	2.25	30	10	6.5h	16.2/1	76.98
				21h	7.67/1	75.25
15	2.25	30	10	6.5h	18.9/1	76.27
				21h	8.06/1	75.69
15	2.25	30	10	6.5h	20.6/1	74.10
				21h	8.72/1	76.82
15	1.19	30	10	6.5h	41.2/1	56.42
				21h	9.06/1	74.41
15	2.25	30	10	6.5h	24.2/1	72.31
				21h	9.98/1	77.88
15	2.25	30	10	6.5h	23.4/1	73.08

				21h	9.85/1	77.42
20	3	30	10	6.5h	29.1/1	73.07
				21h	12.3/1	80.22
8	2.25	30	10	6.5h	10.1/1	73.14
				21h	5.4/1	66.03
10	3	30	10	6.5h	9.3/1	74.00
				21h	4.82/1	65.65
20	1.5	30	10	6.5h	72.3/1	46.29
				21h	29.8/1	66.91
10	1.5	30	10	6.5h	15.1/1	70.87
				21h	8.68/1	73.11

Ejemplo 38. Síntesis de Compuesto 1

Procedimiento para síntesis de Intermedio A-1



Se cargó diclorometano (2.0 L, 10 vol) en un matraz de tres bocas a 10°C. Se evacuó el matraz y se volvió a llenar con gas nitrógeno tres veces. Se cargó oxidocloruro de fósforo (200 g, 1.0 equiv) en el matraz, antes de enfriar la mezcla a -55°C. Se agregaron diclorometano (200 mL, 1 vol), alcohol bencílico (141 g, 1 equiv) y trietilamina (139 g, 1.05 equiv) a un matraz de mezcla a 10°C, antes de cargar la mezcla resultante en la solución de oxidocloruro de fósforo durante 40 minutos bajo protección de nitrógeno. La mezcla de reacción se agitó durante 1 hora a -55°C, tiempo durante el cual precipitaron sólidos blancos. La reacción pareció completarse en un 99.6 %, por el análisis por

HPLC de una muestra de mezcla de reacción derivatizada con bencilamina. Se agregó clorhidrato de éster isopropílico de L-alanina (219 g, 1 equiv) a la mezcla de reacción, seguido de trietilamina (271 g, 2.05 equiv) durante 30 minutos.

La mezcla de reacción resultante se agitó durante 1 a 2 horas y después se analizó el consumo del primer intermedio mediante análisis HPLC de una muestra derivada con bencilamina. La reacción parecía estar completa en 97.7%.

Se combinaron diclorometano (400 ml, 2 vol), 2-fluorofenol (146 g, 1 equiv) y trietilamina (139 g, 1.05 eq, agregados durante 20 minutos) en un matraz mezclador a 10°C, antes de agregarlos a la mezcla de reacción durante 43 minutos. El lote se calentó de -55°C a 10°C durante un período de 3 horas y después se agitó durante 2 a 4 horas. El análisis por HPLC de una muestra derivatizada con bencilamina mostró un área del segundo intermedio del 2.0 %. El lote se filtró y la torta de filtración se enjuagó con diclorometano (400 ml, 2 vol). Se cargó agua (600 ml, 3 vol) al filtrado y la mezcla se agitó a 10°C durante 5 minutos. Se dejó sedimentar la mezcla y se separaron las capas. Se cargó ácido clorhídrico en agua (3.7% p/p, 1 L, 5 vol) a los compuestos orgánicos y la mezcla se agitó durante 5 minutos a 10°C. Se dejó sedimentar la mezcla y se separaron las capas. Se cargó bicarbonato de sodio en agua (5 % p/p, 1 L, 5 vol) a los compuestos orgánicos y la mezcla se agitó durante 5 minutos a 5 °C. Se dejó sedimentar la mezcla y se separaron las capas. Se agregó agua (600 ml, 3 vol) a los componentes orgánicos y la mezcla se agitó a 10°C durante 5 minutos. Se dejó que la mezcla se asentara y se separaron las capas. Se agregó carbón vegetal (10 g, 5 % p/p) a los componentes orgánicos y la suspensión resultante se agitó durante 2 horas a 10°C. Se filtró la suspensión para eliminar el carbón vegetal y se enjuagó el filtro con diclorometano (100 ml). El filtrado se concentró bajo vacío a 45°C a un volumen de aproximadamente 600 ml (3 vol). Se agregó isopropanol (600 ml, 3 vol) a la mezcla, que se concentró nuevamente hasta aproximadamente 600 ml (3 vol). Se agregó isopropanol (600 ml, 3 vol) a la mezcla, la mezcla se ajustó a 25°C y se tomó una muestra para cuantificar la cantidad de diclorometano restante (quedó un 0.25 %).

Se agregó isopropanol (1.9 L, 9.5 vol) a la mezcla, seguido de dihidroquinina (DHQ, 387 g, 0.908 equiv). La mezcla se agitó hasta que se formó una solución transparente. Se agregó paladio sobre carbono (10% p/p, KF = 63%, 13,7 g) a la mezcla. La suspensión resultante se desgasificó con nitrógeno dos veces y después se desgasificó con hidrógeno tres veces. La mezcla se agitó durante 18 a 20 horas a 25°C bajo 1 atm de gas de hidrógeno. El análisis de una muestra por HPLC mostró que restaba un 0.05% del tercer intermedio.

La suspensión se filtró y la torta se enjuagó con isopropanol (100 mL, 0.5 vol). El disolvente se destiló de la mezcla al vacío a 55°C hasta un volumen de aproximadamente 1200 mL (6 vol), después se cargó acetonitrilo (1.5 L, 7.5 vol) a la mezcla para proporcionar una suspensión. La destilación y la adición de acetonitrilo se repitieron dos veces más. Una muestra de la suspensión

resultante se diluyó con N-metilpirrolidona y se analizó para verificar si había isopropanol residual (se encontró un 0.7 %). La suspensión se agitó a 80 a 90°C durante 1 a 2 horas para proporcionar una solución transparente. La mezcla se enfrió a 5°C con una velocidad de enfriamiento de 20°C por hora, luego se agitó durante 2 a 3 horas. La suspensión se filtró y la torta se lavó con acetonitrilo frío (400 mL, 2 vol, a 5°C). La torta se secó a 55°C durante 18 a 20 horas sin vacío para proporcionar 591.7 g de intermedio A-1 como un polvo blanco (pureza de AUC del 97.9%, rendimiento del 71.8 % en 4 pasos).

Datos de caracterización de Intermedio A-1:

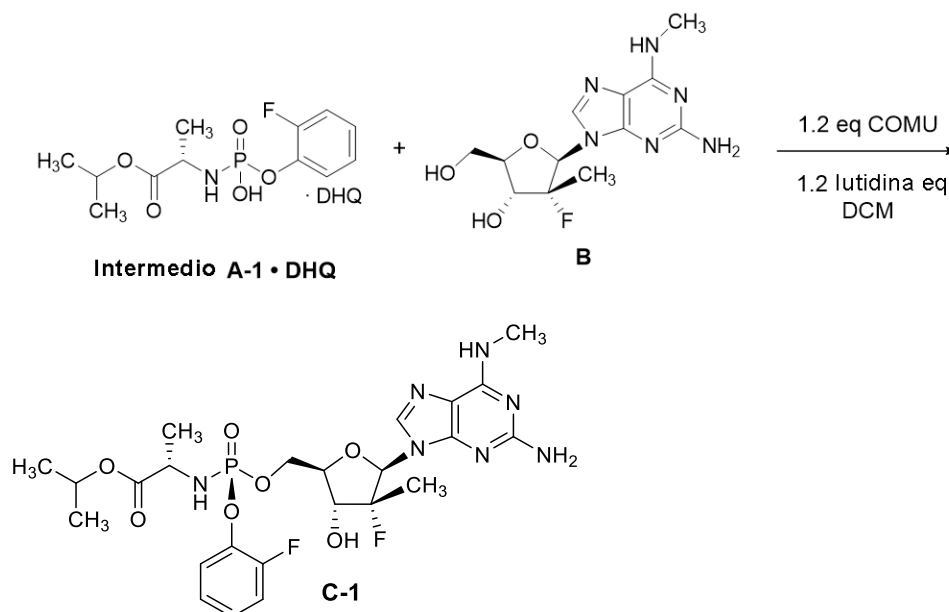
¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.50 (s, 1H), 8.75 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 7.96 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.70 a 7.48 (m, 3H), 7.41 (dd, *J* = 9.2, 2.5 Hz, 1H), 7.12 (dd, *J* = 11.0, 8.2 Hz, 1H), 7.00 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.97 - 6.86 (m, 1H), 6.59 (s, 1H), 6.05 (s, 1H), 4.77 (dq, *J* = 12.5, 6.2 Hz, 1H), 3.97 (s, 4H), 3.87 - 3.66 (m, 2H), 3.57 - 3.34 (m, 2H), 3.07 (s, 1H), 2.84 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H), 1.97 (d, *J* = 36.8 Hz, 3H), 1.87 - 1.61 (m, 2H), 1.38 (t, *J* = 11.8 Hz, 1H), 1.33 - 1.18 (m, 2H), 1.16 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H), 1.09 (dd, *J* = 6.2, 1.2 Hz, 6H), 0.75 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

¹³C NMR (101 MHz, DMSO) δ 174.69 (d, *J* = 5.9 Hz), 158.27 (s), 154.97 (s), 152.58 (d, *J* = 6.7 Hz), 147.78 (s), 146.04 (s), 144.19 (s), 142.55 a 142.06 (m), 131.72 (s), 126.16 (s), 124.38 (d, *J* = 3.4 Hz), 122.73 (s), 122.67 a 122.04 (m), 119.39 (s), 116.16 (d, *J* = 18.9 Hz), 102.09 (s), 67.71 (s), 66.45 (s), 9.32 (s), 56.87 (s), 55.27 (s), 50.96 (s), 43.12 (s), 35.28 (s), 26.04 (s), 24.89 (s), 21.83 (d, *J* = 2.3 Hz), 21.21 (d, *J* = 5.4 Hz), 17.74 (s), 11.86 (s).

³¹P NMR (162 MHz, DMSO) δ 1.04 (s).

¹⁹F NMR (377 MHz, DMSO) δ -132.65 (s).

Paso 2: Reacción de Acoplamiento



Diclorometano (1.33 L, 20 vol), compuesto Intermedio B (50.0 g, 1.0 equiv, 0.160 mol), sal de dihidroquinina del compuesto Intermedio A (222 g, 2.2 equiv) y hexafluorofosfato de (1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminoxi)dimetilamino-morfolino-carbenio (82.3 g, 1.2 equiv) fueron cargados bajo nitrógeno a un matraz de tres bocas de 2 L equipado con un condensador de reflujo y un termómetro.

La suspensión resultante se calentó a 30 a 35°C. Se agregó 2,6-lutidina (20.6 g, 1.2 equiv) a la mezcla de reacción durante 2 horas y la suspensión se disolvió gradualmente durante la adición. La mezcla se agitó a 30 a 35°C durante 5 a 6 horas para proporcionar una solución transparente. Se tomaron muestras de la reacción y el análisis por HPLC mostró que menos del 5% del Intermedio B restante. El rendimiento de la solución calculada por ensayo de la muestra fue de 64.2 g (rendimiento del 66.9 %). La mezcla de reacción se enfrió a 0 a 10°C durante 1 hora.

Se cargó agua (500 ml, 10 vol) a la mezcla y el lote se agitó durante 2 minutos. Se detuvo la agitación y se dejó que el lote se sedimentara en capas antes de remover la capa acuosa. Se cargó ácido clorhídrico acuoso (20% p/p, 133 g, 4.5 equiv) durante un período de 1 hora, durante el cual precipitó la sal de dihidroquinina. La solución se filtró y la torta de filtración se enjuagó con diclorometano (50 ml, 1 vol) y el enjuague se combinó con el filtrado. Se cargó ácido clorhídrico acuoso (7 % p/p, 167 g, 2.0 equiv) al filtrado y el lote se agitó durante 2 min. Se detuvo la agitación, se dejó que el lote se sedimentara en dos capas y se eliminó la capa acuosa. Los compuestos orgánicos se lavaron con bicarbonato de sodio acuoso (5% p/p, 500 g, 1.9 equiv) tres veces y luego se lavaron con agua (500 ml, 10 vol). El rendimiento del ensayo de la capa orgánica resultante fue de 59.4 g (61.9%). La capa orgánica se concentró al vacío a una temperatura de 30 a 50 °C hasta un volumen total de aproximadamente 200 ml (4 vol). Se cargó tolueno (500 ml, 10 vol) a la mezcla y la mezcla se concentró bajo vacío a una temperatura de 40 a 55°C hasta un volumen total de aproximadamente 250 ml (5 vol). La adición y concentración de tolueno se repitió una vez más. Se cargó acetato de etilo (250 ml, 5 vol) en el lote y la mezcla se calentó a 65 a 75°C. Mientras se agitaba, la mezcla se enfrió a 5°C durante 3 horas, tiempo durante el cual se formó un sólido cristalino. El lote se mantuvo durante 4 horas, luego se filtró para proporcionar un sólido cristalino amarillo. Este sólido y acetato de etilo (250 ml, 5 vol) se cargaron en el matraz y se calentaron a 65 a 75°C para proporcionar una solución transparente. La solución se enfrió a 5°C durante 3 horas a medida que se formaba un sólido cristalino. El lote se mantuvo a 5°C durante 4 horas, luego se filtró para proporcionar un sólido amarillo. El sólido amarillo se secó a 45°C durante 15 a 16 horas para proporcionar el Intermedio C-1 (79 g, 56.2% de rendimiento corregido) como un sólido cristalino amarillo.

Datos de caracterización para el Intermedio C-3:

¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.80 (s, 1H), 7.53 a 7.40 (m, 1H), 7.40 – 7.26 (m, 2H), 7.25 – 7.11 (m, 2H), 6.14 (dd, *J* = 12.9, 10.4 Hz, 1H), 6.11 – 5.91 (m, 3H), 5.78 (d, *J* = 6.4 Hz,

1H), 4.91 – 4.71 (m, H), 4.58 – 4.23 (m), 4.15 – 4.05 (m, 1H), 3.91 – 3.72 (m, 1H), 2.88 (s, 3H), 1.32 – 1.20 (m, 3H), 1.17 – 0.97 (m, 9H).

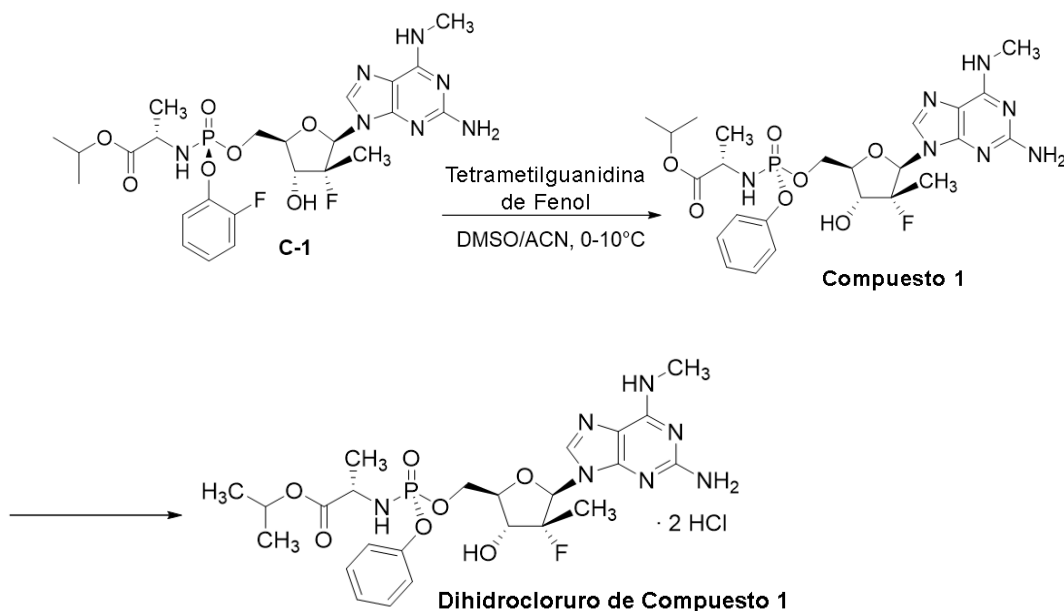
¹⁹F NMR (377 MHz, DMSO) δ -131.41 (s), -159.74 (s).

³¹P NMR (162 MHz, DMSO) δ 4.42 (s).

5

MS (ES⁺): Esperado: 600.2; encontrado: 600.3

Paso 3: Desplazamiento de Ariloxido



10

Acetonitrilo (255 mL, 8,5 vol), sulfóxido de dimetilo (45 mL, 1,5 vol), Intermedio C-1 (30 g, 0,05 mol, 1,0 equiv), fenol (94,1 g, 20,0 equiv) y 1,1,3,3-tetrametilguanidina (17,3 g, 3,0 equiv) se cargaron en un matraz de 350 mL bajo nitrógeno equipado con un termómetro. El lote se calentó a 30°C durante 22 horas mientras se agitaba.

15

Se tomaron muestras de la reacción y se encontró que el Intermedio C-1 restante era menor que el 2%. La mezcla de reacción se enfrió a 0 a 10°C durante 1 hora y el lote se vertió en un reactor que contenía agua (600 mL, 20 vol) mientras se agitaba. Se cargó metil-*tert*-butil éter (600 mL, 20 vol) a la mezcla. Se agregó ácido clorhídrico acuoso (20% p/p, 90 g, 10 equiv) durante 0.5 horas hasta alcanzar un valor de pH de 3 a 4 mientras se mantiene la temperatura de lote a 0 a 10°C.

20

La mezcla se agitó durante 2 minutos adicionales, se detuvo la agitación, se dejó que las capas acuosa y orgánica se separaran y se recolectó la capa acuosa. Se agregó agua (300 ml, 10 vol) a la capa orgánica, seguida por ácido hidrociorhídrico acuoso (20 % p/p, 32 g, 3,5 equiv) durante 0.5 horas mientras se mantiene la temperatura del lote a 0 a 10°C.

25

La mezcla se agitó durante 2 minutos adicionales, se detuvo la agitación, se dejó que las capas acuosa y orgánica se separaran y se recolectó la capa acuosa. Ambas capas acuosas se combinaron y se enfriaron a 0 a 10°C. Se agregó bicarbonato de sodio acuoso (5% p/p, 85 g, 1.0

equiv) durante un período de 0.5 h para llevar el pH a 8 a 9, seguido de diclorometano (300 ml, 10 vol) y agua (300 ml, 10 vol). La mezcla se agitó durante 2 minutos, se dejó sedimentar en dos fases y la fase acuosa se removió. Los compuestos orgánicos resultantes se concentraron a 30 a 40°C bajo vacío hasta un volumen aproximado de 60 ml (2 vol).

- 5 Se cargó acetona (300 ml, 10 vol) a la mezcla. El lote se concentró a 30 a 40°C bajo vacío hasta un volumen aproximado de 60 ml (2 vol). Se cargó acetona (180 ml, 6 vol) a la mezcla para proporcionar una solución transparente, que se enfrió a 0 a 5°C. Se cargó ácido clorhídrico acuoso (36.5% p/p, 10 g, 2.0 equiv) en una porción y la mezcla se agitó a 0 a 5°C durante 12 horas. La suspensión resultante se filtró y el sólido recuperado se secó para proporcionar la sal de bisclorhidrato del compuesto 1 (19.2 g, rendimiento del 59%) en forma de un sólido blanquecino.

Datos de caracterización de la sal de bisclorhidrato del Compuesto 1:

- ¹H NMR (400 MHz, DMSO)** δ 9.68 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H), 8.14 (s, 3H), 7.36 (t, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.18 (dd, *J* = 17.8, 7.9 Hz, 3H), 6.11 (d, *J* = 18.6 Hz, 2H), 4.84 (hept, *J* = 6.2 Hz, 1H), 4.47 (dd, *J* = 10.4, 5.9 Hz, 1H), 4.43 – 4.2, 1H), 3.77 (s, 1H), 3.15 (d, *J* = 4.8 Hz, 3H), 1.28 – 1.07 (m, 12H).

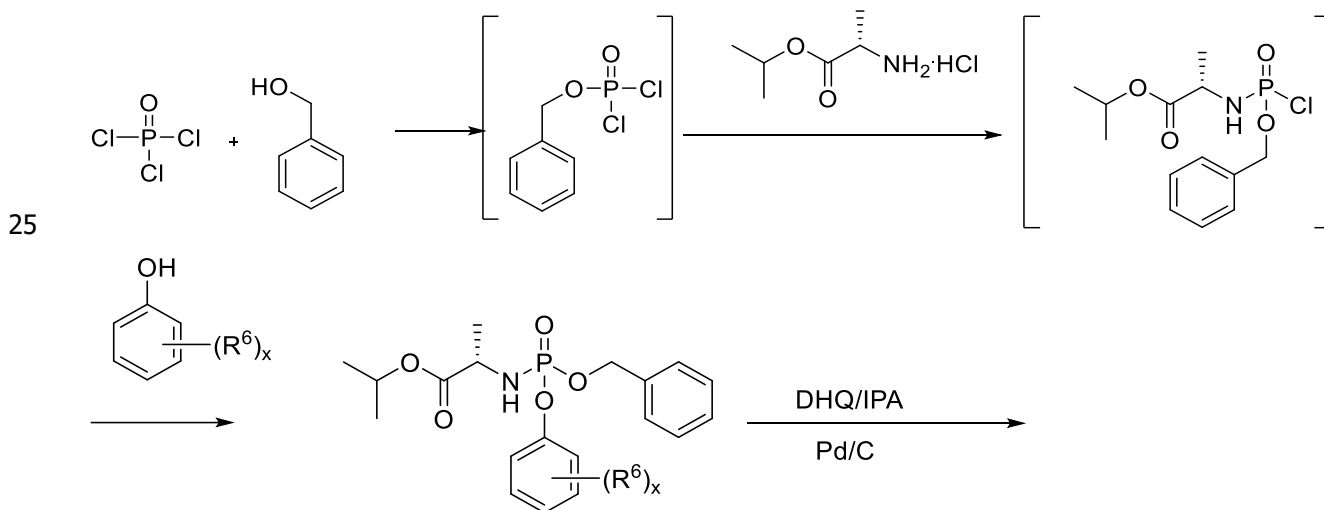
- ¹³C NMR (101 MHz, DMSO)** δ 173.14 (d, *J* = 4.3 Hz), 153.46 (s), 151.11 (d, *J* = 6.0 Hz), 149.58 (s), 130.03 (s), 124.98 (s), 120.62 (d, *J* = 4.6 Hz), 112.08 (s), 102.03 (s), 100.24 (s), 80.59 (s), 72.00 (d, *J* = 18.2 Hz), 68.43 (s), 65.85 (s), 50.42 (s), 40.49 (d, *J* = 13.9 Hz), 40.35 (s), 40.14 (s), 39.93 (s), 39.72 (s), 39.51 (s), 39.30 (s), 31.16 (s), 30.07 (s), 21.84 (d, *J* = 7.2 Hz), 20.08 (d, *J* = 7.2 Hz), 17.15 (s), 16.91 (s).

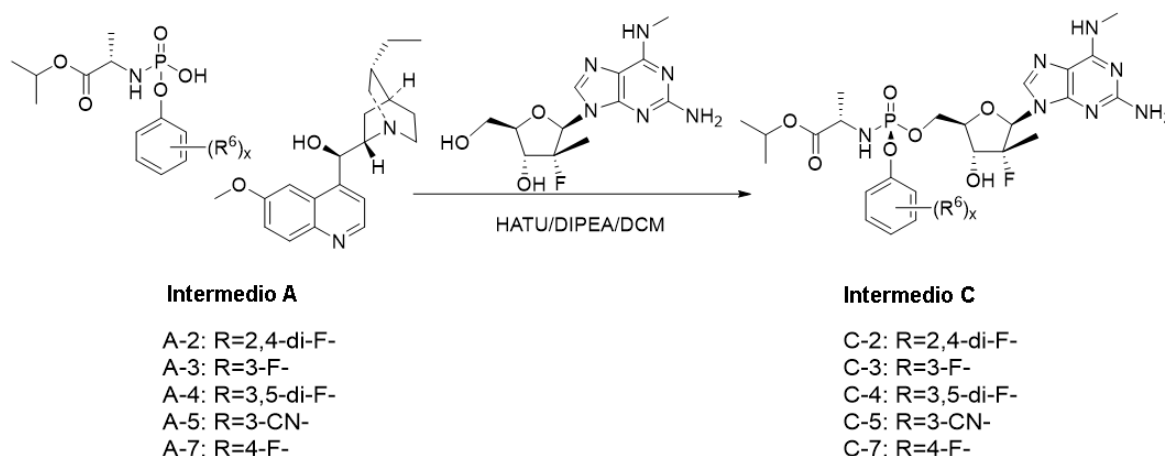
¹⁹F NMR (377 MHz, DMSO) δ -160.09 (s).

³¹P NMR (162 MHz, DMSO) δ 3.66 (s).

MS (ES⁺): Esperado: 582.22; encontrado: 582.35

Síntesis general de los intermediarios C-1 a C-8





Procedimiento general para Intermedios A-2, A-3 y A-7:

5 Se agregó gota a gota una mezcla de alcohol bencílico (10.81 g, 0.1 mol) y TEA (10.62 g, 0.105 mol) a una solución de oxidloruro de fósforo (15.3 g, 0.1 mol) en DCM (150 ml) a -60°C bajo nitrógeno. Después de adición, la reacción se agitó a -60°C durante 1 h.

Se agregó clorhidrato de éster isopropílico de L-alanina (16.76 g, 0.1 mol) a la reacción y, a continuación, se agregó gota a gota TEA (20.74 g, 0.205 mol) a -60°C. La mezcla de reacción se agitó a -60°C durante 1 h. Se agregó gota a gota a la reacción un fenol sustituido y TEA (10.62 g, 0.105 mol) y DCM (20 ml) a -60°C.

Después de adición, la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche antes de extinguirse con agua. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y luego se removió el disolvente bajo vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice para dar un aceite incoloro (intermedios A-2, A-3 y A-7 protegidos con bencilo).

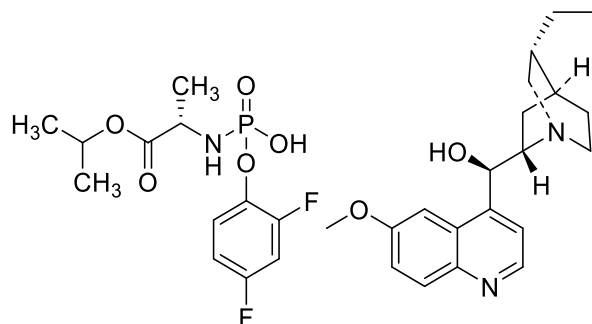
El aceite incoloro (0.1 mol) e isopropanol (200 ml, 5 vol) se cargaron en un matraz de vidrio de 3 bocas de 1000 ml. Se agregó dihidroquinina (32.64 g, 0.1 mol) y se agitó para dar una solución transparente. A esta solución se le agregó 5% de Pd/C húmedo (60% de agua por KF, 5% p/p en base seca) y se realizó hidrogenólisis a 20 a 25°C durante 18 a 20 h utilizando 1 atm de hidrógeno. Cuando el IPC mostró que el material de partida se había consumido completamente, la mezcla se filtró a través de un embudo Buchner y el filtrado se agitó con 4.0 g de carbón durante 2 horas a 25 a 30°C. La mezcla se filtró y la torta se lavó con isopropanol (40 mL). El filtrado se concentró bajo vacío a menos de 0.09 MPa a 50 a 60°C para dar un producto crudo.

Se añadió acetato de isopropilo (200 mL, 5 vol) y la mezcla se concentró nuevamente bajo vacío a menos de 0.09 MPa a 50°C a 60°C. Este paso se repitió una vez más con 5 vol de acetato de isopropilo. Al residuo se le agregó acetato de isopropilo fresco (200 ml, 5 vol) y la mezcla se agitó

a 80°C a 90°C durante 2 a 3 h para dar una solución transparente. Luego se enfrió a 0°C a 10°C con una velocidad de enfriamiento de 20°C/1 h y se agitó a esta temperatura durante 2 a 3 h. El sólido se recolectó por filtración, se enjuagó con acetato de isopropilo frío (40 ml, 1 vol) para dar la torta húmeda, la cual se secó a 50°C sin vacío durante 18 h para dar la sal de dihidroquinina del Intermedio

5 A-2, A-3 o A-7 como un sólido blanquecino.

Datos de caracterización del Intermedio A-2, sal de dihidroquinina:

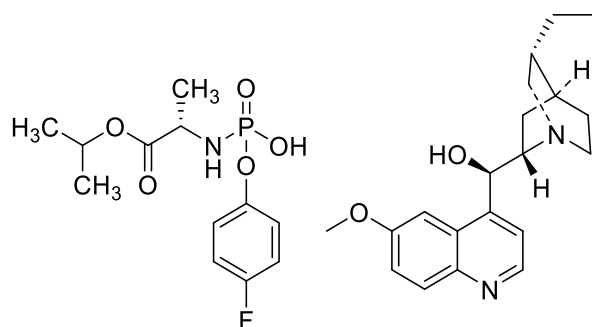


¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.30 (s, 1H), 8.74 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 7.96 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 7.62 – 7.56 (m, 1H), 7.52 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H), 7.41 (dd, *J* = 9.2, 2.6 Hz, 1H), 7.25 – 7.03 (m, 1H), 6.97 – 6.76 (m, 1H), 6.57 (s, 1H), 6.02 (s, 1H), 4.77 (dt, *J* = 12.5, 6.2 Hz, 1H), 3.97 (s, 4H), 3.75 (dd, *J* = 12.1, 7.7 Hz, 2H), 3.59 – 3.28 (m, 3H), 3.09 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 2.86 (s, 1H), 2.01 (s, 2H), 1.92 (s, 1H), 1.88 – 1.64 (m, 2H), 1.38 (t, *J* = 11.8 Hz, 1H), 1.33 – 1.18 (m, 2H), 1.14 (d, *J* = 5.6 Hz, 3H), 1.09 (dd, *J* = 6.2, 0.8 Hz, 6H), 0.75 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

MS (ES-) Esperado: 304.08; encontrado: 304.04

15

Datos de caracterización del Intermedio A-7, sal de dihidroxiquinina:



¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 12.56 (s, 1H), 8.74 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 7.96 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H), 7.41 (dd, *J* = 9.2, 2.6 Hz, 1H), 7.15 (dt, *J* = 8.4, 4.3 Hz, 2H), 7.09 – 6.88 (m, 2H), 6.60 (s, 1H), 6.05 (s, 1H), 4.95 – 4.60 (m, 1H), 3.97 (s, 4H), 3.81 – 3.58 (m, 2H), 3.47 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 3.41 (s, 1H), 3.05 (s, 1H), 2.82 (s, 1H), 2.11 – 1.86 (m, 3H), 1.75 (d, *J* = 36.1 Hz, 2H), 1.28 (ddt, *J* = 20.8, 13.9, 9.0 Hz, 3H), 1.17 – 1.04 (m, 9H), 0.75 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H).

MS (ES-) Esperado: 304.08; encontrado: 304.18

Procedimiento general para Intermedios A-4 y A-5:

Se agregó gota a gota una mezcla de alcohol bencílico (10.81 g, 0.1 mol) y TEA (10.62 g, 0.105 mol) a una solución de oxidloruro de fósforo (15.3 g, 0.1 mol) en DCM (150 ml) a -60°C bajo nitrógeno. Después de la adición, la reacción se agitó a -60°C durante 1 h. Se agregó hidrocloreuro de éster isopropílico de L-alanina (16.76 g, 0.1 mol) a la reacción y entonces se agregó gota a gota TEA (20.74 g, 0.205 mol) a -60°C. La mezcla de reacción se agitó a -60°C durante 1 h. El fenol sustituido correspondiente a la sustitución de fenilo (0.1 mol) y TEA (10.62 g, 0.105 mol) y DCM (20 ml) se agregaron gota a gota a la reacción a -60°C. Después de la adición, la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche antes de apagarse con agua. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y después el disolvente se eliminó al vacío. El residuo se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice para dar un aceite incoloro.

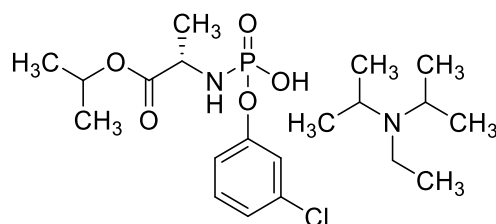
El aceite incoloro (0.1 mol) y el isopropanol (200 ml, 5 vol) se cargaron en un matraz de vidrio de 3 bocas de 1000 ml. Se agregó dihidroquinina (32.64 g, 0.1 mol) y se agitó para dar una solución transparente. A esta solución se le agregó 5% de Pd/C húmedo (60% de agua por KF, 5% p/p en base seca) y se realizó hidrogenólisis a 20°C a 25°C durante 18 a 20 h utilizando 1 atm de hidrógeno. Cuando el IPC mostró que el material de partida se había consumido completamente, la mezcla se filtró a través de un embudo Buchner y el filtrado se agitó con 4.0 g de carbón durante 2 horas a 25°C a 30°C. La mezcla se filtró y la torta se lavó con isopropanol (40 mL).

El filtrado se concentró bajo vacío a menos de 0.09 MPa a 50°C a 60°C para dar un producto crudo. Se agregó tolueno (200 mL, 5 vol) y la mezcla se concentró nuevamente al vacío a menos de 0.09 MPa a 50°C a 60°C. Este paso se repitió dos veces más con 5 vol de tolueno para dar un residuo en forma de aceite. El residuo se utilizó en el siguiente paso sin purificación.

Procedimiento Sintético para Intermedio A-6:

Se agregó gota a gota una mezcla de 3-clorofenol (12.86 g, 0.1 mol) y TEA (10.62 g, 0.105 mol) a una solución de oxidloruro de fósforo (15.3 g, 0.1 mol) en DCM (150 ml) a -60°C bajo nitrógeno. Después de la adición, la reacción se agitó a -60°C durante 1 h. Se agregó hidrocloreuro de éster isopropílico de L-alanina (16.76 g, 0.1 mol) a la reacción y, a continuación, se agregó gota a gota TEA (20.74 g, 0.205 mol) a -60°C. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Se filtró y luego se eliminó el solvente al vacío, se agregó MTBE (128 mL, 10 v) y la mezcla se agitó durante 1 h a 20°C, filtrado, y el filtrado se agitó a 0°C. Entonces se agregó monohidrato de ácido cítrico (42 g, 0.2 mol) en H₂O (200 mL) gota a gota al filtrado a 0°C. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se dejó en reposo para la separación de capas. La capa orgánica se agitó con H₂O (100 mL) y después se dejó en reposo para la separación de capas. Se agregó DIPEA (12.9 g, 0.1 mol) a la fase orgánica. La mezcla se concentró al vacío a menos de 0.09 MPa a 40°C para dar un producto crudo. El producto purificado se obtuvo por pre-HPLC.

Datos de caracterización para el intermedio A-6, sal de diisopropiletilamina



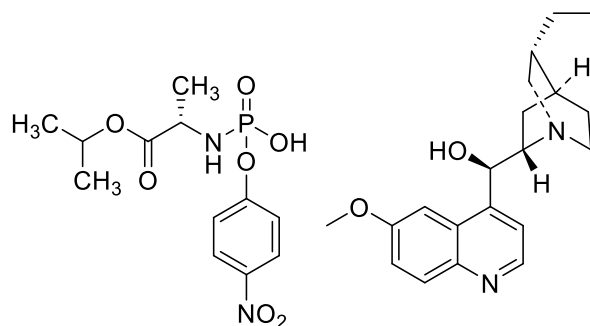
^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 10.25 (s, 1H), 7.23 (dd, J = 18.1, 10.0 Hz, 2H), 6.99 (td, J = 8.0, 1.3 Hz, 2H), 4.80 (dt, J = 12.5, 6.2 Hz, 1H), 3.81 – 3.62 (m, 2H), 3.60 – 3.43 (m, 2H), 3.04 (q, J = 6.9 Hz, 2H), 2.17 – 1.95 (m, 1H), 1.32 – 1.19 (m, 13H), 1.18 – 1.08 (m, 9H).

MS (ES⁻): Esperado: 320.05; encontrado: 320.10

Procedimiento Sintético para Intermedio A-8

Se agregó TEA (20.74 g, 0.205 mol) gota a gota a una solución de diclorofosfonato de 4-nitrofenilo (25.6 g, 0.1 mol) e hidrocloreuro de éster isopropílico de L-alanina (16.76 g, 0.1 mol) en DCM (256 mL, 10 v) a -10°C bajo nitrógeno. Después de la adición, la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se concentró al vacío a menos de 0.09 MPa a 40°C. Se agregó MTBE (256 mL, 10 v) y la mezcla se agitó durante 1 h a 20°C. Se filtró y el filtrado se agitó a 0°C. Se agregó hidróxido de tetrabutilamonio (208 g, 0.2 mol, 25% p/p en H₂O) gota a gota al filtrado a 0°C. Después de la adición, la reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La reacción se dejó reposar para la separación de capas. La capa de agua se agitó con IPAC (200 ml) y después se dejó reposar para la separación de capas. La capa de IPAC se agitó con HCl acuoso (200 ml, 1 mol/l) y luego se dejó reposar para la separación de capas. La capa orgánica se secó sobre Na₂SO₄ y se filtró. Se agregó dihidroquinina (19.6 g, 0.06 mol) al filtrado. La mezcla se concentró al vacío a menos de 0.09 MPa a 50°C para dar un producto crudo. Se agregó MTBE (256 ml, 10 v) y la mezcla se agitó durante 1 h a 20°C y se filtró. La torta húmeda se secó durante 16 h a 60°C sin vacío. Se obtuvo el producto intermedio A-8.

Datos de caracterización para Intermedio A-8, sal de dihidroquinina



^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 11.89 (s, 1H), 8.74 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 8.15 – 8.04 (m, 2H), 7.96 (d, J = 9.2 Hz, 1H), 7.64 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 7.49 (d, J = 2.3 Hz, 1H), 7.45 – 7.32 (m, 3H),

6.59 (s, 1H), 6.00 (s, 1H), 4.75 (dt, $J = 12.5, 6.2$ Hz, 1H), 4.07 – 3.86 (m, 5H), 3.85 – 3.68 (m, 1H), 3.62 – 3.22 (m, 4H), 3.10 (s, 1H), 2.86 (s, 1H), 1.97 (d, $J = 30.9$ Hz, 3H), 1.76 (d, $J = 35.8$ Hz, 2H), 1.40 (t, $J = 11.7$ Hz, 1H), 1.34 – 1.18 (m, 2H), 1.18 – 1.00 (m, 9H), 0.75 (t, $J = 7.3$ Hz, 3H).

MS (ES⁻): Esperado: 331.07; encontrado: 331.06

5

Procedimiento general para Intermedios C-1 a C-5 y C-7

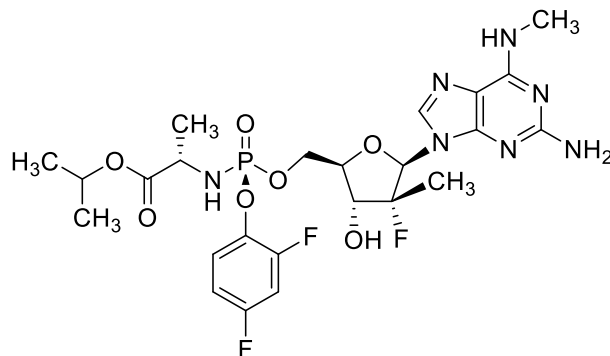
Se agregaron sal del Intermedio A-1 a A-8 (1.7 eq.), Intermedio B (6.25 g, 20 mmol, 1.0 eq.), diisopropil etilamina (2.6 g, 20 mmol, 1.0 eq.) y HATU (12.9 g, 34 mmol, 1.7 eq.) a 188 ml de diclorometano (30 volúmenes). La mezcla se calentó a 40°C y se agitó durante 18 horas bajo nitrógeno. La reacción se controló mediante TLC y HPLC.

10

Después de que se completó la reacción, la mezcla de reacción se enfrió a 0 a 10°C y se lavó con HCl de 2N (100 ml) dos veces, bicarbonato de sodio acuoso al 5% (100 ml), la fase orgánica separada se secó sobre Na₂SO₄ y se filtró. El filtrado se concentró a 40 a 45°C bajo vacío para dar un residuo. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice para obtener el producto crudo. El producto crudo se recristalizó con EA (30 ml), el precipitado se secó sin vacío a 45 a 50°C durante 16 horas para permitir Intermedios C-1 a C-5 o C-7.

15

Datos de caracterización para Intermedio C-2

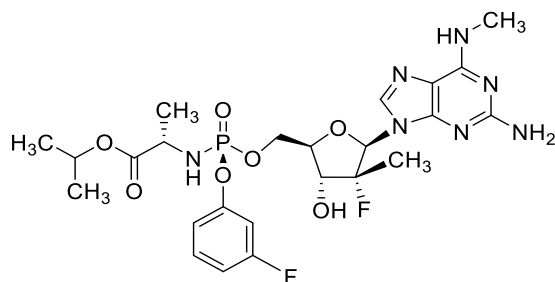


¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.79 (s, 1H), 7.54 – 7.35 (m, 2H), 7.28 (s, 1H), 7.06 (t, $J = 8.6$ Hz, 1H), 6.27 – 5.87 (m, 4H), 5.75 (d, $J = 6.8$ Hz, 1H), 4.81 (dt, $J = 12.5, 6.3$ Hz, 1H), 4.37 (ddd, $J = 18.3, 14.3, 8.5$ Hz, 3H), 4.16 – 3.96 (m, 1H), 3.79 (ddd, $J = 17.1, 7.2, 2.9$ Hz, 1H), 2.88 (s, 3H), 1.24 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H), 1.20 – 1.01 (m, 9H).

20

MS (ES⁺): Esperado: 618.20; encontrado: 618.24

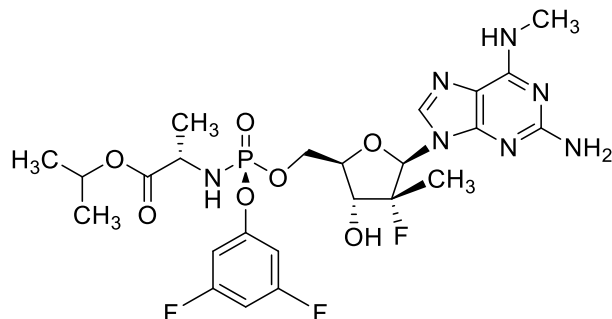
Datos de caracterización para Intermedio C-3:



^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.79 (s, 1H), 7.40 (dd, J = 15.3, 8.0 Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 7.16 – 6.99 (m, 3H), 6.19 – 5.87 (m, 4H), 5.75 (d, J = 6.6 Hz, 1H), 4.81 (dt, J = 12.5, 6.2 Hz, 1H), 4.36 (ddd, J = 18.4, 14.2, 8.3 Hz, 3H), 4.07 (dd, J = 15.2, 8.0 Hz, 1H), 3.93 – 3.70 (m, 1H), 2.88 (s, 3H), 1.21 (d, J = 7.0 Hz, 3H), 1.17 – 1.02 (m, 9H).

MS (ES⁺): Esperado: 600.21; encontrado: 600.24

Datos de caracterización para Intermedio C-4:



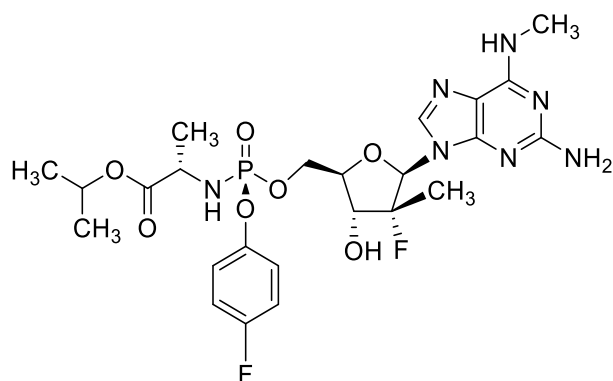
^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.79 (s, 1H), 7.28 (s, 1H), 7.15 – 6.90 (m, 3H), 6.20 (dd, J = 12.6, 10.4 Hz, 1H), 6.13 – 5.88 (m, 3H), 5.77 (d, J = 6.3 Hz, 1H), 4.80 (dq, J = 12.5, 6.2 Hz, 1H), 4.54 – 4.24 (m, 3H), 4.07 (dd, J = 17.6, 10.7 Hz, 1H), 3.92 – 3.69 (m, 1H), 2.87 (s, 3H), 1.22 (d, J = 7.1 Hz, 3H), 1.15 – 1.03 (m, 9H).

MS (ES⁺): Esperado: 618.20; encontrado: 618.34

Datos de caracterización para Intermedio C-5:

^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.79 (s, 1H), 7.75 – 7.62 (m, 2H), 7.62 – 7.53 (m, 2H), 7.27 (s, 1H), 6.16 (dd, J = 12.7, 10.2 Hz, 1H), 6.10 – 5.93 (m, 3H), 5.76 (d, J = 6.8 Hz, 1H), 4.81 (dt, J = 12.5, 6.2 Hz, 1H), 4.53 – 4.27 (m, 3H), 4.08 (dd, J = 13.2, 6.3 Hz, 1H), 3.83 (ddd, J = 17.1, 7.2, 2.9 Hz, 1H), 2.88 (s, 3H), 1.23 (d, J = 7.1 Hz, 3H), 1.15 – 1.04 (m, 9H).

Datos de caracterización para Intermedio C-7:



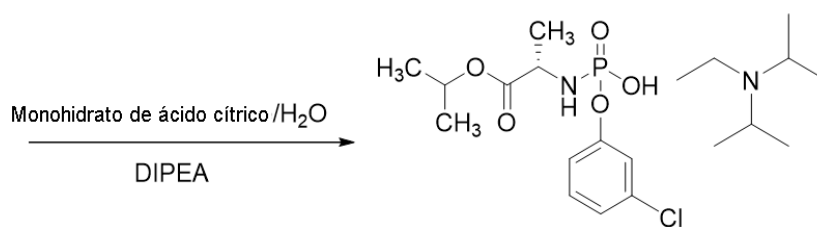
¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.80 (s, 1H), 7.22 (ddd, *J* = 20.8, 13.3, 7.0 Hz, 5H), 6.23 – 5.86 (m, 4H), 5.73 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 4.81 (dt, *J* = 12.5, 6.2 Hz, 1H), 4.54 – 4.20 (m, 3H), 4.06 (dd, *J* = 12.8, 5.8 Hz, 1H), 3.90 – 3.67 (m, 1H), 2.89 (s, 3H), 1.21 (t, *J* = 6.2 Hz, 3H), 1.15 – 1.03 (m, 9H).

MS (ES+): Esperado: 600.21; encontrado: 600.36

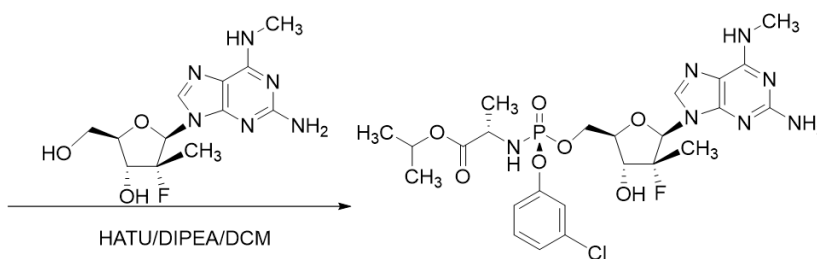
Reaction scheme for the synthesis of compound 10:

3-chlorophenol reacts with POCl_3 to form an intermediate (a 3-chlorophenyl phosphonate).

This intermediate then reacts with (S)-2-amino-3-methylbutanoic acid hydrochloride to form the final product, (S)-2-((3-chlorophenyl)phosphonoamido)-3-methylbutanoic acid, which is labeled as compound 10.

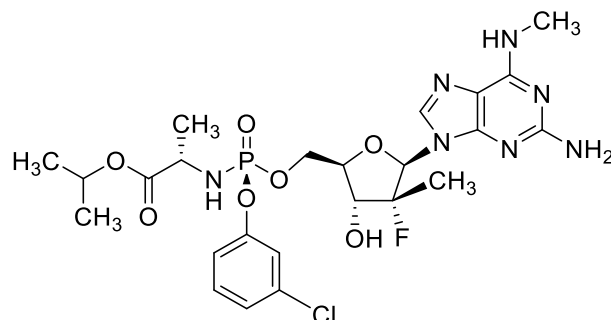


Intermedio A-6



Intermedio C-6

Datos de caracterización para Intermedio C-6:

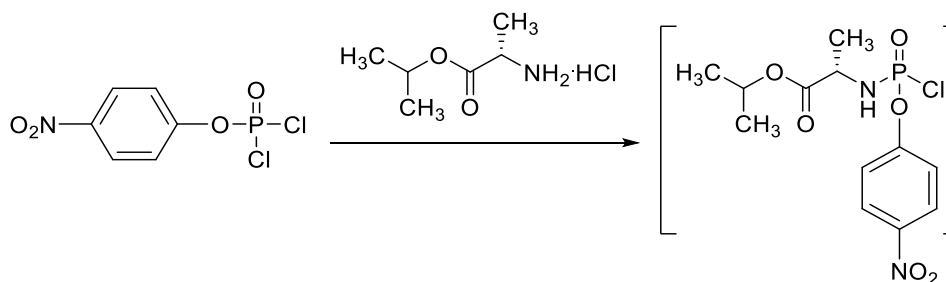


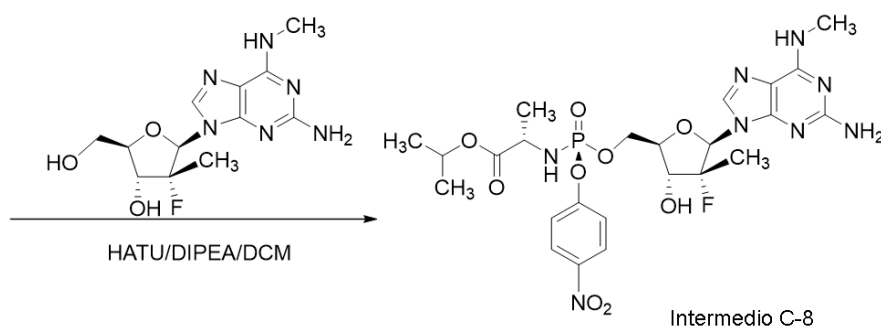
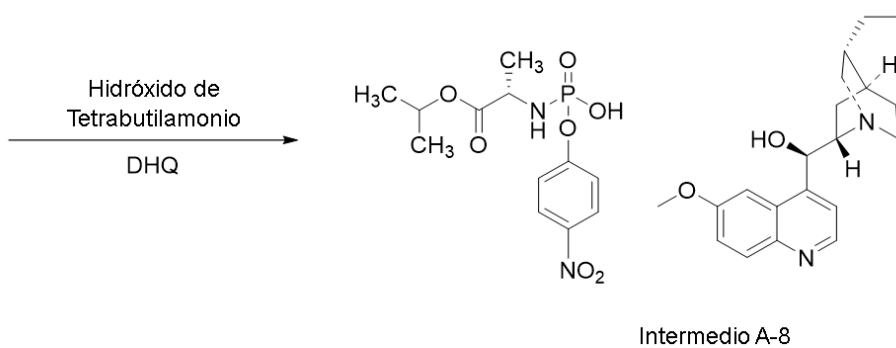
¹H NMR (400 MHz, DMSO) δ 7.80 (s, 1H), 7.39 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.33 (s, 1H), 7.26 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H), 7.22 – 7.16 (m, 1H), 6.23 – 5.89 (m, 4H), 5.76 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 4.81 (dt, *J* = 12.5, 6.2 Hz, 1H), 4.53 – 4.23 (m, 3H), 4.16 – 4.00 (m, 1H), 3.81 (ddd, *J* = 17.1, 7.2, 2.9 Hz, 1H), 2.88 (s, 3H), 1.22 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H), 1.17 – 1.00 (m, 9H).

MS (ES⁺): Esperado: 616.18; encontrado: 616.15

10

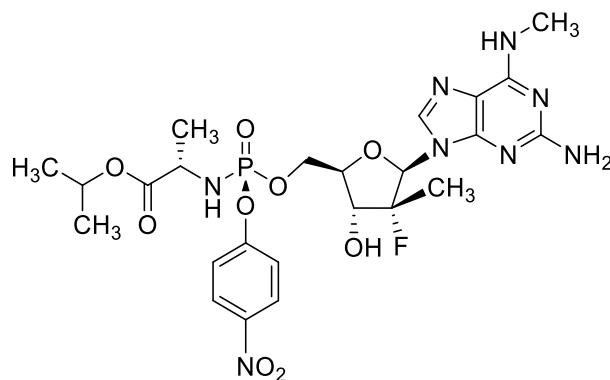
Síntesis de Intermedio C-8





5

Datos de caracterización para Intermedio C-8:



^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.31 – 8.18 (m, 2H), 7.79 (s, 1H), 7.44 (dd, J = 14.3, 9.1 Hz, 2H), 7.18 (d, J = 46.5 Hz, 1H), 6.35 – 6.15 (m, 1H), 6.12 – 5.88 (m, 3H), 5.75 (s, 1H), 4.88 – 4.73 (m, 1H), 4.45 (dd, J = 14.1, 7.1 Hz, 3H), 4.18 – 4.01 (m, 1H), 3.81 (s, 1H), 2.89 (s, 3H), 1.24 (d, J = 7.3 Hz, 3H), 1.10 (dd, J = 14.0, 7.5 Hz, 9H).

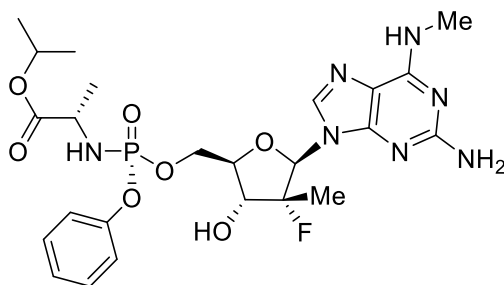
MS (ES⁺): Esperado: 627.21; encontrado: 627.37

Esta especificación ha sido descrito con referencia a modalidades de la invención. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará que se pueden realizar varias modificaciones y cambios sin apartarse del alcance de la invención tal como se establece en las reivindicaciones a continuación.

Por consiguiente, la especificación debe considerarse en un sentido ilustrativo ya sea uno restrictivo, y todas esas modificaciones pretenden estar incluidas dentro del alcance de invención.

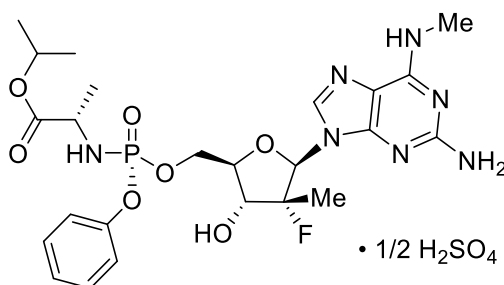
NOVEDAD DE LA INVENCION**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para tratar una infección de virus del Dengue en un huésped humano que lo necesite, caracterizado porque comprende administrar desde aproximadamente 700 mg a aproximadamente 1,000 mg del Compuesto 1,

**Compuesto 1**

- 10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, opcionalmente en un portador farmacéuticamente aceptable, dos, tres veces o cuatro veces al día.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque el compuesto es

**Compuesto 2**

- 15 3. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado además porque se proporciona una sal farmacéuticamente aceptable del Compuesto 1.
4. El método de conformidad con la reivindicación 1 o 2, caracterizado además porque se administra desde aproximadamente 700 mg a aproximadamente 850 mg del Compuesto.
- 20 5. El método de conformidad con la reivindicación 4, caracterizado además porque se administra desde aproximadamente 700 mg a aproximadamente 800 mg del Compuesto.
6. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado además porque se administra desde aproximadamente 700 a 900 mg del Compuesto 2.
7. El método de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque se
- 25 administra desde aproximadamente 700 mg a aproximadamente 900 mg de sal farmacéuticamente

aceptable del mismo.

8. El método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado además porque se administra desde aproximadamente 700 mg a aproximadamente 800 mg de sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 9. El método de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado además porque se administra desde aproximadamente 800 mg a aproximadamente 1000 mg de sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado además porque el compuesto se administra dos veces al día.

10 11. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado además porque el compuesto se administra tres veces al día.

12. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado además porque el compuesto se administra cuatro veces al día.

15 13. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado además porque el compuesto se administra durante tres días consecutivos.

14. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado además porque el compuesto se administra durante cuatro días consecutivos.

15. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado además porque el compuesto se administra durante cinco días consecutivos.

20 16. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado además porque el compuesto se administra durante seis días consecutivos.

17. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado además porque el compuesto se administra durante siete días consecutivos.

25 18. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado además porque el compuesto se administra durante ocho días consecutivos.

19. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado además porque el compuesto se administra durante nueve días consecutivos.

20. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado además porque el compuesto se administra durante diez días consecutivos.

30 21. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, caracterizado además porque el humano tiene el serotipo 1 del virus del Dengue.

22. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, caracterizado además porque el humano tiene el serotipo 2 del virus del Dengue.

35 23. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, caracterizado además porque el humano tiene el serotipo 3 del virus del Dengue.

24. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, caracterizado además porque el humano tiene el serotipo 4 del virus del Dengue.

25. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, caracterizado además porque el compuesto se administra en combinación con un compuesto antiviral adicional.

26. El método de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado además porque el compuesto antiviral adicional es un inhibidor de proteasa NS2B-NS3.

27. El método de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado además porque el compuesto antiviral adicional es un inhibidor de NS3.

28. El método de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado además porque el compuesto antiviral adicional es un inhibidor de interacción de NS3-NS4B.

29. El método de conformidad con la reivindicación 28, caracterizado además porque el inhibidor de interacción NS3B-NS4B es JNJ-1802 o JNJ-A07.

30. El método de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado además porque el compuesto antiviral adicional es otro inhibidor de NS5.

31. El compuesto de conformidad cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, caracterizado además porque el portador farmacéuticamente aceptable comprende celulosa microcristalina silicificada.

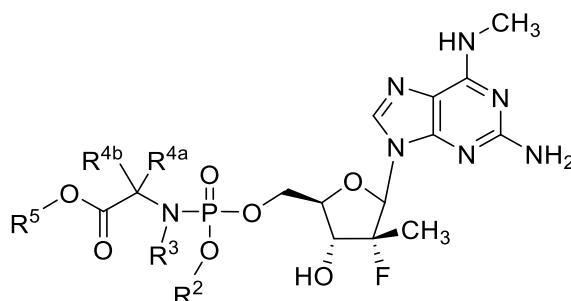
32. El compuesto de conformidad cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31, caracterizado además porque el portador farmacéuticamente aceptable comprende además croscarmelosa sódica.

33. El compuesto de conformidad cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32, caracterizado además porque el portador farmacéuticamente aceptable comprende además estearato de magnesio.

34. El compuesto de conformidad cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32, caracterizado además porque el portador farmacéuticamente aceptable comprende además dióxido de silicio coloidal.

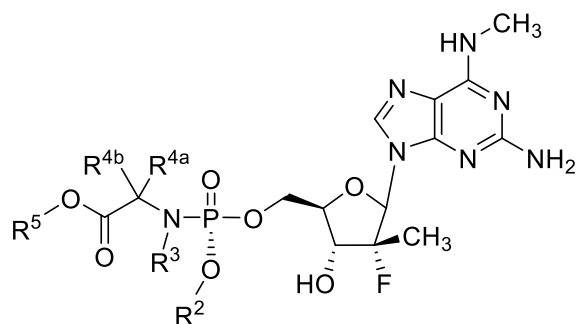
35. El compuesto de conformidad cualquiera de las reivindicaciones 1 a 34, caracterizado además porque el portador farmacéuticamente aceptable comprende fumarato de estearil de sodio.

36. Un método para tratar una infección de virus del Dengue en un huésped humano que lo necesite, caracterizado porque comprende administrar desde aproximadamente 700 a aproximadamente 1000 mg de un compuesto de la Fórmula I:



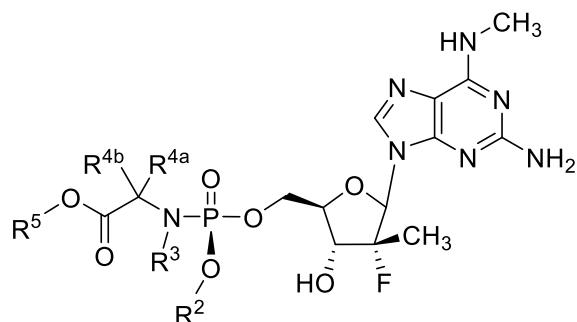
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en donde: R^2 es alquilo de 1 a 6 átomos de carbono (incluyendo metilo, etilo, propilo e isopropilo), cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono, arilo, arilo(alquilo de 1 a 4 átomos de carbono)-, heteroarilo, heteroarilo(alquilo de 1 a 4 átomos de carbono)- o heteroalquilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes seleccionados independientemente en cada aparición de R^{22} ; R^3 es hidrógeno o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono opcionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes seleccionados independientemente en cada aparición de R^{33} ; R^{4a} y R^{4b} se seleccionan independientemente entre hidrógeno, alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, arilo(alquilo de 1 a 6 átomos de carbono)-, cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono, cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono(alquilo de 1 a 6 átomos de carbono)-, heteroarilo(alquilo de 1 a 6 átomos de carbono)- y arilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes seleccionados independientemente en cada aparición de R^{44} ; R^5 es hidrógeno, alquilo de 1 a 6 átomos de carbono (incluyendo metilo, etilo, propilo e isopropilo), haloalquilo de 1 a 6 átomos de carbono o cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono y, en una modalidad alternativa, R^5 es arilo(alquilo de 1 a 4 átomos de carbono)-, arilo, heteroarilo o heteroalquilo, opcionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes seleccionados independientemente en cada aparición de R^{55} . R^{22} , R^{33} , R^{44} y R^{55} se seleccionan independientemente en cada aparición de hidrógeno, alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono, alquenilo, alquinilo, F, Cl, Br, I, heterociclo, heterocicloalquilo, haloalcoxi, haloalquilo, $C(O)R^{66}$, $C(O)OR^{66}$, $C(O)N(R^{66})_2$ y ciano; R^{66} se selecciona independientemente en cada aparición de hidrógeno, alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, arilo(alquilo de 1 a 6 átomos de carbono)-, cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono, cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono(alquilo de 1 a 6 átomos de carbono)-, heteroarilo(alquilo de 1 a 6 átomos de carbono)- y arilo.

37. El compuesto de conformidad con la reivindicación 36, caracterizado además porque el compuesto es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

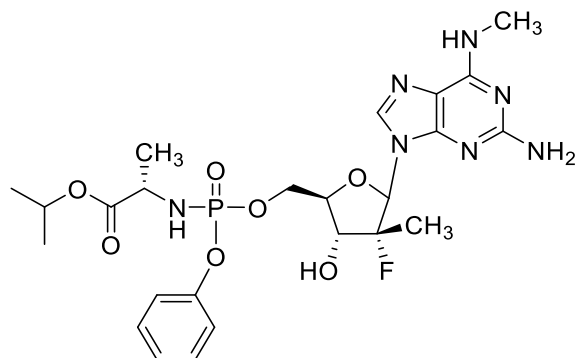
38. El compuesto de conformidad con la reivindicación 36, caracterizado además porque el compuesto es



5

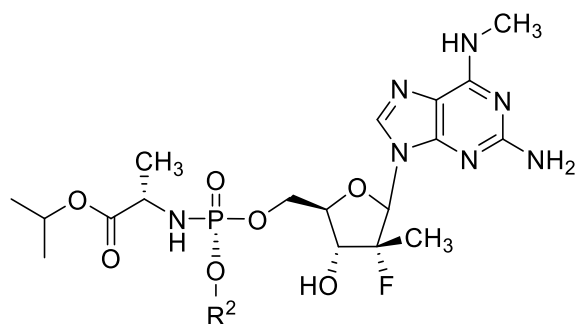
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

39. El compuesto de conformidad con la reivindicación 36, caracterizado además porque el compuesto es



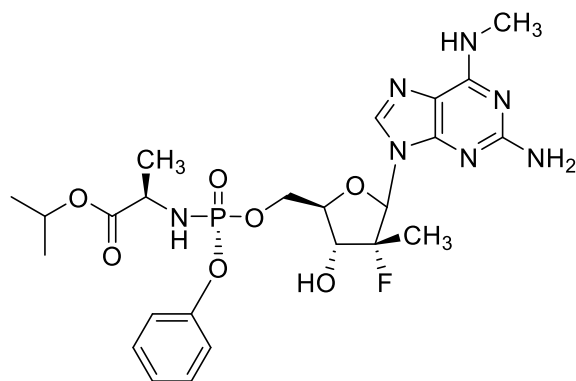
10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

40. El compuesto de conformidad con la reivindicación 37, caracterizado además porque el compuesto es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

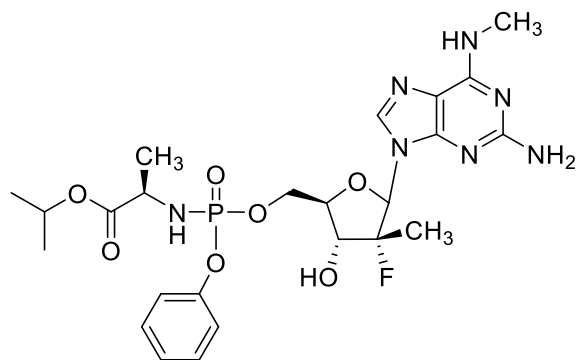
41. El compuesto de conformidad con la reivindicación 37, caracterizado además porque el compuesto es



5

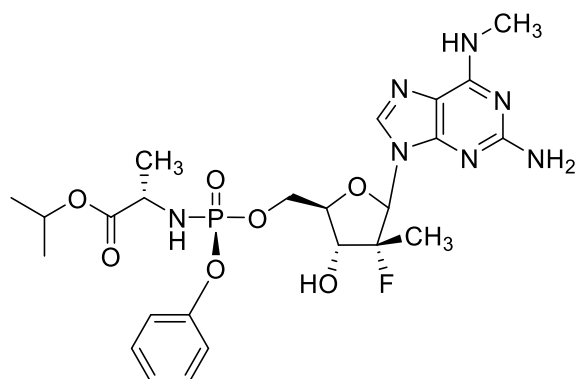
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

42. El compuesto de conformidad con la reivindicación 36, caracterizado además porque el compuesto es



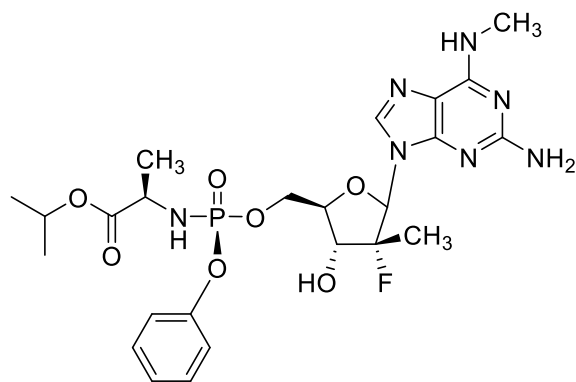
10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

43. El compuesto de conformidad con la reivindicación 38, caracterizado además porque el compuesto es



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

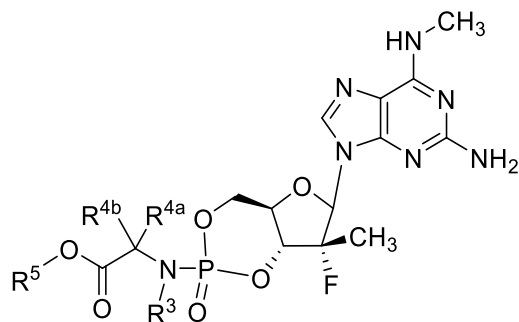
44. El compuesto de conformidad con la reivindicación 38, caracterizado además porque el compuesto es



5

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

45. Un método para tratar una infección de virus del Dengue en un huésped humano que lo necesite, caracterizado porque comprende administrar desde aproximadamente 700 a aproximadamente 1000 mg de un compuesto de un compuesto de Fórmula II,



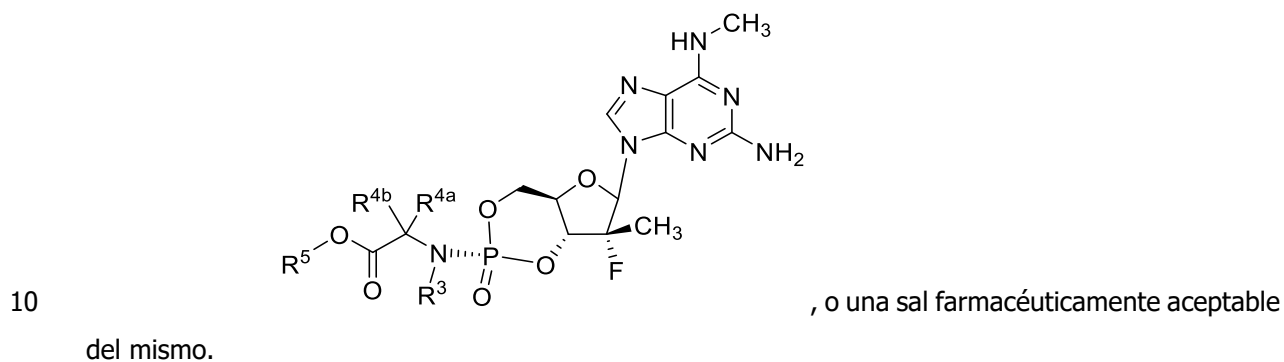
10

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, opcionalmente en un portador farmacéuticamente aceptable, en donde R^3 es hidrógeno o alquilo de 1 a 6 átomos de carbono opcionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes seleccionados independientemente en cada aparición de R^3 ; R^{4a} y R^{4b} se seleccionan independientemente de hidrógeno, alquilo de 1 a 6 átomos de carbono, arilo(alquilo de 1 a 6 átomos de carbono)-, cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono, cicloalquilo de 3 a 7 átomos de

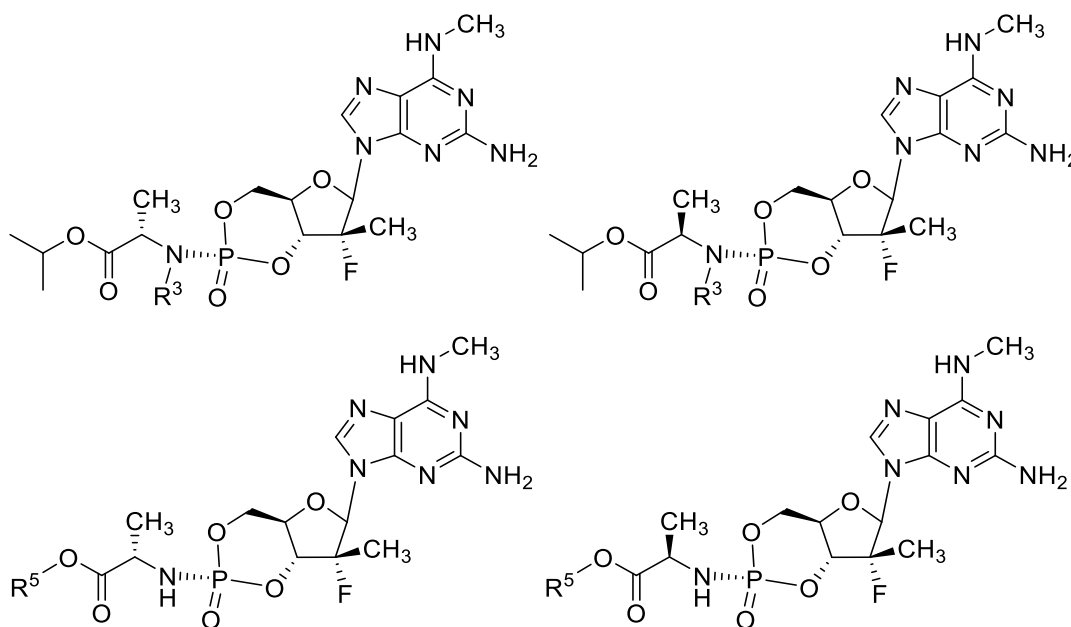
15

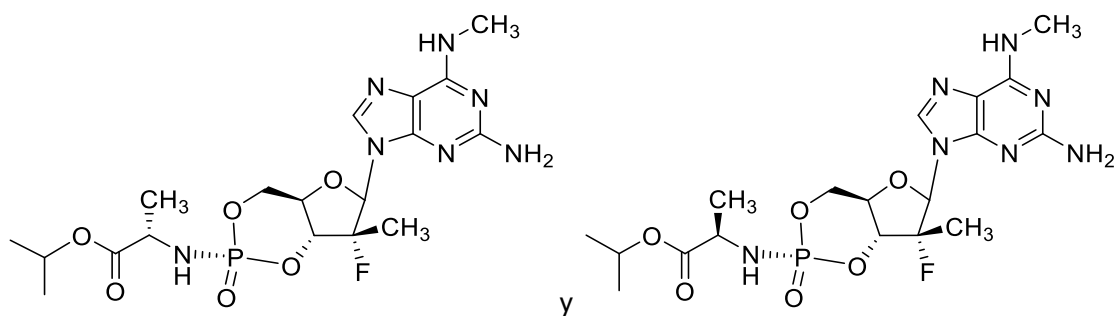
- carbono(alquilo de 1 a 6 átomos de carbono)-, heteroarilo(alquilo de 1 a 6 átomos de carbono)- y arilo, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes seleccionados independientemente en cada aparición de R⁴⁴; y R⁵ es hidrógeno, alquilo de 1 a 6 átomos de carbono (incluyendo metilo, etilo, propilo e isopropilo), haloalquilo de 1 a 6 átomos de carbono o cicloalquilo de 3 a 7 átomos de carbono y en una modalidad alternativa, R⁵ es arilo(alquilo de 1 a 4 átomos de carbono)-, arilo, heteroarilo o heteroalquilo, opcionalmente sustituido con 1, 2, 3 o 4 sustituyentes seleccionados independientemente en cada aparición de R⁵⁵.

46. El método de conformidad con la reivindicación 45, caracterizado además porque el compuesto es de la Fórmula IIA

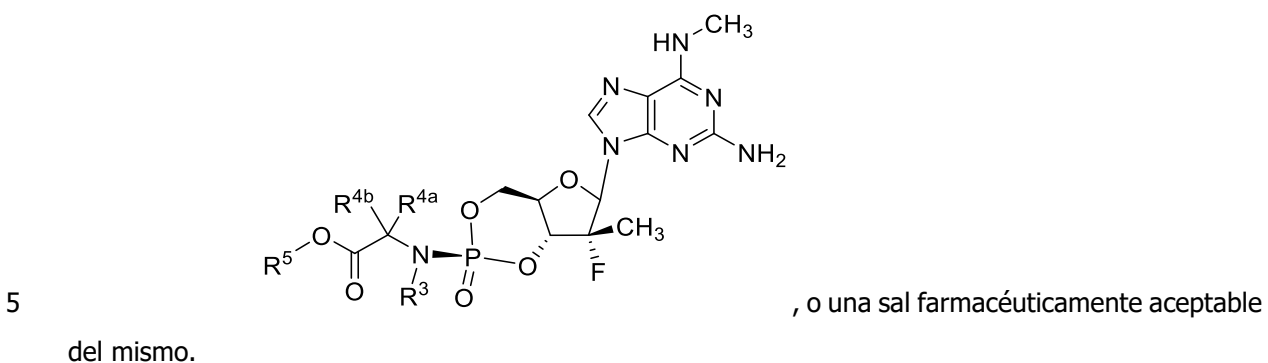


47. El método de conformidad con la reivindicación 46, caracterizado además porque el compuesto se selecciona de

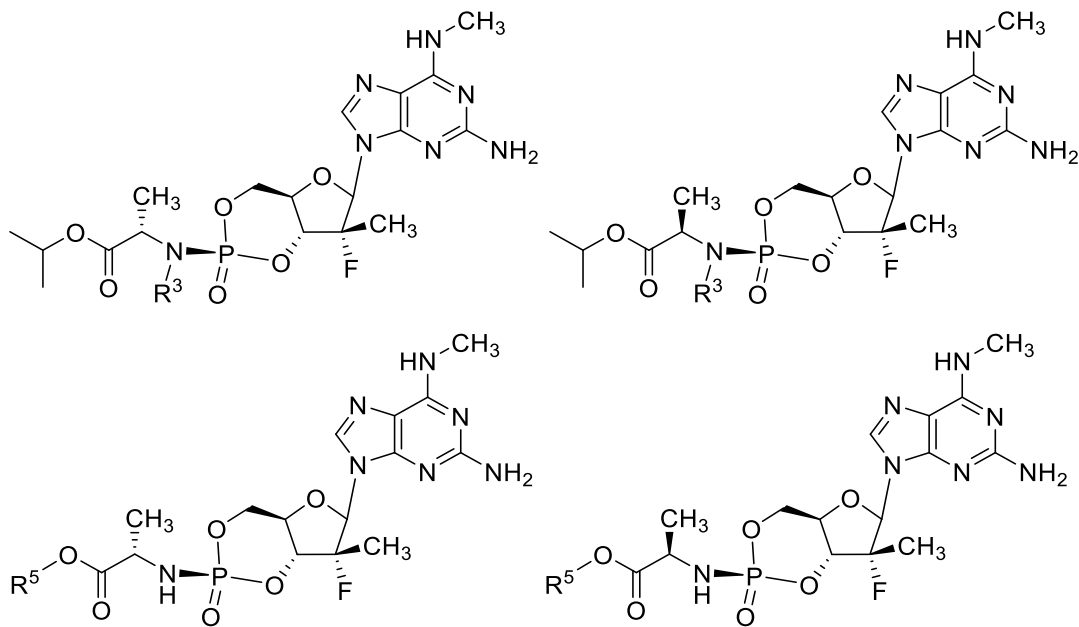


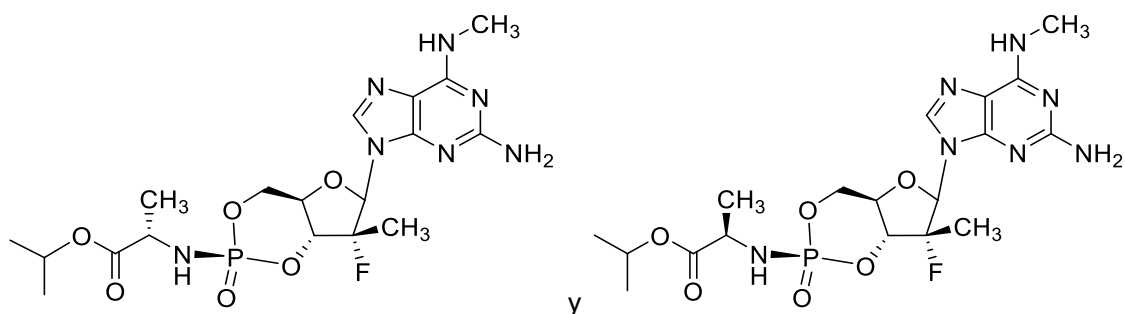


48. El método de conformidad con la reivindicación 45, caracterizado además porque el compuesto es de la Fórmula IIB:

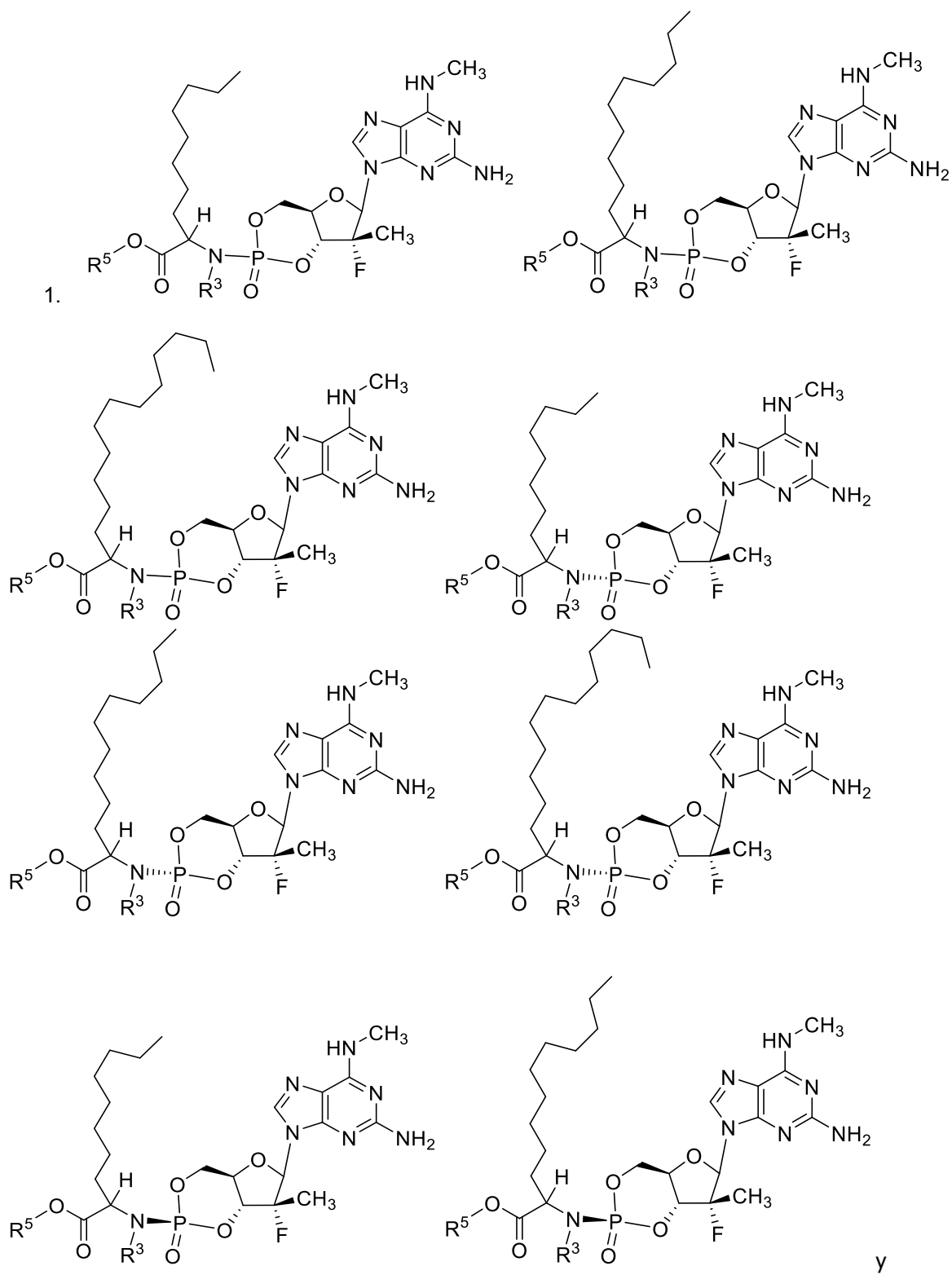


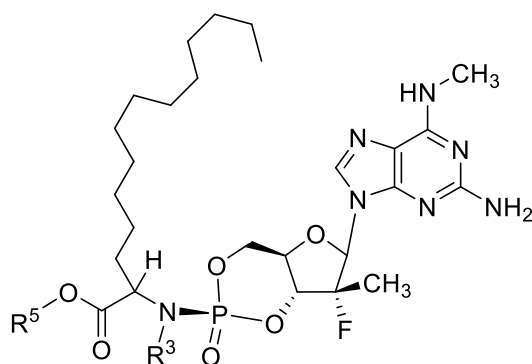
49. El método de conformidad con la reivindicación 48, caracterizado además porque el compuesto se selecciona de





50. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 45 a 49, caracterizado además porque el compuesto se administra una vez al día.
- 5 51. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 45 a 49, caracterizado además porque el compuesto se administra dos veces al día.
52. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 45 a 49, caracterizado además porque el compuesto se administra tres veces al día.
53. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 45 a 49, caracterizado además porque el compuesto se administra cuatro veces al día.
- 10 54. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 45 a 53, caracterizado además porque el compuesto se administra durante tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez días consecutivos.
55. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 45 a 54, caracterizado además porque el virus del Dengue es serotipo 1.
- 15 56. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 45 a 54, caracterizado además porque el virus del Dengue es serotipo 2.
57. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 45 a 54, caracterizado además porque el virus del Dengue es serotipo 3.
- 20 58. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 45 a 54, caracterizado además porque el virus del Dengue es serotipo 4.
59. Un método para tratar una infección de virus del Dengue en un huésped humano que lo necesite, caracterizado porque comprende administrar desde aproximadamente 700 a aproximadamente 800 mg de un compuesto de un compuesto de la Fórmula II, IIA o IIB, en donde
- 25 R^{4a} es alquilo de 7 a 15 átomos de carbono, la variable R^{4b} es hidrógeno y todas las demás variables son como se definen aquí.
60. El método de conformidad con la reivindicación 59, caracterizado además porque el compuesto se selecciona de





61. El método de conformidad con las reivindicaciones 59 o 60, caracterizado además porque el compuesto se administra una vez al día.

5 62. El método de conformidad con las reivindicaciones 59 o 60, caracterizado además porque el compuesto se administra dos veces al día.

63. El método de conformidad con las reivindicaciones 59 o 60, caracterizado además porque el compuesto se administra tres veces al día.

10 64. El método de conformidad con las reivindicaciones 59 o 60, caracterizado además porque el compuesto se administra cuatro veces al día.

65. El método de conformidad con las reivindicaciones 59 a 64, caracterizado además porque el compuesto se administra durante tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o diez días consecutivos.

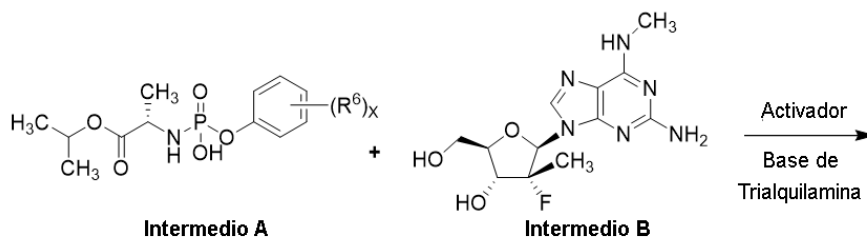
15 66. El método de conformidad con las reivindicaciones 59 a 65, caracterizado además porque el virus del Dengue es serotipo 1.

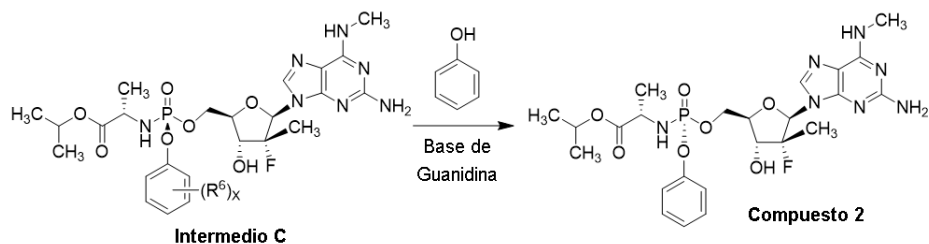
67. El método de conformidad con las reivindicaciones 59 a 65, caracterizado además porque el virus del Dengue es serotipo 2.

68. El método de conformidad con las reivindicaciones 59 a 65, caracterizado además porque el virus del Dengue es serotipo 3.

20 69. El método de conformidad con las reivindicaciones 59 a 65, caracterizado además porque el virus del Dengue es serotipo 4.

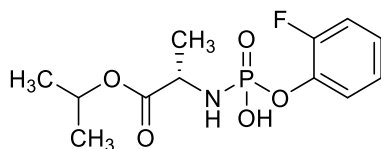
70. Un proceso para la preparación del Compuesto 1 caracterizado porque comprende:





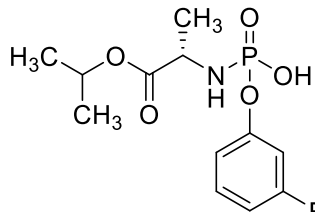
- a. hacer reaccionar un compuesto de fórmula Intermedio A con Intermedio B en presencia de un activador y una base de trialkilamina o piridina para formar un compuesto de fórmula Intermedio C;
- y b. hacer reaccionar un compuesto de fórmula Intermedio C con fenol en presencia de una base de guanidina.

71. El proceso de conformidad con la reivindicación 70, caracterizado además porque el compuesto de la fórmula Intermedio A es Intermedio A-1:



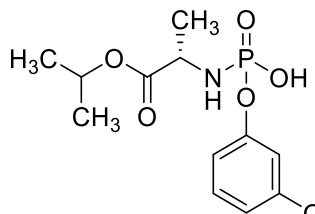
, o una sal del mismo.

72. El proceso de conformidad con la reivindicación 70, caracterizado además porque el compuesto de la fórmula Intermedio A es Intermedio A-3:



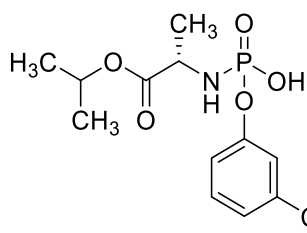
F, o una sal del mismo.

73. El proceso de conformidad con la reivindicación 70, caracterizado además porque el compuesto de la fórmula Intermedio A es Intermedio A-5:



CN, o una sal del mismo.

74. El proceso de conformidad con la reivindicación 70, caracterizado además porque el compuesto de la fórmula Intermedio A es Intermedio A-6:



, o una sal del mismo.

75. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 70 a 74, caracterizado además porque el activador se selecciona entre hexafluorofosfato de 1-[Bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio 3-óxido (HATU) y hexafluorofosfato de 1-ciano-2-etoxi-2-oxoetilidenaminoxidi)dimetilamino-morfolino-carbenio (COMU).

76. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 70 a 75, caracterizado además porque el activador es COMU.

77. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 70 a 75, caracterizado además porque el activador es HATU.

78. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 70 a 77, caracterizado además porque se utiliza una base de trialquilamina en el paso (a).

79. El proceso de conformidad con la reivindicación 78, caracterizado además porque la base de trialquilamina es trietilamina.

80. El proceso de conformidad con la reivindicación 78, caracterizado además porque la base de trialquilamina es diisopropiletilamina.

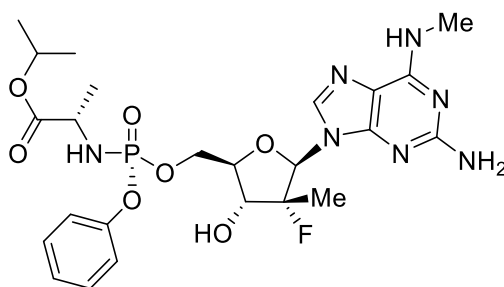
81. El proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 70 a 77, caracterizado además porque se utiliza una base de piridina en la etapa (a).

82. El proceso de conformidad con la reivindicación 81, caracterizado además porque la base de piridina es piridina.

83. El proceso de conformidad con la reivindicación 81, caracterizado además porque la base de piridina es lutidina.

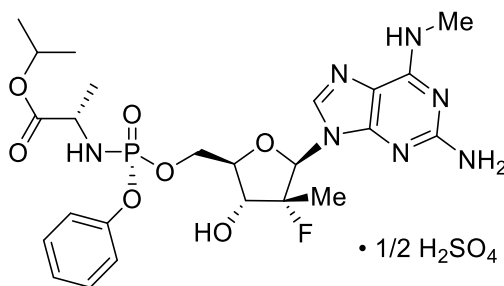
84. El proceso de conformidad con la reivindicación 81, caracterizado además porque la base de piridina es colidina.

85. Un método para tratar una infección de virus del Dengue de serotipos 1, 3 o 4 en un huésped humano que lo necesite, caracterizado porque comprende administrar desde aproximadamente 700 mg a aproximadamente 1000 mg del Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo:

**Compuesto 1**

opcionalmente en un portador farmacéuticamente aceptable, dos, tres o cuatro veces al día.

86. El método de conformidad con la reivindicación 85, caracterizado además porque el compuesto es el Compuesto 2:

**Compuesto 2**

87. El método de conformidad con la reivindicación 85, caracterizado además porque el compuesto es el Compuesto 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
88. El método de conformidad con la reivindicación 86, caracterizado además porque se administran aproximadamente 750 mg del Compuesto 2.
89. El método de conformidad con la reivindicación 87, caracterizado además porque se administran aproximadamente 750 mg del Compuesto 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
90. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 85 a 89, caracterizado además porque el compuesto se administra dos veces al día.
91. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 85 a 89, caracterizado además porque el compuesto se administra tres veces al día.
92. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 85 a 89, caracterizado además porque el compuesto se administra cuatro veces al día.
93. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 85 a 92, caracterizado además porque el compuesto se administra durante tres días consecutivos.
94. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 85 a 92, caracterizado además porque el compuesto se administra durante cuatro días consecutivos.
95. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 85 a 92,

caracterizado además porque el compuesto se administra durante cinco días consecutivos.

96. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 85 a 92, caracterizado además porque el compuesto se administra durante seis días consecutivos.

5 97. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 85 a 92, caracterizado además porque el compuesto se administra durante siete días consecutivos.

98. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 85 a 92, caracterizado además porque el compuesto se administra durante ocho días consecutivos.

99. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 85 a 92, caracterizado además porque el compuesto se administra durante nueve días consecutivos.

10 100. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 85 a 92, caracterizado además porque el compuesto se administra durante diez días consecutivos.

101. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 85 a 100, caracterizado además porque que el humano tiene el serotipo 1 del virus del Dengue.

15 102. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 85 a 100, caracterizado además porque que el humano tiene el serotipo 3 del virus del Dengue.

103. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 85 a 100, caracterizado además porque que el humano tiene el serotipo 4 del virus del Dengue.

20 104. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 85 a 103, caracterizado además porque el compuesto se administra en combinación con un compuesto antiviral adicional.

105. El método de conformidad con la reivindicación 104, caracterizado además porque el compuesto antiviral adicional es un inhibidor de la proteasa NS2B-NS3.

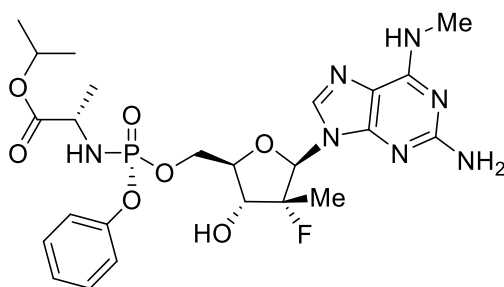
106. El método de conformidad con la reivindicación 104, caracterizado además porque el compuesto antiviral adicional es un inhibidor de NS3.

25 107. El método de conformidad con la reivindicación 104, caracterizado además porque el compuesto antiviral adicional es un inhibidor de la interacción NS3-NS4B.

108. El método de conformidad con la reivindicación 107, caracterizado además porque el inhibidor de la interacción NS3B-NS4B es JNJ-1802 o JNJ-A07.

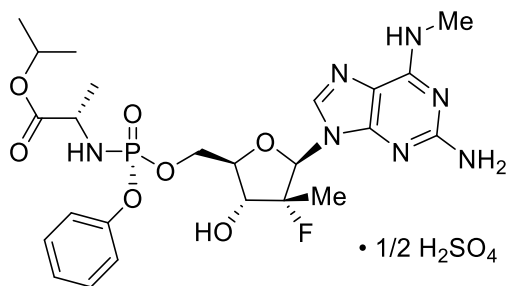
30 109. El método de conformidad con la reivindicación 104, caracterizado además porque el compuesto antiviral adicional es otro inhibidor de NS5.

110. Un compuesto de fórmula:

**Compuesto 1**

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, opcionalmente en un portador farmacéuticamente aceptable, para usarse para tratar la infección de virus del Dengue de serotipo 1, 3 o 4 en un huésped humano que lo necesite, en donde se administran aproximadamente 700 mg a aproximadamente 1000 mg del compuesto.

111. El compuesto para usarse de conformidad con la reivindicación 110, en donde el compuesto es

**Compuesto 2**

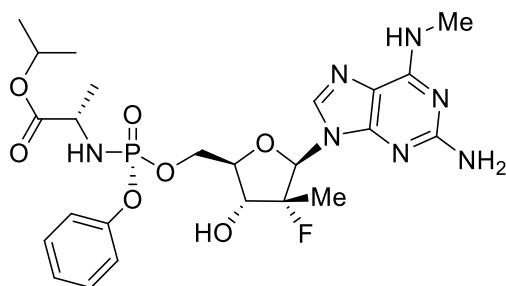
10

112. El compuesto para usarse de conformidad con la reivindicación 110 o 111, en donde el virus del Dengue es serotipo 1.

113. El compuesto para usarse de conformidad con la reivindicación 110 o 111, en donde el virus del Dengue es serotipo 3.

114. El compuesto para usarse de conformidad con la reivindicación 110 o 111, en donde el virus del Dengue es serotipo 4.

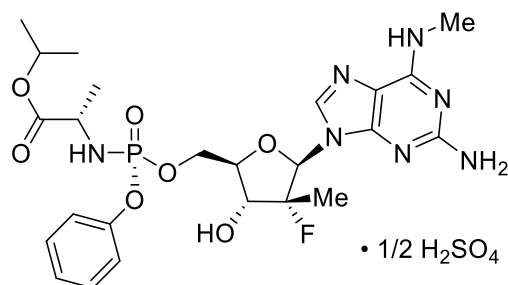
115. El uso de un compuesto de la fórmula:

**Compuesto 1**

15

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, opcionalmente en un portador farmacéuticamente aceptable, para el tratamiento de infección de virus del Dengue de serotipo 1, 3 o 4 en un huésped humano que lo necesite, caracterizado porque comprende administrar aproximadamente 700 mg a aproximadamente 1,000 mg del compuesto.

- 5 116. El uso como el que se reclama en la reivindicación 115, caracterizado además porque el compuesto es



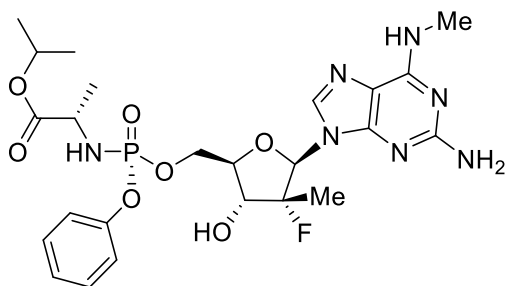
Compuesto 2

- 10 117. El compuesto para usarse de conformidad con la reivindicación 115 o 116, en donde el virus del Dengue es serotipo 1.

118. El compuesto para usarse de conformidad con la reivindicación 115 o 116, en donde el virus del Dengue es serotipo 3.

119. El compuesto para usarse de conformidad con la reivindicación 115 o 116, en donde el virus del Dengue es serotipo 4.

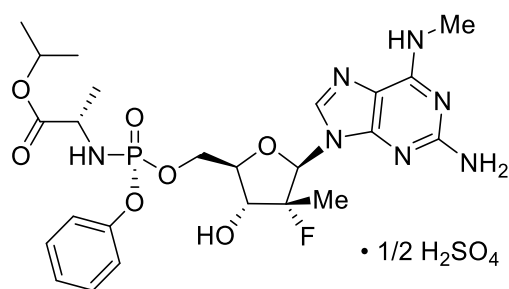
- 15 120. El uso de un compuesto de la fórmula



Compuesto 1

- o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, opcionalmente en un portador farmacéuticamente aceptable, en la fabricación de un medicamento que comprende aproximadamente 700 mg a aproximadamente 1,000 mg del compuesto para el tratamiento del virus del Dengue.
- 20

121. El uso como el que se reclama en la reivindicación 120, en donde el compuesto es



Compuesto 2

122. El uso como el que se reclama en la reivindicación 120 o 121, en donde el virus del Dengue es serotipo 1.
- 5 123. El uso como el que se reclama en la reivindicación 120 o 121, en donde el virus del Dengue es serotipo 2.
124. El uso como el que se reclama en la reivindicación 120 o 121, en donde el virus del Dengue es serotipo 3.
125. El uso como el que se reclama en la reivindicación 120 o 121, en donde el virus
- 10 del Dengue es serotipo 4.
126. El proceso de conformidad con las reivindicaciones 70 a 74, caracterizado además porque la sal del compuesto de fórmula Intermedio A es la sal de dihidroquinina.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona composiciones y combinaciones terapéuticas ventajosas de dosis alta para tratar o prevenir infecciones de virus del Dengue que pueden ser serotipo

5 1, 2, 3 o 4, así como un proceso de fabricación.