

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 117**

51 Int. Cl.:

C07D 209/42 (2006.01)

A61K 31/404 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.09.2015 PCT/EP2015/072534**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2016 WO16050831**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2015 E 15771593 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 3201177**

54 Título: **Indoles mono o disustituidos como inhibidores de la replicación del virus del dengue**

30 Prioridad:

01.10.2014 EP 14187373

23.02.2015 EP 15156073

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

30.04.2019

73 Titular/es:

JANSSEN PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)

1125 Trenton-Harbourton Road

Titusville, NJ 08560, US y

KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN (50.0%)

72 Inventor/es:

KESTELEYN, BART, RUDOLF, ROMANIE;

BONFANTI, JEAN-FRANÇOIS;

JONCKERS, TIM, HUGO, MARIA;

RABOISSON, PIERRE, JEAN-MARIE, BERNARD;

BARDIOT, DOROTHÉE, ALICE, MARIE-EVE y

MARCHAND, ARNAUD, DIDIER, M

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 711 117 T3

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

DESCRIPCIÓN

Indoles mono o disustituidos como inhibidores de la replicación del virus del dengue

5 La presente invención se refiere a compuestos de indol mono o disustituidos, y al uso de dichos compuestos como medicamento, más preferiblemente a su uso como un medicamento para tratar o prevenir infecciones por el virus del dengue. La presente invención se refiere además a composiciones farmacéuticas o preparaciones de combinación de compuestos y a composiciones o preparados para uso como medicamento, más preferiblemente para la prevención o tratamiento de infecciones por el virus del dengue. También se divulgan los procesos de preparación de los compuestos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Los flavivirus, que son transmitidos por los mosquitos o las garrapatas, causan infecciones que ponen en riesgo la vida de los seres humanos, como la encefalitis y la fiebre hemorrágica. Se conocen cuatro serotipos distintos, aunque estrechamente vinculados, del dengue flavivirus, denominados DENV1, -2, -3 y -4. El dengue es endémico en la mayoría de las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, principalmente en zonas urbanas y semiurbanas. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), 2.500 millones de personas, de las cuales mil millones son niños, presentan riesgo de infección por DENV (OMS, 2002). Se estima que cada año, se producen en 15 el mundo entre 50 y 100 millones de casos de fiebre del dengue [FD], medio millón de casos de enfermedad del dengue grave (es decir, fiebre hemorrágica por dengue [DHF] y síndrome de shock por dengue [DSS]), y más de 20.000 muertes. La DHF se ha convertido en la principal causa de hospitalización y muerte entre los niños en regiones endémicas. En conjunto el dengue representa la causa más común de enfermedad por arbovirus. Debido a 20 los grandes brotes, que han tenido lugar recientemente en países situados en Latinoamérica, el Sudeste Asiático y el Pacífico Occidental (incluso Brasil, Puerto Rico, Venezuela, Camboya, Indonesia, Vietnam, Tailandia), la cantidad de casos de dengue ha aumentado drásticamente en los últimos años. No solo la cantidad de casos de dengue está en aumento, a medida que la enfermedad se propaga a nuevas áreas, sino que además, los brotes tienden a ser más graves.

25 Para prevenir y/o controlar la enfermedad asociada con la infección del virus del dengue, los únicos métodos disponibles en la actualidad son las estrategias de erradicación de mosquitos para controlar el vector. Aunque se está avanzando en el desarrollo de vacunas contra el dengue, han surgido muchas dificultades. Estas dificultades incluyen la existencia de un fenómeno, que se conoce como mejora dependiente de anticuerpos (ADE).

30 La recuperación de una infección causada por un serotipo proporciona inmunidad de por vida contra ese serotipo, pero solo confiere una protección parcial y transitoria contra una infección subsiguiente provocada por uno de los otros tres serotipos. Después de la infección con otro serotipo, los anticuerpos heterólogos preexistentes forman complejos con el serotipo del virus del dengue de la nueva infección, pero no neutralizan el patógeno. Por el contrario, se cree que se facilita el ingreso del virus a las células, lo que resulta en la replicación no controlada del virus y títulos virales con picos mayores. Tanto en las infecciones primarias como en las secundarias, los títulos 35 virales más altos se asocian con la enfermedad del dengue más grave. Dado que los anticuerpos maternos pueden pasar fácilmente a los niños mediante la lactancia, esta podría ser una de las razones por la que los niños se ven más afectados por la enfermedad del dengue grave que los adultos.

40 En sitios donde dos o más serotipos que circulan simultáneamente, también conocidos como regiones hiperendémicas, el riesgo de la enfermedad del dengue grave es significativamente mayor debido a un mayor riesgo de sufrir una infección secundaria, más grave. Por otra parte, en una situación de hiperendemicidad, la probabilidad de aparición de cepas más virulentas se incrementa, lo que a su vez aumenta la probabilidad de fiebre hemorrágica por dengue (DHF) o síndrome de shock por dengue.

45 Los mosquitos que transmiten el dengue, incluso los mosquitos de los géneros *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (mosquito tigre) se están dirigiendo hacia el Norte. Según los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos, actualmente, ambos géneros de mosquitos se encuentran omnipresentes en el sur de Texas. La propagación de mosquitos portadores del dengue hacia el Norte no se limita a los Estados Unidos, si no que se ha observado también en Europa.

50 A pesar de los grandes esfuerzos de las últimas tres décadas, actualmente, no existe una vacuna disponible para proteger a los seres humanos contra la enfermedad del virus del dengue. El problema principal radica en desarrollar una vacuna, que ofrezca protección contra los cuatro serotipos en la misma medida (una vacuna tetravalente). Además, hoy en día, no existen fármacos antivirales específicos para el tratamiento o la prevención de la infección por el virus de la fiebre del dengue. Claramente, aún existe una gran necesidad médica no satisfecha de contar con agentes terapéuticos para la prevención o el tratamiento de infecciones virales en animales, más específicamente, en seres humanos y, particularmente, para las infecciones virales causadas por Flavivirus, más específicamente, el 55 virus del dengue. Los compuestos con buena potencia antiviral, niveles reducidos de efectos secundarios, de existir, un amplio espectro de actividad contra múltiples serotipos del virus del dengue, una toxicidad baja y/o buenas propiedades farmacocinéticas o dinámicas resultan muy necesarios. El documento WO/2013/045516 divulga compuestos indol como inhibidores de la replicación viral.

La presente invención proporciona compuestos, derivados de indol mono o disustituido, que muestran una actividad potente y elevada contra los cuatro (4) serotipos del virus del dengue. Por otra parte, los compuestos de conformidad con la invención poseen un buen perfil farmacocinético y, sorprendentemente, estos compuestos específicos muestran una mejor estabilidad quiral.

5 **SUMARIO DE LA INVENCION**

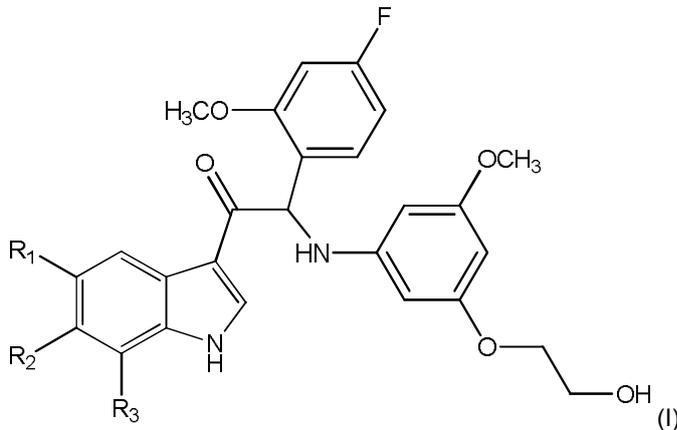
La presente invención se basa en el hallazgo inesperado, que indica que al menos uno de los problemas mencionados anteriormente se puede resolver mediante los compuestos actuales de la invención.

10 La presente invención proporciona compuestos, que han probado poseer una actividad antiviral potente contra los cuatro (4) serotipos conocidos actualmente. La presente invención demuestra, además, que estos compuestos inhiben de manera eficiente la proliferación de virus del dengue (DENV). Por lo tanto, estos compuestos constituyen una clase útil de compuestos potentes, que se puede utilizar en el tratamiento y/o la prevención de infecciones virales en animales, mamíferos y seres humanos, más específicamente para el tratamiento y/o la prevención de infecciones por el virus del dengue.

15 La presente invención se refiere además a dichos compuestos para uso como medicamentos y a su uso para la fabricación de medicamentos para el tratamiento y/o la prevención de las infecciones virales, en particular, las infecciones causadas por los virus pertenecientes a la familia de los virus del dengue en animales o mamíferos, más específicamente, en seres humanos. También se divulgan en la presente métodos para la preparación de todos estos compuestos y a composiciones farmacéuticas que los comprenden en una cantidad efectiva.

20 La presente invención también se refiere a dichos compuestos para uso en un método de tratamiento o prevención de infecciones causadas por el virus del dengue en seres humanos, mediante la administración de una cantidad efectiva de uno o más de dichos compuestos, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos, opcionalmente en combinación con uno o más medicamentos, como otro agente antiviral, a un paciente en necesidad de tratamiento.

Un aspecto de la invención consiste en proporcionar compuestos de fórmula (I)



25 una forma estereoisomérica, una sal, un solvato o un polimorfo farmacéuticamente aceptables de estos, que comprende un grupo indol mono o disustituido; dicho compuesto se selecciona de un grupo donde

R₁ es H, R₂ es F y R₃ es H, F o CH₃;

R₁ es F o CH₃, R₂ es OCH₃ y R₃ es H;

R₁ es H, R₂ es Cl y R₃ es H o CH₃;

30 R₁ es F, R₂ es H y R₃ es CH₃;

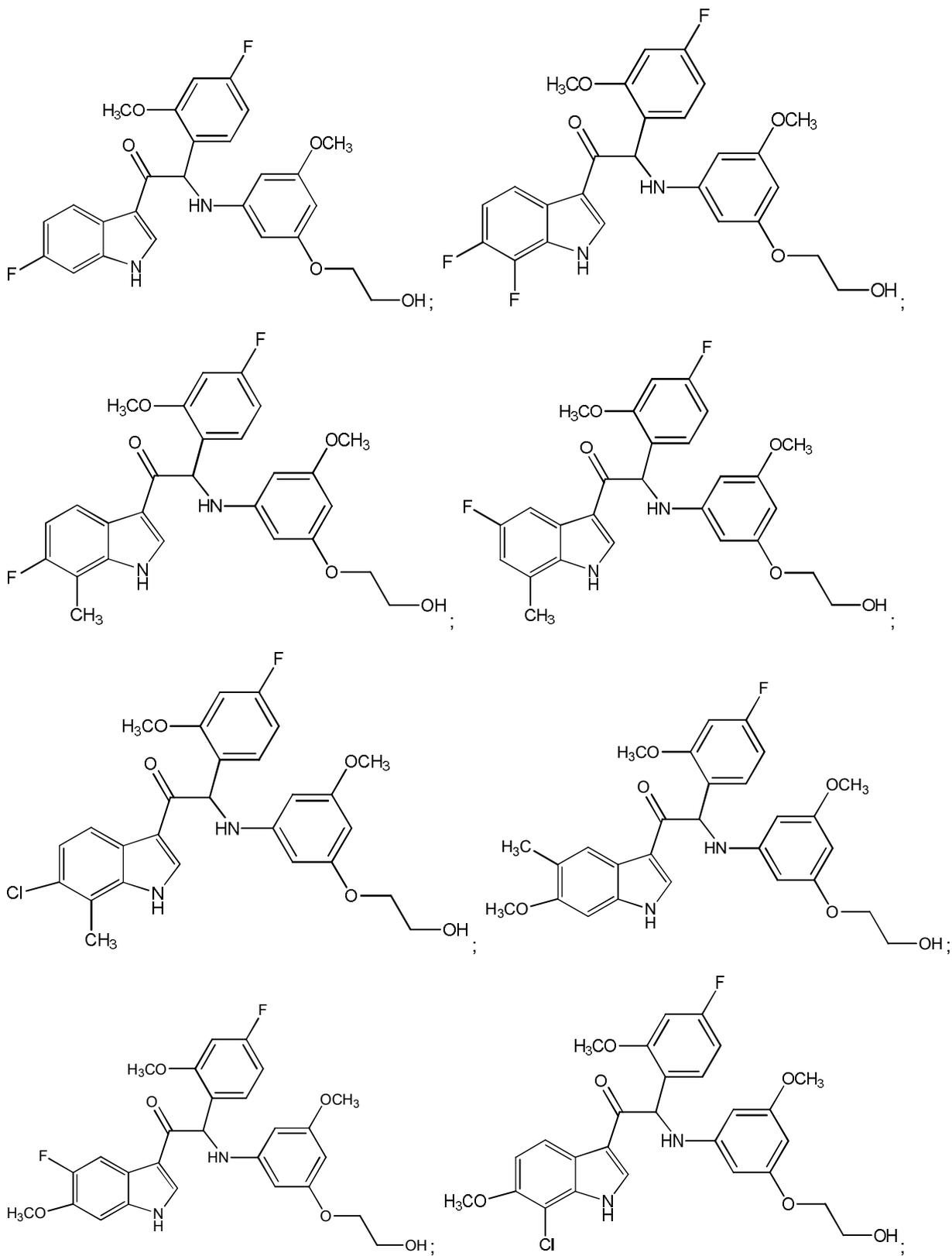
R₁ es H, R₂ es OCH₃ y R₃ es Cl;

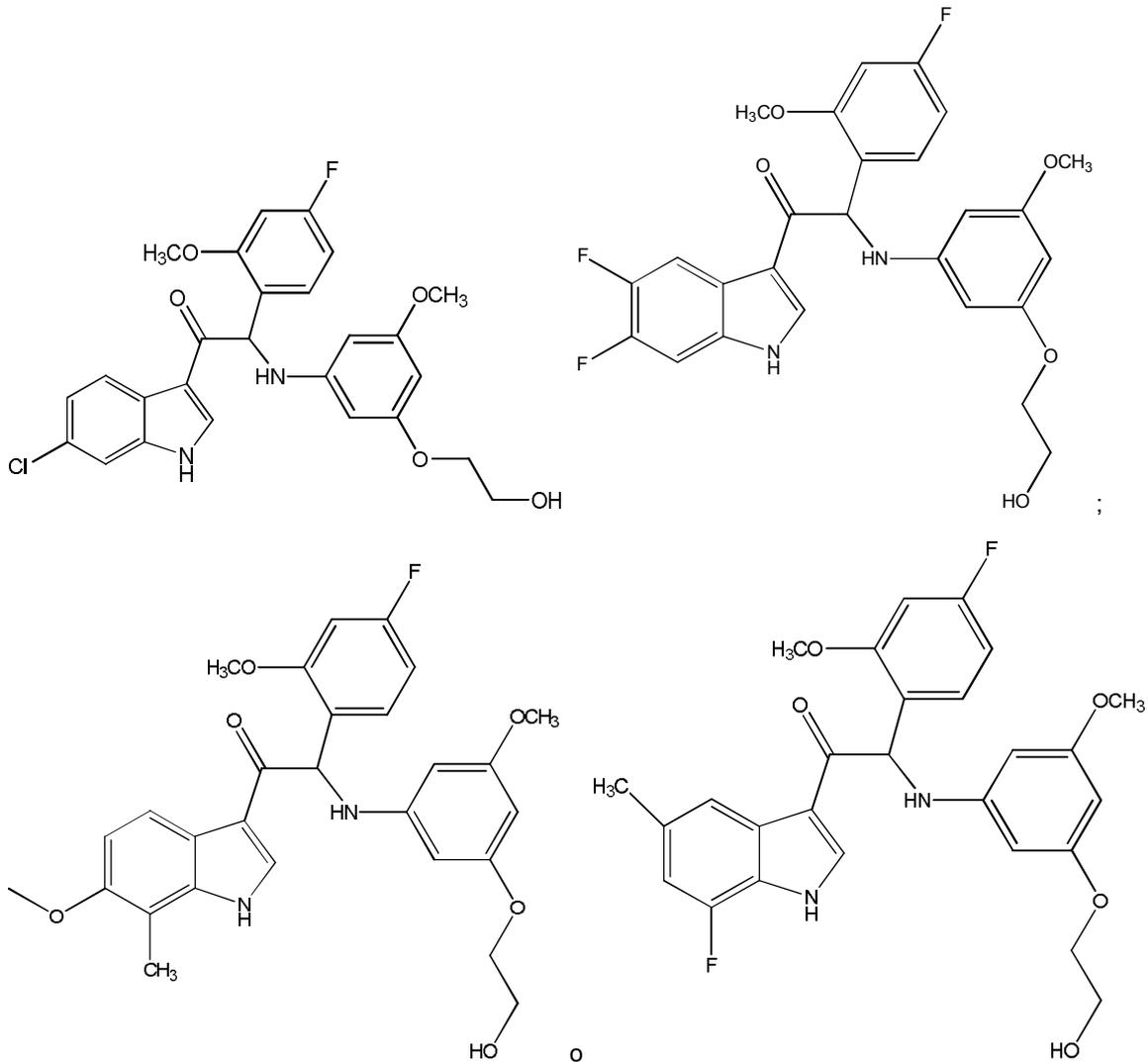
R₁ es F, R₂ es F y R₃ es H;

R₁ es H, R₂ es OCH₃ y R₃ es CH₃ o

R₁ es CH₃, R₂ es H y R₃ es F.

35 En particular, los compuestos de la invención o su forma estereoisomérica, una sal, un solvato o un polimorfo farmacéuticamente aceptables de estos, se seleccionan del grupo:





5 Parte de la presente invención es también una composición farmacéutica, que comprende un compuesto de fórmula (I) o una forma estereoisomérica, una sal, un solvato o un polimorfo farmacéuticamente aceptables de este, junto con uno o más excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos de fórmula (I) incluyen las sales de adición de ácido y las sales básicas de dichos compuestos. Las sales de adición de ácido adecuadas se forman a partir de ácidos, que forman sales no tóxicas. Las sales básicas adecuadas se forman a partir de bases, que forman sales no tóxicas.

10 Lo compuestos de la invención también pueden existir en formas no solvatadas y solvatadas. El término "solvato" se usa en la presente para describir un complejo molecular, que comprende el compuesto de la invención y una o más moléculas de disolvente farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, etanol.

El término "polimorfo" se refiere a la capacidad del compuesto de la invención de existir en más de una forma o estructura cristalina.

15 Los compuestos de la presente invención pueden administrarse como productos cristalinos o amorfos. Pueden obtenerse, por ejemplo, como tapones, polvos o películas sólidas por métodos como precipitación, cristalización, secado por congelación, secado por pulverización o secado por evaporación. Se pueden administrar solos o en combinación con uno o más otros compuestos adicionales de la invención o en combinación con uno o más fármacos adicionales. Generalmente, se administrarán como una formulación en asociación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. El término "excipiente" se usa en la presente para describir cualquier ingrediente distinto del o los compuestos de la invención. La elección del excipiente depende en gran medida de factores como el modo particular de administración, el efecto del excipiente sobre la solubilidad y estabilidad y la naturaleza de la forma de dosificación.

20

Los compuestos de la presente invención o cualquier subgrupo de estos pueden formularse en diversas formas farmacéuticas para propósitos de administración. Como composiciones apropiadas se pueden citar todas las

composiciones empleadas usualmente para administrar fármacos sistémicamente. Para preparar las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se combina una cantidad efectiva del compuesto particular, opcionalmente en forma de sal de adición, como el ingrediente activo en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable; el vehículo puede tomar una amplia variedad de formas en función de la forma de preparación deseada para la administración. Estas composiciones farmacéuticas se encuentran deseablemente en forma de dosificación unitaria adecuada, por ejemplo, para administración oral o rectal. Por ejemplo, para preparar las composiciones en forma de dosificación oral, se puede emplear cualquiera de los medios farmacéuticos habituales, como agua, glicoles, aceites, alcoholes y similares en el caso de preparaciones líquidas orales, como suspensiones, jarabes, elixires, emulsiones y soluciones o vehículos sólidos, como almidones, azúcares, caolín, diluyentes, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares en el caso de polvos, píldoras, cápsulas y tabletas. Debido a su facilidad de administración, las tabletas y cápsulas representan las formas unitarias de dosificación oral más ventajosa, en cuyo caso se emplean obviamente vehículos farmacéuticos sólidos. También se incluyen preparaciones en forma sólida, que se pueden convertir, poco antes de su uso, en formas líquidas.

Resulta especialmente ventajoso formular las composiciones farmacéuticas mencionadas anteriormente en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosis. Forma de dosificación unitaria, como se utiliza en la presente, se refiere a unidades físicamente diferenciadas, adecuadas como dosificaciones unitarias. Cada unidad contiene una cantidad predeterminada de ingrediente activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Los ejemplos de dichas formas de dosificación unitaria incluyen tabletas (incluso tabletas ranuradas o recubiertas), cápsulas, píldoras, paquetes de polvos, obleas, supositorios, soluciones o suspensiones inyectables y similares así como múltiples segregados de estas.

Los entendidos en el tratamiento de enfermedades infecciosas podrán determinar la cantidad efectiva a partir de los resultados de las pruebas, que se presentan a continuación. En general, se considera que una cantidad diaria efectiva oscilará entre 0,01 mg/kg a 50 mg/kg de peso corporal, más preferiblemente entre 0,1 mg/kg y 10 mg/kg de peso corporal. Puede ser apropiado administrar la dosis requerida como dos, tres, cuatro o más subdosis a intervalos apropiados a lo largo del día. Dichas subdosis se pueden formular como formas de dosificación unitarias, por ejemplo, pueden incluir una cantidad de ingrediente activo por forma de dosificación unitaria de 1 a 1000 mg y, en particular, de 5 a 200 mg.

La dosificación y frecuencia de administración exactas dependen del compuesto particular de fórmula (I) utilizado, la afección particular que se está tratando, la gravedad de la afección que se está tratando, la edad, el peso y la condición física general del paciente particular así como de otra medicación que el sujeto pueda estar tomando, como es bien sabido por los entendidos en la técnica. Además, es evidente que la cantidad efectiva puede reducirse o aumentarse en función de la respuesta del sujeto tratado y/o de la evaluación del médico, que prescribe los compuestos de la presente invención. Por lo tanto, las escalas de cantidad efectiva mencionadas anteriormente son meramente orientativas y no están destinadas a limitar el alcance o uso de la invención en ninguna medida.

La presente divulgación también pretende incluir todos los isótopos de átomos, que se encuentran en los compuestos de la invención. Por ejemplo, los isótopos de hidrógeno incluyen tritio y deuterio y los isótopos de carbono incluyen C-13 y C-14.

Los presentes compuestos utilizados en la presente invención también pueden existir en su forma estereoquímicamente isómera, donde se definen todos los compuestos posibles constituidos por los mismos átomos unidos por la misma secuencia de enlaces, pero con diferentes estructuras tridimensionales, que no son intercambiables. Salvo que se mencione o indique lo contrario, la designación química de los compuestos abarca la mezcla de todas las formas estereoquímicamente isómeras posibles, que pueden poseer dichos compuesto.

Dicha mezcla puede contener todos los diastereómeros y/o enantiómeros de la estructura molecular básica de dicho compuesto. Todas las formas estereoquímicamente isómeras de los compuestos utilizados la presente invención, tanto en forma pura o mezcladas unas con otras, están incluidas dentro del alcance de la presente invención, incluso cualquier mezcla racémica o racemato.

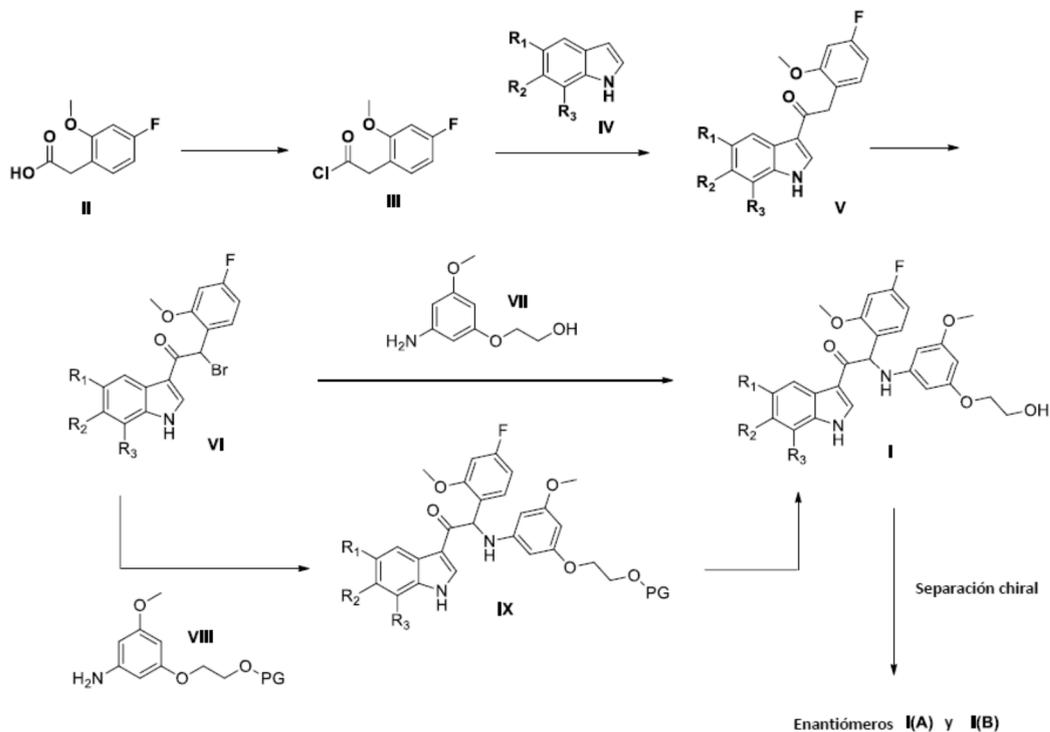
Las formas estereoisómeras puras de los compuestos e intermedios como se menciona en la presente se definen como isómeros sustancialmente libres de otras formas enantioméricas o diastereoméricas de la misma estructura molecular básica de dichos compuestos o intermedios. En particular, el término 'estereoisoméricamente puros' se refiere a compuestos o intermedios, que tienen un exceso estereoisomérico de al menos el 80% (es decir, mínimo el 90% de un isómero y máximo el 10% de los otros isómeros posibles) hasta un exceso estereoisomérico del 100% (es decir, el 100% de un isómero y nada del otro), más específicamente, compuestos o intermedios, que tienen un exceso estereoisomérico del 90% hasta el 100%, incluso más específicamente, que tienen un exceso estereoisomérico del 94% hasta el 100% y, más en particular, que tienen un exceso estereoisomérico del 97% hasta el 100%. Los términos "enantioméricamente puro" y "diastereoméricamente puro" deben entenderse de una manera similar, pero teniendo en cuenta el exceso enantiomérico, respectivamente el exceso diastereomérico de la mezcla en cuestión.

Las formas estereoisómeras puras de los compuestos e intermedios utilizados en esta invención se pueden obtener

mediante la aplicación de procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los enantiómeros pueden separarse entre sí por medio de la cristalización selectiva de sus sales diastereoméricas con ácidos o bases ópticamente activas. Los ejemplos incluyen ácido tartárico, ácido dibenzoiltartárico, ácido ditoluoiltartárico y ácido canfosulfónico. Alternativamente, los enantiómeros pueden separarse por técnicas cromatográficas, mediante el uso de fases estacionarias quirales. Dichas formas estereoquímicamente isoméricas puras también se pueden derivar de las correspondientes formas estereoquímicamente isoméricas puras de los materiales de partida apropiados, siempre que la reacción ocurra estereoespecíficamente. Preferiblemente, si se desea un estereoisómero específico, dicho compuesto se sintetizará por métodos de preparación estereoespecíficos. Estos métodos emplearán ventajosamente materiales de partida enantioméricamente puros.

10 Enfoques sintéticos generales

La síntesis de compuestos de fórmula general I puede llevarse a cabo como se describe en el Esquema 1. El ácido acético 2-(4-fluoro-2-metoxifenil) (II) se puede convertir en el correspondiente cloruro de 2-(4-fluoro-2-metoxifenil) acetilo (III) con un reactivo de cloración, como cloruro de tionilo. La reacción de Friedel-Crafts del cloruro de ácido III con un indol sustituido de fórmula general IV se puede realizar mediante un reactivo ácido de Lewis, como AlCl₃ o Et₂AlCl en un disolvente adecuado, como CH₂Cl₂, y en condiciones de reacción adecuadas, que implican típicamente refrigeración, para proporcionar el indol 3-acilado de fórmula general V. La introducción de una porción anilina en la posición alfa con respecto a la porción carbonilo de los compuestos de fórmula general V se puede lograr mediante una secuencia de reacción, que implica, por ejemplo, bromación de V con un reactivo, como tribromuro de feniltrimetilamonio, en un disolvente adecuado, como THF, para proporcionar los compuestos de fórmula general VI y la posterior reacción de los compuestos de fórmula general VI con 2(3-amino-5-metoxifenoxi) etanol (VII) en un disolvente adecuado, como CH₃CN, y típicamente mediante una base, como TEA o DIPEA, para proporcionar los compuestos de fórmula general I como mezclas racémicas. Alternativamente, los compuestos de fórmula general VI se pueden hacer reaccionar con una anilina O-protegida de fórmula general VIII (PG = grupo protector) en un disolvente adecuado, como CH₃CN, y típicamente mediante una base, como TEA o DIPEA, para proporcionar los compuestos de fórmula general IX. Un grupo protector útil es, por ejemplo, tercbutilo (PG = tBu). La eliminación del grupo protector de los compuestos de fórmula general IX se puede realizar por métodos, con los que los entendidos en la técnica están familiarizados, que incluyen, por ejemplo, un reactivo, como ácido clorhídrico concentrado (para PG = tBu), para proporcionar los compuestos de fórmula general I como mezclas racémicas. La separación quiral de los compuestos de fórmula general I se puede realizar, por ejemplo, mediante cromatografía quiral para proporcionar los enantiómeros A y B de la fórmula general I.



Esquema 1

Ejemplos

Métodos LC/MS

La medición por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) se realizó mediante el uso de una bomba LC, una red de diodos (DAD) o un detector de rayos UV y una columna, como se especifica en los métodos correspondientes. De ser necesario, se incluyen detectores adicionales (véase la tabla de métodos, que se incluye a continuación).

- 5 El flujo de la columna se lleva al espectrómetro de masas (MS), que se configura con una fuente de iones de presión atmosférica. Está dentro del conocimiento del entendido establecer los parámetros de ajuste (por ejemplo, rango de barrido, tiempo de permanencia...) con el fin de obtener los iones, que permiten la identificación del peso molecular (MW) monoisotópico nominal del compuesto. La adquisición de datos se realizó con el software adecuado.

- 10 Los compuestos se describen por sus tiempos de retención experimentales (R_t) y iones Si no se especifica de forma diferente en la tabla de datos, el ion molecular reportado corresponde a $[M+H]^+$ (molécula protonada) y/o $[M-H]^-$ (molécula desprotonada). En caso de que el compuesto no fuera directamente ionizable, se especifica el tipo de aducto (es decir, $[M+NH_4]^+$, $[M+HCOO]^-$, etc...). Para moléculas con múltiples patrones isotópicos (Br, Cl), el valor reportado es el obtenido para la masa de isótopos más baja. Todos los resultados se obtuvieron con incertidumbres experimentales, que se asocian comúnmente con el método utilizado.

- 15 En adelante, "SQD" significa Detector Cuádruplo Simple; "MSD", Detector Selectivo de Masas; "RT", temperatura ambiente; "BEH", híbrido enlazado de etilsiloxano/sílice; "DAD", Detector de Rayos de Diodo; "HSS", Sílice de Alta Resistencia.

Códigos del método LCMS (flujo expresado en mL/min., temperatura en columna (T) en °C, tiempo de ejecución en minutos)

Código del método	Instrumento	Columna	Fase móvil	Gradiente	Flujo ----- Col T	Tiempo de ejecución (min)
LC-A	Waters: Acquity® UPLC® -DAD- SQD	Waters: BEH C18 (1.7µm, 2.1*50mm)	A: 10mM CH ₃ COONH ₄ en 95% H ₂ O + 5% CH ₃ CN B: CH ₃ CN	De 95% A a 5% A en 1.3 min, mantenido por 0.7 min.	0.8 mL/min ----- 55°C	2
LC-B	Waters: Acquity® UPLC® -DAD- SQD	Waters: HSS T3 (1.8µm, 2.1*100mm)	A: 10mM CH ₃ COONH ₄ en 95% H ₂ O + 5% CH ₃ CN B: CH ₃ CN	De 100% A a 5% A en 2.10min, a 0% A en 0.90min, a 5% A en 0.5min.	0.7 mL/min ----- 55°C	3.5
LC-C	Waters: Acquity® UPLC® - DAD- Quattro Micro™	Waters: BEH C18 (1.7µm, 2.1x100mm)	A: 95% CH ₃ COONH ₄ 7mM / 5% CH ₃ CN, B: CH ₃ CN	84.2% A por 0.49min, a 10.5% A en 2.18min, mantenido por 1.94min, nuevamente a 84.2% A en 0.73min, mantenido por 0.73min.	0.343 mL/min ----- 40°C	6.2
LC-D	Dionex®: Ultima® 3000® - DAD-Brucker® - Esquire 6000	Sunfire® C18 (3.5µm, 3,0*100mm) con protector (3.5µm, 3,0*20mm)	A: 0,1% de ácido fórmico en H ₂ O B: CH ₃ CN	50% A por 0,20min, a 10% A en 5.8 min, mantenido por 4.8min, nuevamente a 50% A en 0.20min, mantenido por 3.00min.	1.0 mL/min ----- 30°C	14

Código del método	Instrumento	Columna	Fase móvil	Gradiente	Flujo ----- Col T	Tiempo de ejecución (min)
LC-E	Dionex [®] : Ultima [®] 3000 [®] - DAD-Brucker [®] Esquire 6000	X-Bridge [®] C18 (3.5µm, 3,0*100mm) con protector (3.5µm, 3.0*20mm)	A: 10mM CH ₃ COONH ₄ en H ₂ O ajustar pH 10 con una solución de amoníaco. B: CH ₃ CN	80% A por 0,20min, a 40% A en 6,8 min, a 10% A en 1 min., mantenido por 2.8min, nuevamente a 80% A en 0.20min, mantenido por 3.00min.	1.0 mL/min ----- 30°C	14

Métodos SFC-MS

5 La medición SFC se realizó por medio de un sistema de cromatografía de fluidos supercríticos (SFC), compuesto por una bomba binaria para la liberación de dióxido de carbono (CO₂) y un modificador, un muestreador automático, un horno de columna, un detector de red de diodos equipado con una celda de flujo de alta presión de hasta 400 bares. Si se configura con un Espectrómetro de Masas (MS), el flujo de la columna se lleva al (MS). Está dentro del conocimiento del entendido establecer los parámetros de ajuste (por ejemplo, rango de barrido, tiempo de permanencia...) con el fin de obtener los iones, que permiten la identificación del peso molecular (MW) monoisotópico nominal del compuesto. La adquisición de datos se realizó con el software adecuado.

10 Métodos analíticos SFC-MS (flujo expresado en mL/min., temperatura de columna (T) en °C, tiempo de ejecución en minutos, contrapresión en bares).

Código del método	Columna	Fase móvil	Gradiente	Flujo ----- Col T	Tiempo de ejecución ----- BPR
SFC-A	Columna Daicel Chiralpak [®] AD-H (5 µm, 150 x 4,6 mm)	A:CO ₂ B: MeOH	30% B, mantenido por 7 min.	3 ----- 35	7 ----- 100
SFC-B	Columna Daicel Chiralpak [®] AD-H (5 µm, 150 x 4,6 mm)	A: CO ₂ B: MeOH	40% B, mantenido por 7 min.	3 ----- 35	7 ----- 100
SFC-C	Columna Daicel Chiralcel [®] OJ-H (5 µm, 250 x 4,6 mm)	A: CO ₂ B: MeOH	40% B, mantenido por 7 min.	3 ----- 35	7 ----- 100
SFC-D	Columna Daicel Chiralcel [®] OD-H (5 µm, 150 x 4,6 mm)	A: CO ₂ B: MeOH	40% B, mantenido por 7 min.	3 ----- 35	7 ----- 100
SFC-E	Columna Daicel Chiralcel [®] OD-H (5 µm, 150 x 4,6 mm)	A: CO ₂ B: MeOH	30% B, mantenido por 7 min.	3 ----- 35	7 ----- 100

Código del método	Columna	Fase móvil	Gradiente	Flujo ----- Col T	Tiempo de ejecución ----- BPR
SFC-F	Columna Daicel Chiralpak® AS3 (3,0 µm, 150 x 4,6 mm)	A: CO ₂ B: EtOH +0,2% iPrNH ₂ +3% H ₂ O	25% B, mantenido por 6 min., a 50% en 1 min., mantenido 2.5 min.	2.5 ----- 40	9.5 ----- 110
SFC-G	Columna Daicel Chiralpak® OD-H (5,0 µm, 250 x 4,6 mm)	A: CO ₂ B: EtOH +0,2% iPrNH ₂	35% B, mantenido por 4 min., a 50% en 1 min., mantenido 2 min.	5 ----- 40	7 ----- 110
SFC-H	Columna Daicel Chiralpak® OD3 (3.0 µm, 150 x 4,6 mm)	A: CO ₂ B: EtOH +0,2% iPrNH ₂ +3% H ₂ O	40% B, mantenido por 6 min., a 50% en 1 min., mantenido 2.5 min.	2.5 ----- 40	9.5 ----- 110
SFC-I	Columna Daicel Chiralpak® AS3 (3,0 µm, 150 x 4,6 mm)	A: CO ₂ B: EtOH +0,2% iPrNH ₂ +3% H ₂ O	30% B, mantenido por 6 min., a 50% en 1 min., mantenido 2.5 min.	2.5 ----- 40	9.5 ----- 110
SFC-J	Columna Daicel Chiralpak® OD-H (5,0 µm, 250 x 4,6 mm)	A: CO ₂ B: EtOH +0,2% iPrNH ₂	30% B, mantenido por 4 min., a 50% en 1 min., mantenido 2 min.	5 ----- 40	7 ----- 110
SFC-K	Columna Daicel Chiralpak® OD3 (3.0 µm, 150 x 4,6 mm)	A: CO ₂ B: MeOH +0,2% iPrNH ₂ +3% H ₂ O	35% B, mantenido por 6 min., a 50% en 1 min., mantenido 2.5 min.	2.5 ----- 40	9.5 ----- 110

Puntos de fusión

Los valores son o bien los valores máximos o los rangos de fusión y se obtienen con las incertidumbres experimentales, que se asocian comúnmente con este método analítico.

DSC823e (indicado como DSC)

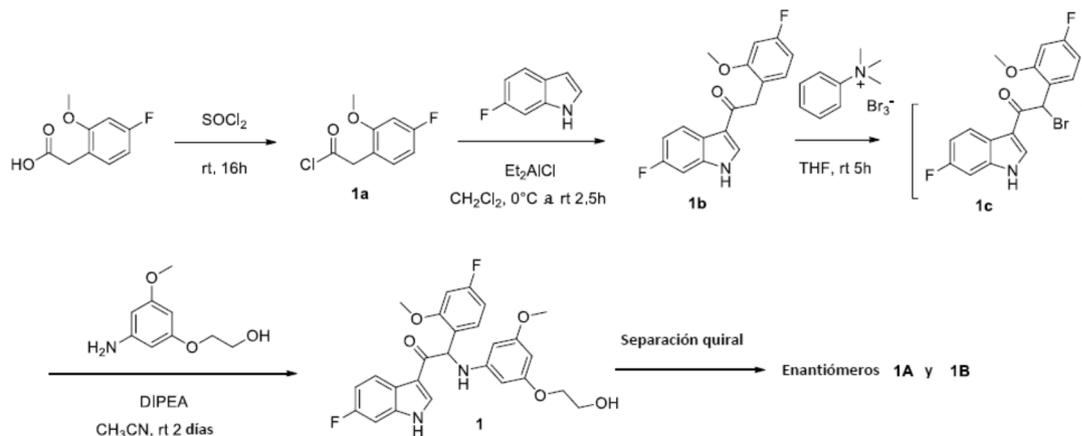
- 5 Para una serie de compuestos, los puntos de fusión se determinaron con un DSC823e (Mettler-Toledo). Los puntos de fusión se midieron con un gradiente de temperatura de 10°C/minuto. La temperatura máxima fue de 300°C.

Rotaciones ópticas:

Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro Perkin-Elmer 341 con una lámpara de sodio y se reportaron como se indica a continuación: $[\alpha]_D^T$ (λ , c g/100ml, disolvente, T°C).

- 10 $[\alpha]_D^T = (100\alpha) / (l \times c)$: donde l es la longitud de ruta en dm y c es la concentración en g/100 ml para una muestra a una temperatura T (°C) y una longitud de onda λ (en nm). Si la longitud de onda de la luz usada es 589 nm (línea D de sodio), entonces el símbolo D podría utilizarse en su lugar. Siempre se debe dar el signo de la rotación (+ o -). Cuando se utiliza esta ecuación, la concentración y el disolvente siempre se proporcionan entre paréntesis después de la rotación. La rotación se representa mediante el uso de grados y no se proporcionan unidades de concentración (se supone que es g/100 ml).
- 15

Ejemplo 1: Síntesis de 1-(6-fluoro-1*H*-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-2-((3-(2-hidroxietoxi)-5-metoxifenil)amino)etanona (Compuesto 1) y separación quiral en enantiómeros **1A** y **1B**.



Síntesis del intermediario 1a:

- 5 Se agregó en porciones pequeñas ácido 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)acético [CAS 886498-61-9] (28.9 g, 157 mmol) a cloruro de tionilo (150 mL) y la solución resultante se agitó durante la noche a temperatura ambiente. El disolvente se concentró bajo presión reducida y se co-evaporó con tolueno para proporcionar cloruro de 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)acetilo **1a** (31.8 g) como un residuo aceitoso que se usó sin purificación adicional en la siguiente etapa.

Síntesis del intermediario 1b:

- 10 Una solución de 6-fluoro-1*H*-indol [CAS 399-51-9] (14.2 g, 105 mmol) en CH₂Cl₂ (400 mL) se enfrió a 0°C bajo atmósfera-N₂. Una solución de cloruro de dietilaluminio 1M en hexano (160 mL, 160 mmol) se agregó durante un periodo de 10 min a la solución agitada y la mezcla resultante se mantuvo a 0°C durante 40 min. Posteriormente, una solución de cloruro de 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)acetilo **1a** (31.8 g, 160 mmol) en CH₂Cl₂ (300 mL) se agregó por goteo durante un periodo de 2.5 h mientras que la temperatura interna de la mezcla de reacción se mantuvo por debajo de 5°C. La temperatura de la mezcla de reacción agitada se mantuvo a 0°C durante 3.5 h. El baño de hielo se eliminó y después de agitarse a temperatura ambiente durante 2.5 h, la mezcla de reacción se enfrió nuevamente a 0°C y la reacción se inactivó mediante la adición lenta de una solución de tetrahidrato tartrato de potasio y sodio (sal de Rochelle) [CAS 6100-16-9] (59.6 g, 210 mmol) en agua (70 mL) mientras se mantenía la temperatura interna de la mezcla por debajo de 10°C. Después de agitar durante 30 min adicionales a 0°C, el baño de hielo se eliminó y la mezcla resultante se diluyó con THF (1 L). Na₂SO₄ (150 g) se agregó y después de agitación durante la noche, la mezcla se filtró sobre dicalite®. La torta de filtrado se lavó dos veces con THF (2x 1 L). Los filtrados combinados se evaporaron bajo presión reducida a un volumen residual de aproximadamente 50 mL. Se filtró un precipitado blanco y se secó al vacío a 50°C para proporcionar 1-(6-fluoro-1*H*-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)etanona **1b** (22.3 g) como un polvo blanco.

Síntesis de compuesto 1 y separación quiral de enantiómeros 1A y 1B:

- 25 Una solución agitada de 1-(6-fluoro-1*H*-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)etanona **1b** (11.0 g, 36.5 mmol) en THF (300 mL) se enfrió a 0°C bajo atmósfera-N₂. Una solución de tribromuro de feniltrimetilamonio [CAS 4207-56-1] (13.9 g, 36.9 mmol) en THF (100 mL) se agregó por goteo durante un periodo de 45 min. La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 5 h y se evaporó bajo presión reducida hasta un residuo blanco. Este residuo, que contenía la 2-bromo-1-(6-fluoro-1*H*-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)etanona en bruto **1c**, se disolvió en acetonitrilo (300 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente. Después de la adición de 2-(3-amino-5-metoxifenoxi)etanol [CAS 725237-16-1] (13.4 g, 73 mmol) y diisopropiletilamina (12.6 mL, 73 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante dos días – hasta una conversión completa a Compuesto **1**. La mezcla de reacción se vertió en agua (1.5 L) y se extrajo con 2-metil-THF (2x 750 mL). Los extractos combinados se lavaron con HCl 0.5N (800 mL), una solución saturada acuosa de NaHCO₃ (200 mL) y salmuera (200 mL), se secaron sobre MgSO₄ y se evaporaron bajo presión reducida. El residuo aceitoso se purificó mediante HPLC preparativa (fase estacionaria: RP Uptisphere® Prep C18 ODB - 10 µm, 30 x 150 mm, fase móvil: 0.25% NH₄HCO₃ solución en agua, CH₃CN). Las fracciones del producto se concentraron, se disolvieron en metanol y se concentraron nuevamente para producir 1-(6-fluoro-1*H*-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-2-((3-(2-hidroxietoxi)-5-metoxifenil)amino)etanona (Compuesto **1**, 9.3 g) como una mezcla racémica.
- 35
- 40 La separación quiral de los enantiómeros del Compuesto **1** (9.3g) se realizó mediante HPLC quiral de fase normal (fase estacionaria: AS 20 µm (1 kg), fase móvil: 100% MeOH). Las fracciones del producto se combinaron y se evaporaron para proporcionar el enantiómero 1A (4.5 g) como el primer producto eluido y el enantiómero 1B (4.6 g) como el segundo producto eluido. Los enantiómeros 1A y 1B se obtuvieron como aceites pegajosos. El enantiómero

- 5 1A (4.5 g) se precipitó desde una solución en MeOH (20 mL) mediante la adición lenta de agua (11 mL). Después de agitar durante 30 min a temperatura ambiente un sólido blanco se filtró, se lavó con cantidades pequeñas de una mezcla de MeOH/agua (1/1) y se secó al vacío a 50°C para proporcionar el enantiómero **1A** (2.4 g) como un polvo amorfo blanco. El enantiómero **1B** (4.6 g) se solidificó mediante trituración del residuo aceitoso con una mezcla de MeOH (10 mL) y agua (15 mL) bajo agitación vigorosa durante 25 min. Los sólidos se filtraron y posteriormente se cristalizaron a partir de una mezcla de MeOH (70 mL) y agua (30 mL) bajo agitación a temperatura ambiente durante 3 h. Se filtró un precipitado blanco y se secó al vacío a 50°C para proporcionar el enantiómero **1B** (2.50 g) como un polvo amorfo blanco.

Compuesto 1:

- 10 ¹H RMN (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.64 (c, J=4.9 Hz, 2 H), 3.61 (s, 3 H), 3.76 - 3.90 (m, 2 H), 3.96 (s, 3 H), 4.80 (t, J=5.3 Hz, 1 H), 5.72 (t, J=2.2 Hz, 1 H), 5.94 (d, J=2.2 Hz, 2 H), 6.14 (d, J=8.0 Hz, 1 H), 6.38 (d, J=8.1 Hz, 1 H), 6.73 (td, J=8.4, 2.6 Hz, 1 H), 6.93 (dd, J=11.5, 2.4 Hz, 1 H), 7.06 (ddd, J=9.7, 8.8, 2.4 Hz, 1 H), 7.27 (dd, J=9.5, 2.2 Hz, 1 H), 7.37 (dd, J=8.6, 6.8 Hz, 1 H), 8.15 (dd, J=8.8, 5.9 Hz, 1 H), 8.43 (s, 1 H), 12.07 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-B): R_t 1.86 min, MH⁺ 483

- 15 **Enantiómero 1A:**

¹H RMN (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.60 (s, 3 H) 3.64 (m, J=6.60 Hz, 2 H) 3.73 - 3.90 (m, 2 H) 3.95 (s, 3 H) 4.80 (t, J=4.94 Hz, 1 H) 5.71 (s a., 1 H) 5.93 (s a., 2 H) 6.14 (d, J=7.95 Hz, 1 H) 6.38 (d, J=7.97 Hz, 1 H) 6.73 (t, J=8.41 Hz, 1 H) 6.93 (d, J=11.24 Hz, 1 H) 7.05 (t, J=9.02 Hz, 1 H) 7.27 (d, J=9.58 Hz, 1 H) 7.37 (t, J=7.70 Hz, 1 H) 8.09 - 8.19 (m, 1 H) 8.43 (s, 1 H) 12.06 (s, 1 H)

- 20 LC/MS (método LC-A): R_t 1.03 min, MH⁺ 483

[α]_D²⁰: +96.9° (c 0.389, DMF)

SFC quiral (método SFC-F): R_t 1.73 min, MH⁺ 483, pureza quiral 100%.

Enantiómero 1B:

- 25 ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.61 (s, 3 H) 3.64 (t, J=5.12 Hz, 2 H) 3.76 - 3.89 (m, 2 H) 3.95 (s, 3 H) 4.77 (s a, 1 H) 5.71 (t, J=2.01 Hz, 1 H) 5.94 (d, J=2.11 Hz, 2 H) 6.14 (d, J=7.97 Hz, 1 H) 6.35 (d, J=8.00 Hz, 1 H) 6.72 (td, J=8.49, 2.44 Hz, 1 H) 6.92 (dd, J=11.36, 2.48 Hz, 1 H) 7.05 (td, J=9.29, 2.38 Hz, 1 H) 7.26 (d, J=9.49 Hz, 1 H) 7.37 (dd, J=8.58, 6.88 Hz, 1 H) 8.14 (dd, J=8.77, 5.59 Hz, 1 H) 8.42 (s, 1 H) 12.08 (s a., 1 H)

LC/MS (método LC-A): R_t 1.03 min, MH⁺ 483

[α]_D²⁰: -100.0° (c 0.478, DMF)

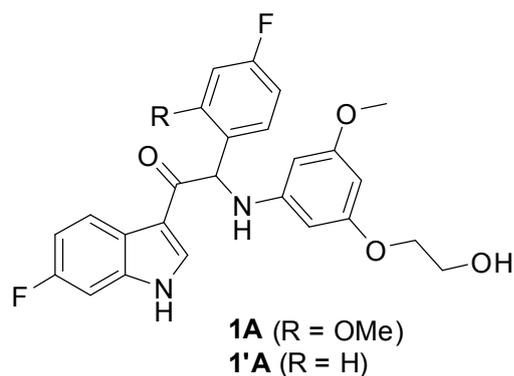
- 30 SFC quiral (método SFC-F): R_t 2.38 min, MH⁺ 483, pureza quiral 100%.

Ejemplo 1.1: Estabilidad quiral del enantiómero **1A** a pH 7.4

- 35 La estabilidad quiral del enantiómero **1A** (R = OMe) se evaluó mediante determinación del exceso enantiomérico (ee%) después de la incubación durante 24 h y 48 h en una solución tamponada a pH 7.4 a 40°C y 60°C. Para evaluar la influencia del sustituyente-metoxi del enantiómero **1A** (R = OMe) en la estabilidad contra racemización, la estabilidad quiral del enantiómero **1'A** (R = H) se evaluó bajo las mismas condiciones.

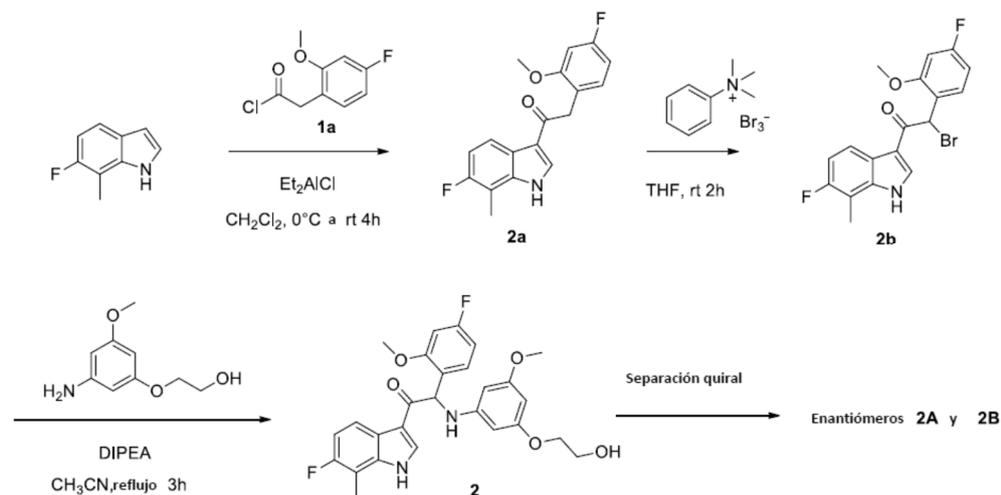
- 40 A esta altura, se prepararon (pH = 7.4) soluciones tamponadas 5 μM de 1A y 1'A mediante la mezcla de 25 μL de una solución 100 μM de **1A** o **1'A** en DMSO con tampón 475 μL acuoso pH 7.4. Se tomaron muestras 24 h y 48 h después de la incubación a 40°C y 60°C. Las muestras analíticas se analizaron mediante SFC quiral (detección MS) y la pureza quiral se expresó como el exceso enantiomérico (ee% = % enantiómero A - % enantiómero B). Ambos enantiómeros **1A** y **1'A** tuvieron una pureza quiral de 100% antes de

su incubación.



Compuesto	Temperatura	ee%	
		Tiempo de toma de muestra (h)	
1A	40°C	100	100
	60°C	100	96
	40°C	92	84
1'A	40°C	26	9

Ejemplo 2: Síntesis de 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-1-(6-fluoro-7-metil-1*H*-indol-3-il)-2-((3-(2-hidroxiethoxy)-5-metoxifenil)amino)etanona (Compuesto **2**) y separación quiral en enantiómeros **2A** y **2B**.



5 Síntesis del intermediario 2a:

Una solución agitada de 6-fluoro-7-metil-1*H*-indol [CAS 57817-10-4] (5.41 g, 36.2 mmol) en CH₂Cl₂ (100 mL) se enfrió en hielo bajo atmósfera-N₂. Una solución de cloruro de dietilaluminio 1M en hexano (54.4 mL, 54.4 mmol) se agregó por goteo. Después de 15 min a 0°C, una solución de cloruro de 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)acetilo **1a** (11.0 g, 54.4 mmol, para síntesis: véase Ejemplo 1) en CH₂Cl₂ (30 mL) se agregó por goteo mientras la temperatura interna se mantuvo por debajo de 5°C. El baño de hielo se eliminó y la suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla de reacción se vertió lentamente en una solución fría (0°C) saturada acuosa de NaHCO₃. La mezcla se filtró sobre dicalite® y la torta de filtrado se lavó con THF. Los filtrados combinados se extrajeron con EtOAc, se secaron sobre MgSO₄ y se evaporaron bajo presión reducida. El residuo se trituró con CH₂Cl₂ y los sólidos se filtraron para proporcionar 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-1-(6-fluoro-7-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **2a** (7.47 g) como un polvo blanco.

Síntesis del intermediario 2b:

Una solución agitada de 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-1-(6-fluoro-7-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **2a** (7.43 g, 23.56 mmol) en THF (100 mL) se enfrió a 0°C bajo atmósfera-N₂. Una solución de tribromuro de feniltrimetilamonio [CAS 4207-56-1] (8.96 g, 23.8 mmol) en THF (100 mL) se agregó por goteo. Después de la adición, la mezcla de reacción se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. La suspensión se filtró para eliminar los sólidos y el filtrado se evaporó bajo presión reducida. El residuo se trituró con CH₂Cl₂, los sólidos se filtraron y se secaron al vacío para proporcionar 2-bromo-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-1-(6-fluoro-7-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **2b** (8.95 g).

Síntesis de compuesto 2 y separación quiral de enantiómeros 2A y 2B:

2-bromo-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-1-(6-fluoro-7-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **2b** (3.30 g, 8.38 mmol), 2-(3-amino-5-metoxifenoxi)etanol [CAS 725237-16-1] (1.54 g, 8.38 mmol) y diisopropiletilamina (1.44 mL, 8.38 mmol) se mezclaron en CH₃CN (100 mL) y la mezcla se calentó bajo reflujo durante 3 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, el disolvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre sílice (fase estacionaria: HP-Spher 25 µm (340 g), fase móvil: gradiente heptano/EtOAc: 100/0 a 0/100). Las fracciones del producto se concentraron y se purificaron posteriormente mediante HPLC preparativa (fase estacionaria: Uptisphere® C18 ODB – 10 µm, 200 g, 5 cm, fase móvil: 0.25% NH₄HCO₃ solución en agua, CH₃CN). Las fracciones del producto se concentraron, se disolvieron en metanol y se concentraron nuevamente para proporcionar 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-1-(6-fluoro-7-metil-1*H*-indol-3-il)-2-((3-(2-hidroxi)etoxi)-5-metoxifenil)amino)etanona (Compuesto **2**, 1.4 g) como una mezcla racémica.

La separación quiral de los enantiómeros del compuesto 2 (1.18 g) se realizó mediante SFC preparativa (fase estacionaria: Quiralcel® Diacel® OD 20 x 250 mm, fase móvil: CO₂, EtOH con 0.2% *i*PrNH₂) y evaporación de las fracciones del producto bajo presión reducida. El primer enantiómero eluido se aisló como la sal del ácido clorhídrico mediante precipitación a partir de una mezcla de MeOH (30 mL), HCl 1N (5 mL) y agua (130 mL). Un precipitado blanco se formó después de la agitación durante la noche y se filtró y se secó al vacío a temperatura ambiente para proporcionar 328 mg de enantiómero **2A** (como la sal del ácido clorhídrico). El segundo enantiómero eluido se solidificó mediante liofilización a partir de una mezcla de CH₃CN/agua para proporcionar 385 mg de enantiómero **2B** como un polvo amorfo.

Compuesto 2:

¹H RMN (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.38 (d, J=1.62 Hz, 3 H) 3.61 (s, 3 H) 3.64 (c, J=5.12 Hz, 2 H) 3.76 - 3.89 (m, 2 H) 3.96 (s, 3 H) 4.79 (t, J=5.54 Hz, 1 H) 5.71 (t, J=2.11 Hz, 1 H) 5.95 (d, J=2.13 Hz, 2 H) 6.16 (d, J=7.95 Hz, 1 H) 6.36 (d, J=7.96 Hz, 1 H) 6.72 (td, J=8.49, 2.47 Hz, 1 H) 6.93 (dd, J=11.37, 2.49 Hz, 1 H) 7.01 (dd, J=10.29, 8.71 Hz, 1 H) 7.37 (dd, J=8.62, 6.85 Hz, 1 H) 7.96 (dd, J=8.73, 5.18 Hz, 1 H) 8.43 (s, 1 H) 12.19 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-A): R_t 1.08 min, MH⁺ 497

Enantiómero 2A:

¹H RMN (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.38 (d, J=0.22 Hz, 3 H) 3.61 (s, 3 H) 3.64 (t, J=5.21 Hz, 2 H) 3.83 (ct, J=10.02, 5.27 Hz, 2 H) 3.96 (s, 3 H) 5.71 (t, J=1.46 Hz, 1 H) 5.95 (d, J=2.11 Hz, 2 H) 6.16 (s a., 1 H) 6.36 (s a., 1 H) 6.72 (td, J=8.55, 2.62 Hz, 1 H) 6.93 (dd, J=11.33, 2.46 Hz, 1 H) 7.01 (t, J=9.49 Hz, 1 H) 7.37 (dd, J=8.64, 6.90 Hz, 1 H) 7.96 (dd, J=8.73, 5.39 Hz, 1 H) 8.43 (d, J=3.24 Hz, 1 H) 12.19 (d, J=2.95 Hz, 1 H)

LC/MS (método LC-A): R_t 1.08 min, MH⁺ 497

[α]_D²⁰: -82.7° (c 0.5055, DMF)

SFC quiral (método SFC-G): R_t 1.69 min, MH⁺ 497, pureza quiral 100%.

40 Análisis CHN: Calc. anal. para C₂₇H₂₆F₂N₂O₅.HCl: C, 60.85; H, 5.11; N, 5.26. Encontrados: C, 62.83; H, 5.02; N, 5.36.

Enantiómero 2B:

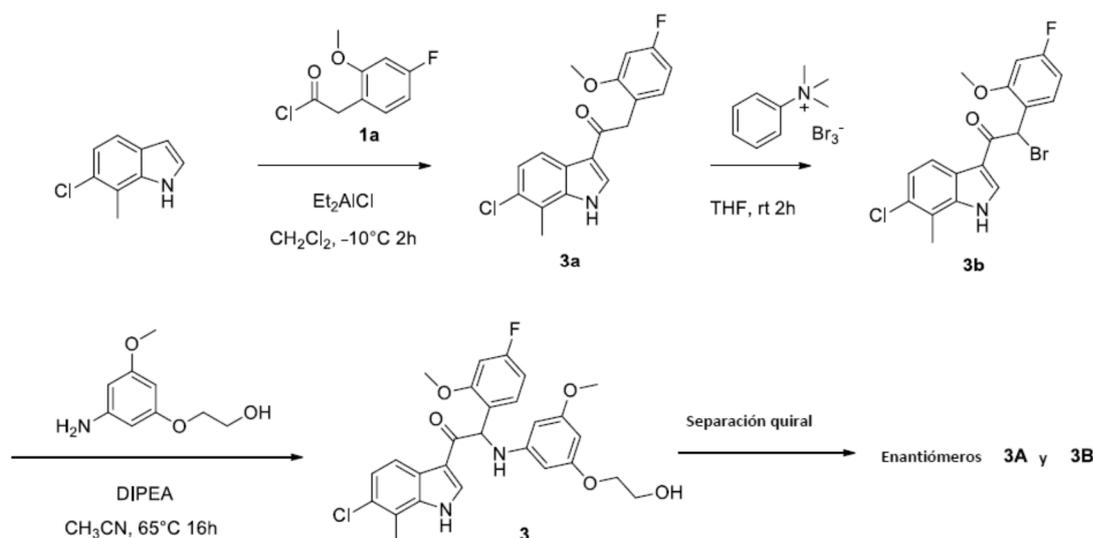
¹H RMN (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.38 (d, J=1.62 Hz, 3 H) 3.61 (s, 3 H) 3.64 (c, J=5.43 Hz, 2 H) 3.75 - 3.89 (m, 2 H) 3.96 (s, 3 H) 4.79 (t, J=5.58 Hz, 1 H) 5.71 (t, J=2.11 Hz, 1 H) 5.95 (d, J=2.20 Hz, 2 H) 6.16 (d, J=7.97 Hz, 1 H) 6.36 (d, J=8.00 Hz, 1 H) 6.72 (td, J=8.56, 2.56 Hz, 1 H) 6.93 (dd, J=11.37, 2.49 Hz, 1 H) 7.01 (dd, J=10.29, 8.72 Hz, 1 H) 7.37 (dd, J=8.68, 6.89 Hz, 1 H) 7.96 (dd, J=8.75, 5.21 Hz, 1 H) 8.43 (s, 1 H) 12.19 (s a., 1 H)

LC/MS (método LC-A): R_t 1.09 min, MH⁺ 497

[α]_D²⁰: +86.7° (c 0.5075, DMF)

SFC quiral (método SFC-G): R_t 2.88 min, MH⁺ 497, pureza quiral 100%.

50 Ejemplo 3: Síntesis de 1-(6-cloro-7-metil-1*H*-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-2-((3-(2-hidroxi)etoxi)-5-metoxifenil)amino)etanona (Compuesto **3**) y separación quiral en enantiómeros **3A** y **3B**.



Síntesis del intermediario 3a:

Una solución agitada de 6-cloro-7-metil-1*H*-indol [CAS 57817-09-1] (3.2 g, 19.3 mmol) en CH₂Cl₂ (150 mL) bajo corriente-N₂, se enfrió en un baño de enfriamiento de hielo-NaCl. Se agregó cloruro de dietilaluminio 1M en hexano (29 mL, 29 mmol) durante un periodo de 2 min y la solución fría se agitó a -10°C durante 30 min. Una solución de cloruro de 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)acetilo **1a** (5.48 g, 27.1 mmol, para síntesis: véase Ejemplo 1) en CH₂Cl₂ (30 mL) se agregó por goteo durante 30 min mientras la temperatura interna se mantuvo por debajo de -10°C y la mezcla resultante se agitó durante 2 h adicionales a -10°C. La reacción se inactivó mediante la adición lenta de una solución de tetrahidrato tartrato de potasio y sodio (sal de Rochelle) [CAS 6100-16-9] (10.9 g, 38.6 mmol) en agua (10 mL) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 15 min. Un precipitado blanco se presentó en la mezcla de reacción. El precipitado se aisló por filtración, se lavó con agua y se secó al vacío para proporcionar 1-(6-cloro-7-metil-1*H*-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)etanona **3a** (4200 mg) como un sólido blancuzco.

Síntesis del intermediario 3b:

Una solución de 1-(6-cloro-7-metil-1*H*-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)etanona **3a** (2000 mg, 6.03 mmol) en THF (120 mL) se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera-N₂. Una solución de tribromuro de feniltrimetilamonio [CAS 4207-56-1] (2.38 g, 6.33 mmol) en THF (35 mL) se agregó por goteo y la mezcla se agitó durante 90 min adicionales a temperatura ambiente. El precipitado se filtró y el filtrado se concentró al vacío para proporcionar 2-bromo-1-(6-cloro-7-metil-1*H*-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)etanona **3b** (2200 mg) como un polvo blancuzco.

Síntesis de compuesto 3 y separación quiral de enantiómeros 3A y 3B:

Se suspendió 2-bromo-1-(6-cloro-7-metil-1*H*-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)etanona **3b** (1.31 g, 2.23 mmol) en CH₃CN (60 mL). Se agregaron 2-(3-amino-5-metoxifenoxi)etanol [CAS 725237-16-1] (0.6 g, 2.46 mmol), y diisopropiletilamina (847 μL, 4.91 mmol) y la mezcla agitada se calentó a 65°C durante la noche. La mezcla se concentró al vacío y el residuo se repartió entre EtOAc y agua. La capa orgánica se separó, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se evaporó bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante HPLC preparativa (fase estacionaria: Uptisphere® C18 ODB – 10 μm, 200 g, 5 cm, fase móvil: 0.25% NH₄HCO₃ solución en agua, CH₃CN) para proporcionar 1-(6-cloro-7-metil-1*H*-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-2-((3-(2-hidroxietoxi)-5-metoxifenil)amino)etanona (Compuesto **3**, 590 mg) como una mezcla racémica.

La separación quiral de los enantiómeros del compuesto 3 (560 mg) se realizó utilizando separación quiral de fase normal (fase estacionaria: AS 5 μm, fase móvil: 100% MeOH, elución isocrática. Ancho de onda de detección 308 nm, flujo 1mL/min). Las fracciones del producto se combinaron y se evaporaron para proporcionar el enantiómero **3A** como el primer producto eluido y el enantiómero **3B** como el segundo producto eluido. Los enantiómeros **3A** y **3B** se obtuvieron como aceites pegajosos. Los enantiómeros se disolvieron en una mezcla MeOH/CH₂Cl₂ (1/1) y se evaporó bajo presión reducida para proporcionar el enantiómero **3A** (245 mg) y el enantiómero **3B** (263 mg) como polvos amorfos.

Compuesto 3:

¹H RMN (400 MHz, CLOROFORMO-*d*) δ ppm 2.48 (s, 3 H) 3.70 (s, 3 H) 3.88 - 3.92 (m, 2 H) 3.93 - 4.02 (m, 2 H) 4.03 (s, 3 H) 5.55 (s a, 1 H) 5.83 (t, J=2.20 Hz, 1 H) 5.89 (d, J=2.16 Hz, 2 H) 6.12 (s, 1 H) 6.54 - 6.66 (m, 2 H) 7.28 (d, J=7.80 Hz, 1 H) 7.33 (dd, J=8.55, 6.60 Hz, 1 H) 8.12 - 8.17 (m, 2 H) 8.59 (s a., 1 H)

LC/MS (método LC-B): R_t 2.08 min, MH^+ 513

Enantiómero 3A:

1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2.50 (s, 3 H) 3.61 (s, 3 H) 3.64 (c, $J=5.54$ Hz, 2 H) 3.77 - 3.90 (m, 2 H) 3.96 (s, 3 H) 4.78 (t, $J=5.40$ Hz, 1 H) 5.71 (t, $J=2.12$ Hz, 1 H) 5.95 (d, $J=2.13$ Hz, 2 H) 6.17 (d, $J=7.96$ Hz, 1 H) 6.35 (d, $J=7.96$ Hz, 1 H) 6.72 (td, $J=8.48, 2.49$ Hz, 1 H) 6.93 (dd, $J=11.35, 2.50$ Hz, 1 H) 7.21 (d, $J=8.61$ Hz, 1 H) 7.37 (dd, $J=8.60, 6.87$ Hz, 1 H) 7.98 (d, $J=8.50$ Hz, 1 H) 8.44 (s, 1 H) 12.23 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-A): R_t 1.12 min, MH^+ 513

$[\alpha]_D^{20}$: +95.2° (c 0.605, DMF)

SFC quiral (método SFC-H): R_t 3.21 min, MH^+ 513, pureza quiral 100%.

10 **Enantiómero 3B:**

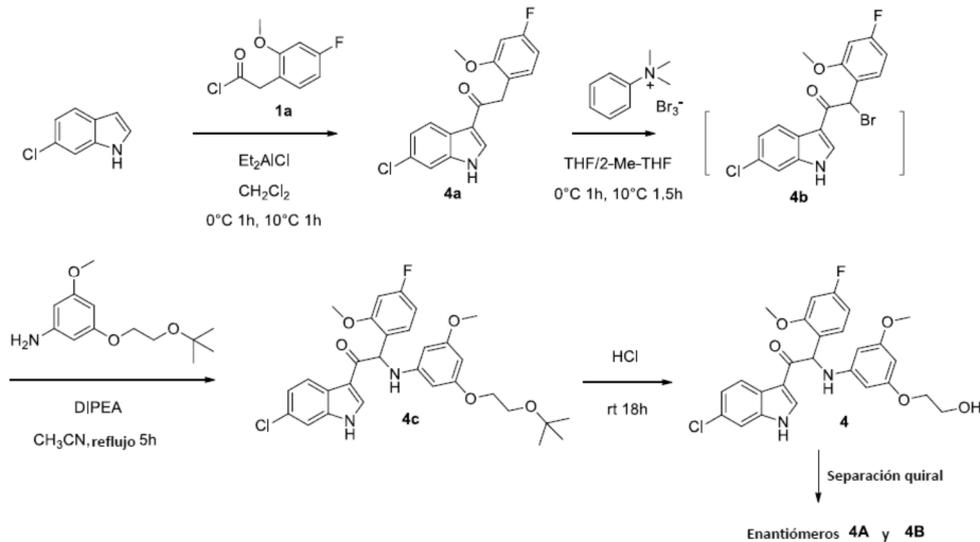
1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2.50 (s, 3 H) 3.61 (s, 3 H) 3.64 (c, $J=5.38$ Hz, 2 H) 3.76 - 3.90 (m, 2 H) 3.96 (s, 3 H) 4.77 (t, $J=5.51$ Hz, 1 H) 5.71 (t, $J=2.12$ Hz, 1 H) 5.95 (d, $J=2.13$ Hz, 2 H) 6.16 (d, $J=7.96$ Hz, 1 H) 6.35 (d, $J=7.96$ Hz, 1 H) 6.72 (td, $J=8.48, 2.49$ Hz, 1 H) 6.93 (dd, $J=11.35, 2.49$ Hz, 1 H) 7.21 (d, $J=8.51$ Hz, 1 H) 7.37 (dd, $J=8.60, 6.87$ Hz, 1 H) 7.98 (d, $J=8.50$ Hz, 1 H) 8.44 (s, 1 H) 12.23 (s, 1 H)

15 LC/MS (método LC-A): R_t 1.12 min, MH^+ 513

$[\alpha]_D^{20}$: -87.2° (c 0.625, DMF)

SFC quiral (método SFC-H): R_t 1.85 min, MH^+ 513, pureza quiral 100%.

Ejemplo 4: Síntesis de 1-(6-cloro-1H-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-2-((3-(2-hidroxi-etoxi)-5-metoxifenil)amino)etanona (Compuesto **4**) y separación quiral en enantiómeros **4A** y **4B**.



20

Síntesis del intermediario 4a:

Una solución agitada de 6-cloro-1H-indol [CAS 17422-33-2] (2.23 g, 14.7 mmol) en CH_2Cl_2 (125 mL) bajo corriente- N_2 , se enfrió a 0°C utilizando un baño de hielo. Una solución de cloruro de dietilaluminio 1M en hexano (22.1 mL, 22.1 mmol) se agregó por goteo y la mezcla se agitó durante 10 min a 0°C. Posteriormente, una solución de cloruro de 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)acetilo **1a** (4.47 g, 22.1 mmol, para síntesis: véase Ejemplo 1) en CH_2Cl_2 (30 mL) se agregó por goteo durante un periodo de 50 min y la mezcla resultante se mantuvo a 0°C durante 1 h y posteriormente se agitó a 10°C durante 1 h. Después de enfriarse a 0°C nuevamente, la reacción se inactivó mediante la adición lenta de una solución de tetrahidrato tartrato de potasio y sodio (sal de Rochelle) [CAS 6100-16-9] (8.31 g, 29.4 mmol) en agua (9 mL) y la mezcla se dejó calentar a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla de reacción se diluyó mediante la adición de 2-metil-THF (150 mL) y se agitó durante 30 min a temperatura ambiente. Se agregó Na_2SO_4 (30 g) y después de agitar durante 30 min, la mezcla se filtró sobre dicalite®. La torta de filtrado se lavó varias veces con 2-metil-THF y los filtrados combinados se concentraron al vacío a un volumen residual de 25 mL. Después de reposar durante 2 h, un precipitado se filtró y se secó al vacío para proporcionar 1-(6-cloro-1H-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)etanona **4a** (2.85 g).

30

Síntesis del intermediario 4c:

Una solución de 1-(6-cloro-1*H*-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)etanona **4a** (1 g, 3.15 mmol) en 2-metil-THF (50 mL) se agitó bajo corriente-N₂ y se enfrió en un baño de hielo. Una solución de tribromuro de feniltrimetilamonio [CAS 4207-56-1] (1.24 g, 3.31 mmol) en THF (10 mL) y 2-metil-THF (10 mL) se agregó por goteo y la mezcla se agitó a 0°C durante 1 h y posteriormente a 10°C durante 90 min. Posteriormente, una solución de 3-(2-(*tert*-butoxi)etoxi)-5-metoxianilina [CAS 1428973-39-0] (0.83 g, 3.46 mmol) y diisopropiletilamina (1.63 mL, 9.44 mmol) en CH₃CN (40 mL) se agregó por goteo y la mezcla de reacción se calentó bajo reflujo durante 90 min. Los disolventes se evaporaron bajo presión reducida. El residuo se recogió en CH₃CN (30 mL) y calentó bajo reflujo durante 5 h. Después de enfriar a temperatura ambiente, el disolvente se evaporó al vacío y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre sílice (fase estacionaria: Grace Reveleris® Sílice 80 g, fase móvil: gradiente heptano/EtOAc 100/0 a 0/100). Las fracciones deseadas se combinaron y se evaporaron, y se co-evaporaron con 1,4-dioxano para proporcionar 2-((3-(2-(*tert*-butoxi)etoxi)-5-metoxifenil)amino)-1-(6-cloro-1*H*-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)etanona **4c** (1.5 g, LC de pureza = 71%). El producto en bruto se utilizó como tal en la siguiente etapa.

Síntesis de compuesto 4 y separación quiral de enantiómeros 4A y 4B:

Se mezcló 2-((3-(2-(*tert*-Butoxi)etoxi)-5-metoxifenil)amino)-1-(6-cloro-1*H*-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)etanona **4c** (1.5 g, 1.92 mmol) con ácido clorhídrico 4M en dioxano (25 mL, 0.1 mol) y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. La mezcla se desgasificó y se vertió lentamente en una solución acuosa saturada de NaHCO₃. El producto se extrajo dos veces con 2-metil-THF y los extractos combinados se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se evaporaron. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre sílice (fase estacionaria: Biotage® SnapUltra Sílice 50 g, fase móvil: heptano/EtOAc/EtOH gradiente 100/0/0 a 60/30/10). Las fracciones deseadas se combinaron y se evaporaron y posteriormente purificaron mediante HPLC preparativa (fase estacionaria: Uptisphere® C18 ODB – 10 µm, 200 g, 5 cm, fase móvil: 0.25% NH₄HCO₃ solución en agua, CH₃CN). Las fracciones del producto se combinaron y se evaporaron. El residuo se coevaporó a partir de una mezcla de MeOH/CH₃CN para proporcionar racémico 1-(6-cloro-1*H*-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-2-((3-(2-hidroxietoxi)-5-metoxifenil)amino)etanona (Compuesto **4**, 500 mg) como un aceite.

Separación quiral de Compuesto **4** (500 mg) se realizó mediante separación quiral de fase normal (fase estacionaria: AS 20 µm, fase móvil: 100% MeOH). Las fracciones del producto se combinaron y se evaporaron. El primer producto eluido se purificó adicionalmente mediante cromatografía ultrarrápida sobre sílice (fase estacionaria: Biotage® SnapUltra Grace Reveleris® Sílice 12 g, fase móvil: gradiente heptano/EtOAc 100/0 a 0/100). Las fracciones del producto se combinaron, se evaporaron bajo presión reducida y posteriormente se co-evaporaron con CH₃CN. El residuo se solidificó mediante liofilización a partir de CH₃CN/agua para proporcionar el enantiómero **4A** (135 mg) como un polvo amorfo. El segundo producto eluido se purificó adicionalmente mediante cromatografía ultrarrápida sobre sílice (fase estacionaria: Biotage® SnapUltra GraceReveleris® Sílice 12 g, fase móvil: gradiente heptano/EtOAc 100/0 a 0/100). Las fracciones del producto se combinaron y se evaporaron bajo presión reducida. El residuo se solidificó mediante liofilización a partir de CH₃CN/agua para proporcionar el enantiómero **4B** (160 mg) como un polvo amorfo.

Compuesto 4:

LC/MS (método LC-B): R_t 1.99 min, MH⁺ 499

Enantiómero 4A:

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.61 (s, 3 H) 3.62 - 3.66 (m, 2 H) 3.77 - 3.89 (m, 2 H) 3.95 (s, 3 H) 4.76 (t, *J*=5.72 Hz, 1 H) 5.71 (t, *J*=2.12 Hz, 1 H) 5.93 (d, *J*=2.14 Hz, 2 H) 6.14 (d, *J*=7.97 Hz, 1 H) 6.35 (d, *J*=8.00 Hz, 1 H) 6.72 (td, *J*=8.49, 2.51 Hz, 1 H) 6.92 (dd, *J*=11.36, 2.52 Hz, 1 H) 7.20 (dd, *J*=8.53, 1.93 Hz, 1 H) 7.37 (dd, *J*=8.60, 6.88 Hz, 1 H) 7.52 (d, *J*=1.92 Hz, 1 H) 8.13 (d, *J*=8.51 Hz, 1 H) 8.44 (s, 1 H) 12.09 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-A): R_t 1.09 min, MH⁺ 499

[α]_D²⁰: +107.4° (c 0.565, DMF)

SFC quiral (método SFC-I): R_t 1.54 min, MH⁺ 499, pureza quiral 100%.

Enantiómero 4B:

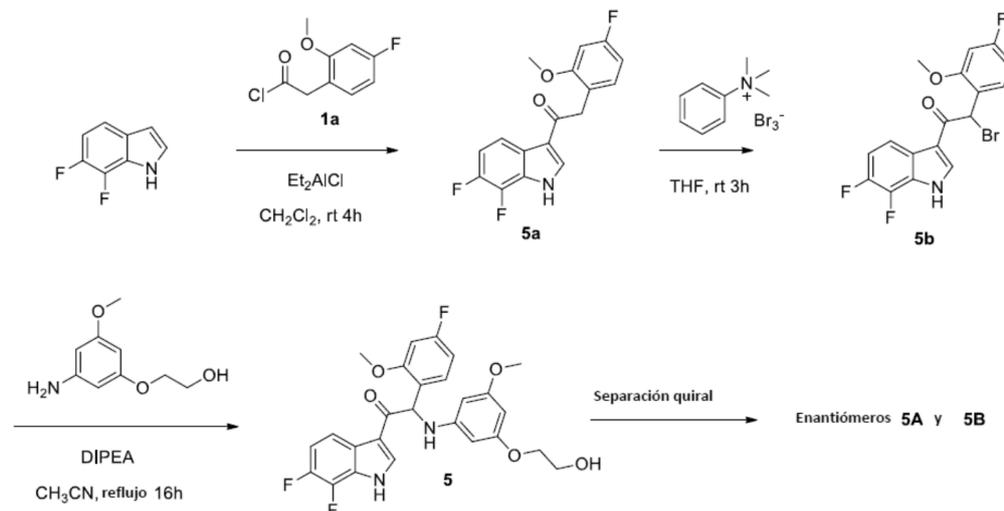
¹H RMN (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.61 (s, 3 H) 3.64 (t, *J*=4.93 Hz, 2 H) 3.76 - 3.90 (m, 2 H) 3.95 (s, 3 H) 4.80 (s a., 1 H) 5.71 (t, *J*=2.09 Hz, 1 H) 5.93 (d, *J*=2.12 Hz, 2 H) 6.14 (d, *J*=8.03 Hz, 1 H) 6.39 (d, *J*=8.05 Hz, 1 H) 6.73 (td, *J*=8.48, 2.46 Hz, 1 H) 6.93 (dd, *J*=11.37, 2.48 Hz, 1 H) 7.21 (dd, *J*=8.52, 1.94 Hz, 1 H) 7.37 (dd, *J*=8.59, 6.88 Hz, 1 H) 7.53 (d, *J*=1.93 Hz, 1 H) 8.14 (d, *J*=8.53 Hz, 1 H) 8.46 (s, 1 H) 12.12 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-A): R_t 1.08 min, MH⁺ 499

[α]_D²⁰: -102.6° (c 0.5295, DMF)

SFC quiral (método SFC-I): R_t 1.90 min, MH^+ 499, pureza quiral 100%.

Ejemplo 5: Síntesis de 1-(6,7-difluoro-1*H*-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-2-((3-(2-hidroxi-etoxi)-5-metoxifenil)amino)etanona (Compuesto **5**) y separación quiral en enantiómeros **5A** y **5B**.



5 Síntesis del intermediario **5a**:

Una solución de 6,7-difluoro-1*H*-indol [CAS 271780-84-8] (3.0 g, 19.6 mmol) en CH_2Cl_2 (75 mL) se agitó bajo N_2 y se enfrió en hielo. Una solución de cloruro de dietilaluminio 1M en hexano (30 mL, 30 mmol) se agregó por goteo y la mezcla se agitó durante 10 min a 0°C . Posteriormente, una solución de cloruro de 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)acetilo **1a** (5.0 g, 24.7 mmol, para síntesis: véase Ejemplo 1) en CH_2Cl_2 (15 mL) se agregó por goteo y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla de reacción se vertió lentamente en una solución fría (0°C) acuosa saturada de NaHCO_3 . La mezcla se filtró sobre dicalite® y la torta de filtrado se lavó con THF. A partir de los filtrados combinados, la capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se evaporó bajo presión reducida. El residuo sólido se trituró con CH_2Cl_2 , los sólidos se filtraron y se secó al vacío a 50°C para proporcionar 1-(6,7-difluoro-1*H*-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)etanona **5a** (4.46 g) como un polvo blanco.

15 Síntesis del intermediario **5b**:

Se suspendió 1-(6,7-difluoro-1*H*-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)etanona **5a** (4.45 g, 13.93 mmol) en THF (60 mL) y se enfrió en hielo bajo N_2 . Una solución de tribromuro de feniltrimetilamonio [CAS 4207-56-1] (5.30 g, 14.1 mmol) en THF (35 mL) se agregó por goteo y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. El precipitado se filtró y se lavó con THF. Los filtrados combinados se evaporaron bajo presión reducida. El residuo se trituró con una pequeña cantidad de CH_2Cl_2 , se filtró y se secó al vacío a 50°C para proporcionar 2-bromo-1-(6,7-difluoro-1*H*-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)etanona **5b** (4.10 g) como un polvo blanco.

Síntesis de compuesto **5** y separación quiral en enantiómeros **5A** y **5B**:

Una mezcla de 2-bromo-1-(6,7-difluoro-1*H*-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)etanona **5b** (4.10 g, 10.31 mmol), 2-(3-amino-5-metoxifenoxi)etanol [CAS 725237-16-1] (1.91 g, 10.43 mmol), y diisopropiletilamina (1.8 mL, 10.44 mmol) se agitó en CH_3CN y calentó bajo reflujo durante la noche. Después de enfriar a temperatura ambiente, los disolventes se evaporaron bajo presión reducida y el residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre sílice (fase estacionaria: Sílice 340 g HP-Spher 25 μm , fase móvil: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ gradiente 100/0 a 50/50). Las fracciones del producto se combinaron y se evaporaron bajo presión reducida. El residuo se purificó adicionalmente mediante HPLC preparativa (fase estacionaria: Uptisphere® C18 ODB – 10 μm , 200 g, 5 cm. Fase móvil: 0.25% NH_4HCO_3 solución en agua, MeOH). Las fracciones del producto se concentraron, se disolvieron en metanol y se concentraron nuevamente para producir 1-(6,7-difluoro-1*H*-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-2-((3-(2-hidroxi-etoxi)-5-metoxifenil)amino)etanona (Compuesto **5**, 1.62 g) como una mezcla racémica. Una pequeña fracción de esta partida se solidificó mediante liofilización a partir de una mezcla de CH_3CN /agua para proporcionar Compuesto **5** (65 mg) como un polvo amorfo blanco.

La separación quiral de Compuesto **5** (1.50 g) se realizó mediante SFC preparativa (fase estacionaria: Quiralcel® Diacel® OD 20 x 250 mm, fase móvil: CO_2 , EtOH con 0.2% $i\text{PrNH}_2$). Las fracciones del producto se combinaron y se evaporaron bajo presión reducida. El primer producto eluido se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna sobre sílice (fase estacionaria: Sílice 25 g HP-Spher 25 μm , fase móvil: $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ gradiente 100/0 a 0/100). Las fracciones del producto se concentraron a una cantidad residual de 2 mL. Un precipitado blanco se filtró, se lavó varias veces con CH_2Cl_2 y se secó al vacío a 50°C para proporcionar el enantiómero **5A** (414 mg) como un

polvo amorfo blanco. El segundo producto eluido se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna sobre sílice (fase estacionaria: Sílice 25 g HP-Spher 25 µm, fase móvil: CH₂Cl₂/MeOH gradiente 100/0 a 0/100). Las fracciones del producto se concentraron a una cantidad residual de 2 mL. Un precipitado blanco se filtró, se lavó varias veces con CH₂Cl₂ y se secó al vacío a 50°C para proporcionar el enantiómero **5B** (437 mg) como un polvo amorfo blanco.

Compuesto 5:

¹H RMN (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.61 (s, 3 H) 3.64 (c, *J*=5.36 Hz, 2 H) 3.74 - 3.89 (m, 2 H) 3.93 (s, 3 H) 4.79 (t, *J*=5.66 Hz, 1 H) 5.71 (t, *J*=2.01 Hz, 1 H) 5.94 (d, *J*=2.18 Hz, 2 H) 6.16 (d, *J*=8.06 Hz, 1 H) 6.38 (d, *J*=8.06 Hz, 1 H) 6.73 (td, *J*=8.42, 2.55 Hz, 1 H) 6.93 (dd, *J*=11.35, 2.55 Hz, 1 H) 7.18 - 7.27 (m, 1 H) 7.37 (dd, *J*=8.43, 6.95 Hz, 1 H) 7.92 (dd, *J*=8.60, 4.92 Hz, 1 H) 8.49 (s, 1 H) 12.76 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-A): R_t 1.07 min, MH⁺ 501

Enantiómero 5A:

¹H RMN (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.61 (s, 3 H) 3.64 (c, *J*=5.63 Hz, 2 H) 3.75 - 3.89 (m, 2 H) 3.94 (s, 3 H) 4.79 (t, *J*=5.53 Hz, 1 H) 5.71 (t, *J*=2.12 Hz, 1 H) 5.95 (d, *J*=2.22 Hz, 2 H) 6.16 (d, *J*=8.21 Hz, 1 H) 6.38 (d, *J*=8.11 Hz, 1 H) 6.73 (td, *J*=8.52, 2.53 Hz, 1 H) 6.93 (dd, *J*=11.35, 2.62 Hz, 1 H) 7.19 - 7.27 (m, 1 H) 7.37 (dd, *J*=8.55, 6.88 Hz, 1 H) 7.92 (dd, *J*=8.94, 4.36 Hz, 1 H) 8.49 (s, 1 H) 12.77 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-A): R_t 1.07 min, MH⁺ 501

[α]_D²⁰: -88.3° (c 0.506, DMF)

SFC quiral (método SFC-J): R_t 2.46 min, MH⁺ 501, pureza quiral 100%.

Enantiómero 5B:

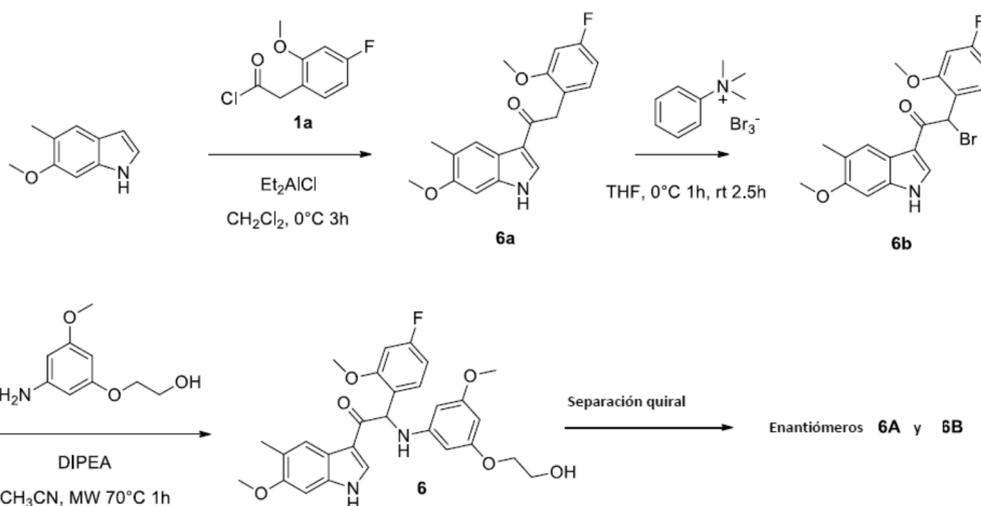
¹H RMN (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.61 (s, 3 H) 3.64 (c, *J*=5.05 Hz, 2 H) 3.76 - 3.89 (m, 2 H) 3.94 (s, 3 H) 4.79 (t, *J*=5.55 Hz, 1 H) 5.71 (t, *J*=2.16 Hz, 1 H) 5.95 (d, *J*=2.07 Hz, 2 H) 6.16 (d, *J*=8.09 Hz, 1 H) 6.38 (d, *J*=8.15 Hz, 1 H) 6.73 (td, *J*=8.43, 2.69 Hz, 1 H) 6.93 (dd, *J*=11.35, 2.67 Hz, 1 H) 7.16 - 7.28 (m, 1 H) 7.37 (dd, *J*=8.55, 6.87 Hz, 1 H) 7.92 (dd, *J*=8.92, 4.37 Hz, 1 H) 8.49 (s, 1 H) 12.77 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-A): R_t 1.07 min, MH⁺ 501

[α]_D²⁰: +90.3° (c 0.523, DMF)

SFC quiral (método SFC-J): R_t 4.27 min, MH⁺ 501, pureza quiral 100%.

Ejemplo 6: Síntesis de 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-2-((3-(2-hidroxietoxi)-5-metoxifenil)amino)-1-(6-metoxi-5-metil-1*H*-indol-3-il)etanona (Compuesto **6**) y separación quiral en enantiómeros **6A** y **6B**.



Síntesis del intermediario 6a:

Se agregó cloruro de dietilaluminio 1M en hexano (18.6 mL, 18.6 mmol) por goteo a 0°C a una solución de 6-metoxi-5-metil-1*H*-indol [CAS 1071973-95-9] (2 g, 12.4 mmol) en CH₂Cl₂ (60 mL). Después de 30 min a 0°C, se agregó lentamente cloruro de 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)acetilo **1a** (3.3 g, 16.3 mmol, para síntesis: véase Ejemplo 1) en

CH₂Cl₂ (60 mL) a 0°C. La reacción se agitó a 0°C durante 3 h. Se agregó hielo-agua y el precipitado se filtró, se lavó con agua, y se secó al vacío para proporcionar 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-1-(6-metoxi-5-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **6a** (3.15 g).

Síntesis del intermediario **6b**:

- 5 A 0°C, se agregó una solución de tribromuro de feniltrimetilamonio [CAS 4207-56-1] (3.8 g, 10.1 mmol) en THF (90 mL) por goteo a una mezcla de 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-1-(6-metoxi-5-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **6a** (3.15 g, 9.6 mmol) en THF (90 mL). La mezcla se agitó a 0°C durante 1 h y a temperatura ambiente durante 2.5 h. El precipitado se filtró y se lavó con EtOAc. El filtrado se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se recogió con una cantidad mínima de CH₃CN y diisopropiléter. El precipitado se filtró y se secó al vacío para proporcionar 2-bromo-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-1-(6-metoxi-5-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **6b** (2.8 g).

Síntesis de compuesto **6** y separación quiral en enantiómeros **6A** y **6B**:

- 15 Una mezcla de 2-bromo-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-1-(6-metoxi-5-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **6b** (1.0 g, 2.46 mmol), 2-(3-amino-5-metoxifenoxi)etanol [CAS 725237-16-1] (676 mg, 3.69 mmol) y diisopropiletilamina (0.64 mL, 3.69 mmol) en CH₃CN (10 mL) y THF (10 mL) se calentó a 70°C durante 1 h utilizando un microondas Biotage® Initiator EXP 60 con un una salida de energía que varía entre 0 a 400W (tiempo de retención fijo). El disolvente se evaporó bajo presión reducida. El residuo se recogió con EtOAc. La capa orgánica se lavó dos veces con HCl 1N, se lavó con agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró y el disolvente se concentró bajo presión reducida. La purificación se llevó a cabo mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (15-40 µm, 40 g, CH₂Cl₂/CH₃OH 99.5/0.5). Las fracciones puras se recogieron y se evaporaron a sequedad para proporcionar 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-2-((3-(2-hidroxietoxi)-5-metoxifenil)amino)-1-(6-metoxi-5-metil-1*H*-indol-3-il)etanona (Compuesto **6**, 330 mg) como una mezcla racémica. Esta fracción se combinó con otra partida de Compuesto **6** (60 mg) antes de separación quiral.

- 25 La separación quiral de Compuesto **6** (390 mg) se realizó mediante SFC preparativa quiral (fase estacionaria: Quiralpak® IC 5 µm 250 x 30 mm, fase móvil: 70% CO₂, 30% MeOH) para producir 137 mg del primer enantiómero eluido y 146 mg del segundo enantiómero eluido. El primer enantiómero eluido se combinó con otra partida (fracción 1, cantidad total: 246 mg). El segundo enantiómero eluido se combinó con otra partida (fracción 2, cantidad total: 245 mg). La fracción 1 se purificó nuevamente mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (15-40 µm, 12 g, CH₂Cl₂/CH₃OH 99.5/0.5). Las fracciones puras se recogieron y se evaporaron a sequedad para proporcionar 207 mg. El compuesto se solidificó a partir de Et₂O/heptano y algunas gotas de CH₃CN para proporcionar el enantiómero **6A** (173 mg) como un polvo amorfo. La fracción 2 se purificó nuevamente mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (15-40 µm, 12 g, CH₂Cl₂/CH₃OH 99.5/0.5). Las fracciones puras se recogieron y se evaporaron a sequedad para proporcionar 204 mg. El compuesto se solidificó a partir de Et₂O/heptano y algunas gotas de CH₃CN para proporcionar el enantiómero **6B** (158 mg) como un polvo amorfo.

Compuesto **6**:

- 35 ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.20 (s, 3 H) 3.60 (s, 3 H) 3.64 (c, *J*=5.4 Hz, 2 H) 3.77- 3.87 (m, 5 H) 3.96 (s, 3 H) 4.79 (t, *J*=5.5 Hz, 1 H) 5.70 (t, *J*=2.0 Hz, 1 H) 5.92 (d, *J*=1.6 Hz, 2 H) 6.10 (d, *J*=7.9 Hz, 1 H) 6.31 (d, *J*=7.9 Hz, 1 H) 6.72 (td, *J*=8.5, 2.2 Hz, 1 H) 6.89 - 6.95 (m, 2 H) 7.32 - 7.38 (m, 1 H) 7.89 (s, 1 H) 8.22 (s, 1 H) 11.74 (s a., 1 H)

LC/MS (método LC-C): R_t 2.89 min, MH⁺ 509

Enantiómero **6A**:

- 40 ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.20 (s, 3 H) 3.55 - 3.68 (m, 5 H) 3.74 - 3.91 (m, 5 H) 3.96 (s, 3 H) 4.78 (t, *J*=5.5 Hz, 1 H) 5.70 (t, *J*=2.0 Hz, 1 H) 5.92 (d, *J*=2.0 Hz, 2 H) 6.10 (d, *J*=7.9 Hz, 1 H) 6.29 (d, *J*=7.9 Hz, 1 H) 6.67 - 6.76 (m, 1 H) 6.88 - 6.96 (m, 2 H) 7.36 (dd, *J*=8.5, 6.9 Hz, 1 H) 7.89 (s, 1 H) 8.22 (s, 1 H) 11.73 (s a., 1 H)

LC/MS (método LC-C): R_t 2.88 min, MH⁺ 509

[α]_D²⁰: +116.9° (c 0.278, DMF)

SFC quiral (método SFC-A): R_t 4.07 min, MH⁺ 509, pureza quiral 100%.

Enantiómero **6B**:

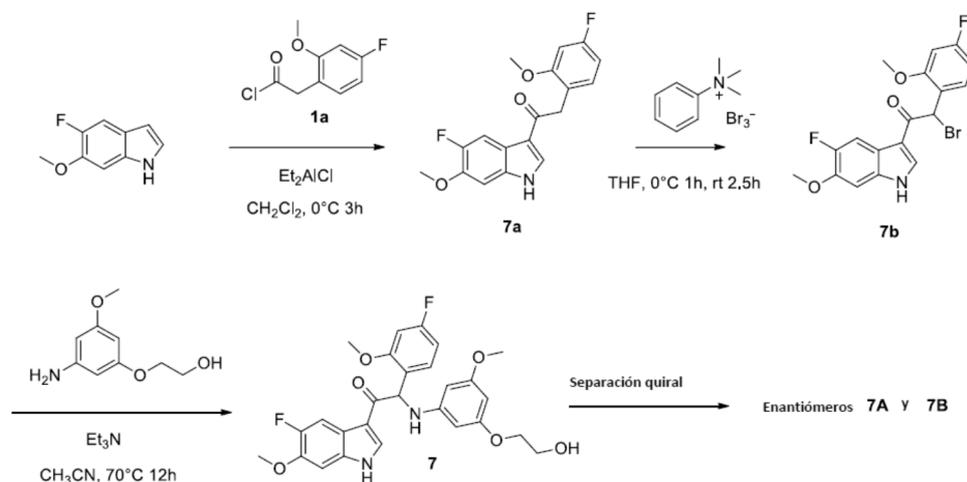
- 45 ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.20 (s, 3 H) 3.55 - 3.67 (m, 5 H) 3.75 - 3.90 (m, 5 H) 3.96 (s, 3 H) 4.78 (t, *J*=5.5 Hz, 1 H) 5.70 (t, *J*=2.0 Hz, 1 H) 5.92 (d, *J*=2.0 Hz, 2 H) 6.10 (d, *J*=7.9 Hz, 1 H) 6.29 (d, *J*=7.9 Hz, 1 H) 6.71 (td, *J*=8.5, 2.4 Hz, 1 H) 6.87 - 6.97 (m, 2 H) 7.36 (dd, *J*=8.5, 6.9 Hz, 1 H) 7.89 (s, 1 H) 8.22 (s, 1 H) 11.73 (s a., 1 H)

LC/MS (método LC-C): R_t 2.88 min, MH⁺ 509

- 50 [α]_D²⁰: -118.6° (c 0.279, DMF)

SFC quiral (método SFC-A): R_t 7.13 min, MH⁺ 509, pureza quiral 100%.

Ejemplo 7: Síntesis de 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-1-(5-fluoro-6-metoxi-1*H*-indol-3-il)-2-((3-(2-hidroxietoxi)-5-metoxifenil)amino)etanona (Compuesto **7**) y separación quiral en enantiómeros **7A** y **7B**.



Síntesis del intermediario **7a**:

- 5 Se agregó cloruro de dietilaluminio 1M en hexano (20 mL, 20 mmol) por goteo a 0°C a una solución de 5-fluoro-6-metoxi-1*H*-indol [CAS 1211595-72-0] (2.2 g, 13.3 mmol) en CH₂Cl₂ (60 mL). Después de 30 min a 0°C, se agregó lentamente cloruro de 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)acetilo **1a** (3.85 g, 19 mmol, para síntesis: véase Ejemplo 1) en CH₂Cl₂ (60 mL) a 0°C. La reacción se agitó a 0°C durante 3 h. Se agregaron hielo-agua y una solución acuosa de NaHCO₃. La mezcla de reacción se extrajo con CH₂Cl₂/MeOH. La capa orgánica se lavó con agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró, y el disolvente se concentró bajo presión reducida. El residuo se recogió con una cantidad mínima de CH₂Cl₂. El precipitado se filtró y se secó para proporcionar 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-1-(5-fluoro-6-metoxi-1*H*-indol-3-il)etanona **7a** (3.2 g).

Síntesis del intermediario **7b**:

- 15 A 0°C, una solución de tribromuro de feniltrimetilamonio [CAS 4207-56-1] (3.22 g, 8.56 mmol) en THF (80 mL) se agregó por goteo a una mezcla de 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-1-(5-fluoro-6-metoxi-1*H*-indol-3-il)etanona **7a** (2.7 g, 8.15 mmol) en THF (80 mL). La mezcla se agitó a 0°C durante 1 h y a temperatura ambiente durante 2.5 h. El precipitado se filtró, se lavó con EtOAc y agua y se secó para proporcionar una primera partida de 2-bromo-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-1-(5-fluoro-6-metoxi-1*H*-indol-3-il)etanona **7b** (1.5 g). La capa orgánica del filtrado se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se recogió con una cantidad mínima de CH₃CN y diisopropiléter. El precipitado se filtró y se secó al vacío para proporcionar una segunda partida de **7b** (1.7 g).

Síntesis de compuesto **7** y separación quiral en enantiómeros **7A** y **7B**:

- 25 Una mezcla de 2-bromo-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-1-(5-fluoro-6-metoxi-1*H*-indol-3-il)etanona **7b** (0.8 g, 1.95 mmol), 2-(3-amino-5-metoxifenoxi)etanol [CAS 725237-16-1] (0.39 g, 2.15 mmol) y trietilamina (0.54 mL, 3.9 mmol) en THF (5 mL) y CH₃CN (5 mL) se agitó a 70°C durante 12 h. El residuo se diluyó con CH₂Cl₂ y H₂O. La capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró, y el disolvente se evaporó bajo presión reducida. El compuesto bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (15-40 μm, 40 g en CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH (99/1/0.1)). Las fracciones que contenían Compuesto **7** se combinaron y el disolvente se evaporó bajo presión reducida. El residuo se disolvió en CH₂Cl₂ y se lavó con HCl 1N. La capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró y el disolvente se concentró bajo presión reducida. Se realizó una segunda purificación mediante HPLC de fase inversa (fase estacionaria: X-Bridge®-C18 5 μm 30 x 150 mm, fase móvil: gradiente de 60% NH₄HCO₃ 0.5% / 40% MeOH a 0% NH₄HCO₃ 0.5% / 100% MeOH) para proporcionar 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-1-(5-fluoro-6-metoxi-1*H*-indol-3-il)-2-((3-(2-hidroxietoxi)-5-metoxifenil)amino)etanona (Compuesto **7**, 350 mg) como una mezcla racémica. Los enantiómeros se separaron mediante SFC preparativa quiral (fase estacionaria: Quiralpak® IC 5 μm 250 x 30 mm, fase móvil: 60% CO₂, 40% MeOH) para proporcionar 70 mg de Compuesto **2** como una mezcla racémica, 104 mg del primer enantiómero eluido y 100 mg del segundo enantiómero eluido. El primer enantiómero eluido se cristalizó a partir de CH₃CN/Et₂O para proporcionar el enantiómero **7A** (76 mg). El segundo enantiómero eluido se cristalizó a partir de CH₃CN/Et₂O para proporcionar el enantiómero **7B** (62 mg).

Compuesto **7**:

- 40 ¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.56 - 3.68 (m, 5 H) 3.76 - 3.88 (m, 5 H) 3.95 (s, 3 H) 4.78 (t, *J*=5.4 Hz, 1 H) 5.70 (s, 1 H) 5.92 (s, 2 H) 6.11 (d, *J*=7.9 Hz, 1 H) 6.35 (d, *J*=7.9 Hz, 1 H) 6.72 (td, *J*=8.4, 2.0 Hz, 1 H) 6.92 (dd,

$J=11.0$, 1.9 Hz, 1 H) 7.14 (d, $J=7.6$ Hz, 1 H) 7.36 (t, $J=7.7$ Hz, 1 H) 7.81 (d, $J=12.0$ Hz, 1 H) 8.33 (s, 1 H) 11.93 (s a., 1 H)

LC/MS (método LC-C): R_t 2.74 min, MH^+ 513

Enantiómero 7A:

- 5 1H RMN (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm 3.59 - 3.67 (m, 5 H) 3.77 - 3.88 (m, 5 H) 3.95 (s, 3 H) 4.78 (t, $J=5.5$ Hz, 1 H) 5.71 (t, $J=1.6$ Hz, 1 H) 5.92 (d, $J=1.6$ Hz, 2 H) 6.11 (d, $J=7.9$ Hz, 1 H) 6.35 (d, $J=7.9$ Hz, 1 H) 6.72 (td, $J=8.4$, 2.2 Hz, 1 H) 6.92 (dd, $J=11.3$, 2.2 Hz, 1 H) 7.14 (d, $J=7.3$ Hz, 1 H) 7.31 - 7.41 (m, 1 H) 7.81 (d, $J=11.7$ Hz, 1 H) 8.33 (s, 1 H) 11.71 - 12.11 (m, 1 H)

LC/MS (método LC-C): R_t 2.74 min, MH^+ 513

- 10 $[\alpha]_D^{20}$: +85.7° (c 0.28, DMF)

SFC quiral (método SFC-B): R_t 1.87 min, MH^+ 513, pureza quiral 100%.

Punto de fusión: 226°C

Enantiómero 7B:

- 15 1H RMN (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm 3.58 - 3.66 (m, 5 H) 3.76 - 3.87 (m, 5 H) 3.95 (s, 3 H) 4.78 (t, $J=5.5$ Hz, 1 H) 5.70 (t, $J=1.6$ Hz, 1 H) 5.92 (d, $J=1.6$ Hz, 2 H) 6.11 (d, $J=7.9$ Hz, 1 H) 6.35 (d, $J=7.9$ Hz, 1 H) 6.72 (td, $J=8.4$, 2.2 Hz, 1 H) 6.92 (dd, $J=11.3$, 2.2 Hz, 1 H) 7.14 (d, $J=7.3$ Hz, 1 H) 7.36 (t, $J=7.7$ Hz, 1 H) 7.81 (d, $J=11.7$ Hz, 1 H) 8.33 (s, 1 H) 11.92 (s a., 1 H)

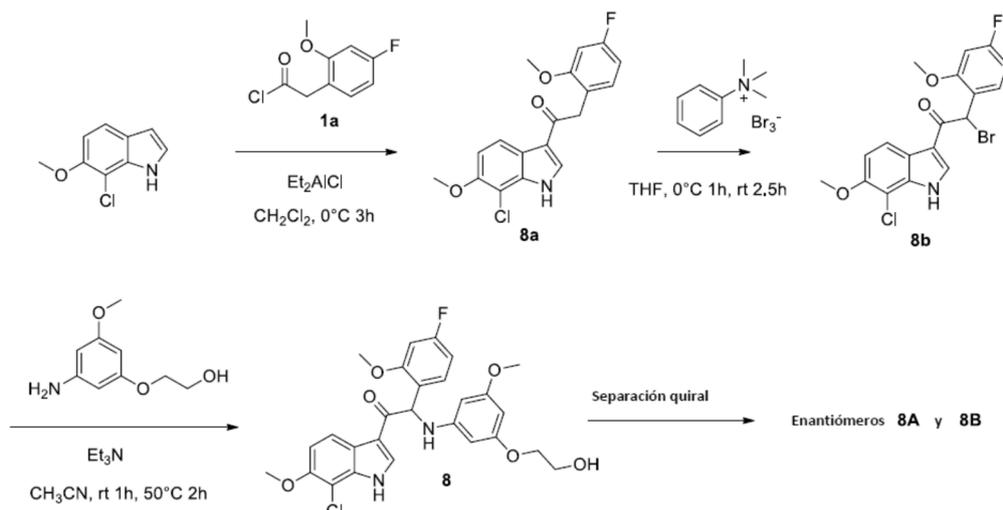
LC/MS (método LC-C): R_t 2.74 min, MH^+ 513

$[\alpha]_D^{20}$: -87.6° (c 0.283, DMF)

- 20 SFC quiral (método SFC-B): R_t 3.24 min, MH^+ 513, pureza quiral 100%.

Punto de fusión: 226°C

Ejemplo 8: Síntesis de 1-(7-cloro-6-metoxi-1*H*-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-2-((3-(2-hidroxi-etoxi)-5-metoxifenil)amino)etanona (Compuesto **8**) y separación quiral en enantiómeros **8A** y **8B**.



25 Síntesis del intermediario 8a:

Se agregó cloruro de dietilaluminio 1M en hexano (16.5 mL, 16.5 mmol) por goteo a 0°C a una solución de 7-cloro-6-metoxi-1*H*-indol [CAS 1227604-21-8] (2 g, 11 mmol) en CH_2Cl_2 (60 mL). Después de 30 min a 0°C, cloruro de 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)acetilo **1a** (3.3 g, 16.3 mmol, para síntesis: véase Ejemplo 1) en CH_2Cl_2 (60 mL) se agregó lentamente a 0°C. La reacción se agitó a 0°C durante 3 h. Se agregó hielo-agua y el precipitado se filtró, se lavó con agua, y se secó al vacío para proporcionar 1-(7-cloro-6-metoxi-1*H*-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)etanona **8a** (2.7 g).

30 Síntesis del intermediario 8b:

A 0°C, una solución de tribromuro de feniltrimetilamonio [CAS 4207-56-1] (3.06 g, 8.15 mmol) en THF (80 mL) se

agregó por goteo a una mezcla de 1-(7-cloro-6-metoxi-1*H*-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)etanona **8a** (2.7 g, 7.76 mmol) en THF (80 mL). La mezcla se agitó a 0°C durante 1 h y a temperatura ambiente durante 2.5 h. El precipitado se filtró, se lavó con EtOAc. El filtrado se concentró bajo presión reducida, se solubilizó nuevamente en EtOAc y se lavó con agua. La capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró bajo presión reducida. El residuo resultante se recogió con una cantidad mínima de CH₃CN y diisopropiléter. El precipitado se filtró y se secó al vacío para proporcionar 2-bromo-1-(7-cloro-6-metoxi-1*H*-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)etanona **8b** (3.2 g).

Síntesis de compuesto **8** y separación quiral en enantiómeros **8A** y **8B**:

Una mezcla de 2-bromo-1-(7-cloro-6-metoxi-1*H*-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)etanona **8b** (2 g, 4.69 mmol), 2-(3-amino-5-metoxifenoxi)etanol [CAS 725237-16-1] (0.86 g, 4.69 mmol) y trietilamina (1.3 mL, 9.4 mmol) en CH₃CN (100 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 1 h, y posteriormente a 50°C durante 2 h. El producto en bruto se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (15-40 µm, 80 g) en tolueno/2-propanol/NH₄OH (90/10/0.1) para proporcionar 800 mg de Compuesto en bruto **8**. Parte de esta partida se cristalizó a partir de diisopropiléter para proporcionar una primera partida de 1-(7-cloro-6-metoxi-1*H*-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-2-((3-(2-hidroxietoxi)-5-metoxifenil)amino)etanona (Compuesto **8**, 90 mg). La purificación del material restante del Compuesto en bruto **8** se realizó mediante cromatografía en columna (fase estacionaria: sílice irregular en columna 40 g, fase móvil: 0.3% NH₄OH, 97% CH₂Cl₂, 3% MeOH) para proporcionar Compuesto **8** (500 mg) como una mezcla racémica.

Los enantiómeros se separaron mediante SFC quiral (fase estacionaria: Quiralpak® IC 5 µm 250 x 30 mm, fase móvil: 55% CO₂, 45% MeOH) para proporcionar 184 mg del primer enantiómero eluido y 190 mg del segundo enantiómero eluido. El primer enantiómero eluido se cristalizó a partir de heptano/diisopropiléter/CH₃CN para proporcionar el enantiómero **8A** (135 mg) como un sólido amorfo. El segundo enantiómero eluido se cristalizó a partir de heptano/diisopropiléter/CH₃CN para proporcionar el enantiómero **8B** (150 mg) como un sólido amorfo.

Compuesto **8**:

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.59 - 3.67 (m, 5 H) 3.77 - 3.90 (m, 5 H) 3.95 (s, 3 H) 4.78 (t, J=5.4 Hz, 1 H) 5.71 (s, 1 H) 5.94 (d, J=1.6 Hz, 2 H) 6.14 (d, J=8.2 Hz, 1 H) 6.35 (d, J=7.9 Hz, 1 H) 6.72 (td, J=8.5, 2.2 Hz, 1 H) 6.93 (dd, J=11.3, 2.2 Hz, 1 H) 7.10 (d, J=8.8 Hz, 1 H) 7.32 - 7.40 (m, 1 H) 8.04 (d, J=8.8 Hz, 1 H) 8.33 (s, 1 H) 12.16 (s a., 1 H)

LC/MS (método LC-C): R_t 2.89 min, MH⁺ 529

Enantiómero **8A**:

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.54 - 3.68 (m, 5 H) 3.73 - 3.90 (m, 5 H) 3.95 (s, 3 H) 4.78 (t, J=5.6 Hz, 1 H) 5.71 (t, J=2.0 Hz, 1 H) 5.94 (d, J=2.0 Hz, 2 H) 6.14 (d, J=8.1 Hz, 1 H) 6.36 (d, J=8.1 Hz, 1 H) 6.72 (td, J=8.5, 2.3 Hz, 1 H) 6.93 (dd, J=11.1, 2.3 Hz, 1 H) 7.10 (d, J=8.6 Hz, 1 H) 7.36 (dd, J=8.6, 7.1 Hz, 1 H) 8.04 (d, J=8.6 Hz, 1 H) 8.33 (s, 1 H) 12.03 - 12.26 (m, 1 H)

LC/MS (método LC-C): R_t 2.88 min, MH⁺ 529

[α]_D²⁰: +84.3° (c 0.267, DMF)

SFC quiral (método SFC-C): R_t 4.82 min, MH⁺ 529, pureza quiral 100%.

Enantiómero **8B**:

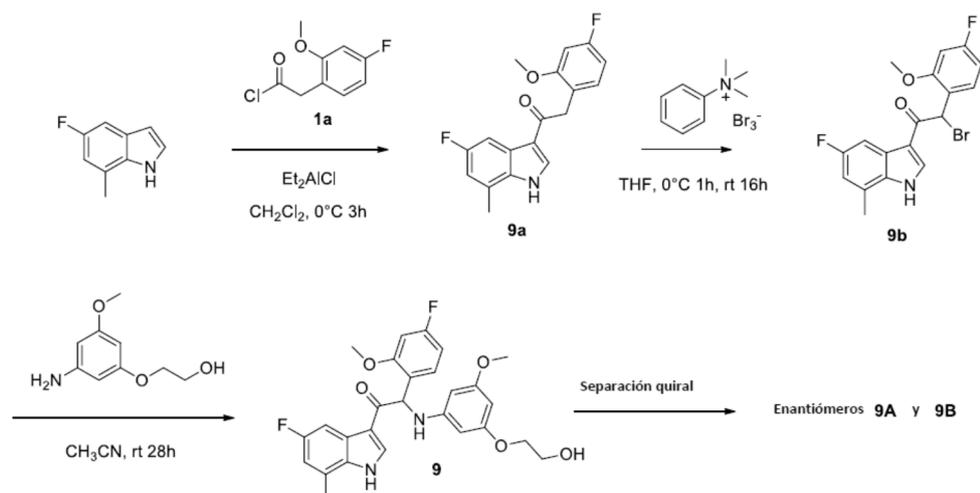
¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.58 - 3.68 (m, 5 H) 3.76 - 3.90 (m, 5 H) 3.95 (s, 3 H) 4.78 (t, J=5.6 Hz, 1 H) 5.71 (s, 1 H) 5.94 (s, 2 H) 6.14 (d, J=8.1 Hz, 1 H) 6.35 (d, J=8.1 Hz, 1 H) 6.72 (td, J=8.5, 2.3 Hz, 1 H) 6.93 (dd, J=11.1, 2.3 Hz, 1 H) 7.10 (d, J=8.6 Hz, 1 H) 7.31 - 7.41 (m, 1 H) 8.04 (d, J=8.6 Hz, 1 H) 8.33 (s, 1 H) 12.06 - 12.31 (m, 1 H)

LC/MS (método LC-C): R_t 2.88 min, MH⁺ 529

[α]_D²⁰: -84.7° (c 0.268, DMF)

SFC quiral (método SFC-C): R_t 6.42 min, MH⁺ 529, pureza quiral 99.36%.

Ejemplo 9: Síntesis de 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-1-(5-fluoro-7-metil-1*H*-indol-3-il)-2-((3-(2-hidroxietoxi)-5-metoxifenil)amino)etanona (Compuesto **9**) y separación quiral en enantiómeros **9A** y **9B**.



Síntesis del intermediario 9a:

Se agregó cloruro de dietilaluminio 1M en hexano (22 mL, 22 mmol) por goteo a 0°C a una solución de 5-fluoro-7-metil-1*H*-indol [CAS 1082041-52-8] (1.62 g, 10.9 mmol) en CH₂Cl₂ (45 mL). Después de 30 min a 0°C, una solución de cloruro de 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)acetilo **1a** (3.3 g, 16.3 mmol, para síntesis: véase Ejemplo 1) en CH₂Cl₂ (30 mL) se agregó lentamente a 0°C. La reacción se agitó a 0°C durante 3 h. Se agregó solución de sal de Rochelle (1N, 75 mL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El precipitado se filtró y se repartió entre en EtOAc y HCl 1N. La fase orgánica se lavó con HCl 1N y salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró bajo presión reducida. El residuo se recogió con a minimum amount of EtOAc. El precipitado se filtró para proporcionar 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-1-(5-fluoro-7-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **9a** (2.4 g).

Síntesis del intermediario 9b:

Una solución de tribromuro de feniltrimetilamonio [CAS 4207-56-1] (2.2 g, 5.85 mmol) en THF (60 mL) se agregó por goteo a 0°C a una solución de 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-1-(5-fluoro-7-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **9a** (1.66 g, 5.26 mmol) en THF (45 mL). La mezcla se agitó a 0°C durante 1 h y a temperatura ambiente durante la noche. El precipitado se filtró y se lavó con EtOAc. El filtrado se concentró bajo presión reducida para proporcionar 2-bromo-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-1-(5-fluoro-7-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **9b** (1.9 g).

Síntesis de compuesto 9 y separación quiral en enantiómeros 9A y 9B:

Una mezcla de 2-bromo-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-1-(5-fluoro-7-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **9b** (0.202 g, 0.512 mmol) y 2-(3-amino-5-metoxifenoxi)etanol [CAS 725237-16-1] (0.468 g, 2.554 mmol) en CH₃CN (2 mL) y THF (2 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 28 h. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con HCl 1N. La fase orgánica se lavó con una solución de NaHCO₃ acuoso saturado y salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (10 g) utilizando un gradiente de isopropanol (10% a 40%) en heptano. Las fracciones que contenían el compuesto deseado se combinaron y se concentraron bajo presión reducida. El residuo se trituró con EtOAc y heptano para proporcionar 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-1-(5-fluoro-7-metil-1*H*-indol-3-il)-2-((3-(2-hidroxiethoxy)-5-metoxifenil)amino)etanona (Compuesto **9**, 147 mg) como una mezcla racémica.

La separación quiral de Compuesto **9** (430 mg) se realizó mediante SFC quiral (fase estacionaria: Quiralcel® OD-H 5 μm 250 x 20 mm, fase móvil: 55% CO₂, 45% MeOH) para proporcionar 198 mg del primer enantiómero eluido y 188 mg del segundo enantiómero eluido. El primer enantiómero eluido se cristalizó a partir de CH₂Cl₂/diisopropiléter para proporcionar el enantiómero **9A** (138 mg). El segundo enantiómero eluido se cristalizó a partir de CH₂Cl₂/diisopropiléter para proporcionar el enantiómero **9B** (151 mg).

Compuesto 9:

¹H RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.47 (s, 3 H) 3.61 (s, 3 H) 3.62 - 3.67 (m, 2 H) 3.77 - 3.89 (m, 2 H) 3.96 (s, 3 H) 4.79 (t, *J*=5.1 Hz, 1 H) 5.71 (t, *J*=2.0 Hz, 1 H) 5.94 (d, *J*=2.0 Hz, 2 H) 6.14 (d, *J*=7.9 Hz, 1 H) 6.35 (d, *J*=7.9 Hz, 1 H) 6.69 - 6.73 (m, 1 H) 6.89 - 6.95 (m, 2 H) 7.34 - 7.39 (m, 1 H) 7.63 - 7.67 (m, 1 H) 8.45 (s, 1 H) 12.21 (s a., 1 H)

LC/MS (método LC-D): R_t 3.9 min, MH⁺ 497

Enantiómero 9A:

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.47 (s, 3 H) 3.52 - 3.67 (m, 5 H) 3.76 - 3.89 (m, 2 H) 3.96 (s, 3 H) 4.72 - 4.83 (m, 1 H) 5.71 (s a., 1 H) 5.94 (s, 2 H) 6.15 (d, *J*=7.9 Hz, 1 H) 6.36 (d, *J*=7.9 Hz, 1 H) 6.69 - 6.77 (m, 1 H) 6.90 - 6.97

(m, 2 H) 7.36 (t, $J=7.9$ Hz, 1 H) 7.62 - 7.69 (m, 1 H) 8.44 (s, 1 H) 12.21 (s a., 1 H)

LC/MS (método LC-C): R_t 2.92 min, MH^+ 497

$[\alpha]_D^{20}$: -80.0° (c 0.436, DMF)

SFC quiral (método SFC-D): R_t 2.14 min, MH^+ 497, pureza quiral 100%.

5 Punto de fusión: 181°C

Enantiómero 9B:

1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 2.47 (s, 3 H) 3.53 - 3.68 (m, 5 H) 3.74 - 3.88 (m, 2 H) 3.96 (s, 3 H) 4.78 (t, $J=5.4$ Hz, 1 H) 5.66 - 5.73 (m, 1 H) 5.94 (s, 2 H) 6.15 (d, $J=7.9$ Hz, 1 H) 6.36 (d, $J=7.9$ Hz, 1 H) 6.72 (td, $J=8.0, 1.6$ Hz, 1 H) 6.85 - 6.98 (m, 2 H) 7.36 (t, $J=8.0$ Hz, 1 H) 7.65 (dd, $J=9.5, 1.6$ Hz, 1 H) 8.44 (s, 1 H) 12.04 - 12.43 (m, 1 H)

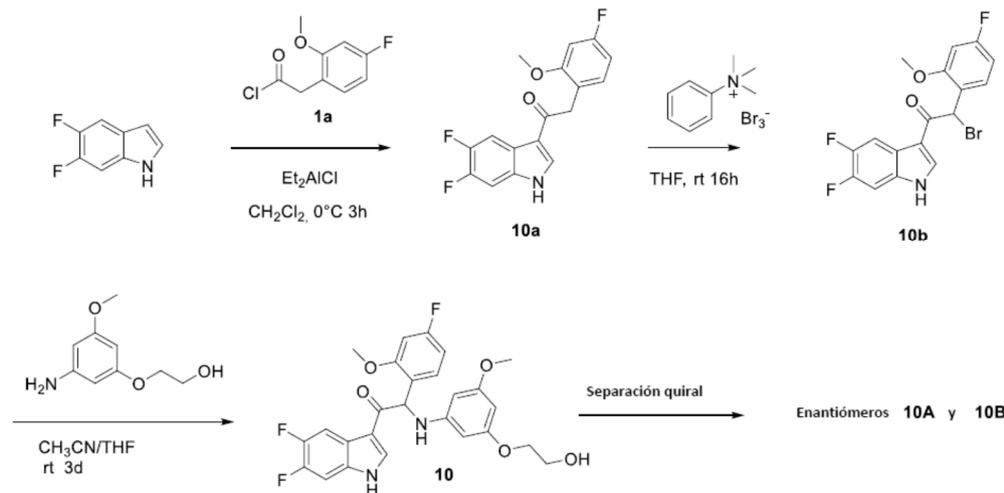
10 LC/MS (método LC-C): R_t 2.93 min, MH^+ 497

$[\alpha]_D^{20}$: +81.1° (c 0.388, DMF)

SFC quiral (método SFC-D): R_t 3.45 min, MH^+ 497, pureza quiral 100%.

Punto de fusión: 179°C

15 Ejemplo 10: Síntesis de 1-(5,6-difluoro-1*H*-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-2-((3-(2-hidroxi)etoxi)-5-metoxifenil)amino)etanona (Compuesto **10**) y separación quiral en enantiómeros **10A** y **10B**.



Síntesis del intermediario 10a:

20 Se agregó cloruro de dietilaluminio 1M en hexano (9.8 mL, 9.8 mmol) por goteo a 0°C a una solución de 5,6-difluoro-1*H*-indol [CAS 169674-01-5] (1.00 g, 6.5 mmol) en CH_2Cl_2 (12 mL). Después de 30 min a 0°C, se agregó lentamente una solución de cloruro de 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)acetilo **1a** (1.99 g, 9.8 mmol, para síntesis: véase Ejemplo 1) en CH_2Cl_2 (3 mL) a 0°C. La reacción se agitó a 0°C durante 3 h. Se agregó solución 1M de sal de Rochelle y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Los sólidos formados se filtraron y se repartieron entre EtOAc y HCl 1N. Las fases se separaron. La capa orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se concentró bajo presión reducida para proporcionar 1-(5,6-difluoro-1*H*-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)etanona **10a** (1.26 g).

Síntesis del intermediario 10b:

30 Una solución de tribromuro de feniltrimetilamonio [CAS 4207-56-1] (1.63 g, 4.34 mmol) en THF (5 mL) se agregó por goteo a 0°C a una solución de 1-(5,6-difluoro-1*H*-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)etanona **10a** (1.26 g, 3.95 mmol) en THF (35 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante la noche. El precipitado se filtró y se lavó con EtOAc. El filtrado se concentró bajo presión reducida. El residuo se recogió con una cantidad mínima de acetonitrilo. El precipitado se filtró, se lavó con acetonitrilo y se secó al vacío para proporcionar 2-bromo-1-(5,6-difluoro-1*H*-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)etanona **10b** (0.758 g).

Síntesis de compuesto 10 y separación quiral en enantiómeros 10A y 10B:

Una mezcla de 2-bromo-1-(5,6-difluoro-1*H*-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)etanona **10b** (0.758 g, 1.90 mmol) y 2-(3-amino-5-metoxifenoxi)etanol [CAS 725237-16-1] (0.746 g, 4.07 mmol) en THF (10 mL) y CH₃CN (10 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida. El residuo se repartió entre EtOAc y HCl 1N. Las fases se separaron. La fase acuosa se extrajo con EtOAc. Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con una solución de NaHCO₃ acuoso saturado y salmuera, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice utilizando un gradiente de EtOAc (15% a 100%) en heptano. Las fracciones que contenían Compuesto **10** se combinaron y se concentraron bajo presión reducida. Se realizó una segunda purificación mediante HPLC de fase inversa (fase estacionaria: X-Bridge®-C18 5 µm 19 x 100 mm, fase móvil: gradiente de 80% ácido fórmico 0.1% / 20% CH₃CN a 10% ácido fórmico 0.1% / 90% CH₃CN) para proporcionar 1-(5,6-difluoro-1*H*-indol-3-il)-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-2-((3-(2-hidroxietoxi)-5-metoxifenil)amino)etanona (Compuesto **10**, 499 mg) como una mezcla racémica.

Los enantiómeros de Compuesto **10** (459 mg) se separaron mediante SFC preparativa quiral (fase estacionaria: Quiralcel® OD-H 5 µm 250 x 30 mm, fase móvil: 60% CO₂, 40% MeOH) para proporcionar 208 mg del primer enantiómero eluido y 221 mg del segundo enantiómero eluido. El primer enantiómero eluido se solidificó a partir de heptano para proporcionar el enantiómero **10A** (168 mg). El segundo enantiómero eluido se solidificó a partir de heptano para proporcionar el enantiómero **10B** (174 mg).

Compuesto **10**:

¹H RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.55 - 3.70 (m, 5 H) 3.83 (m, 2 H) 3.94 (s, 3 H) 4.79 (t, *J*=5.5 Hz, 1 H) 5.72 (s, 1 H) 5.93 (d, *J*=1.9 Hz, 2 H) 6.13 (d, *J*=7.9 Hz, 1 H) 6.38 (d, *J*=8.3 Hz, 1 H) 6.73 (td, *J*=8.5, 2.3 Hz, 1 H) 6.93 (dd, *J*=11.3, 2.3 Hz, 1 H) 7.37 (dd, *J*=8.5, 7.0 Hz, 1 H) 7.54 (dd, *J*=10.7, 7.0 Hz, 1 H) 8.00 (dd, *J*=10.9, 8.3 Hz, 1 H) 8.47 (s, 1 H) 12.17 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-E): R_t 8.3 min, MH⁺ 501

Enantiómero **10A**:

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12.17 (s a., 1 H) 8.47 (s, 1 H) 7.99 (dd, *J*=11.0, 8.2 Hz, 1 H) 7.53 (dd, *J*=10.6, 7.1 Hz, 1 H) 7.36 (t, *J*=7.7 Hz, 1 H) 6.92 (dd, *J*=11.3, 2.2 Hz, 1 H) 6.73 (td, *J*=8.5, 2.2 Hz, 1 H) 6.38 (d, *J*=7.9 Hz, 1 H) 6.13 (d, *J*=7.9 Hz, 1 H) 5.93 (s, 2 H) 5.71 (s a., 1 H) 4.79 (t, *J*=5.5 Hz, 1 H) 3.94 (s, 3 H) 3.82 (m, 2 H) 3.57 - 3.67 (m, 5 H)

LC/MS (método LC-C): R_t 2.89 min, MH⁺ 501

[α]_D²⁰: -86.4° (c 0.5727, DMF)

SFC quiral (método SFC-E): R_t 2.97 min, MH⁺ 501, pureza quiral 100%.

Enantiómero **10B**:

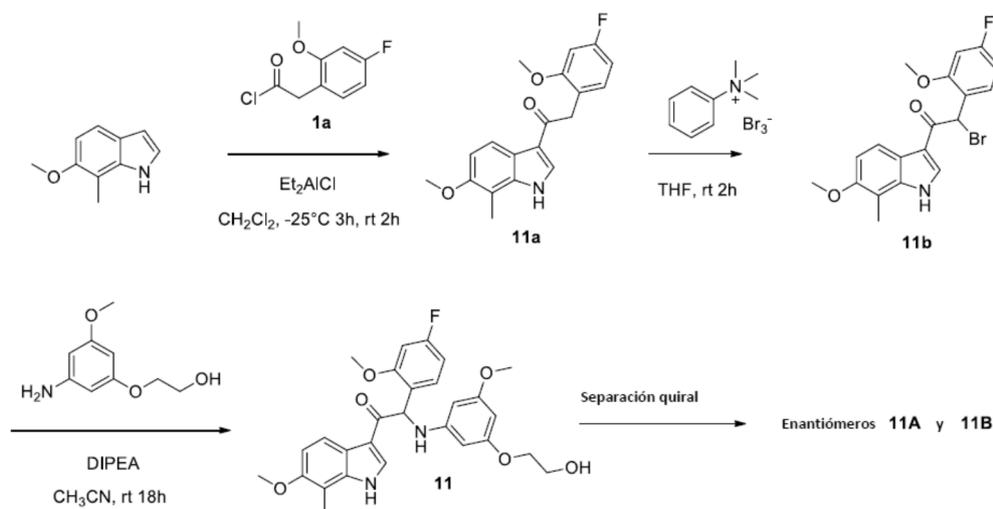
¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12.17 (s a., 1 H) 8.47 (s, 1 H) 7.99 (dd, *J*=10.9, 8.4 Hz, 1 H) 7.53 (dd, *J*=10.6, 7.1 Hz, 1 H) 7.36 (t, *J*=7.7 Hz, 1 H) 6.92 (dd, *J*=11.3, 1.6 Hz, 1 H) 6.73 (t, *J*=7.7 Hz, 1 H) 6.38 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 6.13 (d, *J*=7.9 Hz, 1 H) 5.93 (s, 2 H) 5.71 (s a., 1 H) 4.79 (t, *J*=5.5 Hz, 1 H) 3.94 (s, 3 H) 3.77- 3.88 (m, 2 H) 3.58 - 3.67 (m, 5 H)

LC/MS (método LC-C): R_t 2.89 min, MH⁺ 501

[α]_D²⁰: +90.7° (c 0.5227, DMF)

SFC quiral (método SFC-E): R_t 4.67 min, MH⁺ 501, pureza quiral 100%.

Ejemplo 11: Síntesis de 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-2-((3-(2-hidroxietoxi)-5-metoxifenil)amino)-1-(6-metoxi-7-metil-1*H*-indol-3-il)etanona (Compuesto **11**) y separación quiral en enantiómeros **11A** y **11B**.



Síntesis del intermediario 11a:

Se agregó cloruro de dietilaluminio 1M en hexano (40.8 mL, 40.8 mmol) por goteo a -25°C a una solución de 6-metoxi-7-metil-1*H*-indol [CAS 19500-05-1] (4.39 g, 27.2 mmol) en CH₂Cl₂ (200 mL) bajo atmósfera-N₂. Después de agitar durante 15 min a -25°C, se agregó por goteo una solución de cloruro de 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)acetilo **1a** (7.72 g, 38.1 mmol, para síntesis: véase Ejemplo 1) en CH₂Cl₂ (200 mL) a -25°C. Se continuó agitando a -25°C durante 1 h y la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente mientras se agitaba durante 2 h. La mezcla de reacción se vertió en una solución hielo-agua / sal de Rochelle, y después de agitar durante un tiempo, los sólidos se eliminaron por filtración sobre dicalite® y la torta de filtrado se lavó varias veces con porciones pequeñas de THF. Las fases se separaron y la capa acuosa se extrajo con THF. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se evaporaron bajo presión reducida. El residuo sólido se suspendió en CH₂Cl₂ (20 mL). Los sólidos se filtraron, se lavaron con porciones pequeñas de CH₂Cl₂ y se secaron al vacío a 50°C para proporcionar 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-1-(6-metoxi-7-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **11a** (7.5 g).

Síntesis del intermediario 11b:

Una solución de tribromuro de feniltrimetilamonio [CAS 4207-56-1] (5.8 g, 15.5 mmol) en THF (200 mL) se agregó por goteo a 0°C a una solución de 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-1-(6-metoxi-7-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **11a** (4.95 g, 14.1 mmol) en THF (200 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. El precipitado se filtró y se lavó con THF. El filtrado se concentró bajo presión reducida. El residuo se trituró con una pequeña cantidad de CH₂Cl₂. El precipitado se filtró, se lavó con CH₂Cl₂ y se secó al vacío para proporcionar 2-bromo-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-1-(6-metoxi-7-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **11b** (4.04 g).

Síntesis de compuesto 11 y separación quiral en enantiómeros 11A y 11B:

Una mezcla de 2-bromo-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-1-(6-metoxi-7-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **11b** (1434 mg, 3.78 mmol) y 2-(3-amino-5-metoxifenoxy)etanol [CAS 725237-16-1] (1037 mg, 5.66 mmol) y diisopropiletilamina (976 µL, 5.66 mmol) en CH₃CN (100 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida. El residuo se repartió entre CH₂Cl₂ y HCl 0.5N. Las fases se separaron. La capa orgánica se lavó con agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (fase estacionaria: Biotage® SNAP Ultra 100 g, fase móvil: EtOAc:EtOH(3:1)/heptano gradiente 0/100 a 60/40). Las fracciones que contenían Compuesto **11** se combinaron y se concentraron bajo presión reducida para proporcionar 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-2-((3-(2-hidroxietoxi)-5-metoxifenil)amino)-1-(6-metoxi-7-metil-1*H*-indol-3-il)etanona (Compuesto **11**, 995 mg) como una mezcla racémica. La separación quiral de los enantiómeros del Compuesto **11** (995 mg) se realizó utilizando separación quiral de fase normal (fase estacionaria: (S,S) Whelk-O 1 (500 g), fase móvil: 100% EtOH, elución isocrática). Las fracciones del producto se combinaron y se evaporaron para proporcionar el enantiómero **11A** como el primer producto eluido y el enantiómero **11B** como el segundo producto eluido. Enantiómeros **11A** se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (fase estacionaria: Biotage® SNAP Ultra 10 g, fase móvil CH₂Cl₂/MeOH gradiente 100/0 a 98/2). Las fracciones del producto se combinaron, el disolvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo se secó al vacío a 50°C para proporcionar el enantiómero **11A** (255 mg) como un polvo amorfo blanco. El enantiómero **11B** se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (fase estacionaria: SNAP Ultra 10 g, fase móvil CH₂Cl₂/MeOH gradiente 100/0 a 98/2). Las fracciones del producto se combinaron, el disolvente se evaporó bajo presión reducida y el residuo se secó al vacío a 50°C para

proporcionar el enantiómero **11B** (270 mg) como un polvo amorfo blanco.

Compuesto 11:

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.29 (s, 3 H) 3.61 (s, 3 H) 3.64 (c, J=5.2 Hz, 2 H) 3.79 (s, 3 H) 3.80 - 3.90 (m, 2 H) 3.97 (s, 3 H) 4.77 (t, J=5.4 Hz, 1 H) 5.71 (t, J=2.0 Hz, 1 H) 5.94 (d, J=2.0 Hz, 2 H) 6.13 (d, J=7.9 Hz, 1 H) 6.32 (d, J=7.9 Hz, 1 H) 6.71 (td, J=8.5, 2.5 Hz, 1 H) 6.92 (dd, J=11.3, 2.4 Hz, 1 H) 6.94 (d, J=8.8 Hz, 1 H) 7.37 (dd, J=8.6, 6.9 Hz, 1 H) 7.93 (d, J=8.9 Hz, 1 H) 8.31 (d, J=2.9 Hz, 1 H) 11.83 (d, J=3.1 Hz, 1 H)

LC/MS (método LC-A): R_t 1.10 min, MH⁺ 509

Enantiómero 11A:

¹H RMN (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.29 (s, 3 H) 3.61 (s, 3 H) 3.64 (c, J=5.4 Hz, 2 H) 3.79 (s, 3 H) 3.80 - 3.89 (m, 2 H) 3.97 (s, 3 H) 4.79 (t, J=5.5 Hz, 1 H) 5.70 (t, J=2.0 Hz, 1 H) 5.94 (d, J=2.2 Hz, 2 H) 6.13 (d, J=7.7 Hz, 1 H) 6.34 (d, J=7.7 Hz, 1 H) 6.72 (td, J=8.4, 2.6 Hz, 1 H) 6.93 (dd, J=11.5, 2.4 Hz, 1 H) 6.94 (d, J=8.8 Hz, 1 H) 7.37 (dd, J=8.6, 6.8 Hz, 1 H) 7.93 (d, J=8.8 Hz, 1 H) 8.32 (s a, 1 H) 11.85 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-A): R_t 1.05 min, MH⁺ 509

[α]_D²⁰: +98.8° (c 0.5285, DMF)

SFC quiral (método SFC-F): R_t 2.26 min, MH⁺ 509, pureza quiral 100%.

Enantiómero 11B:

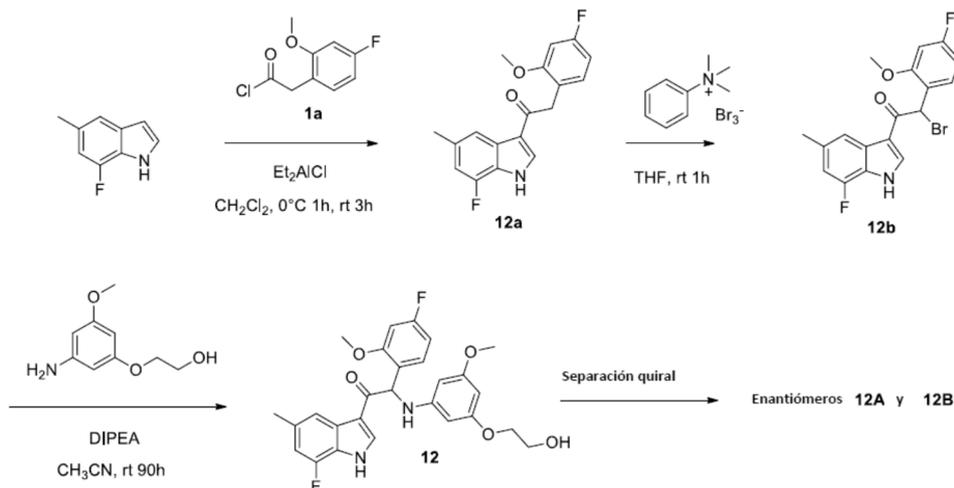
¹H RMN (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.29 (s, 3 H) 3.61 (s, 3 H) 3.64 (c, J=5.1 Hz, 2 H) 3.79 (s, 3 H) 3.80 - 3.90 (m, 2 H) 3.97 (s, 3 H) 4.79 (t, J=5.5 Hz, 1 H) 5.70 (t, J=2.0 Hz, 1 H) 5.94 (d, J=2.2 Hz, 2 H) 6.13 (d, J=8.1 Hz, 1 H) 6.34 (d, J=8.1 Hz, 1 H) 6.72 (td, J=8.4, 2.6 Hz, 1 H) 6.93 (dd, J=11.5, 2.4 Hz, 1 H) 6.94 (d, J=8.8 Hz, 1 H) 7.37 (dd, J=8.8, 7.0 Hz, 1 H) 7.93 (d, J=8.4 Hz, 1 H) 8.32 (s a, 1 H) 11.85 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-A): R_t 1.05 min, MH⁺ 509

[α]_D²⁰: -94.1° (c 0.461, DMF)

SFC quiral (método SFC-F): R_t 2.73 min, MH⁺ 509, pureza quiral 100%.

Ejemplo 12: Síntesis de 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-1-(7-fluoro-5-metil-1H-indol-3-il)-2-((3-(2-hidroxi-etoxi)-5-metoxifenil)amino)etanona (Compuesto 12) y separación quiral en enantiómeros **12A** y **12B**.



Síntesis del intermediario 12a: Se agregó por goteo cloruro de dietilaluminio 1M en hexano (25.6 mL, 25.6 mmol) a 0°C a una solución de 7-fluoro-5-metil-1H-indol [CAS442910-91-0] (2.54 g, 17.0 mmol) en CH₂Cl₂ (150 mL) bajo atmósfera-N₂. Después de agitar durante 30 min a 0°C, una solución de cloruro de 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)acetilo **1a** (5.2 g, 25.6 mmol, para síntesis: véase Ejemplo 1) en CH₂Cl₂ (150 mL) se agregó por goteo a 0°C. se continuó agitando a 0°C durante 1 h y la mezcla de reacción se dejó calentar a temperatura ambiente mientras se agitaba durante 3h. La mezcla de reacción se vertió en una solución hielo-agua / sal de Rochelle, y después de agitar durante un tiempo, los sólidos se eliminaron por filtración sobre dicalite® y la torta de filtrado se lavó varias veces con porciones pequeñas de THF. Las fases se separaron y la capa acuosa se extrajo con THF. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se evaporaron bajo presión reducida. El residuo sólido se suspendió en CH₂Cl₂ (20 mL). Los sólidos se filtraron, se lavó con porciones pequeñas de

CH₂Cl₂/heptano (1/1) y se secó al vacío a 50°C para proporcionar 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-1-(7-fluoro-5-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **12a** (4.13 g).

Síntesis del intermediario **12b**:

5 Una solución de tribromuro de feniltrimetilamonio [CAS 4207-56-1] (5.39 g, 14.3 mmol) en THF (150 mL) se agregó por goteo a 0°C a una solución de 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-1-(7-fluoro-5-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **12a** (4.11 g, 13.0 mmol) en THF (100 mL). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. El precipitado se filtró y se lavó con THF. El filtrado se concentró bajo presión reducida. El residuo se trituró con una pequeña cantidad de CH₂Cl₂. El precipitado se filtró, se lavó con CH₂Cl₂ y se secó al vacío a 50°C para proporcionar 2-bromo-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-1-(7-fluoro-5-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **12b** (4.81 g).

10 Síntesis de compuesto **12** y separación quiral en enantiómeros **12A** y **12B**:

15 Una mezcla de 2-bromo-2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-1-(7-fluoro-5-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **12b** (1096 mg, 2.78 mmol) y 2-(3-amino-5-metoxifenoxi)etanol [CAS 725237-16-1] (764 mg, 4.17 mmol) y diisopropiletilamina (718 µL, 4.17 mmol) en CH₃CN (25 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 90 h. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida. El residuo se repartió entre CH₂Cl₂ y HCl 0.5N. Las fases se separaron. La capa orgánica se lavó con agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (fase estacionaria: Biotage® SNAP Ultra 100 g, fase móvil: EtOAc: EtOH(3:1)/heptano gradiente 0/100 a 50/50). Las fracciones que contenían Compuesto **12** se combinaron y se concentraron bajo presión reducida para proporcionar 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)-1-(7-fluoro-5-metil-1*H*-indol-3-il)-2-((3-(2-hidroxietoxi)-5-metoxifenil)amino)etanona (Compuesto **12**, 919 mg) como una mezcla racémica.

20 La separación quiral de los enantiómeros del Compuesto **12** (919 mg) se realizó mediante SFC preparativa (fase estacionaria: Quiralcel® Diacel® OD 20 x 250 mm, fase móvil: CO₂, EtOH con 0.2% *i*PrNH₂). Las fracciones del producto se combinaron, se evaporaron y se secaron al vacío a 50°C para proporcionar el enantiómero **12A** (307 mg) como el primer producto eluido y el enantiómero **12B** (302 mg) como el segundo producto eluido. Los enantiómeros se produjeron como polvo amorfo blanco.

25 Compuesto **12**:

LC/MS (método LC-A): R_t 1.08 min, MH⁺ 497

Enantiómero **12A**:

30 ¹H RMN (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.39 (s, 3 H) 3.62 (s, 3 H) 3.65 (c, J=5.4 Hz, 2 H) 3.77 - 3.90 (m, 2 H) 3.95 (s, 3 H) 4.80 (t, J=5.5 Hz, 1 H) 5.72 (t, J=2.0 Hz, 1 H) 5.95 (d, J=2.2 Hz, 2 H) 6.15 (d, J=8.1 Hz, 1 H) 6.35 (d, J=8.1 Hz, 1 H) 6.74 (td, J=8.5, 2.4 Hz, 1 H) 6.92 (dd, J=12.1, 1.1 Hz, 1 H) 6.94 (dd, J=11.3, 2.2 Hz, 1 H) 7.37 (dd, J=8.8, 7.0 Hz, 1 H) 7.79 (s, 1 H) 8.40 (s, 1 H) 12.48 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-B): R_t 1.98 min, MH⁺ 497

[α]_D²⁰: -113.5° (c 0.355, DMF)

SFC quiral (método SFC-K): R_t 2.26 min, MH⁺ 497, pureza quiral 100%.

35 Enantiómero **12B**:

¹H RMN (360 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.38 (s, 3 H) 3.61 (s, 3 H) 3.64 (c, J=5.1 Hz, 2 H) 3.77 - 3.89 (m, 2 H) 3.94 (s, 3 H) 4.79 (t, J=5.5 Hz, 1 H) 5.71 (t, J=1.8 Hz, 1 H) 5.94 (d, J=1.8 Hz, 2 H) 6.15 (d, J=8.1 Hz, 1 H) 6.34 (d, J=7.7 Hz, 1 H) 6.73 (td, J=8.5, 2.4 Hz, 1 H) 6.91 (d a, J=12.1 Hz, 1 H) 6.93 (dd, J=11.3, 2.6 Hz, 1 H) 7.36 (dd, J=8.4, 7.0 Hz, 1 H) 7.78 (s, 1 H) 8.39 (s, 1 H) 12.46 (s a, 1 H)

40 LC/MS (método LC-B): R_t 1.98 min, MH⁺ 497

[α]_D²⁰: +117.0° (c 0.448, DMF)

SFC quiral (método SFC-K): R_t 3.67 min, MH⁺ 497, pureza quiral 100%.

ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE LOS COMPUESTOS DE LA INVENCIÓN *Ensayo antiviral de DENV-2*

45 La actividad antiviral de todos los compuestos de la invención se ensayó contra la cepa 16681 de DENV-2 que se marcó con la proteína verde fluorescente mejorada (eGFP). El medio de cultivo consiste en un medio esencial mínimo suplementado con 2% de suero de ternera fetal inactivado por calor, 0,04% de gentamicina (50 mg/ml) y 2 mM de L-glutamina. Las células Vero, obtenidas de ECACC, se suspendieron en un medio de cultivo y se añadieron 25µL a placas de 384 pocillos (2.500 células/pocillo), que ya contienen los compuestos antivirales. Típicamente, estas placas contienen una dilución cuádruple en serie de 9 etapas de dilución del compuesto del ensayo a 200 veces la concentración final en DMSO al 100% (200nL). Además, la concentración de cada compuesto se prueba

50

por cuadruplicado (rango de concentración final: 25µM - 0.00038µM). Por último, cada placa contiene pocillos que están asignados como controles de virus (que contienen las células y los virus en ausencia del compuesto), controles de células (que contienen las células en ausencia del virus y el compuesto) y controles de medios (que contienen medios en ausencia de células, virus y compuestos). A los pocillos asignados como controles de medios se añadieron 25µL del medio de cultivo en lugar de células Vero. Una vez que se añadieron las células a las placas, las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente para permitir que las células se distribuyan uniformemente dentro de los pocillos. Luego, las placas se incubaron en un incubador completamente humidificado (37°C, 5% CO₂) hasta el día siguiente. Posteriormente, la cepa 16681 de DENV-2, marcada con eGFP, se añadió a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,5. Por lo tanto, se añadieron 15µL de suspensión de virus a todos los pocillos que contienen el compuesto de prueba y a los pocillos asignados como control de virus. Paralelamente, se añadieron 15µL de medio de cultivo a los controles de medios y células. Seguidamente, las placas se incubaron durante 3 días en un incubador completamente humidificado (37°C, 5% CO₂). El día de la lectura, la fluorescencia eGFP se midió con un microscopio de fluorescencia automatizado a 488 nm (láser azul). Con el uso de un sistema LIMS interno se calcularon las curvas de respuesta a la dosis de inhibición para cada compuesto y se determinó la concentración efectiva máxima media (EC₅₀). Por lo tanto, el porcentaje de inhibición (I) para cada concentración de ensayo se calcula mediante la siguiente fórmula: $I = 100 \cdot (S_T - S_{CC}) / (S_{VC} - S_{CC})$; S_T, S_{CC} y S_{VC} son la cantidad de señal eGFP en los pocillos del compuesto de prueba, control de células y control de virus, respectivamente. La EC₅₀ representa la concentración de un compuesto en la que la replicación del virus se inhibe al 50%, que se mide por una reducción del 50% de la intensidad fluorescente eGFP comparada con el control de virus. La EC₅₀ se calcula con la interpolación lineal (Tabla 1).

Paralelamente se evaluó la toxicidad de los compuestos en las mismas placas. Una vez realizada la lectura de la señal eGFP se agregaron 10µL de resazurina, una tintura de viabilidad celular, a todos los pocillos de las placas de 384 pocillos. El ensayo de resazurina se basa en la reducción de la resazurina azul por NADH, producida por las células, en el producto altamente fluorescente, resorufina. La formación de resorufina fluorescente de color rosa está directamente relacionada con la cantidad de células viables en el pocillo. Las placas se incubaron durante 5 horas adicionales en un incubador completamente humidificado (37°C, 5% CO₂). Luego se midieron las placas en un lector de Infinito (Tecan) mediante el uso de una longitud de onda de excitación de 530 nm. También se determinó la concentración citotóxica máxima media (CC₅₀), definida como la concentración requerida para reducir la conversión de resazurina al 50%, en comparación con la de los pocillos de control de células (Tabla 1). Por último, se determinó el índice de selectividad (SI) para los compuestos, que se calcula de la siguiente manera: $SI = CC_{50} / EC_{50}$.

Tabla 1: EC₅₀, CC₅₀, y SI para los compuestos de la invención en el ensayo antiviral de DENV-2

No. de compuesto	EC50 (µM)	N	CC50 (µM)	N	SI	N
1	0.0080	4	11	4	>1564	4
1A	0.0038	5	8.4	4	2100	4
1B	0.66	5	12	5	18	5
2	0.0054	4	7.0	4	1291	4
2A	0.66	5	5.4	4	8,1	4
2B	0.0022	5	5.3	4	2581	4
3	0.0021	3	6.3	4	2915	3
3A	0.00077	6	4.1	5	5120	5
3B	0.18	5	5.8	5	32	5
4A	0.0016	4	5.9	4	3698	4
4B	0.38	4	7.7	4	20	4
5	0.0089	4	5.2	4	586	4
5A	0.44	5	7.4	4	17	4
5B	0.0025	30	6.5	30	2673	29
6A	0.0027	9	7.5	8	2968	8
6B	0.29	5	9.6	5	33	5
7	0.014	4	>9.7	4	1049	4
7A	0.0046	6	>8.6	5	1864	5
7B	0.54	5	14	5	39	5
8	0.0039	4	6.8	4	1733	4
8A	0.0010	7	8.6	6	10020	6
8B	0.15	5	9.1	6	59	5
9	0.0094	4	7.5	4	794	4
9A	0.63	6	8.8	5	14	5
9B	0.0034	6	5.5	5	1575	5

No. de compuesto	EC50 (μM)	N	CC50 (μM)	N	SI	N
10	0.0068	3	9.3	3	1362	3
10A	0.58	3	11	3	19	3
10B	0.0027	3	6.9	2	2565	2
11	0.0024	3	10	2	4455	2
11A	0.00081	3	8.9	3	10981	3
11B	0.41	3	12	3	28	3
12A	0.93	3	9.2	3	10	3
12B	0.0051	3	5.5	3	1063	3

N = cantidad de experimentos independientes en los que se ensayaron los compuestos.

Ensayo de tetravalente con transcriptasa inversa cuantitativa-PCR (RT-qPCR): Protocolo A.

La actividad antiviral de los compuestos de la invención se ensayó contra la cepa TC974#666 (NCPV) de DENV-1, la cepa 16681 de DENV-2, la cepa H87 (NCPV) de DENV-3 y las cepas H241 (NCPV) y EDEN (SG/06K2270DK1/2005; número de acceso GenBank QG398256) de DENV-4 en un ensayo de RT-qPCR. Por lo tanto, se infectaron células Vero, ya sea con DENV-1, -2, -3 o -4 en presencia o ausencia de compuestos de ensayo. Al día 3 de infectadas, las células se lisaron y los lisados celulares se utilizaron para preparar ADNc de objetivo viral (3'UTR de DENV; tabla 2) y un gen de referencia celular (β -actina, tabla 2). Posteriormente, se realizó un PCR en tiempo real dúplex en un instrumento Lightcycler480. El valor Cp generado es inversamente proporcional a la cantidad de expresión de ARN de estos objetivos. La inhibición de la replicación de DENV produce un cambio de Cp en el compuesto de ensayo para el gen 3'UTR. Por otro lado, si un compuesto de ensayo es tóxico para las células se observará un efecto similar sobre la expresión de β -actina. El método comparativo $\Delta\Delta$ Cp se utiliza para calcular EC₅₀, que se basa en la expresión génica relativa del gen objetivo (3'UTR) normalizado con el gen de limpieza celular (β -actina). Además, los valores CC₅₀ se determinaron en base a los valores de Cp adquiridos para la limpieza de genes β -actina.

Tabla 2: Cebadores y sondas utilizados para RT-PCR cuantitativa, en tiempo real

Primer/sonda	Objetivo	Secuencia ^{a, b}
F3utr258	DENV 3'-UTR	5'-CGGTTAGAGGAGACCCCTC-3'
R3utr425	DENV 3'-UTR	5'-GAGACAGCAGGATCTCTGGTC-3'
P3utr343	DENV 3'-UTR	FAM-5'-AAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCC-3'-BHQ1
Factin743	β -actina	5'-GGCCAGGTCATCACCATT-3'
Ractin876	β -actina	5'-ATGTCCACGTCACACTTCATG-3'
Pactin773	β -actina	HEX-5'-TTCCGCTGCCCTGAGGCTCTC-3'-BHQ1

^a Los elementos de tintes reportero (FAM, HEX) y tinte inhibidor de fluorescencia (BHQ1) se indican en negrita y cursiva.

^b La secuencia de nucleótidos de los cebadores y sondas se seleccionó de la región conservada en la región 3'UTR del genoma del virus del dengue, basada en el alineamiento de 300 secuencias de nucleótidos de los cuatro serotipos del dengue depositados en GenBank (Gong et al., 2013, Methods Mol Biol, Capítulo 16).

El medio de cultivo consiste en un medio esencial mínimo suplementado con 2% de suero de ternera fetal inactivado por calor, 0,04% de gentamicina (50 mg/ml) y 2 mM de L-glutamina. Las células Vero, obtenidas de ECACC, se suspendieron en un medio de cultivo y se añadieron 75μL/pocillo a placas de 96 pocillos (10.000 células/pocillo), que ya contienen los compuestos antivirales. Típicamente, estas placas contienen una dilución cuádruple en serie de 9 etapas de dilución del compuesto del ensayo a 200 veces la concentración final en DMSO al 100% (500nL; rango de concentración final: 25μM - 0.00038μM). Asimismo, cada placa contiene pocillos que están asignados como controles de virus (que contienen las células y los virus en ausencia del compuesto) y controles de células (que contienen las células en ausencia del virus y el compuesto). Una vez que las células se agregaron a las placas, las placas se incubaron en un incubador completamente humidificado (37°C, 5% CO₂) hasta el día siguiente. Luego se agregó la cepa TC974 # 666 de DENV-1, cepa 16681 de DENV-2, cepa H87 de DENV-3 o las cepas H241 o EDEN de DENV-4. Por lo tanto, se añadieron 25μL de suspensión de virus, donde se logró un Cp de ~ 22 en RTqPCR, y se agregó a todos los pocillos que contienen el compuesto de prueba y a los pocillos asignados como control de virus. Paralelamente, se añadieron 25μL de medio de cultivo a los controles de células. Seguidamente, las placas se incubaron durante 3 días en un incubador completamente humidificado (37°C, 5% CO₂). Después de 3 días, se eliminó el sobrenadante de los pocillos y las células se lavaron dos veces con PBS enfriado con hielo (~ 100 pl). El granulato celular dentro de las placas de 96 pocillos se almacenó a -80°C durante al menos 1 día. A continuación, se extrajo el ARN con el kit para lisis Cells-to-CT™, de conformidad con las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems). Los lisados de células se pueden almacenar a -80°C o utilizarse inmediatamente en la etapa de transcripción inversa.

Como preparación para la etapa de transcripción inversa se preparó la mezcla A (tabla 3A) y se distribuyeron

7,57µL/pocillo en una placa de 96 pocillos. Después de la adición de 5µL del lisado celular, se siguió con una etapa de desnaturalización durante 5 minutos a 75°C (tabla 3B). Posteriormente, se añadieron 7,43µL de la mezcla B (tabla 3C) y se inició el paso de transcripción reversa (tabla 3D) para generar ADNc.

- 5 Por último, se preparó una mezcla de RT-qPCR, la mezcla C (tabla 4A), que se distribuyó en placas de 96 pocillos LightCycler qPCR a los que se agregaron 3µL de ADNc y la qPCR se realizó de conformidad con las condiciones de la tabla 4B en un LightCycler 480.

Mediante el uso del software LightCycler y un sistema LIMS interno, se calcularon las curvas dosis-respuesta para cada compuesto y se determinaron la concentración media máxima eficaz (EC₅₀) y la concentración citotóxica media máxima (CC₅₀) (Tablas 6-9).

- 10 Tabla 3: Síntesis de ADNc mediante el uso de la Mezcla A, desnaturalización, Mezcla B y transcripción inversa.

Mezcla A

A Placas	8			Vol. de reacción (µl)	20
Muestras	828				
Ítem de la mezcla	Concentración			Volumen para (µl)	
	Unidad	Stock	Final	muestra 1	muestras x
Milli-Q H ₂ O				7.27	6019.56
R3utr425	µM	20	0.27	0.15	124.20
Ractin876	µM	20	0.27	0.15	124.20
Volumen mezcla/pocillo (µl)				7.57	
Lisados celulares				5.00	

B Etapa de desnaturalización:

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	75°C	5'
Espera	4°C	espera

C Mezcla B

Muestras	864				
Ítem de la mezcla	Concentración			Volumen para (µl)	
	Unidad	Stock	Final	muestra 1	muestras x
Buffer HIFI Expand 2	X	10.00	1.00	2.00	1728.0
MgCl ₂	mM	25.00	3.50	2.80	2419.2
dNTPs	mM	10.00	1.00	2.00	1728.0
Inhibidor de ribonucleasa	U/µl	40.00	1.00	0.50	432.0
Expansor de RT	U/µl	50.00	0.33	0.13	112.3
Volumen de mezcla total (µl)				7.43	

D Protocolo de síntesis de ADNc

Etapa	Temperatura	Tiempo
Transcriptasa inversa	42°C	30'
Desnaturalización	99°C	5'
Espera	4°C	espera

Tabla 4: Protocolo y mezcla para qPCR

A Mezcla C

Muestras	833			Vol. de reacción (µl)	25
Ítem de la mezcla	Concentración			Volumen para (µl)	
	Unidad	Stock	Final	muestra 1	muestras x
H ₂ O grado PCR Roche				7.74	6447.42
Roche 2xMM mix	X	2	1	12.50	10412.50
F3utr258	µM	20	0.3	0.38	316.54
R3utr425	µM	20	0.3	0.38	316.54
P3utr343	µM	20	0.1	0.13	108.29
Factin743	µM	20	0.3	0.38	316.54
Ractin876	µM	20	0.3	0.38	316.54
Pactin773	µM	20	0.1	0.13	108.29
Volumen mezcla/ conducto (µl)				22.02	
ADNc				3.00	

B Protocolo qPCR3

Etapa	Temperatura	Tiempo	Velocidad de aumento	
preincub/desnat	95°C	10 min	4.4	
Desnaturalización	95°C	10 seg	4.4	40 ciclos
Hibridación	58°C	1 min	2.2	
Alargamiento	72°C	1 seg	4.4	
Enfriamiento	40°C	10 seg	1.5	

Ensayo de tetravalente con transcriptasa inversa cualitativa-PCR (RT-qPCR): Protocolo B.

- 5 Se insertaron células Vero (4×10^4) en placas de 96 pocillos. Después de un día, se reemplazó el medio de cultivo celular con 100 µL de medio de ensayo que contiene una dilución doble, triple o quintuple en serie del compuesto (rango de concentración: 50 mg/ml - 0.00038 g/ml, 50 mg/ml - 0.0076 g/ml, y 50 µg/mL - 0.00013 g/ml, respectivamente) y 100 µL de dilución de virus del dengue, donde se logró un Ct de ~ 20 en RTqPCR. Tras un período de incubación de 2 horas, la monocapa de células se lavó 3 veces con medio de ensayo para eliminar el virus residual, no adsorbido y los cultivos se incubaron adicionalmente durante 4 días (DENV-2 NGC-Tongalike) o 7 días (cepa D1/H/IMTSSA/98/606 de DENV-1 Djibouti, cepa prototipo H87 de DENV-3, cepa H241' de DENV-4) en presencia del inhibidor. El sobrenadante se recogió y la carga viral de ARN se determinó por RT-PCR cuantitativa en tiempo real. La concentración efectiva 50% (EC₅₀), que se define como la concentración del compuesto que se requiere para inhibir la replicación del ARN viral en un 50%, se determinó mediante la interpolación logarítmica (Tablas 7 y 8).
- 15 Se aisló el ARN de 100 µL de sobrenadante con el kit para virus NucleoSpin 96 (Servicio Filter, Düren, Alemania) de conformidad con las instrucciones del fabricante. Las secuencias de los cebadores TaqMan (DENV-For, DENV-Rev; Tabla 5) y sondas TaqMan (DENV-Sonda Tabla 5) se seleccionaron de genes no estructurales 3 (NS3) o NS5, de los respectivos flavivirus mediante el uso del software Cebador Express (versión 2.0; Applied Biosystems, Lennik, Bélgica). La sonda TaqMan fue marcada con fluorescencia mediante 6-carboxifluoresceína (FAM) en el extremo 5' como tinte reportero y con unión al surco menor (MGB) en el extremo 3' como tinte inhibidor de la fluorescencia (Tabla 5). De un solo paso, se realizó RT-PCR cuantitativa en un volumen total de 25 µL, que contiene 13,9375 µL de H₂O, 6,25 µL de mezcla maestra (Eurogentec, Seraing, Bélgica), 0,375 µL de cebador directo, 0,375 µL de cebador inverso, 1 µL de sonda, 0,0625 µL de transcriptasa inversa (Eurogentec) y 3 µL de muestra. Se realizó RT-PCR a través del sistema rápido de análisis por PCR en tiempo real ABI 7500 PCR (Applied Biosystems, Branchburg, Nueva Jersey, EE.UU.) bajo las siguientes condiciones: 30 min a 48°C y 10 min a 95°C, seguido por 40 ciclos de 15 seg a 95°C y 1 min a 60°C. Los datos fueron analizados con el software ABI PRISM 7500 SDS (versión 1.3.1; Applied Biosystems). Para la cuantificación absoluta, las curvas de calibración se generaron mediante el uso de diluciones de 10 veces los preparados modelo de concentraciones conocidas.
- 25

Tabla 5: Cebadores y sondas utilizados para RT-PCR cuantitativa, en tiempo real

Primer/sonda	Secuencia (5' → 3') ^a	Origen ^b	Objetivo
DENV-For	TCGGAGCCGGAGTTTACAAA (SEQ. ID. N. 7)	DENV 2 NGC	NS3
DENV-Rev	TCTTAACGTCCGCCCATGAT (SEQ ID N. 8)		
DENV-Sonda	FAM -ATTCCACACAATGTGGCAT- MGB (SEQ ID N. 9)		
DenS	GGATAGACCAGAGATCCTGCTGT (SEQ ID N. 10)	DENV-1, -3, -4	NS5
DenAS1-3	CATTCCATTTTCTGGCGTTC (SEQ ID N. 11)	DENV-1, -3	
DenAS4	CAATCCATCTTGCGGCGCTC (SEQ ID N. 12)	DENV-4	
DEN_1-3 sonda	FAM -CAGCATCATTCCAGGCACAG- MGB (SEQ ID N. 13)	DENV-1, -3	
DEN_4 sonda	FAM -CAACATCAATCCAGGCACAG- MGB (SEQ ID N. 14)	DENV-4	

^a Los elementos de tintes reportero (FAM) y tinte inhibidor de fluorescencia (MGB/TAMRA) se indican en negrita y cursiva.

^b La secuencia de nucleótidos y la posición de los cebadores y sondas en el genoma se dedujeron de la secuencia de nucleótidos de DENV 2 NGC (número de acceso GenBank M29095; Irie et al, 1989), serotipo 1 del virus del dengue Djibouti cepa D1/H/IMTSSA/98/606 (número de acceso GenBank AF298808), serotipo 3 del dengue prototipo cepa H87 (c93130), serotipo 4 del virus del dengue cepa H241 (no hay secuencias disponibles).

Ensayo citotóxico (Protocolo B)

Se evaluaron posibles efectos citotóxicos de los compuestos en células Vero no infectadas. Las células se insertaron en 4 x 10⁴ células/pocillo en una placa de 96 pocillos en presencia de soluciones dobles, triples o quintuples en serie (que van desde 50 µg/mL - 0.0038 µg/mL, 50 µg/mL - 0.0076 µg/mL y 50 µg/mL - 0.0013 µg/mL, respectivamente) del compuesto y se incubaron durante 4 a 7 días. Se descartó el medio de cultivo y se añadieron 100 µg/mL 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio/fenazina metosulfato (MTS/PMS; Promega, Leiden, Países Bajos) en PBS en cada pocillo. Tras un período de incubación de 2 horas a 37°C, la densidad óptica se determinó a 498 nm. La actividad citotóxica se calculó con la siguiente fórmula: % viabilidad celular = 100 x (OD_{Compuesto}/OD_{CC}), donde OD_{Compuesto} y OD_{CC} corresponden a la densidad óptica a 498 nm de los cultivos celulares no infectados tratados con el compuesto y la de cultivos de células no infectadas, no tratadas, respectivamente. La concentración citotóxica en 50% (es decir, la concentración que reduce la cantidad total de células en 50%; CC₅₀) se calculó mediante la interpolación lineal (tablas 7 y 8).

Tabla 6: Ensayos sobre EC₅₀, CC₅₀, y SI para los compuestos contra el serotipo 1 en RT-qPCR

Protocolo A						
RT-qPCR serotipo 1 TC974#666						
No. de compuesto	EC50 (µM)	N	CC50 (µM)	N	SI	N
1A	0.018	6	8.7	5	447	5
2B	0.013	3	3.6	3	261	3
3A	0.016	3	4.1	3	224	3
4A	0.020	3	5.9	3	280	3
5B	0.027	3	6.3	3	224	3
6A	0.016	3	5.4	3	327	3
7A	0.029	3	3.8	3	129	3
8A	0.032	3	10	3	291	3
9B	0.019	3	3.8	3	175	3
10B	0.016	3	3.8	3	261	3
11A	0.020	3	6.3	2	307	2
12B	0.020	3	5.0	3	230	3

Protocolo B						
RT-qPCR serotipo 1 Djibouti						
No. de compuesto	EC50 (µM)	N	CC50 (µM)	N	SI	N
1A	0.040	3	13	5	333	2
2B	0.041	3	9.2	6	265	3
3A	0.045	3	7.6	6	144	2

ES 2 711 117 T3

Protocolo B						
RT-qPCR serotipo 1 Djibouti						
No. de compuesto	EC50 (µM)	N	CC50 (µM)	N	SI	N
4A	0.027	3	9.7	6	325	2
5B	0.065	3	12	7	172	3
6A	0.021	3	9.7	9	341	3
7A	0.055	3	16	5	308	2
8A	0.049	3	9,6	8	206	3
9B	0.042	3	8.8	6	263	3
10B	0.052	2	7,3	5	141	2
11A	0.023	2	11	5	534	2
12B	0.096	3	9.4	8	97	3

N = cantidad de experimentos independientes en los que se ensayaron los compuestos.

Tabla 7: Ensayos sobre EC₅₀, CC₅₀, y SI para los compuestos contra el serotipo 2 en RT-qPCR

Protocolo A						
RT-qPCR serotipo 2 16681						
No. de compuesto	EC50 (µM)	N	CC50 (µM)	N	SI	N
1A	0.0032	6	12	6	4043	6
2B	0.0023	3	4.9	3	1700	3
3A	0.00079	4	4.2	4	5745	4
4A	0.0016	3	13	3	7510	3
5B	0.0036	3	3.6	3	1087	3
6A	0.0017	6	4.1	6	2535	6
7A	0.0034	4	4.3	4	1316	4
8A	0.00090	4	10	4	11745	4
9B	0.0032	4	3.7	4	1180	4
10B	0.0032	3	6.5	3	1818	3
11A	0.00084	5	7.2	6	9329	5
12B	0.0081	3	4.7	3	520	3

Protocolo B						
RT-qPCR serotipo 2 NGC-Tongalike						
No. de compuesto	EC50 (µM)	N	CC50 (µM)	N	SI	N
1A	0.0010	3	13	3	11200	1
2B	0.00081	3	15	3	18500	3
3A	<0.00028	5	13	4	46900	4
4A	<0.00029	3	18	3	109414	1
5B	0.00044	3	11	3	30000	1
6A	<0.00035	5	17	3	39200	3
7A	0.0016	3	18	3	9980	1
8A	<0.00024	4	NA		NA	
9B	0.00080	2	14	2	17500	2
10B	0.0016	3	11	3	6750	3
11A	0.00068	3	12	3	17600	1
12B	0.0017	3	14	3	8070	3

N = cantidad de experimentos independientes en los que se ensayaron los compuestos. NA= no aprobado.

ES 2 711 117 T3

Tabla 8: Ensayos sobre EC₅₀, CC₅₀, y SI para los compuestos contra el serotipo 3 en RT-qPCR

Protocolo A						
RT-qPCR serotipo 3 H87						
No. de compuesto	EC50 (µM)	N	CC50 (µM)	N	SI	N
1A	0.12	6	4.4	5	38	5
2B	0.11	3	>2.5	1	>32	1
3A	0.088	3	2.2	2	23	2
4A	0.14	3	3.6	3	22	3
5B	0.19	3	3.4	3	20	3
6A	0.13	3	3.1	2	27	2
7A	0.19	3	3.9	2	24	2
8A	0.20	3	5.8	2	41	2
9B	0.19	3	>2.5	1	>12	1
10B	0.13	3	2.3	3	18	3
11A	0.085	3	3.7	3	44	3
12B	0.27	3	2.8	3	11	3

Protocolo B						
RT-qPCR serotipo 3 H87						
No. de compuesto	EC50 (µM)	N	CC50 (µM)	N	SI	N
1A	0.053	3	13	5	207	3
2B	0.042	3	9.2	6	188	1
3A	0.032	4	7.6	6	232	4
4A	0.016	3	9.7	6	443	3
5B	0.050	3	12	7	212	3
6A	0.020	5	9.7	9	484	4
7A	0.041	3	16	5	339	3
8A	0.029	5	9.6	8	324	5
9B	0.066	3	8.8	6	109	1
10B	<0.022	3	7.3	5	>337	3
11A	0.040	3	11	5	261	3
12B	0,077	4	9,4	8	133	4

N = cantidad de experimentos independientes en los que se ensayaron los compuestos.

Tabla 9: Ensayos sobre EC₅₀, CC₅₀, y SI para los compuestos contra el serotipo 4 en RT-qPCR

Protocolo A						
RT-qPCR serotipo 4 H241						
No. de compuesto	EC50 (µM)	N	CC50 (µM)	N	SI	N
1A	0.48	6	9.0	7	16	6
2B	0.32	3	3.7	3	11	3
3A	0.24	5	2.8	4	12	4
4A	0.40	4	7.0	4	17	4
5B	0.45	3	2.5	3	5	3
6A	0.20	6	2.8	6	15	6
7A	0.47	4	2.4	3	4	3
8A	0.52	4	6.6	3	15	3
9B	0.39	4	2.9	4	7	4
10B	0.39	3	4.5	2	7	2
11A	0.35	5	5.1	4	15	4
12B	0.29	3	5.0	3	20	3

ES 2 711 117 T3

Protocolo A						
RT-qPCR serotipo 4 EDEN						
No. de compuesto	EC50 (µM)	N	CC50 (µM)	N	SI	N
1A	0.012	6	12	6	1066	6
2B	0.011	4	4.9	4	416	4
3A	0.016	3	4.1	3	261	3
4A	0.016	4	6.7	4	422	4
5B	0.024	4	5.6	4	223	4
6A	0.013	4	6.6	4	506	4
7A	0.023	4	4.5	4	184	4
8A	0.021	4	6.8	4	311	4
9B	0.020	4	4.9	4	236	4
10B	0.020	4	6.0	4	284	4
11A	0.015	5	4.8	3	235	3
12B	0.017	3	3.8	3	219	3

N = cantidad de experimentos independientes en los que se ensayaron los compuestos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Janssen Pharmaceuticals, Inc
 Katholieke Universiteit Leuven

5

<120> Indoles mono o disustituidos como inhibidores de la replicación del virus del dengue
 <130> TIP 325 PCT

10

<150> EP14187373.7
 <151> 2014-10-01
 <150> EP15156073.7
 <151> 2015-02-23

15

<160> 14
 <170> BiSSAP 1.2

20

<210> 1
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Virus del dengue

25

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..19
 <223> /organismo="Virus del dengue"
 /tipo_mol="ADN sin asignar"

30

<400> 1
 cggtagagg agaccctc 19

35

<210> 2
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Virus del dengue

40

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..21
 <223> /organismo="Virus del dengue"
 /tipo_mol="ADN sin asignar"

45

<400> 2
 gagacagcag gatctctggt c 21

50

<210> 3
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Virus del dengue

55

<220>
 <221> fuente
 <222> 1..28
 <223> /organismo="Virus del dengue"
 /tipo_mol="ADN sin asignar"

60

<400> 3
 aaggactaga ggtagagga gaccccc 28

65

<210> 4
 <211> 18
 <212> ADN

<213> Virus del dengue
 <220>
 <221> fuente
 5 <222> 1..18
 <223> /organismo="Virus del dengue"
 /tipo_mol="ADN sin asignar"
 <400> 4
 10 ggccaggtca tcaccatt 18
 <210> 5
 <211> 21
 15 <212> ADN
 <213> Virus del dengue
 <220>
 <221> fuente
 20 <222> 1..21
 <223> /organismo="Virus del dengue"
 /tipo_mol="ADN sin asignar"
 <400> 5
 25 atgtccacgt cacactcat g 21
 <210> 6
 <211> 21
 30 <212> ADN
 <213> Virus del dengue
 <220>
 <221> fuente
 35 <222> 1..21
 <223> /organismo="Virus del dengue"
 /tipo_mol="ADN sin asignar"
 <400> 6
 40 ttccgctgcc ctgaggctct c 21
 <210> 7
 <211> 20
 45 <212> ADN
 <213> Virus del dengue
 <220>
 <221> fuente
 50 <222> 1..20
 <223> /organismo="Virus del dengue"
 /tipo_mol="ADN sin asignar"
 <400> 7
 55 tcggagccgg agtttacaaa 20
 <210> 8
 <211> 20
 60 <212> ADN
 <213> Virus del dengue
 <220>
 <221> fuente
 65 <222> 1..20
 <223> /organismo="Virus del dengue"

```

        /tipo_mol="ADN sin asignar"
<400> 8
5  tcttaacgtc cgcccatgat                20

    <210> 9
    <211> 19
    <212> ADN
10  <213> Virus del dengue

    <220>
    <221> fuente
    <222> 1..19
15  <223> /organismo="Virus del dengue"
        /tipo_mol="ADN sin asignar"

    <400> 9
20  attccacaca atgtggcat                19

    <210> 10
    <211> 23
    <212> ADN
25  <213> Virus del dengue

    <220>
    <221> fuente
    <222> 1..23
30  <223> /organismo="Virus del dengue"
        /tipo_mol="ADN sin asignar"

    <400> 10
35  ggatagacca gagatcctgc tgt          23

    <210> 11
    <211> 20
    <212> ADN
40  <213> Virus del dengue

    <220>
    <221> fuente
    <222> 1..20
45  <223> /organismo="Virus del dengue"
        /tipo_mol="ADN sin asignar"

    <400> 11
50  cattccattt tctggcggtc            20

    <210> 12
    <211> 20
    <212> ADN
55  <213> Virus del dengue

    <220>
    <221> fuente
    <222> 1..20
60  <223> /organismo="Virus del dengue"
        /tipo_mol="ADN sin asignar"

    <400> 12
65  caatccatct tgcggcgctc            20

```

```

<210> 13
<211> 20
<212> ADN
<213> Virus del dengue
5
<220>
<221> fuente
<222> 1..20
<223> /organismo="Virus del dengue"
10   /tipo_mol="ADN sin asignar"

<400> 13
cagcatcatt ccaggcacag                20

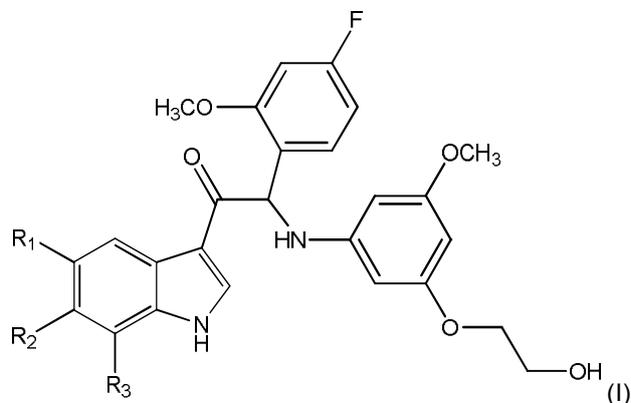
15
<210> 14
<211> 20
<212> ADN
<213> Virus del dengue
20
<220>
<221> fuente
<222> 1..20
<223> /organismo="Virus del dengue"
25   /tipo_mol="ADN sin asignar"

<400> 14
caacatcaat ccaggcacag                20

```

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I)



5 una forma estereoisomérica, una sal, un solvato o un polimorfo farmacéuticamente aceptables de este, que comprende un grupo indol mono o disustituido; dicho compuesto se selecciona de un grupo donde

R₁ es H, R₂ es F y R₃ es H, F o CH₃;

R₁ es F o CH₃, R₂ es OCH₃ y R₃ es H;

R₁ es H, R₂ es Cl y R₃ es H o CH₃;

R₁ es F, R₂ es H y R₃ es CH₃;

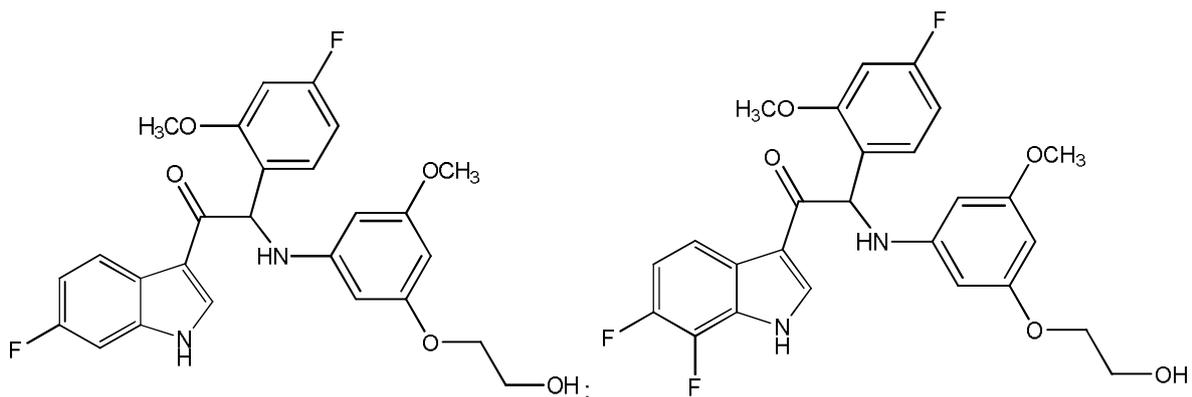
10 R₁ es H, R₂ es OCH₃ y R₃ es Cl;

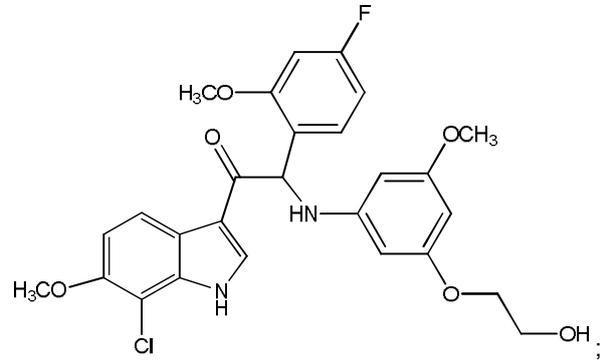
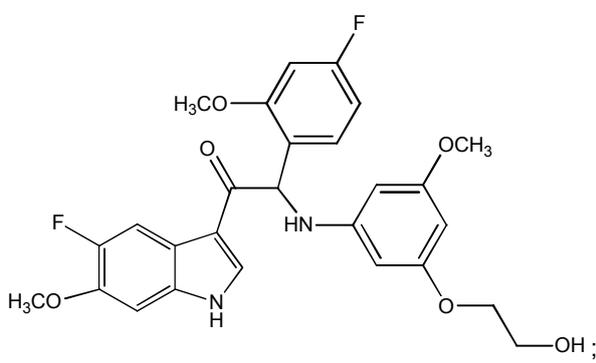
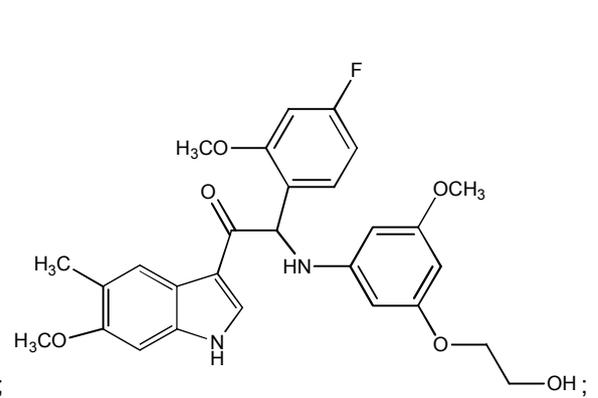
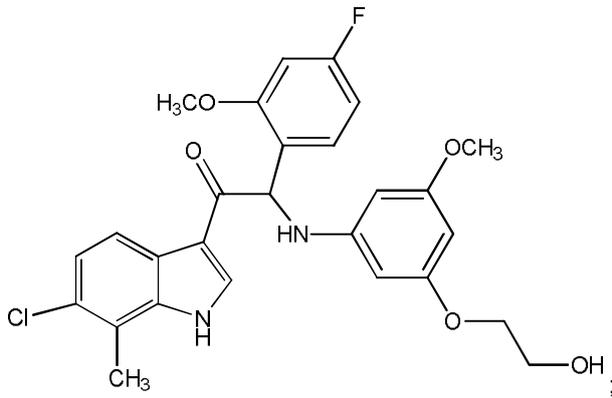
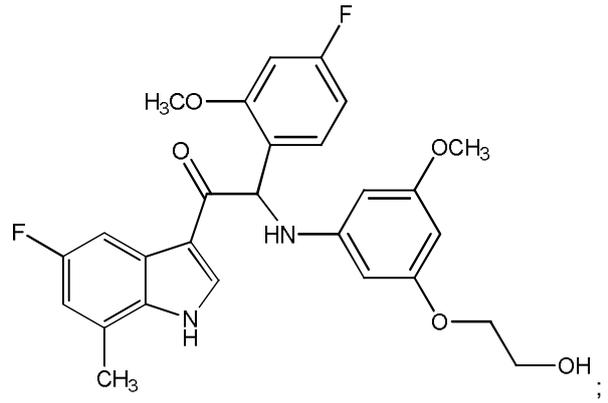
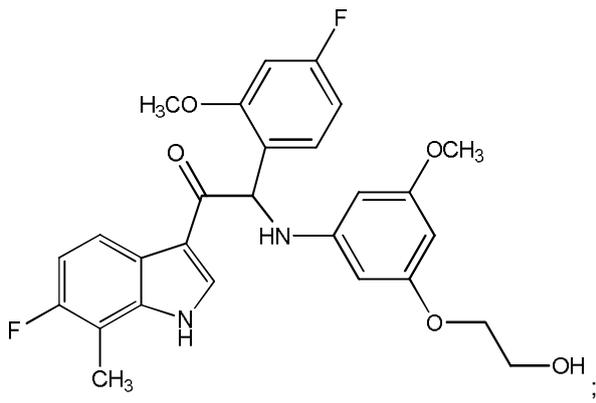
R₁ es F, R₂ es F y R₃ es H;

R₁ es H, R₂ es OCH₃ y R₃ es CH₃ o

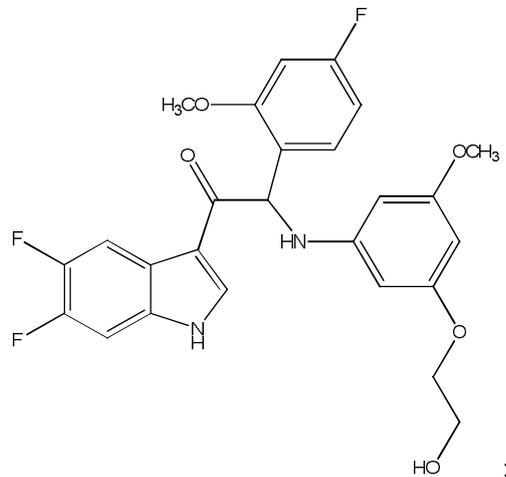
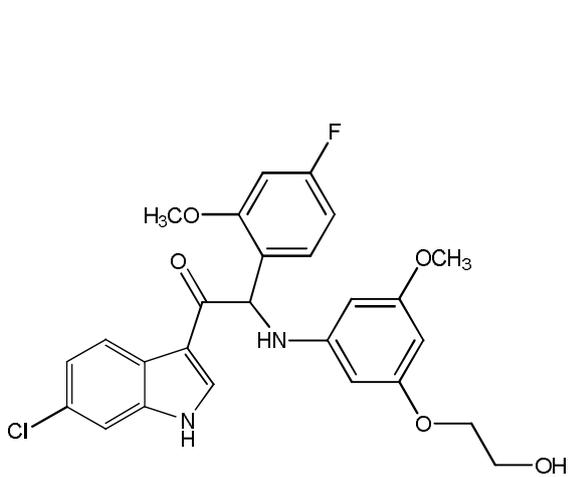
R₁ es CH₃, R₂ es H y R₃ es F.

15 2. Un compuesto o su forma estereoisomérica, una sal, un solvato o un polimorfo farmacéuticamente aceptables de este de conformidad con la reivindicación 1, donde el compuesto se selecciona entre el grupo:

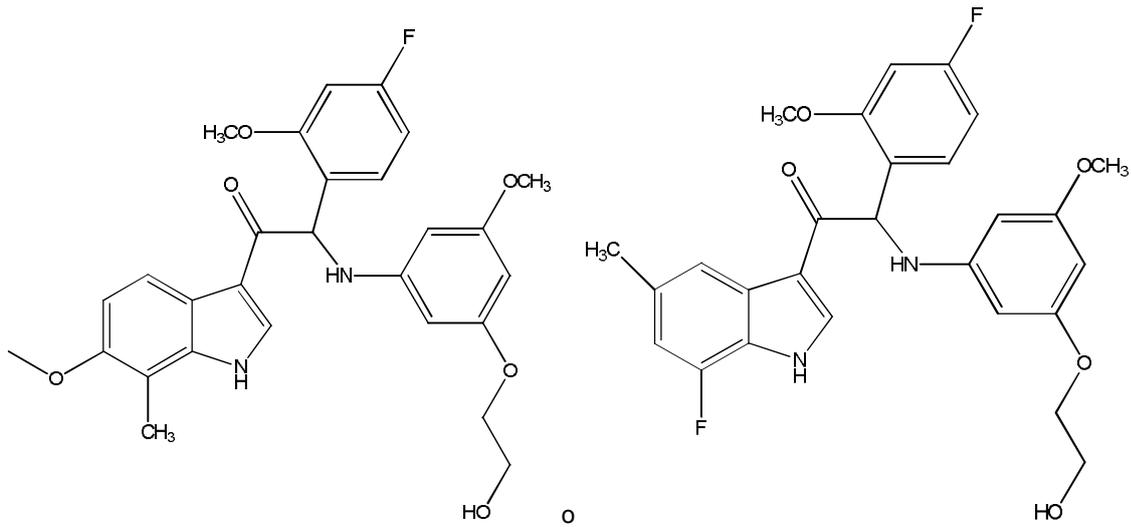




o



5

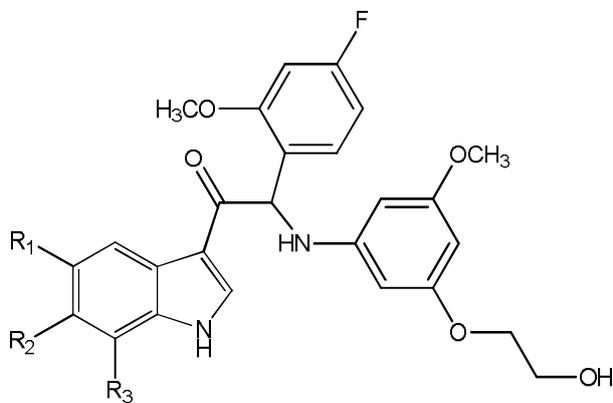


3. Una composición farmacéutica, que comprende un compuesto de fórmula (I) o una forma estereoisomérica, una sal, un solvato o un polimorfo farmacéuticamente aceptables de este de conformidad con la reivindicación 1 o 2, junto con uno o más excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

5 4. Un compuesto de fórmula (I) o una forma estereoisomérica, una sal, un solvato o un polimorfo farmacéuticamente aceptables de este de conformidad con la reivindicación 1 o una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 3 para su uso como medicamento.

10 5. Un compuesto de fórmula (I) o una forma estereoisomérica, una sal, un solvato o un polimorfo farmacéuticamente aceptables de este de conformidad con la reivindicación 1 o una composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 3 para su uso en el tratamiento del dengue.

6. Un compuesto representado por la siguiente fórmula estructural (I)



una forma estereoisomérica, una sal, un solvato o un polimorfo farmacéuticamente aceptables de este, que comprende un grupo indol mono o disustituido; dicho compuesto se selecciona de un grupo donde

15 R₁ es H, R₂ es F y R₃ es H, F o CH₃;

R₁ es F o CH₃, R₂ es OCH₃ y R₃ es H;

R₁ es H, R₂ es Cl y R₃ es H o CH₃;

R₁ es F, R₂ es H y R₃ es CH₃;

R₁ es H, R₂ es OCH₃ y R₃ es Cl;

20 R₁ es F, R₂ es F y R₃ es H;

R₁ es H, R₂ es OCH₃ y R₃ es CH₃ o

R₁ es CH₃, R₂ es H y R₃ es F

para uso en la inhibición de la replicación del virus o los virus del dengue en una muestra biológica o un paciente.

7. El compuesto para uso de conformidad con la reivindicación 6 que comprende además la coadministración de un agente terapéutico adicional.

5 8. El compuesto para uso de conformidad con la reivindicación 7 donde dicho agente terapéutico adicional es otro agente antiviral.