

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 074**

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/EP2015/072551**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2016 WO16050841**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2015 E 15771136 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2018 EP 3201176**

54 Título: **Derivados de indol mono- o disustituidos como inhibidores de la replicación del virus del dengue**

30 Prioridad:

**01.10.2014 EP 14187374**

**16.03.2015 EP 15159164**

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

**27.05.2019**

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 2 714 074 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

Derivados de indol mono- o disustituidos como inhibidores de la replicación del virus del dengue

La presente invención se refiere a compuestos de indol mono- o disustituidos, y se refiere también 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 procesos de preparación de los compuestos.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

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 DENV-1, -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 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 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.

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). 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 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.

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.

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.

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 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.

WO 2013/045516 divulga compuestos de indol como inhibidores de la replicación del virus.

La presente invención proporciona compuestos, derivados de indol mono- o disustituidos, 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

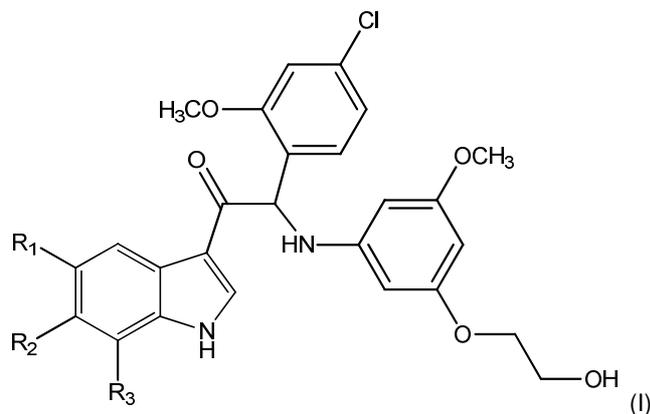
La presente invención se basa en el hallazgo inesperado, que indica que al menos uno de los problemas mencionados anteriormente se puede resolver mediante los compuestos actuales de la invención.

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:

R<sub>1</sub> es H, R<sub>2</sub> es F y R<sub>3</sub> es H, F o CH<sub>3</sub>;

R<sub>1</sub> es F o CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> es OCH<sub>3</sub> y R<sub>3</sub> es H;

R<sub>1</sub> es F, R<sub>2</sub> es H y R<sub>3</sub> es CH<sub>3</sub>;

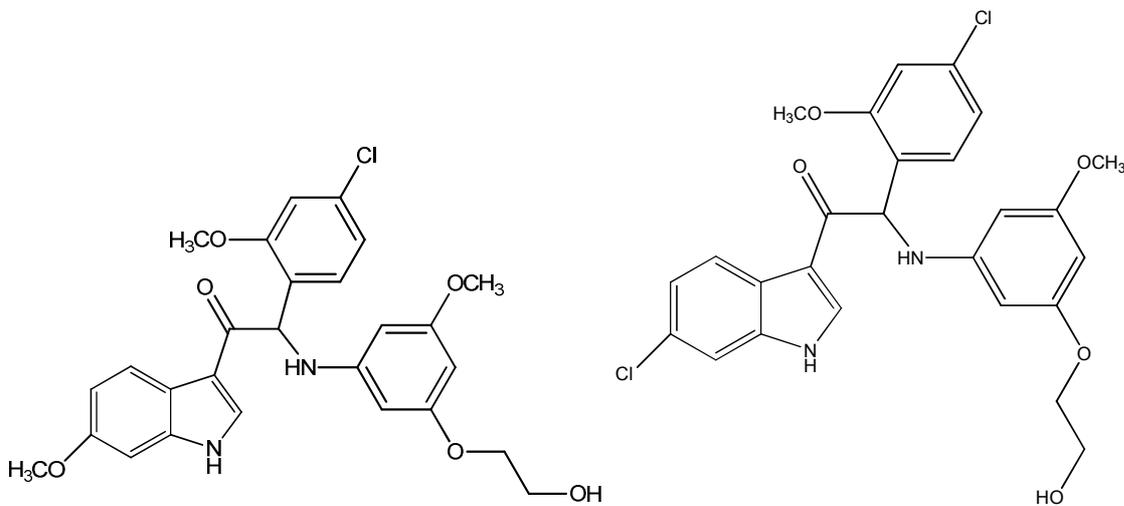
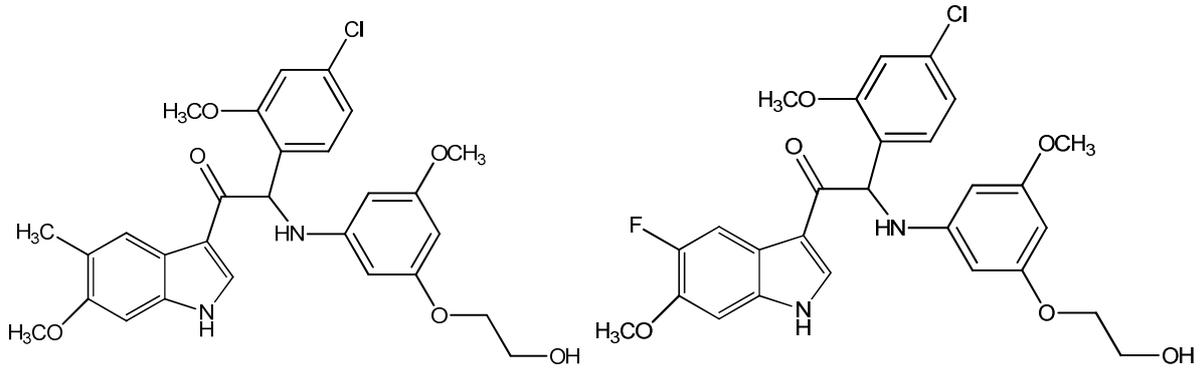
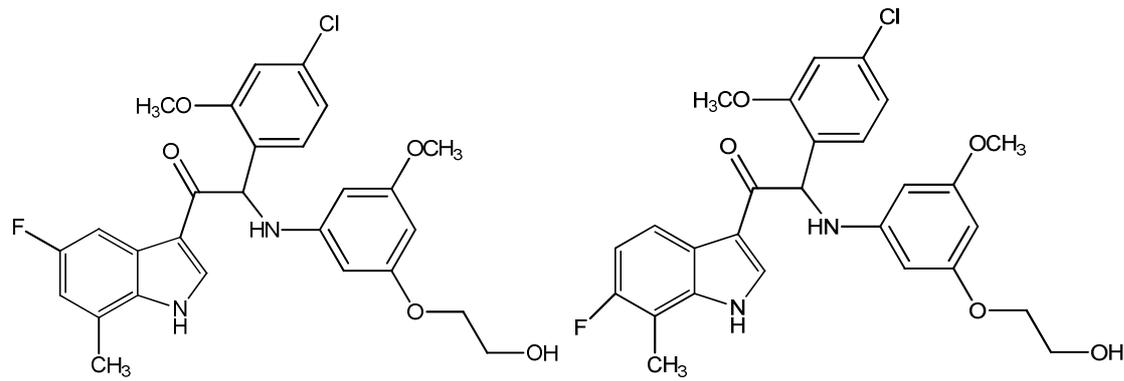
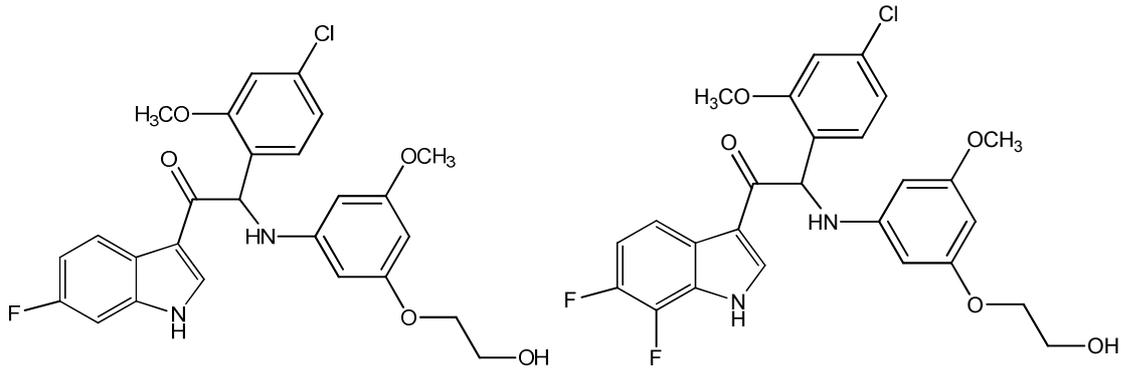
30 R<sub>1</sub> es H, R<sub>2</sub> es OCH<sub>3</sub> y R<sub>3</sub> es H;

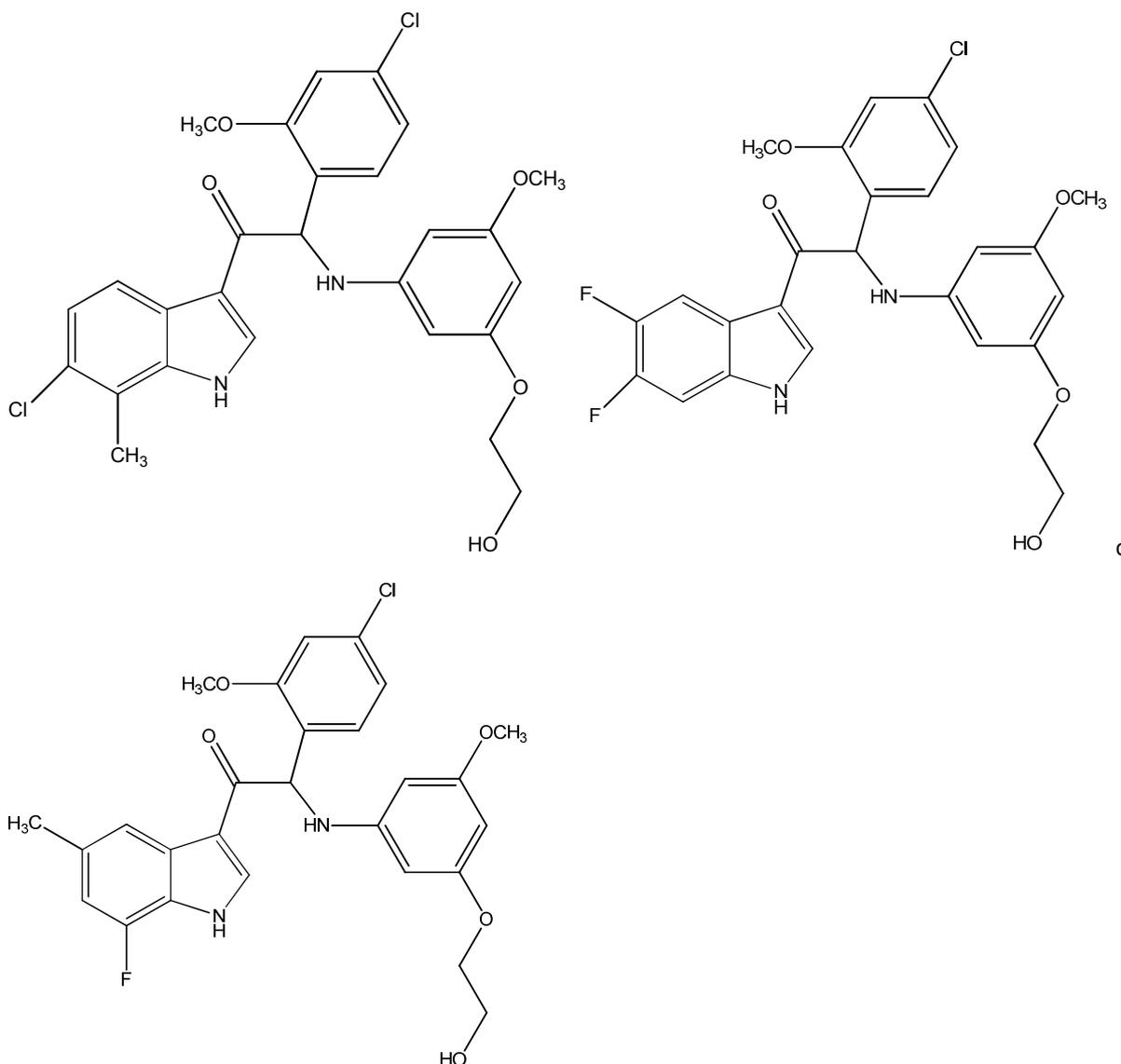
R<sub>1</sub> es H, R<sub>2</sub> es Cl y R<sub>3</sub> es H o CH<sub>3</sub>;

R<sub>1</sub> es F, R<sub>2</sub> es F y R<sub>3</sub> es H o

R<sub>1</sub> es CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> es H y R<sub>3</sub> 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 oscilaría 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.

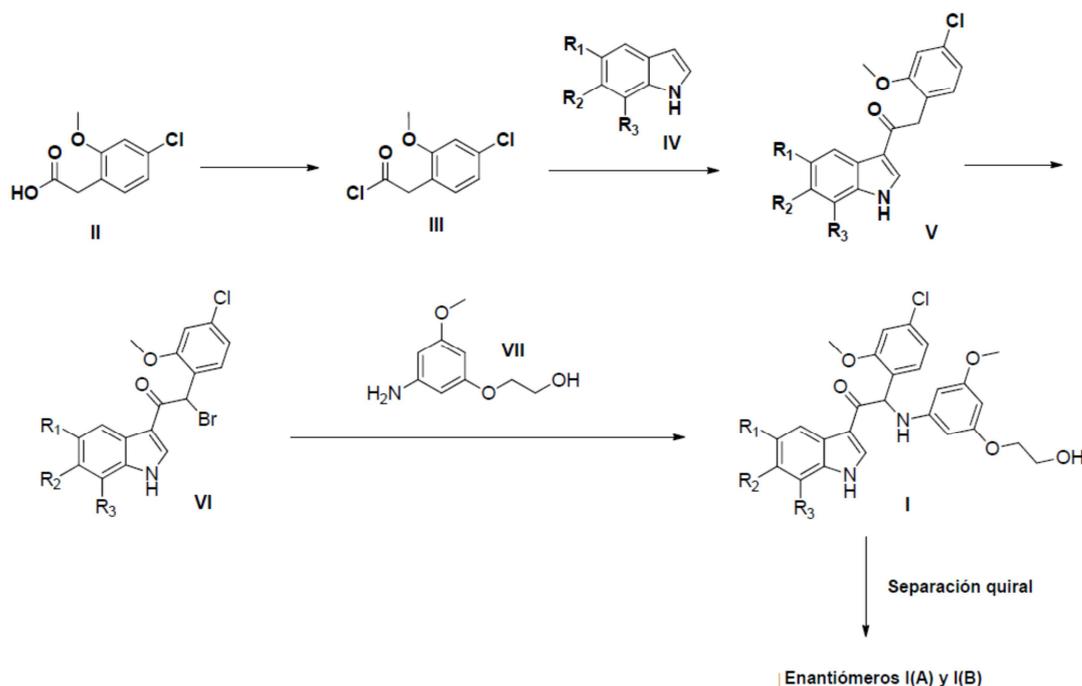
Dicha mezcla puede contener todos los diastereómeros y/o enantiómeros de la estructura molecular básica de dicho compuesto. Todas las formas estereoquímicamente isómeras de los compuestos utilizados la presente invención, tanto en forma pura o mezcladas unas con otras, están incluidas dentro del alcance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

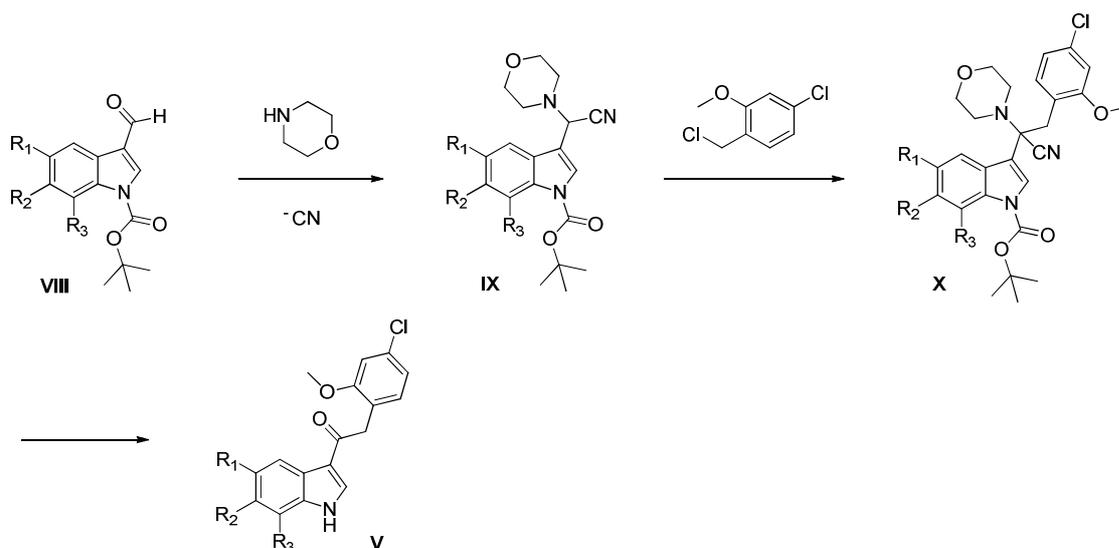
### Enfoques sintéticos generales

La síntesis de compuestos de fórmula general I puede llevarse a cabo como se describe en el Esquema 1: ácido 2-(4-cloro-2-metoxifenil) acético (II) se puede convertir en el correspondiente cloruro de 2-(4-cloro-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  $\text{Et}_2\text{AlCl}$  en un disolvente adecuado, como  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 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  $\text{CH}_3\text{CN}$ , y típicamente mediante una base, como TEA o DIPEA, 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

Como un enfoque alternativo, el intermediario de fórmula general V se pueden preparar también como se describe en el Esquema 2: El indol-3-carbaldehído sustituido N-Boc protegido de fórmula general VIII se puede convertir en el correspondiente tipo Strecker del intermediario de fórmula general IX mediante la reacción con morfolina en presencia de reactivos como por ejemplo cianuro de sodio y bisulfito de sodio y en un solvente adecuado como por ejemplo una mezcla de agua y un solvente orgánico miscible agua como por ejemplo dioxano. La alquilación del compuesto de fórmula general IX con cloruro de 4-cloro-2-metoxi-bencilo se puede realizar en presencia de una base como por ejemplo hexametildisilazano de potasio y en un solvente adecuado como por ejemplo DMF para proporcionar el compuesto de fórmula general X. La presentación del compuesto de fórmula general X a una condición hidrolítica adecuado acuosa ácida como por ejemplo el tratamiento con una solución acuosa de ácido clorhídrico a temperatura elevada, proporciona el intermedio de fórmula general V.



Esquema 2

**Ejemplos****Métodos LC/MS**

- 5 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).

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.

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.

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 LC/MS (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, 2.1x50mm)	A: 10mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> en 95% H <sub>2</sub> O + 5% CH <sub>3</sub> CN B: CH <sub>3</sub> CN	De 95% A a 5% A en 1.3 min, mantenido por 0.7 min.	0.8 mL/min ----- 55°C	2

Código del método	Instrumento	Columna	Fase móvil	Gradiente	Flujo ----- Col T	Tiempo de ejecución (min)
LC-B	Waters: Acquity® UPLC® -DAD-SQD	Waters: HSS T3 (1.8µm, 2.1x100mm)	A: 10mM CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> en 95% H <sub>2</sub> O + 5% CH <sub>3</sub> CN B: CH <sub>3</sub> 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 <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> 7mM / 5% CH <sub>3</sub> CN, B: CH <sub>3</sub> 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	Waters:Acquity® UPLC® -DAD-TQD	Waters:HSSC18 (1.8µm, 2.1x50mm)	A: 0.1% de ácido fórmico en H <sub>2</sub> O B: CH <sub>3</sub> CN	50% A a 10% en 3.5 min, mantenido por 1.5 min.	0.5 mL/min ----- 40°C	5

### Métodos SFC-MS

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 (CO<sub>2</sub>) 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.

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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> B: MeOH	40% B, mantenido por 7 min.	3 ----- 35	7 ----- 100
SFC-C	Columna Daicel Chiralpak® OJ-H (5 µm, 250 x 4,6 mm)	A: CO <sub>2</sub> B: MeOH	40% B, mantenido por 7 min.	3 ----- 35	7 ----- 100

Código del método	Columna	Fase móvil	Gradiente	Flujo ----- Col T	Tiempo de ejecución ----- BPR
SFC-D	Columna Daicel Chiralpak® OD-H (5 µm, 150 x 4,6 mm)	A: CO <sub>2</sub> B: MeOH	40% B, mantenido por 7 min.	3 ----- 35	7 ----- 100
SFC-E	WHELK-O1 (S,S) 250*4.6mm 5µm Regis	A: CO <sub>2</sub> B: MeOH	60% B, mantenido por 7 min.	3 ----- 35	7 ----- 100
SFC-F	Columna Daicel Chiralpak® AS3 (3,0 µm, 150 x 4,6 mm)	A: CO <sub>2</sub> B: EtOH +0,2% iPrNH <sub>2</sub> +3% H <sub>2</sub> 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® AS3 (3,0 µm, 150 x 4,6 mm)	A: CO <sub>2</sub> B: EtOH +0,2% iPrNH <sub>2</sub> +3% H <sub>2</sub> O	30% 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)

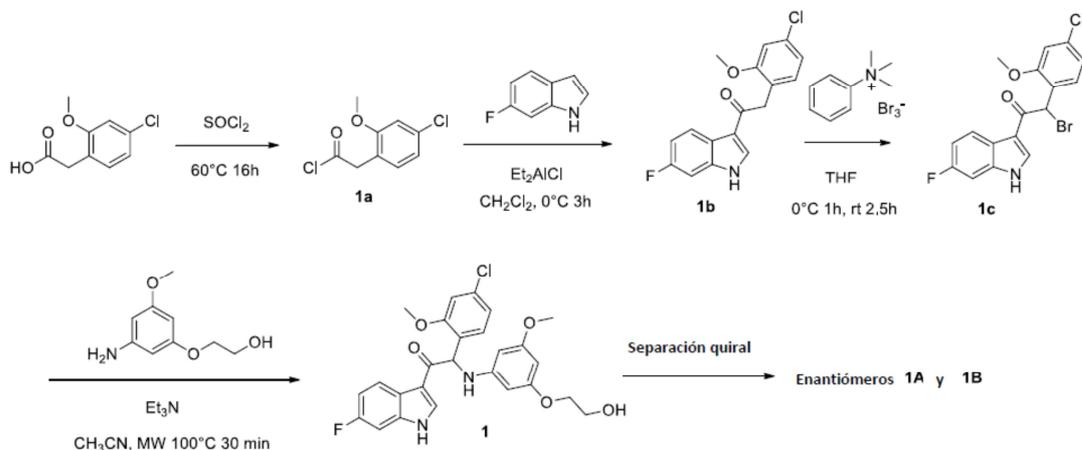
- 5 Para una serie de compuestos, los puntos de fusión se determinaron con un DSC823e (Mettler-Toledo). Los puntos de fusión se midieron con un gradiente de temperatura de 10°C/minuto. La temperatura máxima fue de 300°C.

### 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:  $[\alpha]_D^T$  ( $\lambda$ , 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  $\lambda$  (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 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(6-fluoro-1H-indol-3-il)-2-((3-(2-hidroxietoxi)-5-metoxifenil)amino)etanona (Compuesto 1) y separación quiral en enantiómeros **1A** y **1B**.



### Síntesis del intermediario 1a:

Se agregó ácido 2-(4-cloro-2-metoxifenil)acético [CAS 170737-95-8] (5.8 g, 28.9 mmol) en porciones pequeñas a cloruro de tionilo (50 mL) y la solución resultante se agitó durante la noche a 60°C. El disolvente se concentró bajo presión reducida y se co-evaporó con tolueno para proporcionar cloruro de 2-(4-cloro-2-metoxifenil)acetilo **1a** (6.5 g) como un residuo aceitoso que se usó sin purificación adicional en la siguiente etapa.

### Síntesis del intermediario 1b:

Se agregó por goteo cloruro de dietilaluminio 1M en hexano (37.1 mL, 37.14 mmol) a 0°C a una solución de 6-fluoro-1*H*-indol [CAS 399-51-9] (3.34 g, 24.76 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL). Después de 30 min a 0°C, una solución de cloruro de 2-(4-cloro-2-metoxifenil)acetilo **1a** (6.3 g, 28.76 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 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 una pequeña cantidad de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Los sólidos se secaron al vacío a 70°C durante la noche para proporcionar 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(6-fluoro-1*H*-indol-3-il)etanona **1b** (4.9 g).

### Síntesis del intermediario 1c:

A 0°C, una solución de tribromuro de feniltrimetilamonio [CAS 4207-56-1] (5.8 g, 15.4 mmol) en THF (65 mL) se agregó por goteo a una mezcla de 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(6-fluoro-1*H*-indol-3-il)etanona **1b** (4.9 g, 15.4 mmol) en THF (60 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 se recogió con EtOAc y se lavó con agua. Se formó un precipitado en la capa orgánica y se filtró y se secó para proporcionar una primera partida de 2-bromo-2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(6-fluoro-1*H*-indol-3-il)etanona **1c** (4.6 g). La capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y el disolvente se evaporó bajo presión reducida. El residuo se cristalizó a partir de EtOAc, el precipitado se filtró, se lavó con Et<sub>2</sub>O y se secó al vacío para proporcionar una segunda fracción de 2-bromo-2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(6-fluoro-1*H*-indol-3-il)etanona **1c** (1.6 g).

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

Una mezcla de 2-bromo-2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(6-fluoro-1*H*-indol-3-il)etanona **1c** (2.1 g, 5.3 mmol), 2-(3-amino-5-metoxifenoxi)etanol [CAS 725237-16-1] (924 mg, 5.05 mmol) y trietilamina (1.47 mL, 10.6 mmol) en CH<sub>3</sub>CN (16 mL) en un tubo sellado se calentó a 100°C durante 30 min utilizando un microondas Biotage® Initiator EXP 60 con un una salida de energía que varía entre 0 a 400 W (tiempo de retención fijo). La reacción se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y la capa orgánica se lavó con agua, se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y el disolvente se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (15-40 μm, 80 g) utilizando a heptano/EtOAc gradiente of 50/50 a 0/100. Las fracciones puras se recogieron y se concentró para proporcionar 1.1 g de Compuesto **1**. Esta fracción se combinó con otra partida de 0.93 g de Compuesto **1** y posteriormente se purificó mediante SFC aquiral (fase estacionaria: CIANO 6 μm 150 x 21.2 mm, fase móvil: 75% CO<sub>2</sub>, 25% MeOH) para proporcionar 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(6-fluoro-1*H*-indol-3-il)-2-((3-(2-hidroxi)etoxi)-5-metoxifenil)amino)etanona (Compuesto **1**, 1.36 g) como una mezcla racémica.

Los enantiómeros de Compuesto **1** (1.36 g) se separaron mediante SFC quiral (fase estacionaria: Chiralcel® OJ 20 x 250 mm, fase móvil: 60% CO<sub>2</sub>, 40% MeOH) Para producir 611 mg del primer enantiómero eluido y 586 mg del segundo enantiómero eluido. El primer enantiómero eluido se recogió con CH<sub>3</sub>CN/diisopropiléter/heptano. El precipitado se filtró y se secó para proporcionar el enantiómero **1A** (496 mg) como un polvo amorfo. El segundo enantiómero eluido se recogió con CH<sub>3</sub>CN/diisopropiléter/heptano. El precipitado se filtró y se secó para proporcionar el enantiómero **1B** (458 mg) como un polvo amorfo.

**Compuesto 1:**

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 3.61 (s, 3 H) 3.64 (c, *J*=5.3 Hz, 2 H) 3.77 - 3.88 (m, 2 H) 3.96 (s, 3 H) 4.78 (t, *J*=5.5 Hz, 1 H) 5.71 (t, *J*=1.9 Hz, 1 H) 5.93 (d, *J*=1.9 Hz, 2 H) 6.15 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 6.40 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 6.96 (dd, *J*=8.2, 1.9 Hz, 1 H) 7.02 - 7.08 (m, 1 H) 7.09 (d, *J*=1.9 Hz, 1 H) 7.27 (dd, *J*=9.6, 2.4 Hz, 1 H) 7.35 (d, *J*=8.5 Hz, 1 H) 8.13 (dd, *J*=8.8, 5.7 Hz, 1 H) 8.43 (s, 1 H) 11.96 - 12.17 (m, 1 H)

LC/MS (método LC-C): R<sub>t</sub> 2.95 min, MH<sup>+</sup> 499

**Enantiómero 1A:**

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 3.57 - 3.68 (m, 5 H) 3.77 - 3.89 (m, 2 H) 3.96 (s, 3 H) 4.73 - 4.87 (m, 1 H) 5.71 (t, *J*=1.9 Hz, 1 H) 5.91 - 5.96 (m, 2 H) 6.15 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 6.39 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 6.96 (dd, *J*=8.2, 1.9 Hz, 1 H) 7.01 - 7.11 (m, 2 H) 7.27 (dd, *J*=9.6, 2.4 Hz, 1 H) 7.36 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 8.13 (dd, *J*=9.6, 5.7 Hz, 1 H) 8.43 (s, 1 H) 11.45 - 12.31 (m, 1 H)

LC/MS (método LC-C): R<sub>t</sub> 2.95, MH<sup>+</sup> 499

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +112.1° (c 0.281, DMF)

SFC quiral (método SFC-C): R<sub>t</sub> 3.17 min, MH<sup>+</sup> 499, pureza quiral 100%.

**Enantiómero 1B:**

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 3.57 - 3.67 (m, 5 H) 3.74 - 3.90 (m, 2 H) 3.96 (s, 3 H) 4.78 (s a, 1 H) 5.70 - 5.74 (m, 1 H) 5.93 (s, 2 H) 6.15 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 6.40 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 6.96 (dd, *J*=8.2, 1.9 Hz, 1 H) 7.02 - 7.08 (m, 1 H) 7.09 (d, *J*=1.9 Hz, 1 H) 7.27 (dd, *J*=9.6, 2.4 Hz, 1 H) 7.36 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 8.13 (dd, *J*=9.6, 5.5 Hz, 1 H) 8.43 (s, 1 H) 11.63 - 12.47 (m, 1 H)

LC/MS (método LC-C): R<sub>t</sub> 2.95, MH<sup>+</sup> 499

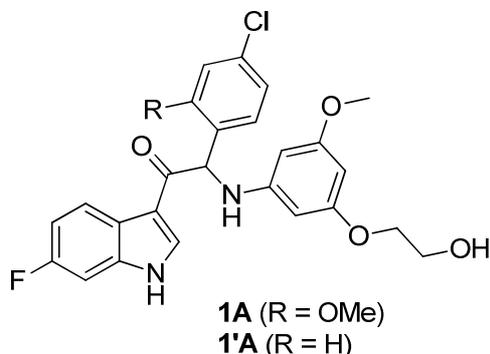
[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -113.9° (c 0.28, DMF)

SFC quiral (método SFC-C): R<sub>t</sub> 4.12 min, MH<sup>+</sup> 499, pureza quiral 100%.

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

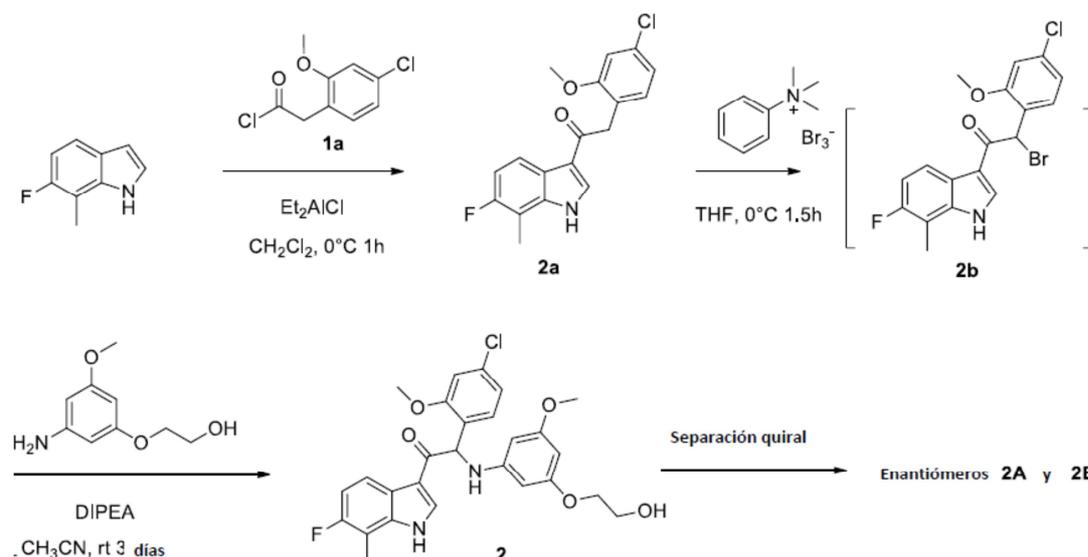
La estabilidad quiral del enantiómero **1A** (R = OMe) se evaluó mediante determinación del exceso enantiomérico (ee%) después de la incubación durante 24 h y 48 h en una solución tamponada a pH 7.4 a 40°C y 60°C. Para evaluar la influencia del sustituyente-metoxi del enantiómero **1A** (R = OMe) en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

A esta altura, soluciones 5 μM tamponadas (pH = 7.4) de **1A** y **1'A** se prepararon 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)	
		24	48
<b>1A</b>	40°C	100	100
	60°C	99	96
<b>1'A</b>	40°C	69	41
	60°C	0	0

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



### 5 Síntesis del intermediario 2a:

Una solución de 6-fluoro-7-metil-1*H*-indol [CAS 57817-10-4] (1.10 g, 7.37 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 mL) se enfrió en un baño de hielo bajo corriente-N<sub>2</sub>. Se agregó cloruro de dietilaluminio 1M en hexano (10 mL, 10 mmol) por goteo durante 15 min. Después de agitación adicional durante 15 min a 0°C, una solución de cloruro de 2-(4-cloro-2-metoxifenil)acetilo **1a** (2.06 g, 9.42 mmol, para síntesis: véase Ejemplo 1) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (35 mL) se agregó durante 75 min a 0°C. La reacción se agitó a 0°C durante 1 h y posteriormente se desactivó mediante la adición lenta de una solución de tetrahidrato tartrato de potasio y sodio (sal de Rochelle) [CAS 6100-16-9] (4.24 g, 15 mmol) en agua (10 mL), mientras se mantenía la temperatura interna de la mezcla por debajo de 10°C. El baño de hielo se eliminó, se agregaron 2-metil-THF (160 mL) y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (60 g) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. La mezcla se filtró sobre dicalite® y la torta de filtrado se lavó con varias porciones de THF. Los filtrados combinados se evaporaron bajo presión reducida y el residuo se trituroó con una pequeña cantidad de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Los sólidos se aislaron por filtración y se secaron al vacío para proporcionar 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(6-fluoro-7-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **2a** (1.9 g) como un polvo blanco.

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

Una solución de 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(6-fluoro-7-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **2a** (1.9 g, 5.73 mmol) en THF seco (60 mL) se enfrió en un baño de hielo bajo corriente-N<sub>2</sub>. a 0°C, una solución de tribromuro de feniltrimetilamonio [CAS 4207-56-1] (2.3 g, 5.91 mmol) en THF (50 mL) se agregó por goteo durante un periodo de 1 h y la mezcla se agitó a 0°C durante 1.5 h adicionales. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida y el residuo, que contenía el Intermediario en bruto bromado **2b**, se disolvió en CH<sub>3</sub>CN (100 mL). Se agregaron 2-(3-amino-5-metoxifenoxi)etanol [CAS 725237-16-1] (2.11 g, 11.5 mmol) y diisopropiletilamina (2 mL, 11.6 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 días. agua (350 mL) se agregó y la reacción productos se extrajeron con 2-metil-THF (3x 100 mL). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con HCl 0.5 M (200 mL) y agua

(3x 300 mL), se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> y se evaporaron bajo presión reducida. El residuo (2.48 g) se purificó mediante cromatografía en columna (fase estacionaria: Sílice 40 g, HP-Spher<sup>®</sup> 40 µm; Fase móvil: gradiente heptano/EtOAc 100/0 a 0/100). Las fracciones que contenían producto de reacción se combinaron y se evaporaron bajo presión reducida. El residuo se trituró con una pequeña cantidad de una mezcla de EtOAc/heptano (1/1), los sólidos se filtraron y se secaron al vacío para proporcionar 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(6-fluoro-7-metil-1*H*-indol-3-il)-2-((3-(2-hidroxietoxi)-5-metoxifenil)amino)etanona (Compuesto **2**, 1.38 g) como una mezcla racémica.

Los enantiómeros de Compuesto **2** (1.38 g) se separaron mediante SFC preparativa (fase estacionaria: Quiralpak<sup>®</sup> Diacel AS 20 x 250 mm, fase móvil: CO<sub>2</sub>, EtOH con 0.4% *i*PrNH<sub>2</sub>). El primer enantiómero eluido se disolvió en una mezcla de MeOH (50 mL) y agua (20 mL) y la mezcla se evaporó bajo presión reducida (200 mbar, baño de agua 40°C) a un volumen residual de 20 mL. La suspensión resultante se diluyó con 20 mL de agua y se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Un sólido blanco se filtró, se lavó con agua y se secó al vacío a temperatura ambiente para proporcionar el enantiómero **2A** (631 mg) como un polvo amorfo blanco. El segundo enantiómero eluido se disolvió en una mezcla de MeOH (50 mL) y agua (20 mL) y la mezcla se evaporó bajo presión reducida (200 mbar, baño de agua 40°C) a un volumen residual de 20 mL. La suspensión resultante se diluyó con 20 mL de agua y se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. Un sólido blanco se filtró, se lavó con agua y se secó al vacío a temperatura ambiente para proporcionar el enantiómero **2B** (625 mg) como un polvo amorfo blanco.

#### Compuesto 2:

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 2.37 (s a, 3 H) 3.60 (s, 3 H) 3.63 (c, *J*=5.2 Hz, 2 H) 3.76 - 3.89 (m, 2 H) 3.96 (s, 3 H) 4.76 (t, *J*=5.5 Hz, 1 H) 5.71 (t, *J*=2.1 Hz, 1 H) 5.94 (d, *J*=2.2 Hz, 2 H) 6.16 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 6.36 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 6.95 (dd, *J*=8.4, 2.0 Hz, 1 H) 7.00 (dd, *J*=10.1, 8.8 Hz, 1 H) 7.08 (d, *J*=2.0 Hz, 1 H) 7.35 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 7.95 (dd, *J*=8.7, 5.2 Hz, 1 H) 8.41 (s, 1 H) 12.17 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-A): R<sub>t</sub> 1.19 min, MH<sup>+</sup> 513

#### Enantiómero 2A:

<sup>1</sup>H RMN (360 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 2.38 (s, 3 H) 3.61 (s, 3 H) 3.62 - 3.67 (m, 2 H) 3.82 (ddt, *J*=15.4, 10.2, 5.1, 5.1 Hz, 2 H) 3.97 (s, 3 H) 4.81 (t, *J*=5.5 Hz, 1 H) 5.71 (t a, *J*=1.8 Hz, 1 H) 5.95 (d, *J*=1.5 Hz, 2 H) 6.17 (d a, *J*=8.4 Hz, 1 H) 6.40 (d a, *J*=8.1 Hz, 1 H) 6.96 (dd, *J*=8.4, 1.8 Hz, 1 H) 7.02 (dd a, *J*=10.1, 9.0 Hz, 1 H) 7.10 (d, *J*=1.8 Hz, 1 H) 7.36 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 7.96 (dd, *J*=8.6, 5.3 Hz, 1 H) 8.44 (s, 1 H) 12.22 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-A): R<sub>t</sub> 1.20, MH<sup>+</sup> 513

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +83.3° (c 0.36, DMF)

SFC quiral (método SFC-F): R<sub>t</sub> 2.05 min, MH<sup>+</sup> 513, pureza quiral 100%

#### Enantiómero 2B:

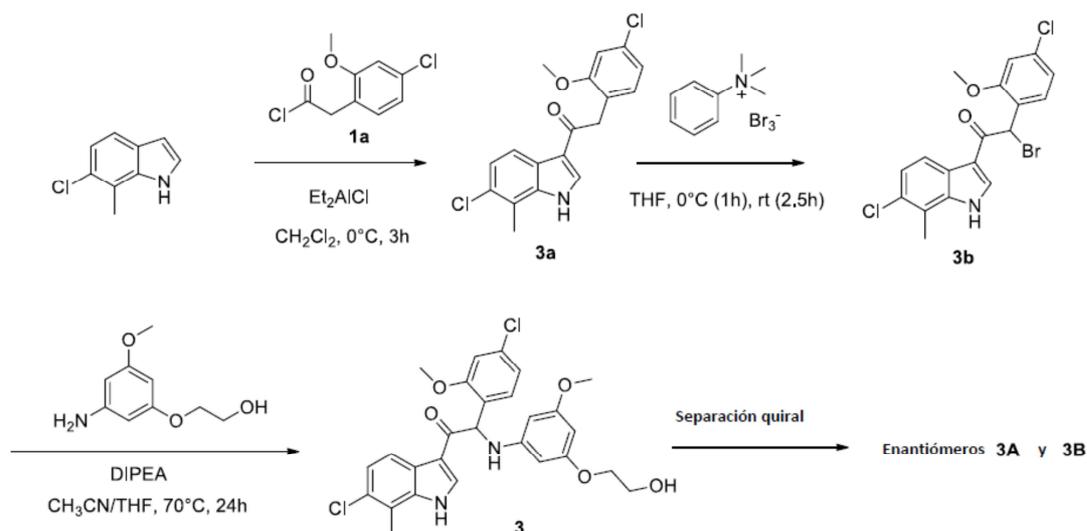
<sup>1</sup>H RMN (360 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 2.38 (s, 3 H) 3.61 (s, 3 H) 3.62 - 3.67 (m, 2 H) 3.83 (ct, *J*=10.2, 5.1 Hz, 2 H) 3.97 (s, 3 H) 4.80 (t, *J*=5.5 Hz, 1 H) 5.71 (t a, *J*=2.2 Hz, 1 H) 5.95 (d, *J*=1.8 Hz, 2 H) 6.17 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 6.40 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 6.96 (dd, *J*=8.4, 1.8 Hz, 1 H) 7.02 (dd, *J*=10.2, 8.8 Hz, 1 H) 7.10 (d, *J*=1.8 Hz, 1 H) 7.36 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 7.96 (dd, *J*=8.6, 5.3 Hz, 1 H) 8.44 (s, 1 H) 12.21 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-A): R<sub>t</sub> 1.20, MH<sup>+</sup> 513

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -81.9° (c 0.515, DMF)

SFC quiral (método SFC-F): R<sub>t</sub> 3.28 min, MH<sup>+</sup> 513, pureza quiral 100%

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

**Síntesis****del intermediario 3a:**

Se agregó cloruro de dietilaluminio 1M en hexano (18.1 mL, 18.1 mmol) por goteo a 0°C a una solución de 6-cloro-7-metil-1*H*-indol [CAS 57817-09-1] (2 g, 12.08 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (60 mL). Después de 30 min a 0°C, se agregó lentamente una solución de cloruro de 2-(4-cloro-2-metoxifenil)acetilo **1a** (3.21 g, 14.66 mmol, para síntesis: véase Ejemplo 1) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (60 mL) a 0°C. La reacción se agitó a 0°C durante 3 h. Se agregó hielo-agua y el precipitado se filtró y se lavó con agua. El sólido se secó al vacío para proporcionar 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(6-cloro-7-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **3a** (3.2 g).

**Síntesis del intermediario 3b:**

A 0°C, una solución de tribromuro de feniltrimetilamonio [CAS 4207-56-1] (3.63 g, 9.65 mmol) en THF (85 mL) se agregó por goteo a una solución de 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(6-cloro-7-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **3a** (3.2 g, 9.2 mmol) en THF (85 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 se recogió con una cantidad mínima de CH<sub>3</sub>CN/diisopropiléter. El precipitado se filtró y se secó al vacío para proporcionar 2-bromo-2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(6-cloro-7-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **3b** (4.1 g).

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

Una mezcla de 2-bromo-2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(6-cloro-7-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **3b** (3.1 g, 7.26 mmol), 2-(3-amino-5-metoxifenoxy)etanol [CAS 725237-16-1] (1.33 g, 7.26 mmol) y diisopropiltilamina (1.9 mL, 10.9 mmol) en CH<sub>3</sub>CN/THF (1/1) (120 mL) se agitó a 70°C durante 24 h. La mezcla se concentró bajo presión reducida. El residuo se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y se lavó con HCl 1N. La capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y el disolvente se evaporó bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (15-40 μm, 80 g en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (99.5/0.5)). Las fracciones puras se recogieron y se evaporaron bajo presión reducida (2.3 g). Una pequeña cantidad se cristalizó a partir de Et<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN para proporcionar una muestra analítica de 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(6-cloro-7-metil-1*H*-indol-3-il)-2-((3-(2-hidroxi-etoxi)-5-metoxifenil)amino)etanona (Compuesto **3**) como un racemato.

Los enantiómeros de Compuesto **3** (2.2 g) se separaron mediante SFC preparativa quiral (fase estacionaria: (S,S) Whelk-O 15 μm 250 x 21.1 mm, fase móvil: 45% CO<sub>2</sub>, 55% EtOH (+ 2% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)) para proporcionar 1.11 g del primer enantiómero eluido y 1.07 g del segundo enantiómero eluido. El primer enantiómero eluido se solidificó a partir de CH<sub>3</sub>CN/Et<sub>2</sub>O/heptano para proporcionar el enantiómero 3A (461 mg) como un polvo amorfo blanco. El segundo enantiómero eluido se solidificó a partir de CH<sub>3</sub>CN/Et<sub>2</sub>O/heptano para proporcionar el enantiómero 3B (872 mg) como un polvo amorfo blanco.

**Compuesto 3:**

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 12.26 (d, J=2.8 Hz, 1 H) 8.46 (d, J=3.2 Hz, 1 H) 7.97 (d, J=8.5 Hz, 1 H) 7.35 (d, J=8.2 Hz, 1 H) 7.22 (d, J=8.5 Hz, 1 H) 7.09 (d, J=1.9 Hz, 1 H) 6.96 (dd, J=8.2, 1.9 Hz, 1 H) 6.40 (d, J=8.2 Hz, 1 H) 6.18 (d, J=8.2 Hz, 1 H) 5.95 (d, J=2.2 Hz, 2 H) 5.71 (t, J=2.2 Hz, 1 H) 4.79 (t, J=5.5 Hz, 1 H) 3.96 (s, 3 H) 3.77 - 3.89 (m, 2 H) 3.58 - 3.67 (m, 5 H)

LC/MS (método LC-C): R<sub>t</sub> 3.28 min, MH<sup>+</sup> 529

Punto de fusión: 220°C

**Enantiómero 3A:**

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 12.26 (s a, 1 H) 8.46 (s, 1 H) 7.97 (d, J=8.2 Hz, 1 H) 7.36 (d, J=8.2 Hz, 1 H) 7.21 (d, J=8.5 Hz, 1 H) 7.10 (d, J=1.9 Hz, 1 H) 6.96 (dd, J=8.2, 1.9 Hz, 1 H) 6.40 (d, J=7.9 Hz, 1 H) 6.18 (d, J=8.2 Hz, 1 H) 5.95 (d, J=2.2 Hz, 2 H) 5.71 (t, J=2.0 Hz, 1 H) 4.79 (t, J=5.5 Hz, 1 H) 3.97 (s, 3 H) 3.77 - 3.89 (m, 2 H) 3.59 - 3.67 (m, 5 H)

LC/MS (método LC-C): R<sub>t</sub> 3.27 min, MH<sup>+</sup> 529

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +88.8° (c 0.2691, DMF)

SFC quiral (método SFC-E): R<sub>t</sub> 3.40 min, MH<sup>+</sup> 529, pureza quiral 100%.

**Enantiómero 3B:**

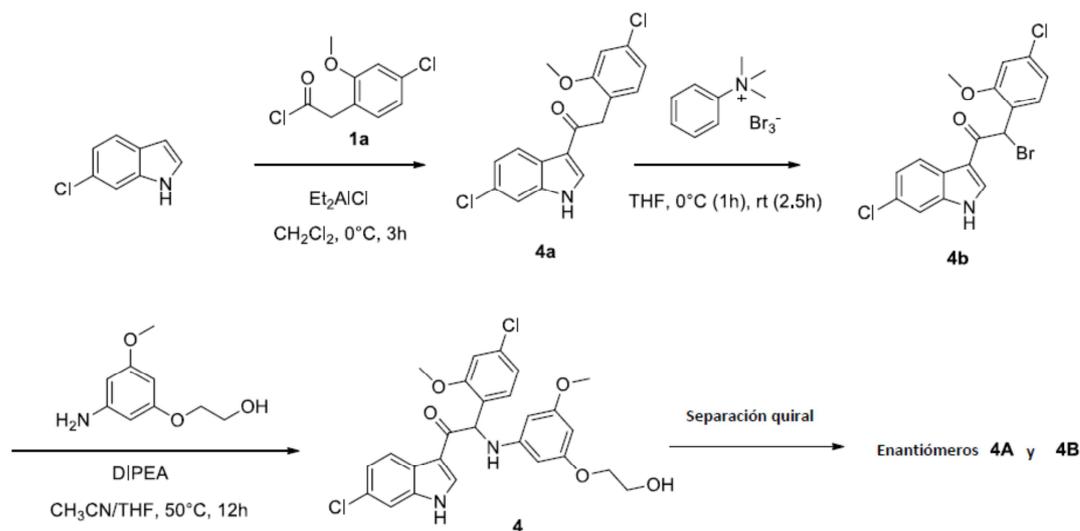
<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 12.26 (s a, 1 H) 8.45 (s, 1 H) 7.97 (d, J=8.5 Hz, 1 H) 7.36 (d, J=8.5 Hz, 1 H) 7.21 (d, J=8.5 Hz, 1 H) 7.09 (d, J=1.9 Hz, 1 H) 6.96 (dd, J=8.2, 1.9 Hz, 1 H) 6.40 (d, J=8.2 Hz, 1 H) 6.18 (d, J=8.2 Hz, 1 H) 5.95 (d, J=2.2 Hz, 2 H) 5.71 (t, J=2.0 Hz, 1 H) 4.79 (t, J=5.5 Hz, 1 H) 3.97 (s, 3 H) 3.76 - 3.90 (m, 2 H) 3.60-3.66 (m, 5 H)

LC/MS (método LC-C): R<sub>t</sub> 3.27 min, MH<sup>+</sup> 529

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -87.4° (c 0.2564, DMF)

SFC quiral (método SFC-E): R<sub>t</sub> 4.19 min, MH<sup>+</sup> 529, pureza quiral 100%.

**Ejemplo 4:** Síntesis de 1-(6-cloro-1H-indol-3-il)-2-(4-cloro-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:**

Se agregó cloruro de dietilaluminio 1M en hexano (19.8 mL, 19.8 mmol) por goteo a 0°C a una solución de 6-cloro-1H-indol [CAS 17422-33-2] (2 g, 13.2 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (45 mL). Después de 30 min a 0°C, se agregó lentamente una solución de cloruro de 2-(4-cloro-2-metoxifenil)acetilo **1a** (3.36 g, 15.3 mmol, para síntesis: véase Ejemplo 1) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (45 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 una cantidad mínima de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. El sólido se secó al vacío para proporcionar 1-(6-cloro-1H-indol-3-il)-2-(4-cloro-2-metoxifenil)etanona **4a** (2.68 g).

**Síntesis del intermediario 4b:**

A 0°C, una solución de tribromuro de feniltrimetilamonio [CAS 4207-56-1] (3.165 g, 8.4 mmol) en THF (50 mL) se agregó por goteo a una solución de 1-(6-cloro-1H-indol-3-il)-2-(4-cloro-2-metoxifenil)etanona **4a** (2.68 g, 8 mmol) en THF (50 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 se disolvió en EtOAc y se lavó con agua. Se formó un precipitado y los sólidos se filtraron y se secaron al vacío para proporcionar 2-bromo-1-(6-cloro-1H-indol-3-il)-2-(4-cloro-2-metoxifenil)etanona **4b** (2.75 g).

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

Una mezcla de 2-bromo-1-(6-cloro-1*H*-indol-3-il)-2-(4-cloro-2-metoxifenil)etanona **4b** (2.3 g, 5.6 mmol), 2-(3-amino-5-metoxifenoxi)etanol [CAS 725237-16-1] (1.53 g, 8.4 mmol) y diisopropiletilamina (2.4 mL, 13.9 mmol) en CH<sub>3</sub>CN/THF (1/1) (140 mL) se agitó a 50°C durante 12 h. La mezcla se concentró bajo presión reducida. El residuo se diluyó con EtOAc, se lavó con HCl 1N, y posteriormente con agua. La capa orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, 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, 80 g en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (99.5/0.5)). Las fracciones puras se recogieron y se evaporaron bajo presión reducida. Una pequeña cantidad se cristalizó a partir de Et<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN para proporcionar una muestra analítica de 1-(6-cloro-1*H*-indol-3-il)-2-(4-cloro-2-metoxifenil)-2-((3-(2-hidroxietoxi)-5-metoxifenil)amino)etanona (Compuesto **4**) como una mezcla racémica. La cantidad restante de Compuesto **4** (2.1 g) se purificó adicionalmente mediante LC preparativa (fase estacionaria: sílice irregular en columna 150 g, fase móvil: tolueno/iPrOH 95/5).

Los enantiómeros de Compuesto **4** (1.9 g) se separaron mediante SFC preparativa quiral (fase estacionaria: Quiralpak® IC 5 µm 250 x 30 mm, fase móvil: 60% CO<sub>2</sub>, 40% MeOH) para proporcionar 870 mg del primer enantiómero eluido y 870 mg del segundo enantiómero eluido. Los dos enantiómeros se purificaron nuevamente mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (15-40 µm, 24 g en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (99.5/0.5)). El primer enantiómero eluido (800 mg) se solidificó a partir de CH<sub>3</sub>CN/Et<sub>2</sub>O para proporcionar el enantiómero **4A** (693 mg) como un polvo amorfo blanco. El segundo enantiómero eluido se solidificó a partir de CH<sub>3</sub>CN/Et<sub>2</sub>O para proporcionar el enantiómero **4B** (619 mg) como un polvo amorfo blanco.

#### Compuesto 4:

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 3.60 (s, 3 H) 3.64 (t, *J*=5.0 Hz, 2 H) 3.75 - 3.88 (m, 2 H) 3.95 (s, 3 H) 4.38 - 5.09 (m, 1 H) 5.71 (t, *J*=1.9 Hz, 1 H) 5.93 (d, *J*=2.2 Hz, 2 H) 6.13 - 6.18 (m, 1 H) 6.35 - 6.46 (m, 1 H) 6.97 (dd, *J*=8.4, 1.9 Hz, 1 H) 7.09 (d, *J*=2.2 Hz, 1 H) 7.21 (dd, *J*=8.5, 1.9 Hz, 1 H) 7.35 (d, *J*=8.4 Hz, 1 H) 7.53 (d, *J*=1.9 Hz, 1 H) 8.13 (d, *J*=8.5 Hz, 1 H) 8.46 (d, *J*=2.8 Hz, 1 H) 12.13 (d, *J*=2.8 Hz, 1 H)

LC/MS (método LC-C): R<sub>t</sub> 3.11 min, MH<sup>+</sup> 515

Punto de fusión: 154°C

#### Enantiómero 4A:

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 3.60 (s, 3 H) 3.64 (c, *J*=5.0 Hz, 2 H) 3.74 - 3.88 (m, 2 H) 3.95 (s, 3 H) 4.79 (t, *J*=5.0 Hz, 1 H) 5.71 (t, *J*=2.0 Hz, 1 H) 5.93 (d, *J*=2.0 Hz, 2 H) 6.15 (d, *J*=7.9 Hz, 1 H) 6.41 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 6.97 (dd, *J*=8.2, 1.9 Hz, 1 H) 7.09 (d, *J*=1.9 Hz, 1 H) 7.21 (dd, *J*=8.5, 1.9 Hz, 1 H) 7.35 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 7.53 (d, *J*=1.9 Hz, 1 H) 8.13 (d, *J*=8.5 Hz, 1 H) 8.46 (s, 1 H) 12.12 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-C): R<sub>t</sub> 3.13 min, MH<sup>+</sup> 515

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +111.6° (c 0.284, DMF)

SFC quiral (método SFC-A): R<sub>t</sub> 3.68 min, MH<sup>+</sup> 515, pureza quiral 100%.

#### Enantiómero 4B:

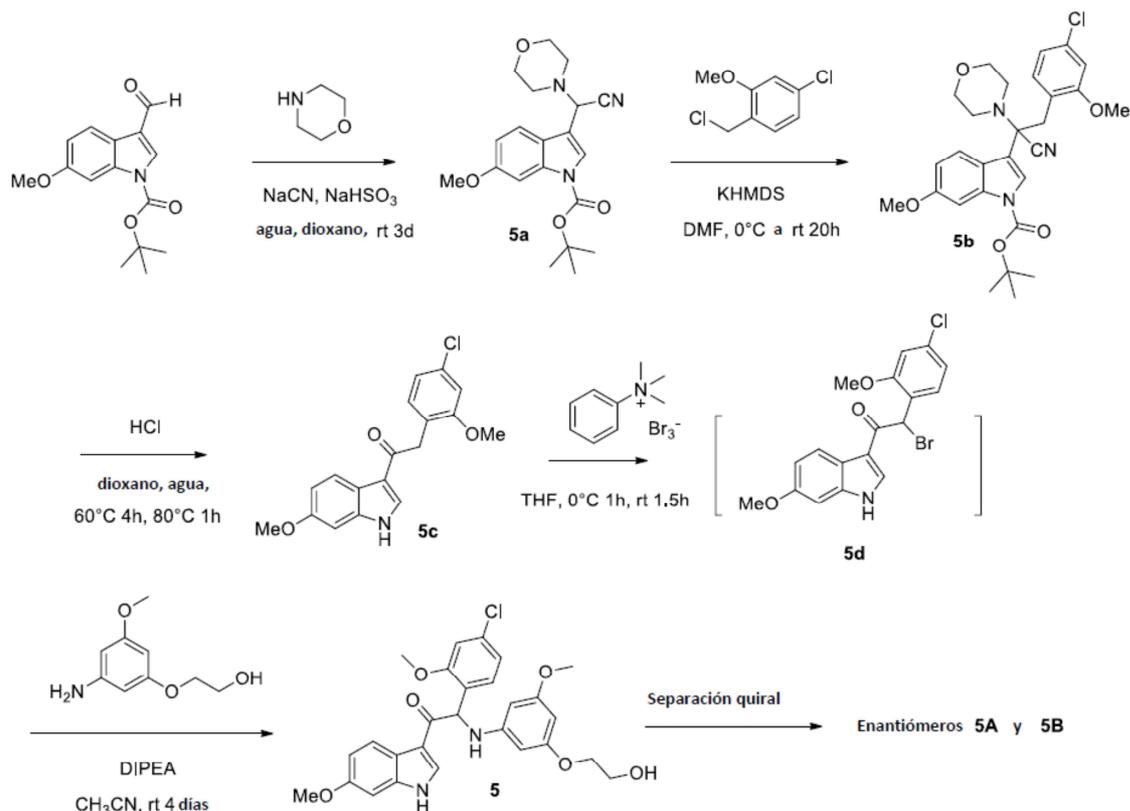
<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 3.61 (s, 3 H) 3.62 - 3.68 (m, 2 H) 3.76 - 3.89 (m, 2 H) 3.95 (s, 3 H) 4.74 - 4.83 (m, 1 H) 5.72 (t, *J*=2.0 Hz, 1 H) 5.93 (d, *J*=2.0 Hz, 2 H) 6.15 (d, *J*=7.9 Hz, 1 H) 6.42 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 6.97 (dd, *J*=8.2, 1.9 Hz, 1 H) 7.09 (d, *J*=1.9 Hz, 1 H) 7.21 (dd, *J*=8.5, 1.9 Hz, 1 H) 7.35 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 7.53 (d, *J*=1.9 Hz, 1 H) 8.13 (d, *J*=8.5 Hz, 1 H) 8.46 (s, 1 H) 12.13 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-C): R<sub>t</sub> 3.14 min, MH<sup>+</sup> 515

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -113.9° (c 0.288, DMF)

SFC quiral (método SFC-A): R<sub>t</sub> 5.04 min, MH<sup>+</sup> 515, pureza quiral 100%.

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



### Síntesis del intermediario 5a:

Una solución de NaHSO<sub>3</sub> (5.7 g, 54.5 mmol) en agua (45 mL) se agregó una solución agitada de 3-formil-6-metoxi-1*H*-indol-1-carboxilato de *tert*-butilo [CAS 847448-73-1] (10 g, 36.3 mmol) en dioxano (45 mL). Después de 15 min, se agregó morfolina (4.8 mL, 54.5 mmol) y 35 min después, se agregó sodio cianuro (NaCN) (1.96 g, 40 mmol). La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 días, hasta que se completó de la reacción. El producto se filtró y se lavó con una mezcla 1/1 de dioxano/agua (3x 35 mL) y posteriormente con agua (3x 45 mL) y se secó al vacío a 60°C. Los sólidos se agitaron en Et<sub>2</sub>O (125 mL), se filtraron, se lavaron con Et<sub>2</sub>O (3x) y se secaron al vacío a 50°C para proporcionar 3-(ciano(morfolino)metil)-6-metoxi-1*H*-indol-1-carboxilato de *tert*-butilo **5a** (12.3 g).

### 10 Síntesis del intermediario 5b:

Una mezcla de 3-(ciano(morfolino)metil)-6-metoxi-1*H*-indol-1-carboxilato de *tert*-butilo **5a** (6.0 g, 16.2 mmol) en DMF seco (80 mL) se agitó bajo atmósfera-N<sub>2</sub> mientras se enfriaba en un baño de hielo. Una solución de KHMDS 0.5 M en tolueno (35.5 mL, 17.8 mmol) se agregó por goteo durante 10 min. Después de agitar durante 10 min adicionales, se agregó 4-cloro-1-(clorometil)-2-metoxibenceno [CAS 101079-84-9] (3.09 g, 16.2 mmol) y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. La mezcla de reacción se vertió en agua fría (400 mL) y el producto se extrajo con Et<sub>2</sub>O (2x). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron, se evaporaron bajo presión reducida y se co-evaporaron con xileno. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (fase estacionaria: Biotage® Grace Reveleris Sílice 120 g, fase móvil: gradiente heptano/EtOAc 100/0 a 20/80). Las fracciones deseadas se combinaron, se evaporaron bajo presión reducida y se co-evaporaron con dioxano para proporcionar 3-(2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-ciano-1-morfolinoetil)-6-metoxi-1*H*-indol-1-carboxilato de *tert*-butilo **5b** (7.75 g).

### Síntesis del intermediario 5c:

A una suspensión agitada de 3-(2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-ciano-1-morfolinoetil)-6-metoxi-1*H*-indol-1-carboxilato de *tert*-butilo **5b** (7.75 g, 14.7 mmol) en dioxano (40 mL) y agua (20 mL) se agregó una solución de HCl 6M en isopropanol (36.8 mL, 220 mmol). La mezcla resultante se agitó a 60°C durante 4 h y posteriormente a 80°C durante 1 hora. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla se dejó reposar durante 20 h para permitir la cristalización del producto de reacción. El producto se filtró, se lavó con una mezcla 1/1/1 de *i*PrOH/H<sub>2</sub>O/dioxano (2x 15 mL) y se secó al vacío a 50°C para proporcionar 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(6-metoxi-1*H*-indol-3-il)etanona **5c** (3.67 g).

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

Una mezcla agitada de 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(6-metoxi-1*H*-indol-3-il)etanona **5c** (2.35 g, 7.13 mmol) en THF (100mL) se enfrió en un baño de hielo bajo atmósfera-N<sub>2</sub>. Se agregó tribromuro de feniltrimetilamonio [CAS 4207-56-1] (2.81 g, 7.48 mmol) y la mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 1 h y posteriormente a temperatura ambiente durante 1.5 h. Se agregaron 2-(3-amino-5-metoxifenoxi)etanol [CAS 725237-16-1] (2.61 g, 14.3 mmol), diisopropiletilamina (2.46 mL, 14.3 mmol) y CH<sub>3</sub>CN (100 mL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 h y at 55°C durante 2 h. La mezcla de reacción se concentró bajo presión reducida a 50% del volumen original. Se agregaron 2-(3-amino-5-metoxifenoxi)etanol [CAS 725237-16-1] (1 g) y diisopropiletilamina (1.5 mL) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 65 h. La mezcla de reacción se vertió en agua (400 mL) y el producto se extrajo con 2-MeTHF (2x). Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se evaporaron bajo presión reducida. El residuo (7 g) se purificó mediante cromatografía ultrarrápida (fase estacionaria: Biotage® Grace Reveleris Sílice 120 g, fase móvil: heptano/EtOAc/EtOH gradiente 100/0/0 a 50/37/13). Las fracciones deseadas se combinaron y se evaporaron bajo presión reducida. El residuo (5.8 g) se purificó adicionalmente mediante HPLC preparativa (fase estacionaria: Uptisphere® C18 ODB – 10 µm, 200 g, 5 cm, fase móvil: 0.25% NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> solución en agua, CH<sub>3</sub>CN). Las fracciones del producto se combinaron y se evaporaron bajo presión reducida. El residuo se disolvió en MeOH (20 mL) y se dejó reposar para cristalizar durante 4 h. Los sólidos se filtraron, se lavaron con MeOH (3x 5 mL) y se secaron al vacío a 50°C para proporcionar 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-2-((3-(2-hidroxi-etoxi)-5-metoxifenil)amino)-1-(6-metoxi-1*H*-indol-3-il)etanona (Compuesto **5**, 2.06 g) como una mezcla racémica.

La separación quiral de Compuesto **5** (2 g) se realizó mediante separación quiral de fase normal (fase estacionaria: AD-H, fase móvil: 50% metanol, 50% etanol). Las fracciones del producto se combinaron y se evaporaron bajo presión reducida. El primer enantiómero eluido se cristalizó a partir de una solución agitada de MeOH (13 mL) mediante la adición de agua (3 mL). Después de agitación durante la noche, los sólidos se filtraron, se lavaron con una mezcla 3/1 de MeOH/H<sub>2</sub>O (4x 3mL) y se secaron al vacío a 50°C para proporcionar el enantiómero **5A** (476 mg). El segundo enantiómero eluido se cristalizó a partir de una solución agitada de MeOH (13 mL) mediante la adición de agua (3 mL). Después de agitación durante la noche, los sólidos se filtraron, se lavaron con una mezcla 3/1 de MeOH/H<sub>2</sub>O (4x 3mL) y se secaron al vacío a 50°C para proporcionar el enantiómero **5B** (362 mg).

#### Compuesto 5:

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 3.61 (s, 3 H) 3.65 (c, *J*=5.3 Hz, 2 H) 3.77 (s, 3 H) 3.78 - 3.90 (m, 2 H) 3.97 (s, 3 H) 4.77 (t, *J*=5.6 Hz, 1 H) 5.71 (t, *J*=2.1 Hz, 1 H) 5.93 (d, *J*=2.2 Hz, 2 H) 6.13 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 6.36 (d, *J*=7.9 Hz, 1 H) 6.83 (dd, *J*=8.7, 2.3 Hz, 1 H) 6.92 - 7.00 (m, 2 H) 7.09 (d, *J*=2.0 Hz, 1 H) 7.36 (d, *J*=8.4 Hz, 1 H) 8.01 (d, *J*=8.6 Hz, 1 H) 8.29 (d, *J*=2.9 Hz, 1 H) 11.81 (d a, *J*=2.2 Hz, 1 H)

LC/MS (método LC-B): R<sub>t</sub> 1.93, MH<sup>+</sup> 511

#### Enantiómero 5A:

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 3.61 (s, 3 H) 3.64 (c, *J*=5.4 Hz, 2 H) 3.77 (s, 3 H) 3.78 - 3.90 (m, 2 H) 3.97 (s, 3 H) 4.77 (t, *J*=5.5 Hz, 1 H) 5.71 (t, *J*=2.0 Hz, 1 H) 5.93 (d, *J*=2.0 Hz, 2 H) 6.13 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 6.36 (d, *J*=7.9 Hz, 1 H) 6.83 (dd, *J*=8.7, 2.3 Hz, 1 H) 6.92 - 6.99 (m, 2 H) 7.09 (d, *J*=2.0 Hz, 1 H) 7.36 (d, *J*=8.4 Hz, 1 H) 8.01 (d, *J*=8.8 Hz, 1 H) 8.29 (d, *J*=3.1 Hz, 1 H) 11.81 (d a, *J*=2.4 Hz, 1 H)

LC/MS (método LC-A): R<sub>t</sub> 1.08, MH<sup>+</sup> 511

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +109.3° (c 0.61, DMF)

SFC quiral (método SFC-G): R<sub>t</sub> 1.78 min, MH<sup>+</sup> 511, pureza quiral 100%

#### Enantiómero 5B:

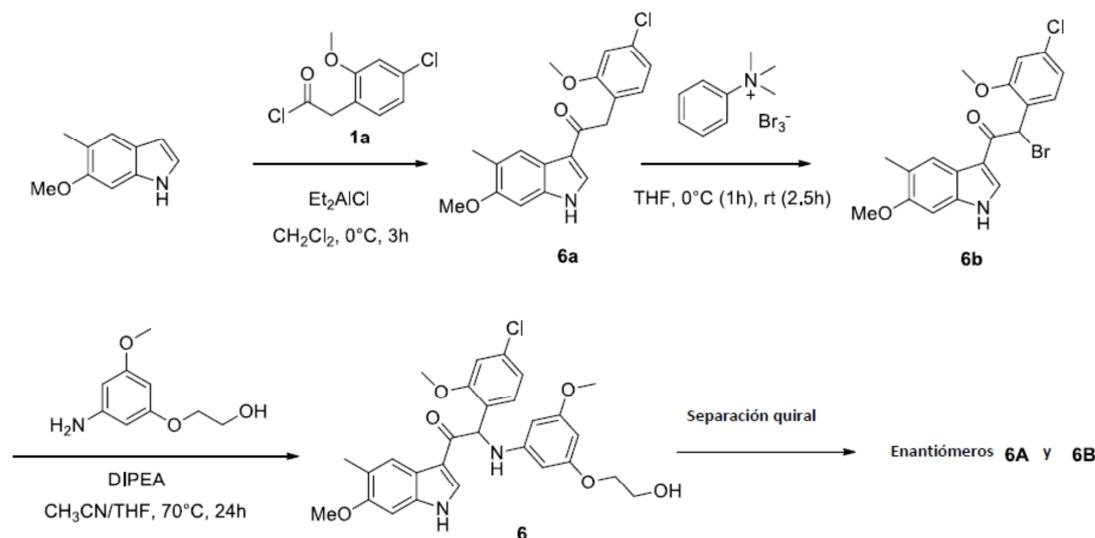
<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 3.61 (s, 3 H) 3.64 (c, *J*=5.2 Hz, 2 H) 3.77 (s, 3 H) 3.78 - 3.89 (m, 2 H) 3.97 (s, 3 H) 4.77 (t, *J*=5.6 Hz, 1 H) 5.71 (t, *J*=2.1 Hz, 1 H) 5.93 (d, *J*=2.0 Hz, 2 H) 6.12 (d, *J*=7.9 Hz, 1 H) 6.35 (d, *J*=7.9 Hz, 1 H) 6.82 (dd, *J*=8.7, 2.3 Hz, 1 H) 6.91 - 7.01 (m, 2 H) 7.09 (d, *J*=2.0 Hz, 1 H) 7.36 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 8.01 (d, *J*=8.6 Hz, 1 H)

LC/MS (método LC-A): R<sub>t</sub> 1.08, MH<sup>+</sup> 511

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -108.9° (c 0.52, DMF)

SFC quiral (método SFC-G): R<sub>t</sub> 2.19 min, MH<sup>+</sup> 511, pureza quiral 100%

Ejemplo 6: Síntesis de 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-2-((3-(2-hidroxi-etoxi)-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 (13.5 mL, 13.5 mmol) por goteo a 0°C a una solución de 6-metoxi-5-metil-1*H*-indol [CAS 1071973-95-9] (1.45 g, 9 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (45 mL). Después de 30 min a 0°C, una solución de cloruro de 2-(4-cloro-2-metoxifenil)acetilo **1a** (2.4 g, 10.9 mmol, para síntesis: véase Ejemplo 1) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (45 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 y se lavó con agua. El sólido se secó al vacío para proporcionar 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(6-metoxi-5-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **6a** (2.1 g).

#### Síntesis del intermediario 6b:

A 0°C, se agregó por goteo una solución de tribromuro de feniltrimetilamonio [CAS 4207-56-1] (2.4 g, 6.4 mmol) en THF (65 mL) a una mezcla de 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(6-metoxi-5-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **6a** (2.1 g, 6.1 mmol) en THF (60 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 se recogió con una cantidad mínima de diisopropiléter. El precipitado se filtró y se secó al vacío para proporcionar 2-bromo-2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(6-metoxi-5-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **6b** (2.36 g).

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

Una mezcla de 2-bromo-2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(6-metoxi-5-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **6b** (1.35 g, 3.2 mmol), 2-(3-amino-5-metoxifenoxi)etanol [CAS 725237-16-1] (0.585 g, 3.2 mmol) y diisopropiletilamina (0.83 mL, 4.8 mmol) en CH<sub>3</sub>CN/THF (1/1) (80 mL) se agitó a 70°C durante 24 h. La mezcla se concentró bajo presión reducida. El residuo se diluyó con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se lavó con HCl 1N y agua. La capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, 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, 80 g en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (99.5/0.5)). Una pequeña cantidad se cristalizó a partir de Et<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN para proporcionar una muestra analítica de 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-2-((3-(2-hidroxi)etoxi)-5-metoxifenil)amino)-1-(6-metoxi-5-metil-1*H*-indol-3-il)etanona (Compuesto **6**) como una mezcla racémica. La cantidad restante de Compuesto en bruto **6** se mezcló con otra partida (cantidad total 1.19 g) y se purificó adicionalmente dos veces mediante LC preparativa (fase estacionaria: sílice irregular en columna 150 g, fase móvil: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (98/2), y posteriormente tolueno/*i*PrOH (95/5)).

Los enantiómeros de Compuesto **6** (950 mg) se separaron mediante SFC preparativa quiral (fase estacionaria: Quiralpak® IC 5 μm 250 x 30 mm, fase móvil: 50% CO<sub>2</sub>, 50% MeOH) para proporcionar 485 mg del primer enantiómero eluido y 480 mg del segundo enantiómero eluido. El primer enantiómero eluido se solidificó a partir de CH<sub>3</sub>CN/Et<sub>2</sub>O para proporcionar el enantiómero **6A** (406 mg) como un polvo amorfo blanco. El segundo enantiómero eluido se solidificó a partir de CH<sub>3</sub>CN/Et<sub>2</sub>O para proporcionar el enantiómero **6B** (436 mg) como un polvo amorfo blanco.

#### Compuesto 6:

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 2.21 (s, 3 H) 3.61 (s, 3 H) 3.62 - 3.68 (m, 2 H) 3.74 - 3.90 (m, 5 H) 3.97 (s, 3 H) 4.76 (t, *J*=4.8 Hz, 1 H) 5.68 - 5.74 (m, 1 H) 5.93 (d, *J*=1.5 Hz, 2 H) 6.11 (d, *J*=7.6 Hz, 1 H) 6.31 (d, *J*=7.6 Hz, 1 H) 6.92 (s, 1 H) 6.95 (dd, *J*=8.3, 1.8 Hz, 1 H) 7.09 (d, *J*=1.8 Hz, 1 H) 7.35 (d, *J*=8.3 Hz, 1 H) 7.89 (s, 1 H) 8.22 (s, 1 H) 11.73 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-C):  $R_t$  3.02 min,  $MH^+$  525

**Enantiómero 6A:**

$^1H$  RMN (500 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 2.20 (s, 3 H) 3.60 (s, 3 H) 3.64 (c,  $J=5.3$  Hz, 2 H) 3.75 - 3.88 (m, 5 H) 3.97 (s, 3 H) 4.78 (t,  $J=5.3$  Hz, 1 H) 5.70 (t,  $J=2.0$  Hz, 1 H) 5.92 (d,  $J=2.0$  Hz, 2 H) 6.11 (d,  $J=7.9$  Hz, 1 H) 6.33 (d,  $J=7.9$  Hz, 1 H) 6.92 (s, 1 H) 6.95 (dd,  $J=8.2, 1.9$  Hz, 1 H) 7.09 (d,  $J=1.9$  Hz, 1 H) 7.35 (d,  $J=8.2$  Hz, 1 H) 7.88 (s, 1 H) 8.23 (s, 1 H) 11.75 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-C):  $R_t$  3.04 min,  $MH^+$  525

$[\alpha]_D^{20}$ : +116.8° (c 0.4536, DMF)

SFC quiral (método SFC-B):  $R_t$  2.40 min,  $MH^+$  525, pureza quiral 100%.

10 **Enantiómero 6B:**

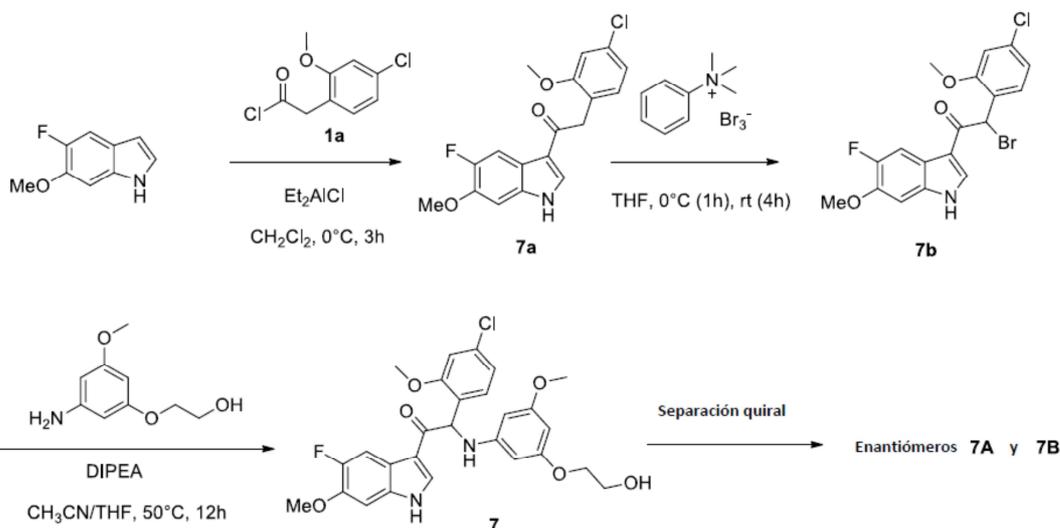
$^1H$  RMN (500 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  ppm 2.20 (s, 3 H) 3.60 (s, 3 H) 3.64 (c,  $J=5.4$  Hz, 2 H) 3.77 - 3.88 (m, 5 H) 3.97 (s, 3 H) 4.78 (t,  $J=5.4$  Hz, 1 H) 5.70 (t,  $J=2.0$  Hz, 1 H) 5.92 (d,  $J=2.0$  Hz, 2 H) 6.11 (d,  $J=7.9$  Hz, 1 H) 6.33 (d,  $J=7.9$  Hz, 1 H) 6.92 (s, 1 H) 6.95 (dd,  $J=8.2, 1.9$  Hz, 1 H) 7.09 (d,  $J=1.9$  Hz, 1 H) 7.35 (d,  $J=8.2$  Hz, 1 H) 7.88 (s, 1 H) 8.23 (s, 1 H) 11.75 (s a, 1 H)

15 LC/MS (método LC-C):  $R_t$  3.04 min,  $MH^+$  525

$[\alpha]_D^{20}$ : -121.9° (c 0.3855, DMF)

SFC quiral (método SFC-B):  $R_t$  3.75 min,  $MH^+$  525, pureza quiral 99.86%.

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



20

**Síntesis del intermediario 7a:**

Se agregó cloruro de dietilaluminio 1M en hexano (15.7 mL, 15.7 mmol) por goteo a 0°C a una solución de 5-fluoro-6-metoxi-1*H*-indol [CAS 1211595-72-0] (2 g, 12.1 mmol) en  $CH_2Cl_2$  (50 mL). Después de 30 min a 0°C, una solución de cloruro de 2-(4-cloro-2-metoxifenil)acetilo **1a** (3.2 g, 14.6 mmol, para síntesis: véase Ejemplo 1) en  $CH_2Cl_2$  (50 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 una cantidad mínima de  $CH_2Cl_2$ . El sólido se secó al vacío para proporcionar 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(5-fluoro-6-metoxi-1*H*-indol-3-il)etanona **7a** (2.82 g).

25

**Síntesis del intermediario 7b:**

A 0°C, una solución de tribromuro de feniltrimetilamonio [CAS 4207-56-1] (3.5 g, 8.1 mmol) en THF (20 mL) se agregó por goteo a una solución de 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(5-fluoro-6-metoxi-1*H*-indol-3-il)etanona **7a** (2.82 g, 8.1 mmol) en THF (46 mL). La mezcla se agitó a 0°C durante 1 h y a temperatura ambiente durante 4 h. El precipitado se filtró y se lavó con EtOAc. El filtrado se concentró bajo presión reducida. El residuo se disolvió en EtOAc, se lavó con agua. La fase orgánica se secó sobre  $MgSO_4$ , se filtró y el disolvente se evaporó bajo presión

30

reducida. El residuo se recogió con una cantidad mínima de EtOAc. El precipitado se filtró y se secó al vacío para proporcionar 2-bromo-2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(5-fluoro-6-metoxi-1*H*-indol-3-il)etanona **7b** (2.5 g).

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

5 Una mezcla de 2-bromo-2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(5-fluoro-6-metoxi-1*H*-indol-3-il)etanona **7b** (2.4 g, 5.6 mmol), 2-(3-amino-5-metoxifenoxi)etanol [CAS 725237-16-1] (1.5 g, 8.2 mmol) y diisopropiletilamina (1.45 mL, 8.4 mmol) en CH<sub>3</sub>CN/THF (1/1) (48 mL) se agitó a 50°C durante 12 h. La mezcla se concentró bajo presión reducida. El residuo se diluyó con EtOAc, se lavó con HCl 1N y agua. La capa orgánica se separó, se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y el disolvente se evaporó bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna sobre gel de sílice (15-40 µm, 80 g en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (99.5/0.5)). Las fracciones puras se recogieron y se evaporaron bajo presión reducida. Una pequeña cantidad se solidificó a partir de Et<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN para proporcionar una muestra analítica de 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(5-fluoro-6-metoxi-1*H*-indol-3-il)-2-((3-(2-hidroxietoxi)-5-metoxifenil)amino)etanona (Compuesto **7**) como una mezcla racémica.

15 Los enantiómeros de Compuesto **7** (1.6 g) se separaron mediante SFC preparativa quiral (fase estacionaria: Quiralpak® IC 5 µm 250 x 30 mm, fase móvil: 55% CO<sub>2</sub>, 45% MeOH) para proporcionar 680 mg del primer enantiómero eluido y 720 mg del segundo enantiómero eluido. El primer enantiómero eluido se solidificó a partir de CH<sub>3</sub>CN/Et<sub>2</sub>O para proporcionar el enantiómero **7A** (603 mg) como un polvo amorfo blanco. El segundo enantiómero eluido se solidificó a partir de CH<sub>3</sub>CN/Et<sub>2</sub>O para proporcionar el enantiómero **7B** (505 mg) como un polvo amorfo blanco.

#### Compuesto 7:

20 <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 3.60 (s, 3 H) 3.62 - 3.67 (m, 2 H) 3.74 - 3.88 (m, 5 H) 3.96 (s, 3 H) 4.77 (t, *J*=5.3 Hz, 1 H) 5.66 - 5.75 (m, 1 H) 5.92 (d, *J*=1.8 Hz, 2 H) 6.12 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 6.37 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 6.96 (dd, *J*=8.1, 1.8 Hz, 1 H) 7.09 (d, *J*=1.8 Hz, 1 H) 7.14 (d, *J*=7.6 Hz, 1 H) 7.35 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 7.81 (d, *J*=11.6 Hz, 1 H) 8.33 (s, 1 H) 11.94 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-C): R<sub>t</sub> 2.90 min, MH<sup>+</sup> 529

#### 25 Enantiómero 7A:

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 3.60 (s, 3 H) 3.64 (c, *J*=5.5 Hz, 2 H) 3.76 - 3.88 (m, 5 H) 3.96 (s, 3 H) 4.79 (t, *J*=5.5 Hz, 1 H) 5.71 (t, *J*=1.9 Hz, 1 H) 5.92 (d, *J*=1.9 Hz, 2 H) 6.12 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 6.39 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 6.96 (dd, *J*=8.2, 2.0 Hz, 1 H) 7.09 (d, *J*=1.9 Hz, 1 H) 7.14 (d, *J*=7.6 Hz, 1 H) 7.35 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 7.81 (d, *J*=11.7 Hz, 1 H) 8.34 (s, 1 H) 11.95 (s a, 1 H)

30 LC/MS (método LC-C): R<sub>t</sub> 2.90 min, MH<sup>+</sup> 529

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +86.2° (c 0.232, DMF)

SFC quiral (método SFC-B): R<sub>t</sub> 2.28 min, MH<sup>+</sup> 529, pureza quiral 100%.

#### Enantiómero 7B:

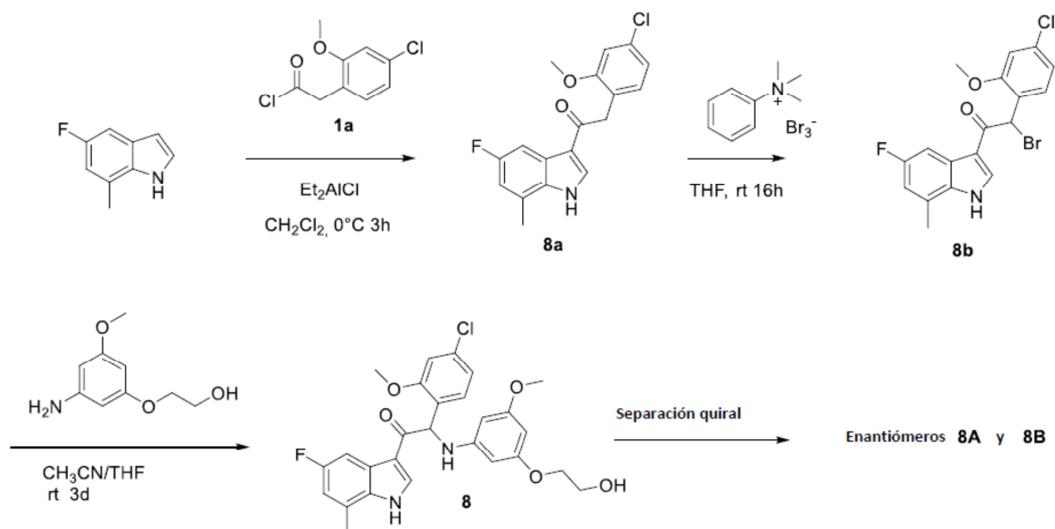
35 <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 3.60 (s, 3 H) 3.64 (c, *J*=5.5 Hz, 2 H) 3.76 - 3.88 (m, 5 H) 3.96 (s, 3 H) 4.79 (t, *J*=5.5 Hz, 1 H) 5.71 (t, *J*=1.9 Hz, 1 H) 5.92 (d, *J*=1.9 Hz, 2 H) 6.12 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 6.39 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 6.96 (dd, *J*=8.2, 1.9 Hz, 1 H) 7.09 (d, *J*=1.9 Hz, 1 H) 7.14 (d, *J*=7.6 Hz, 1 H) 7.35 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 7.81 (d, *J*=12.0 Hz, 1 H) 8.34 (s, 1 H) 11.95 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-C): R<sub>t</sub> 2.90 min, MH<sup>+</sup> 529

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -88.7° (c 0.3, DMF)

40 SFC quiral (método SFC-B): R<sub>t</sub> 4.04 min, MH<sup>+</sup> 529, pureza quiral 100%.

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



### Síntesis del intermediario 8a:

Se agregó cloruro de dietilaluminio 1M en hexano (15.0 mL, 15.0 mmol) por goteo a 0°C a una solución de 5-fluoro-7-metil-1*H*-indol [CAS 1082041-52-8] (1.49 g, 10.0 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL). Después de 30 min a 0°C, una solución de cloruro de 2-(4-cloro-2-metoxifenil)acetilo **1a** (3.28 g, 15.0 mmol, para síntesis: véase Ejemplo 1) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) se agregó lentamente 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 que se formaron se filtraron y se repartieron entre EtOAc y HCl 1N. Las fases se separaron. La capa acuosa se extrajo con EtOAc. Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida para proporcionar 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(5-fluoro-7-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **8a** (2.03 g).

### Síntesis del intermediario 8b:

Una solución de tribromuro de feniltrimetilamonio [CAS 4207-56-1] (2.53 g, 6.72 mmol) en THF (10 mL) se agregó por goteo a 0°C a una solución de 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(5-fluoro-7-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **8a** (2.03 g, 6.11 mmol) en THF (50 mL). La mezcla de reacción 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-2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(5-fluoro-7-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **8b** (2.00 g).

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

Una mezcla de 2-bromo-2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(5-fluoro-7-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **8b** (1.70 g, 4.14 mmol) y 2-(3-amino-5-metoxifenoxi)etanol [CAS 725237-16-1] (2.28 g, 12.4 mmol) en THF (10 mL) y CH<sub>3</sub>CN (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 orgánica se lavó dos veces con HCl 1N, con una solución de NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado y salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró bajo presión reducida. El residuo se recogió con una cantidad mínima de acetonitrilo. El precipitado se filtró y se secó al vacío para proporcionar 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(5-fluoro-7-metil-1*H*-indol-3-il)-2-((3-(2-hidroxi)etoxi)-5-metoxifenil)amino)ethan-ona (Compuesto **8**, 1.23 g) como una mezcla racémica.

Los enantiómeros del Compuesto **8** (1.17 g) se separaron mediante separación quiral de fase normal (fase estacionaria: Daicel Quiralpak® OD-H, fase móvil: 80% heptano, 20% etanol). El primer producto eluido se purificó adicionalmente mediante cromatografía ultrarrápida (fase estacionaria: Biotage® Grace Reveleris Sílice 12 g, fase móvil: heptano/EtOAc/EtOH gradiente 100/0/0 a 40/45/15). Las fracciones puras se combinaron y se evaporaron. El producto se cristalizó durante la noche a partir de una mezcla de MeOH (4 mL) y agua (1 mL), se filtró, se lavó con MeOH (3x) y se secó al vacío a 50°C para proporcionar el enantiómero **8A** (37 mg). El segundo producto eluido se purificó adicionalmente mediante cromatografía ultrarrápida (fase estacionaria: Biotage® Grace Reveleris Sílice 12 g, fase móvil: heptano/EtOAc/EtOH gradiente 100/0/0 a 40/45/15). Las fracciones puras se combinaron y se evaporaron. El producto se cristalizó a partir de una mezcla de MeOH y H<sub>2</sub>O, se filtró, se lavó con MeOH y se secó al vacío a 50°C para proporcionar el enantiómero **8B** (177 mg).

### Compuesto 8:

$^1\text{H}$  RMN (300 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 2.48 (s, 3 H) 3.56 - 3.71 (m, 5 H) 3.74 - 3.92 (m, 2 H) 3.97 (s, 3 H) 4.79 (t,  $J=5.5$  Hz, 1 H) 5.72 (s, 1 H) 5.95 (d,  $J=1.9$  Hz, 2 H) 6.17 (d,  $J=7.9$  Hz, 1 H) 6.40 (d,  $J=8.3$  Hz, 1 H) 6.87 - 7.01 (m, 2 H) 7.10 (d,  $J=1.9$  Hz, 1 H) 7.36 (d,  $J=8.3$  Hz, 1 H) 7.65 (dd,  $J=9.8, 2.3$  Hz, 1 H) 8.46 (s, 1 H) 12.22 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-D):  $R_t$  1.52 min,  $\text{MH}^+$  513

#### 5 Enantiómero 8A:

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 3.61 (s, 3 H) 3.64 (c,  $J=5.2$  Hz, 2 H) 3.77 (s, 3 H) 3.78 - 3.89 (m, 2 H) 3.97 (s, 3 H) 4.77 (t,  $J=5.6$  Hz, 1 H) 5.71 (t,  $J=2.1$  Hz, 1 H) 5.93 (d,  $J=2.0$  Hz, 2 H) 6.12 (d,  $J=7.9$  Hz, 1 H) 6.35 (d,  $J=7.9$  Hz, 1 H) 6.82 (dd,  $J=8.7, 2.3$  Hz, 1 H) 6.91 - 7.01 (m, 2 H) 7.09 (d,  $J=2.0$  Hz, 1 H) 7.36 (d,  $J=8.1$  Hz, 1 H) 8.01 (d,  $J=8.6$  Hz, 1 H) 8.29 (d,  $J=2.9$  Hz, 1 H) 11.81 (d a,  $J=2.4$  Hz, 1 H)

10 LC/MS (método LC-A):  $R_t$  1.12 min,  $\text{MH}^+$  513

$[\alpha]_D^{20}$ : -83.8° (c 0.4725, DMF)

SFC quiral (método SFC-G):  $R_t$  2.32 min,  $\text{MH}^+$  513, pureza quiral 100%

#### Enantiómero 8B:

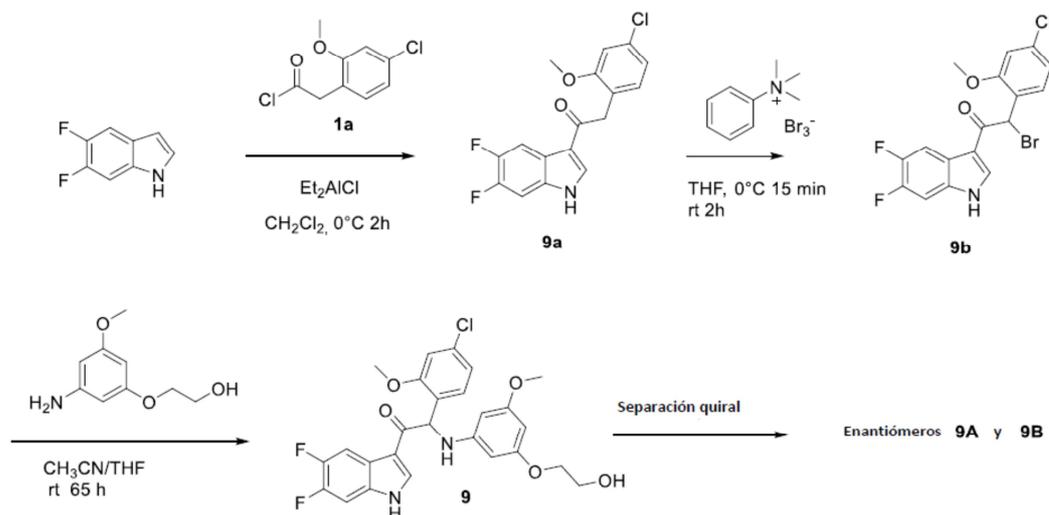
15  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  ppm 2.47 (s, 3 H) 3.61 (s, 3 H) 3.65 (c,  $J=5.2$  Hz, 2 H) 3.77 - 3.90 (m, 2 H) 3.97 (s, 3 H) 4.77 (t,  $J=5.6$  Hz, 1 H) 5.72 (t,  $J=2.1$  Hz, 1 H) 5.95 (d,  $J=2.0$  Hz, 2 H) 6.16 (d,  $J=8.1$  Hz, 1 H) 6.37 (d,  $J=7.9$  Hz, 1 H) 6.92 (dd,  $J=10.1, 2.0$  Hz, 1 H) 6.96 (dd,  $J=8.3, 1.9$  Hz, 1 H) 7.10 (d,  $J=1.8$  Hz, 1 H) 7.36 (d,  $J=8.4$  Hz, 1 H) 7.65 (dd,  $J=9.7, 2.4$  Hz, 1 H) 8.45 (d,  $J=3.5$  Hz, 1 H) 12.20 (d a,  $J=2.9$  Hz, 1 H)

LC/MS (método LC-A):  $R_t$  1.14 min,  $\text{MH}^+$  513

$[\alpha]_D^{20}$ : +86.6° (c 0.4805, DMF)

20 SFC quiral (método SFC-G):  $R_t$  1.44 min,  $\text{MH}^+$  513, pureza quiral 100%

**Ejemplo 9:** Síntesis de 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(5,6-difluoro-1*H*-indol-3-il)-2-((3-(2-hidroxi-etoxi)-5-metoxifenil)amino)etanona (Compuesto **9**) y separación quiral en enantiómeros **9A** y **9B**.



#### Síntesis del intermediario 9a:

25 Se agregó por goteo cloruro de dietilaluminio 1M en hexano (14.9 mL, 14.9 mmol) a 0°C a una solución de 5,6-difluoro-1*H*-indol [CAS 169674-01-5] (1.50 g, 9.8 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL). Después de 30 min a 0°C, se agregó lentamente una solución de cloruro de 2-(4-cloro-2-metoxifenil)acetilo **1a** (3.22 g, 14.7 mmol, para síntesis: véase Ejemplo 1) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL) a 0°C. La reacción se agitó a 0°C durante 2 h. Se agregó solución 1M de sal de Rochelle y la mezcla de reacción se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante 2 h. El precipitado se filtró y se repartió entre EtOAc y HCl 1N. Las fases se separaron. La capa acuosa se extrajo dos veces con EtOAc. Las fases orgánicas se combinaron, se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtraron y se concentraron bajo presión reducida. El residuo se recogió con una cantidad mínima de acetonitrilo. El precipitado se filtró y se secó al vacío para proporcionar 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(5,6-difluoro-1*H*-indol-3-il)etanona **9a** (2.73 g).

30

**Síntesis del intermediario 9b:**

Una solución de tribromuro de feniltrimetilamonio [CAS 4207-56-1] (3.36 g, 8.94 mmol) en THF (50 mL) se agregó por goteo a 0°C a una solución de 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(5,6-difluoro-1*H*-indol-3-il)-2-(4-cloro-2-metoxifenil)etanona **9a** (2.73 g, 8.13 mmol) en THF (80 mL). La mezcla de reacción se agitó a 0°C durante 15 min y a temperatura ambiente durante 2 h. 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 y se secó al vacío para proporcionar 2-bromo-2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(5,6-difluoro-1*H*-indol-3-il)etanona **9b** (3.00 g).

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

Una mezcla de 2-bromo-2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(5,6-difluoro-1*H*-indol-3-il)etanona **9b** (1.80 g, 4.34 mmol) y 2-(3-amino-5-metoxifenoxi)etanol [CAS 725237-16-1] (2.39 g, 13.0 mmol) en THF (9 mL) y CH<sub>3</sub>CN (9 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 65 h. Se agregó HCl 1N y la mezcla de reacción se extrajo con EtOAc. Las fases se separaron. La fase orgánica se lavó con HCl 1N, se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice utilizando un gradiente de EtOAc (15% a 70%) en diclorometano. Las fracciones puras se combinaron y se concentraron bajo presión reducida para proporcionar 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(5,6-difluoro-1*H*-indol-3-il)-2-((3-(2-hidroxietoxi)-5-metoxifenil)amino)etanona (Compuesto **9**, 1.20 g) como una mezcla racémica. Las fracciones impuras se combinaron y se purificaron mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice utilizando un gradiente de acetato de etilo (15% a 70%) en diclorometano para proporcionar una segunda partida de Compuesto **9** (0.290 g) como una mezcla racémica.

Los enantiómeros de Compuesto **9** (1.4 g) se separaron mediante separación quiral de fase normal (fase estacionaria: Daicel Quiralpak® OD-H, fase móvil: 80% heptano, 20% etanol). El primer producto eluido se purificó adicionalmente mediante cromatografía ultrarrápida (fase estacionaria: Biotage® Grace Reveleris Sílice 12 g, fase móvil: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH gradiente de 100/0 a 90/10). Las fracciones puras se combinaron, se evaporaron y se co-evaporaron con MeOH. El residuo se liofilizó desde una mezcla disolvente de CH<sub>3</sub>CN (4.5 mL) y agua (2.5 mL) y se secó al vacío a 45°C para proporcionar el enantiómero **9A** (409 mg). El segundo producto eluido se purificó adicionalmente mediante cromatografía ultrarrápida (fase estacionaria: Biotage® Grace Reveleris Sílice 12 g, fase móvil: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH gradiente de 100/0 a 90/10). Las fracciones puras se combinaron, se evaporaron y se co-evaporaron con MeOH. El residuo se liofilizó desde una mezcla disolvente de CH<sub>3</sub>CN (5 mL) y agua (3 mL) y se secó al vacío a 45°C para proporcionar el enantiómero **9B** (388 mg).

**Compuesto 9:**

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 3.61 (s, 3 H) 3.62 - 3.70 (m, 2 H) 3.75 - 3.90 (m, 2 H) 3.95 (s, 3 H) 4.79 (t, *J*=5.6 Hz, 1 H) 5.72 (t, *J*=2.1 Hz, 1 H) 5.93 (d, *J*=2.0 Hz, 1 H) 6.15 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 6.42 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 6.97 (dd, *J*=8.2, 2.2 Hz, 1 H) 7.10 (d, *J*=2.0 Hz, 1 H) 7.35 (d, *J*=8.3 Hz, 1 H) 7.54 (dd, *J*=10.8, 7.0 Hz, 1 H) 7.99 (dd, *J*=11.2, 8.2 Hz, 1 H) 8.48 (s, 1 H) 12.19 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-D): R<sub>t</sub> 1.44 min, MH<sup>+</sup> 517

**Enantiómero 9A:**

<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 3.61 (s, 3 H) 3.64 (c, *J*=5.2 Hz, 2 H) 3.77 - 3.89 (m, 2 H) 3.95 (s, 3 H) 4.77 (t, *J*=5.5 Hz, 1 H) 5.72 (t, *J*=2.1 Hz, 1 H) 5.93 (d, *J*=2.0 Hz, 2 H) 6.14 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 6.39 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 6.97 (dd, *J*=8.4, 2.0 Hz, 1 H) 7.09 (d, *J*=2.0 Hz, 1 H) 7.35 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 7.53 (dd, *J*=10.8, 7.0 Hz, 1 H) 7.99 (dd, *J*=11.2, 8.1 Hz, 1 H) 8.47 (s, 1 H) 12.16 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-A): R<sub>t</sub> 1.15 min, MH<sup>+</sup> 517

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -98.9° (c 0.445, DMF)

SFC quiral (método SFC-G): R<sub>t</sub> 1.92 min, MH<sup>+</sup> 517, pureza quiral 100%

**Enantiómero 9B:**

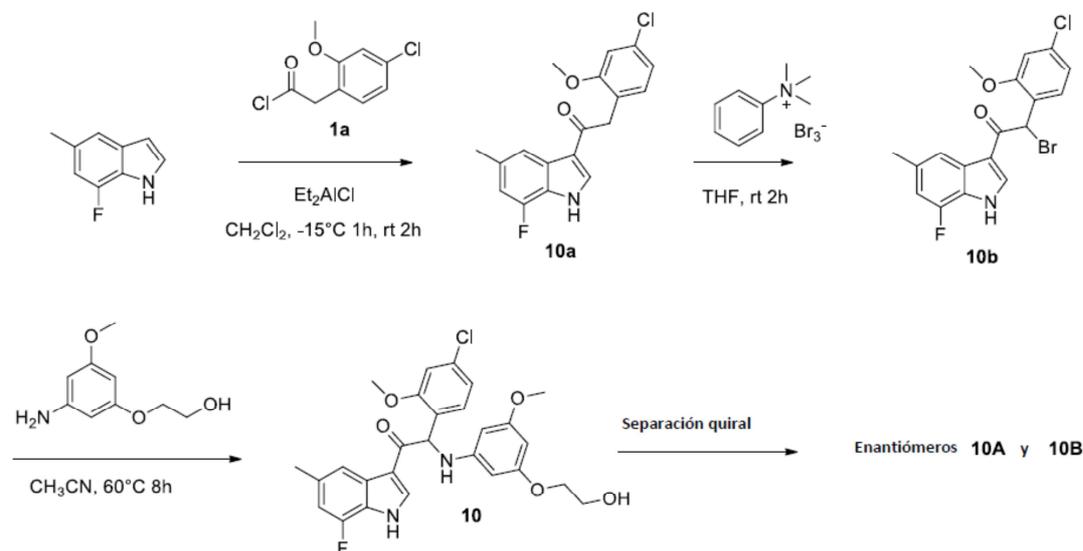
<sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 3.61 (s, 3 H) 3.64 (c, *J*=5.2 Hz, 2 H) 3.75 - 3.91 (m, 2 H) 3.95 (s, 3 H) 4.77 (t, *J*=5.6 Hz, 1 H) 5.72 (t, *J*=2.1 Hz, 1 H) 5.93 (d, *J*=2.2 Hz, 2 H) 6.14 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 6.39 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 6.97 (dd, *J*=8.1, 2.0 Hz, 1 H) 7.09 (d, *J*=2.0 Hz, 1 H) 7.35 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 7.53 (dd, *J*=10.8, 7.0 Hz, 1 H) 7.99 (dd, *J*=11.1, 8.3 Hz, 1 H) 8.47 (s, 1 H) 12.16 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-A): R<sub>t</sub> 1.15 min, MH<sup>+</sup> 517

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +98.9° (c 0.555, DMF)

SFC quiral (método SFC-G): R<sub>t</sub> 1.36 min, MH<sup>+</sup> 517, pureza quiral 100%

**Ejemplo 10:** Síntesis de 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(7-fluoro-5-metil-1*H*-indol-3-il)-2-((3-(2-hidroxietoxi)-5-metoxifenil)amino)etanona (Compuesto **10**) y separación quiral en enantiómeros **10A** y **10B**.



#### Síntesis del intermediario 10a:

5 Se agregó por goteo cloruro de dietilaluminio 1M en hexano (16 mL, 16 mmol) a  $-15^{\circ}\text{C}$  a una solución de 7-fluoro-5-metil-1*H*-indol [CAS 442910-91-0] (1.59 g, 10.7 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (150 mL) bajo  $\text{N}_2$  flow. Después de 15 min a  $-15^{\circ}\text{C}$ , se agregó lentamente una solución de cloruro de 2-(4-cloro-2-metoxifenil)acetilo **1a** (3.27 g, 14.9 mmol, para síntesis: véase Ejemplo 1) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL) a  $-15^{\circ}\text{C}$ . La reacción se agitó a  $-15^{\circ}\text{C}$  durante 1 h y a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de reacción se vertió en una mezcla agitada de hielo/sal de Rochelle. Los sólidos se eliminaron a partir de la mezcla de reacción por filtración sobre una almohadilla corta de dicalite® y la torta de filtrado se lavó varias veces con THF. Las capas se separaron y la capa acuosa se extrajo con THF. Las capas orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, agua, se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtraron, y se evaporaron bajo presión reducida. El residuo sólido se suspendió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL). Los sólidos se filtraron, se lavaron con una pequeña cantidad de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y se secaron al vacío a  $50^{\circ}\text{C}$  para proporcionar 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(7-fluoro-5-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **10a** (2.22 g).

#### Síntesis del intermediario 10b:

Una solución de tribromuro de feniltrimetilamonio [CAS 4207-56-1] (2.77 g, 7.36 mmol) en THF (50 mL) se agregó por goteo a  $0^{\circ}\text{C}$  a una solución de 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(7-fluoro-5-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **10a** (2.22 g, 6.7 mmol) en THF (150 mL). La mezcla de reacción 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 recogió con una cantidad mínima de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . El precipitado se filtró, se lavó con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2x) y se secó al vacío a  $50^{\circ}\text{C}$  para proporcionar 2-bromo-2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(7-fluoro-5-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **10b** (2.55 g).

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

Una mezcla de 2-bromo-2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(7-fluoro-5-metil-1*H*-indol-3-il)etanona **10b** (2 g, 4.87 mmol), 2-(3-amino-5-metoxifenoxi)etanol [CAS 725237-16-1] (1.6 g, 7.3 mmol) y diisopropiletilamina (1.26 mL, 7.3 mmol) en  $\text{CH}_3\text{CN}$  (100 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 20 h, a  $60^{\circ}\text{C}$  durante 8 h y nuevamente a temperatura ambiente durante 16 h. El disolvente se evaporó bajo presión reducida. El residuo se disolvió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL), se lavó con HCl 0.5 M (50 mL) y agua (50 mL), se secó sobre  $\text{MgSO}_4$ , se filtró y se evaporó. El residuo se purificó mediante cromatografía en columna (fase estacionaria: Biotage® Grace Reveleris Sílice 120 g, fase móvil: EtOAc/heptano gradiente de 0/100 a 60/40). Las fracciones que contenían producto se combinaron, se evaporaron y se secaron a  $50^{\circ}\text{C}$  al vacío para proporcionar 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(7-fluoro-5-metil-1*H*-indol-3-il)-2-((3-(2-hidroxietoxi)-5-metoxifenil)amino)etanona (Compuesto **10**, 1.3 g) como un sólido blanco.

Los enantiómeros de Compuesto **10** (1.3 g) se separaron mediante separación quiral de fase normal (fase estacionaria: AD-H, fase móvil: 70% etanol, 30% metanol) para proporcionar 637 mg del primer enantiómero eluido y 628 mg del segundo enantiómero eluido. El primer producto eluido se cristalizó a partir de una mezcla de MeOH/agua. Los sólidos se filtraron y se lavaron con una mezcla de MeOH/agua (1/1) para proporcionar el enantiómero **10A** (302 mg) como un polvo amorfo blanco. El segundo producto eluido se purificó adicionalmente mediante cromatografía ultrarrápida (fase estacionaria: Biotage® Grace Reveleris Sílice 40 g, fase móvil:

MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> gradiente de 0/100 a 2/98). Las fracciones que contenían producto se combinaron y se evaporaron para proporcionar el enantiómero **10B** (335 mg) como un polvo amorfo blanco.

**Compuesto 10:**

5 <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 2.38 (s, 3 H) 3.61 (s, 3 H) 3.62 - 3.67 (m, 2 H) 3.77 - 3.89 (m, 2 H) 3.95 (s, 3 H) 4.77 (t, *J*=5.5 Hz, 1 H) 5.72 (t, *J*=2.0 Hz, 1 H) 5.94 (d, *J*=2.0 Hz, 2 H) 6.15 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 6.34 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 6.90 (d, *J*=12.1 Hz, 1 H) 6.96 (dd, *J*=8.1, 2.0 Hz, 1 H) 7.09 (d, *J*=2.0 Hz, 1 H) 7.35 (d, *J*=8.4 Hz, 1 H) 7.77 (s, 1 H) 8.38 (s, 1 H) 12.46 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-A): R<sub>t</sub> 1.16 min, MH<sup>+</sup> 513

**Enantiómero 10A:**

10 <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 2.38 (s, 3 H) 3.62 (s, 3 H) 3.66 (t a, *J*=4.8 Hz, 2 H) 3.77 - 3.92 (m, 2 H) 3.96 (s, 3 H) 4.78 (s a, 1 H) 5.73 (s, 1 H) 5.96 (s, 2 H) 6.17 (d a, *J*=7.9 Hz, 1 H) 6.35 (d a, *J*=8.1 Hz, 1 H) 6.91 (d, *J*=12.1 Hz, 1 H) 6.97 (dd, *J*=8.3, 1.4 Hz, 1 H) 7.10 (d, *J*=1.5 Hz, 1 H) 7.36 (d, *J*=8.4 Hz, 1 H) 7.79 (s, 1 H) 8.39 (s, 1 H) 12.47 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-A): R<sub>t</sub> 1.15 min, MH<sup>+</sup> 513

15 [α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +132.3° (c 0.505, DMF)

SFC quiral (método SFC-F): R<sub>t</sub> 2.13 min, MH<sup>+</sup> 513, pureza quiral 100%

**Enantiómero 10B:**

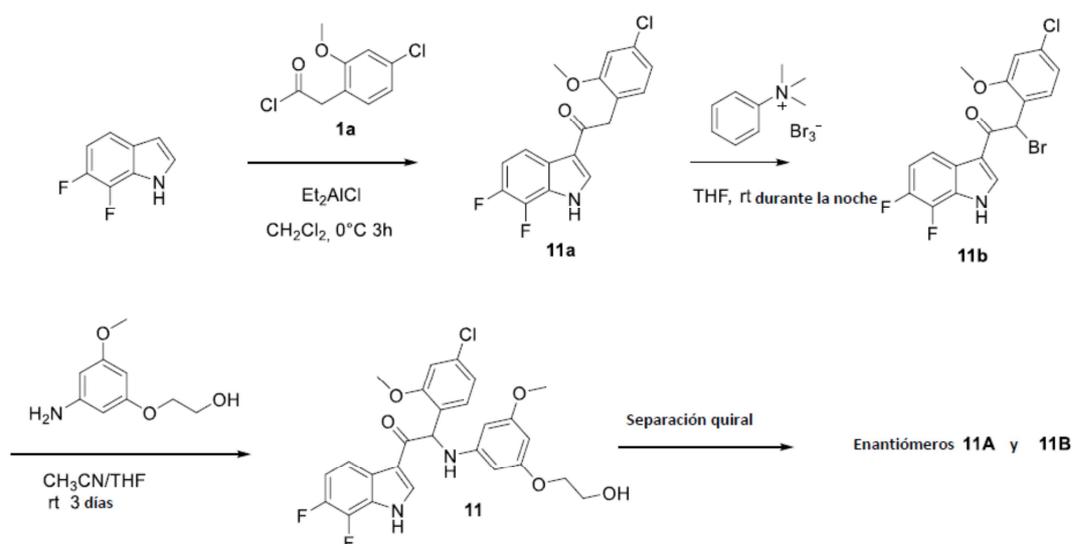
20 <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 2.38 (s, 3 H) 3.61 (s, 3 H) 3.63 - 3.68 (m, 2 H) 3.77 - 3.92 (m, 2 H) 3.96 (s, 3 H) 4.77 (t a, *J*=5.7 Hz, 1 H) 5.72 (t, *J*=2.0 Hz, 1 H) 5.95 (d, *J*=2.0 Hz, 2 H) 6.16 (d, *J*=7.9 Hz, 1 H) 6.35 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 6.91 (d, *J*=12.1 Hz, 1 H) 6.97 (dd, *J*=8.4, 2.0 Hz, 1 H) 7.09 (d, *J*=2.0 Hz, 1 H) 7.36 (d, *J*=8.4 Hz, 1 H) 7.78 (s, 1 H) 8.39 (s, 1 H) 12.46 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-A): R<sub>t</sub> 1.15 min, MH<sup>+</sup> 513

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -144.1° (c 0.4975, DMF)

SFC quiral (método SFC-F): R<sub>t</sub> 3.13 min, MH<sup>+</sup> 513, pureza quiral 100%

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



**Síntesis del intermediario 11a:**

30 Se agregó por goteo cloruro de dietilaluminio 1M en hexano (15.0 mL, 15.0 mmol) a 0°C a una solución de 6,7-difluoro-1*H*-indol [CAS 271780-84-8] (1.53 g, 10.0 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL). Después de 30 min a 0°C, se agregó lentamente una solución de cloruro de 2-(4-cloro-2-metoxifenil)acetilo **1a** (3.28 g, 15.0 mmol, para síntesis: véase

Ejemplo 1) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 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 se filtraron y se repartieron entre EtOAc y HCl 1N. Las fases se separaron. La capa acuosa se extrajo con EtOAc. Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtraron y se concentraron bajo presión reducida para proporcionar 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(6,7-difluoro-1*H*-indol-3-il)etanona **11a** (2.36 g).

#### Síntesis del intermediario 11b:

Una solución de tribromuro de feniltrimetilamonio [CAS 4207-56-1] (2.90 g, 7.02 mmol) en THF (10 mL) se agregó por goteo a 0°C a una solución de 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(6,7-difluoro-1*H*-indol-3-il)etanona **11a** (2.36 g, 7.02 mmol) en THF (50 mL). La mezcla de reacción 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-2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(6,7-difluoro-1*H*-indol-3-il)etanona **11b** (2.34 g).

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

Una mezcla de 2-bromo-2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(6,7-difluoro-1*H*-indol-3-il)etanona **11b** (1.70 g, 4.14 mmol) y 2-(3-amino-5-metoxifenoxi)etanol [CAS 725237-16-1] (2.25 g, 12.3 mmol) en THF (10 mL) y CH<sub>3</sub>CN (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 orgánica se lavó dos veces con HCl 1N, con una solución de NaHCO<sub>3</sub> acuoso saturado y salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub>, se filtró y se concentró bajo presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice utilizando un gradiente de EtOAc (20% a 100%) en heptano. Las fracciones que contenían el compuesto deseado se combinaron y se concentraron bajo presión reducida. El residuo se cristalizó a partir de una mezcla de Et<sub>2</sub>O, acetonitrilo y heptano para proporcionar 2-(4-cloro-2-metoxifenil)-1-(6,7-difluoro-1*H*-indol-3-il)-2-((3-(2-hidroxietoxi)-5-metoxifenil)amino)etanona (Compuesto **11**, 1.54 g) como una mezcla racémica.

Los enantiómeros de Compuesto **11** (1.22 g) se separaron mediante SFC preparativa quiral (fase estacionaria: Quiralcel® OD-H 5 μm 250 x 30 mm, fase móvil: 55% CO<sub>2</sub>, 45% MeOH) para proporcionar 550 mg del primer enantiómero eluido y 570 mg del segundo enantiómero eluido. El primer enantiómero eluido se solidificó a partir de CH<sub>3</sub>CN/diisopropiléter para proporcionar el enantiómero **11A** (487 mg). El segundo enantiómero eluido se solidificó a partir de CH<sub>3</sub>CN/diisopropiléter para proporcionar el enantiómero **11B** (460 mg). Los enantiómeros se produjeron como polvos amorfos.

#### 30 Compuesto 11:

<sup>1</sup>H RMN (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 3.56 - 3.69 (m, 5 H) 3.75 - 3.90 (m, 2 H) 3.95 (s, 3 H) 4.79 (t, *J*=5.5 Hz, 1 H) 5.73 (s, 1 H) 5.95 (d, *J*=1.9 Hz, 2 H) 6.18 (d, *J*=8.3 Hz, 1 H) 6.41 (d, *J*=8.3 Hz, 1 H) 6.97 (dd, *J*=8.1, 1.7 Hz, 1 H) 7.10 (d, *J*=1.9 Hz, 1 H) 7.16 - 7.30 (m, 1 H) 7.36 (d, *J*=8.3 Hz, 1 H) 7.92 (dd, *J*=8.7, 4.5 Hz, 1 H) 8.50 (s, 1 H) 12.78 (s a, 1 H)

35 LC/MS (método LC-D): R<sub>t</sub> 1.52 min, MH<sup>+</sup> 517

#### Enantiómero 11A:

<sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 12.79 (s a, 1 H) 8.50 (s, 1 H) 7.92 (dd, *J*=8.7, 4.3 Hz, 1 H) 7.36 (d, *J*=8.5 Hz, 1 H) 7.20 - 7.27 (m, 1 H) 7.10 (d, *J*=1.6 Hz, 1 H) 6.97 (dd, *J*=8.4, 1.7 Hz, 1 H) 6.42 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 6.18 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 5.95 (d, *J*=1.6 Hz, 2 H) 5.72 (s, 1 H) 4.79 (t, *J*=5.4 Hz, 1 H) 3.94 (s, 3 H) 3.78 - 3.89 (m, 2 H) 3.59 - 3.68 (m, 5 H)

40 LC/MS (método LC-C): R<sub>t</sub> 3.07 min, MH<sup>+</sup> 517

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: -99.6° (c 0.2218, DMF)

SFC quiral (método SFC-D): R<sub>t</sub> 1.80 min, MH<sup>+</sup> 517, pureza quiral 100%.

#### Enantiómero 11B:

45 <sup>1</sup>H RMN (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ ppm 12.79 (s a, 1 H) 8.50 (s, 1 H) 7.91 (dd, *J*=8.7, 4.3 Hz, 1 H) 7.36 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 7.17 - 7.28 (m, 1 H) 7.10 (d, *J*=1.9 Hz, 1 H) 6.97 (dd, *J*=8.2, 1.9 Hz, 1 H) 6.41 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 6.18 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 5.95 (d, *J*=1.9 Hz, 2 H) 5.72 (t, *J*=1.9 Hz, 1 H) 4.79 (t, *J*=5.5 Hz, 1 H) 3.94 (s, 3 H) 3.77 - 3.88 (m, 2 H) 3.55 - 3.70 (m, 5 H)

LC/MS (método LC-C): R<sub>t</sub> 3.07 min, MH<sup>+</sup> 517

[α]<sub>D</sub><sup>20</sup>: +99.2° (c 0.2127, DMF)

50 SFC quiral (método SFC-D): R<sub>t</sub> 3.38 min, MH<sup>+</sup> 517, pureza quiral 100%.

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

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 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% CO<sub>2</sub>) 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% CO<sub>2</sub>). 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 (EC<sub>50</sub>). 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<sub>T</sub>, S<sub>CC</sub> y S<sub>VC</sub> son la cantidad de señal eGFP en los pocillos del compuesto de prueba, control de células y control de virus, respectivamente. La EC<sub>50</sub> 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 EC<sub>50</sub> 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% CO<sub>2</sub>). 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 (CC<sub>50</sub>), 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 determina el índice de selectividad (SI) para los compuestos, que se calcula de la siguiente manera:  $SI = CC_{50} / EC_{50}$ .

Tabla 1: EC<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub>, 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	0.0030	4	6.2	4	2053	4
1A	0.00081	14	4.3	16	5395	13
1B	0.14	7	6.3	7	44	7
2A	0.00081	4	4.2	4	5166	4
2B	0.081	3	6.2	3	77	3
3	0.00072	3	5.5	3	7587	3
3A	0.00034	4	4.5	4	20070	4
3B	0.045	3	7.1	3	158	3
4	0.0014	3	6.3	4	4398	3
4A	0.00070	3	4.9	3	6965	3
4B	0.045	3	7.4	3	164	3
5	0.0023	3	6.5	3	2860	3
5A	0.00084	4	5.9	4	7057	4
5B	0.40	3	8.1	3	21	3
6	0.0012	3	5.6	3	4639	3
6A	0.00082	15	5.1	15	6520	14

No. de compuesto	EC50 ( $\mu\text{M}$ )	N	CC50 ( $\mu\text{M}$ )	N	SI	N
6B	0.076	4	5.4	4	71	4
7	0.0026	3	7.4	3	2860	3
7A	0.0011	4	6.1	4	5569	4
7B	0.069	3	7.8	3	112	3
8	0.0024	3	8.0	3	3270	3
8A	0.0012	3	4.2	3	3457	3
8B	0.26	3	5.7	3	22	3
9	0.0022	3	7.3	3	3329	3
9A	0.0044	4	3.9	4	899	4
9A	0.076	3	6.5	3	85	3
10	0.0075	3	5.8	3	767	3
10A	0.0032	3	4.5	3	1416	3
10B	0.19	4	3.8	3	20	3
11	0.0031	3	5.8	3	1879	3
11A	0.090	3	6.5	3	72	3
11B	0.0012	3	4.1	3	3526	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 ( $\beta$ -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  $\beta$ -actina. El método comparativo  $\Delta\Delta\text{Cp}$  se utiliza para calcular  $\text{EC}_{50}$ , que se basa en la expresión génica relativa del gen objetivo (3'UTR) normalizado con el gen de limpieza celular ( $\beta$ -actina). Además, los valores  $\text{CC}_{50}$  se determinaron en base a los valores de Cp adquiridos para la limpieza de genes -actina.

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

Primer/sonda	Objetivo	Secuencia <sup>a, b</sup>
F3utr258	DENV 3'-UTR	5'-CGGTTAGAGGAGACCCCTC-3'
R3utr425	DENV 3'-UTR	5'-GAGACAGCAGGATCTCTGGTC-3'
P3utr343	DENV 3'-UTR	<b>FAM-5'-AAGGACTAGAGGTTAGAGGAGACCCCCC-3'-BHQ1</b>
Factin743	$\beta$ -actina	5'-GGCCAGGTCATCACCATT-3'
Ractin876	$\beta$ -actina	5'-ATGTCCACGTCACACTTCATG-3'
Pactin773	$\beta$ -actina	<b>HEX-5'-TTCCGCTGCCCTGAGGCTCTC-3'-BHQ1</b>

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

<sup>b</sup> 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 75 $\mu\text{L}$ /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: 25 $\mu\text{M}$  - 0.00038 $\mu\text{M}$ ). 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%  $\text{CO}_2$ ) 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 25 $\mu\text{L}$  de suspensión de virus, donde se logró un Cp de  $\sim 22$  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% CO<sub>2</sub>). 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 granulado 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.

5

10

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.

15

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 (EC<sub>50</sub>) y la concentración citotóxica media máxima (CC<sub>50</sub>) (Tablas 6-9).

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

**Mezcla A**

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

**B Etapa de desnaturalización:**

<b>B</b>	<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
	<b>Desnaturalización</b>	75°C	5'
	<b>Espera</b>	4°C	espera

20

**C Mezcla B**

	<b>Muestras</b>	<b>864</b>				
	<b>Ítem de la mezcla</b>	<b>Concentración</b>			<b>Volumen para (µl)</b>	
		<b>Unidad</b>	<b>Stock</b>	<b>Final</b>	<b>muestra 1</b>	<b>muestras x</b>
	Buffer HIFI Expand 2	X	10.00	1.00	2.00	1728.0
	MgCl <sub>2</sub>	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
		<b>Volumen de mezcla total (µl)</b>			<b>7.43</b>	

**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
Item de la mezcla	Concentración			Volumen para (µl)	
	Unidad	Stock	Final	muestra 1	muestras x
H <sub>2</sub> 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
<b>Volumen mezcla/conducto (µl)</b>				<b>22.02</b>	
<b>ADNc</b>				<b>3.00</b>	

**B Protocolo qPCR3**

Etapa	Temperatura	Tiempo	Velocidad de aumento	
preincub/desnat	95°C	10 min	4.4	40 ciclos
Desnaturalización	95°C	10 seg	4.4	
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 ( $4 \times 10^4$ ) 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 quíntuple 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 logra 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% (EC<sub>50</sub>), 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).

- 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 H<sub>2</sub>O, 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.

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

Primer/sonda	Secuencia (5' → 3') <sup>a</sup>	Origen <sup>b</sup>	Objetivo
DENV-For	TCGGAGCCGGAGTTTACAAA (SEQ. ID. N. 1)	DENV 2 NGC	NS3
DENV-Rev	TCTTAACGTCCGCCCATGAT (SEQ ID N. 2)		
DENV-Sonda	<b>FAM-ATTCCACACAATGTGGCAT-MGB</b> (SEQ ID N. 3)		
DenS	GGATAGACCAGAGATCCTGCTGT (SEQ ID N. 4)	DENV-1, -3, -4	NS5
DenAS1-3	CATTCATTTTCTGGCGTTC (SEQ ID N. 5)	DENV-1, -3	
DenAS4	CAATCCATCTTGCGCGCTC (SEQ ID N. 6)	DENV-4	
DEN_1-3 sonda	<b>FAM-CAGCATCATTCCAGGCACAG-MGB</b> (SEQ ID N. 7)	DENV-1, -3	
DEN_4 sonda	<b>FAM-CAACATCAATCCAGGCACAG-MGB</b> (SEQ ID N. 8)	DENV-4	

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

10 <sup>b</sup> 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)

15 Se evaluaron posibles efectos citotóxicos de los compuestos en células Vero no infectadas. Las células se insertaron en 4 x 10<sup>4</sup> 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-sulfenil)-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<sub>Compuesto</sub>/OD<sub>CC</sub>), donde OD<sub>Compuesto</sub> y OD<sub>CC</sub> 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%; CC<sub>50</sub>) se calculó mediante la interpolación lineal (tablas 7 y 8).

Tabla 6: Ensayos sobre EC<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub>, y SI para los compuestos contra el serotipo 1 en RT-qPCR

Protocolo A						
RT-qPCR serotype 1 TC974#666						
No. de compuesto	EC50 (µM)	N	CC50 (µM)	N	SI	N
1A	0.0077	5	4.1	5	530	5
2A	0.0071	4	4.5	4	628	4
3A	0.0053	3	3.8	3	721	3
4A	0.0078	4	4.6	3	447	3
5A	0.013	3	5.2	3	392	3
6A	0.0036	5	4.8	5	1348	5
7A	0.016	3	4.6	3	282	3
8A	0.0096	3	3.5	3	368	3
9A	0.0050	3	4.7	3	934	3
10A	0.014	3	4.1	3	290	3
11B	0.018	3	3.7	3	202	3

Protocolo B	
RT-qPCR serotype 1 Djibouti	

ES 2 714 074 T3

No. de compuesto	EC50 (μM)	N	CC50 (μM)	N	SI	N
1A	0.022	3	9.7	9	506	2
2A	0.017	2	7.4	5	447	2
3A	0.018	2	7.7	5	450	2
4A	0.020	2	9.5	5	392	2
5A	0.019	2	7.8	5	471	2
6A	<0.015	3	8.1	7	>693	3
7A	0.020	2	7.2	5	366	2
8A	0.017	2	7.7	5	450	2
9A	0.019	2	7.9	5	454	2
10A	0.020	2	8.0	5	413	2
11B	0.025	2	7.7	5	320	2

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

Tabla 7: Ensayos sobre EC<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub>, y SI para los compuestos contra el serotipo 2 en RT-qPCR

Protocolo A						
RT-qPCR serotype 2 16681						
No. de compuesto	EC50 (μM)	N	CC50 (μM)	N	SI	N
1A	0.0011	9	4.7	9	4457	9
2A	0.00085	4	5.7	4	6744	4
3A	0.00024	3	4.3	6	25632	3
4A	0.00044	5	5.2	6	12915	5
5A	0.00050	4	4.5	5	10575	4
6A	0.00054	7	3.7	7	8391	6
7A	0.00091	3	4.7	4	5763	3
8A	0.0012	3	5.2	3	4406	3
9A	0.00079	3	3.8	3	4833	3
10A	0.0032	3	4.2	3	1312	3
11B	0.0010	3	4.7	3	4562	3

Protocolo B						
RT-qPCR serotype 2 NGC-Tongalike						
No. de compuesto	EC50 (μM)	N	CC50 (μM)	N	SI	N
1A	0.00038	5	14	6	36900	5
2A	0.00040	3	13	3	31100	3
3A	<0.00033	3	12	3	>3720 0	3
4A	<0.00034	3	13	3	>3730 0	3
5A	<0.00040	3	11	3	>2800 0	3
6A	0.00040	4	13	4	29300	3
7A	0.00027	3	12	2	18900	2
8A	0.0014	3	11	3	8050	3
9A	<0.00031	3	12	3	>3730 0	3
10A	0.0014	3	12	3	8910	3
11B	0.00027	3	11	3	37900	1

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

5 Tabla 8: Ensayos sobre EC<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub>, y SI para los compuestos contra el serotipo 3 en RT-qPCR

ES 2 714 074 T3

Protocolo A						
RT-qPCR serotype 3 H87						
No. de compuesto	EC50 (μM)	N	CC50 (μM)	N	SI	N
1A	0.063	5	1.7	4	28	4
2A	0.053	4	3.9	3	76	3
3A	0.036	3	3.7	3	104	3
4A	0.065	4	3.8	2	52	2
5A	0.068	3	2.9	3	42	3
6A	0.026	5	3.0	4	106	4
7A	0.070	3	4.6	2	66	2
8A	0.076	3	3.6	3	47	3
9A	0.063	3	3.0	3	48	3
10A	0.070	3	3.3	3	47	3
11B	0.070	3	3.4	3	48	3

Protocolo B						
RT-qPCR serotype 3 H87						
No. de compuesto	EC50 (μM)	N	CC50 (μM)	N	SI	N
1A	<0.015	6	9.7	9	>1440	6
2A	0.021	3	7.4	5	350	3
3A	0.020	3	7.7	5	383	3
4A	0.029	3	9.5	5	376	3
5A	0.025	3	7.8	5	291	3
6A	<0.015	4	8.1	7	>591	4
7A	<0.017	3	7.2	5	>423	3
8A	0.032	3	7.7	5	244	3
9A	0.018	3	7.9	5	400	3
10A	0.027	3	8.0	5	291	3
11B	0.026	3	7.7	5	294	3

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

Tabla 9: Ensayos sobre EC<sub>50</sub>, CC<sub>50</sub>, y SI para los compuestos contra cadenas serotipo 4 H241 (A) y SG/06K2270DK1/2005 (B) en RT-qPCR

Protocolo A						
RT-qPCR serotype 4 H241						
No. de compuesto	EC50 (μM)	N	CC50 (μM)	N	SI	N
1A	0.24	10	3.1	9	13	9
2A	0.26	4	1.7	3	7	3
3A	0.18	5	3.0	5	17	5
4A	0.24	4	2.4	4	10	4
5A	0.32	4	4.5	4	13	4
6A	0.084	8	2.1	8	25	8
7A	0.23	3	2.8	3	12	3
8A	0.30	3	3.1	2	11	2
9A	0.24	3	2.7	3	11	3
10A	0.32	3	2.7	2	8	2
11B	0.35	3	2.5	3	7	3

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

ES 2 714 074 T3

Protocolo A						
RT-qPCR serotype 4 EDEN						
No. de compuesto	EC50 (µM)	N	CC50 (µM)	N	SI	N
1A	0.0062	6	3.7	6	583	6
2A	0.0043	5	4.4	5	1007	5
3A	0.0029	4	4.1	3	1579	3
4A	0.0052	5	4.4	3	981	3
5A	0.0046	3	4.2	2	630	2
6A	0.0029	3	3.6	3	1241	3
7A	0.0066	4	3.7	3	536	3
8A	0.0065	4	4.5	4	690	4
9A	0.0047	3	2.6	3	717	3
10A	0.0086	4	4.4	3	436	3
11B	0.0098	4	4.0	3	374	3

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

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Janssen Pharmaceuticals, Inc  
 Katholieke Universiteit Leuven  
 5 <120> Derivados de indol mono o disustituídos como inhibidores de la replicación del virus del dengue  
 <130> TIP 326 PCT  
 10 <150> EP14187374.5  
 <151> 2014-10-01  
 <150> EP15159164.1  
 <151> 2015-03-16  
 15 <160> 14  
 <170> BiSSAP 1.2  
 <210> 1  
 20 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Virus del dengue  
 <220>  
 25 <221> fuente  
 <222> 1..20  
 <223> /organismo="Virus del dengue"  
 tipo\_mol="ADN sin asignar"  
 30 <400> 1  
 tcggagccgg agtttcaaaa 20  
 <210> 2  
 35 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Virus del dengue  
 <220>  
 40 <221> fuente  
 <222> 1..20  
 <223> /organismo="Virus del dengue"  
 tipo\_mol="ADN sin asignar"  
 45 <400> 2  
 tcttaacgct cgcccatgat 20  
 <210> 3  
 50 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Virus del dengue  
 <220>  
 55 <221> fuente  
 <222> 1..19  
 <223> /organismo="Virus del dengue"  
 tipo\_mol="ADN sin asignar"  
 60 <400> 3  
 attccacaca atgtggcat 19  
 <210> 4  
 65 <211> 23  
 <212> ADN

<213> Virus del dengue  
 <220>  
 <221> fuente  
 5 <222> 1..23  
 <223> /organismo="Virus del dengue"  
 tipo\_mol="ADN sin asignar"  
 <400> 4  
 10 ggatagacca gagatcctgc tgt 23  
 <210> 5  
 <211> 20  
 15 <212> ADN  
 <213> Virus del dengue  
 <220>  
 <221> fuente  
 20 <222> 1..20  
 <223> /organismo="Virus del dengue"  
 tipo\_mol="ADN sin asignar"  
 <400> 5  
 25 cattccattt tctggcgctc 20  
 <210> 6  
 <211> 20  
 30 <212> ADN  
 <213> Virus del dengue  
 <220>  
 <221> fuente  
 35 <222> 1..20  
 <223> /organismo="Virus del dengue"  
 tipo\_mol="ADN sin asignar"  
 <400> 6  
 40 caatccatct tgccggcgtc 20  
 <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 cagcatcatt ccaggcacag 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"

5 <400> 8  
caacatcaat ccaggcacag 20

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

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

20 <400> 9  
cggtagagg agaccctc 19

25 <210> 10  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Virus del dengue

30 <220>  
<221> fuente  
<222> 1..21  
<223> /organismo="Virus del dengue"  
tipo\_mol="ADN sin asignar"

35 <400> 10  
gagacagcag gatctctggt c 21

40 <210> 11  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Virus del dengue

45 <220>  
<221> fuente  
<222> 1..28  
<223> /organismo="Virus del dengue"  
tipo\_mol="ADN sin asignar"

50 <400> 11  
aaggactaga ggtagagga gaccccc 28

55 <210> 12  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Virus del dengue

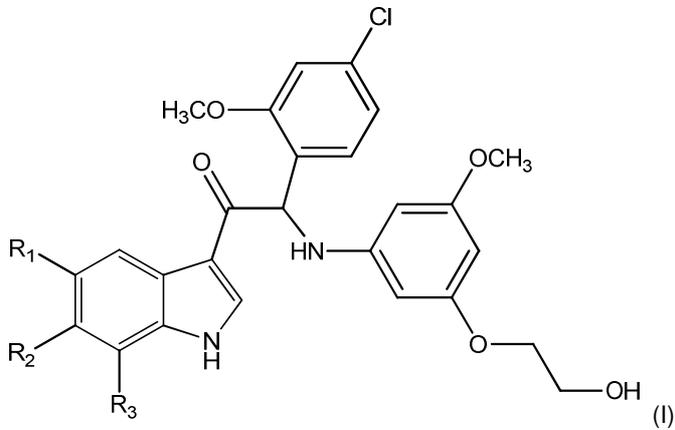
60 <220>  
<221> fuente  
<222> 1..18  
<223> /organismo="Virus del dengue"  
tipo\_mol="ADN sin asignar"

65 <400> 12  
ggccaggtca tcaccatt 18



REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula (I)



5 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:

R<sub>1</sub> es H, R<sub>2</sub> es F y R<sub>3</sub> es H, F o CH<sub>3</sub>;

R<sub>1</sub> es F o CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> es OCH<sub>3</sub> y R<sub>3</sub> es H;

R<sub>1</sub> es F, R<sub>2</sub> es H y R<sub>3</sub> es CH<sub>3</sub>;

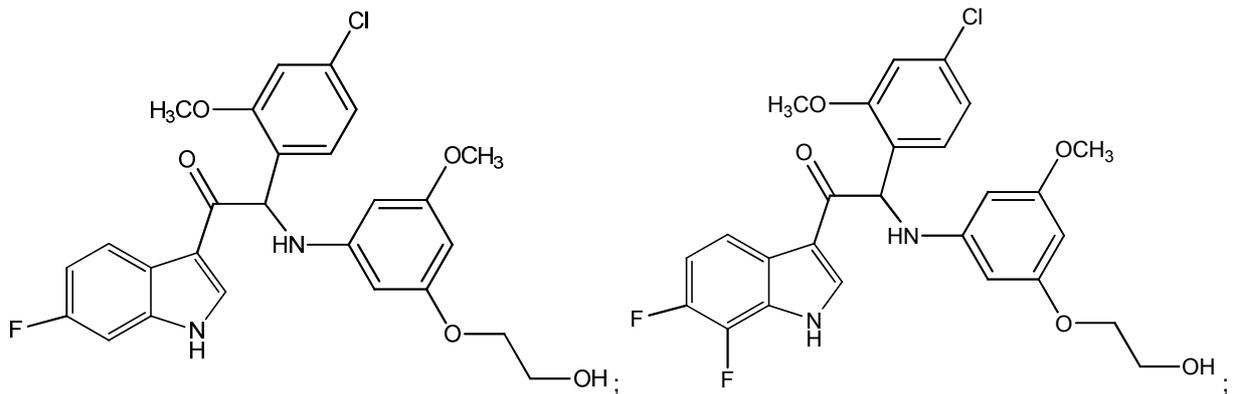
R<sub>1</sub> es H, R<sub>2</sub> es OCH<sub>3</sub> y R<sub>3</sub> es H;

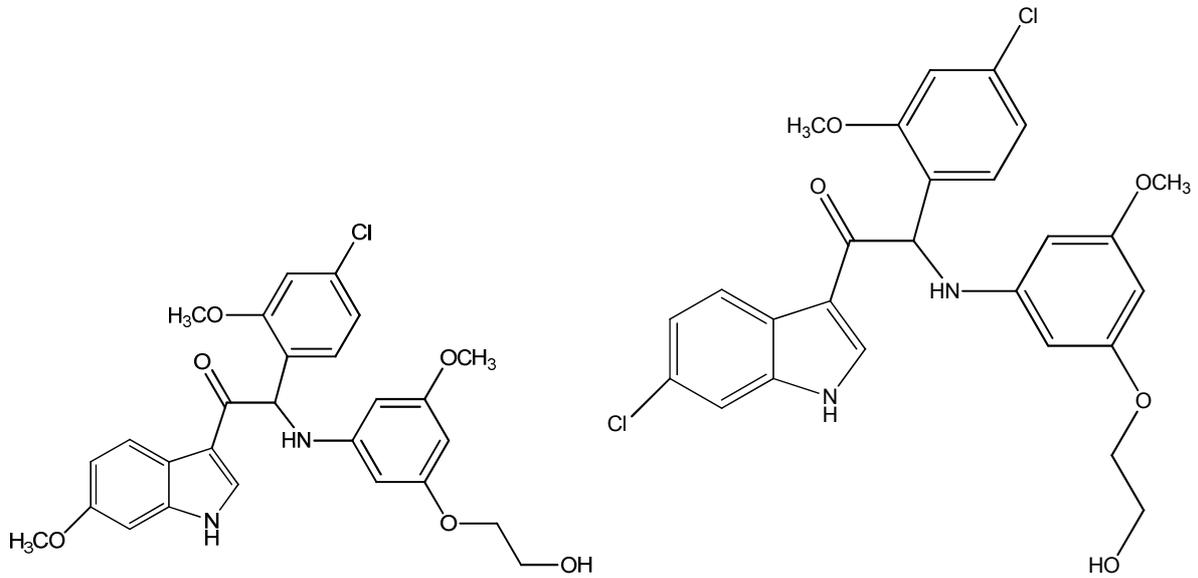
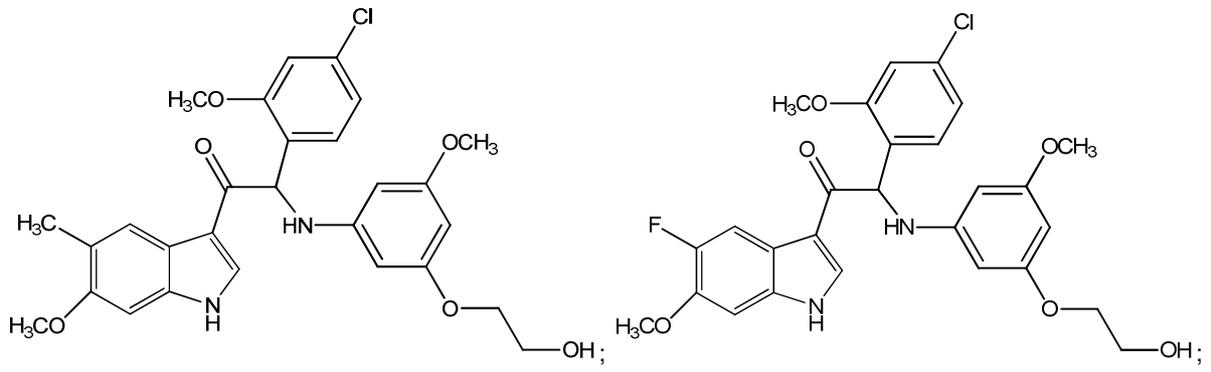
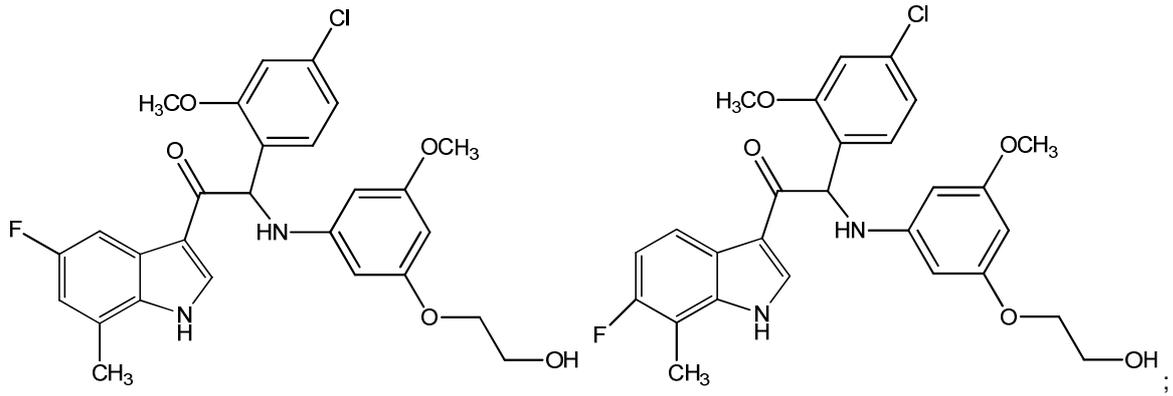
10 R<sub>1</sub> es H, R<sub>2</sub> es Cl y R<sub>3</sub> es H o CH<sub>3</sub>;

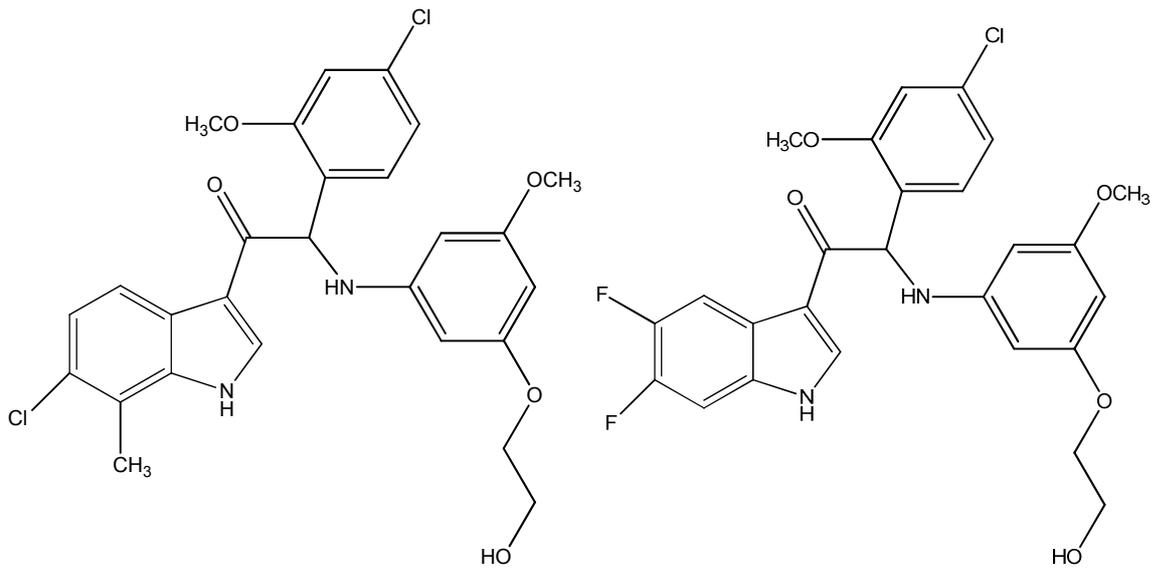
R<sub>1</sub> es F, R<sub>2</sub> es F y R<sub>3</sub> es H o

R<sub>1</sub> es CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> es H y R<sub>3</sub> es F.

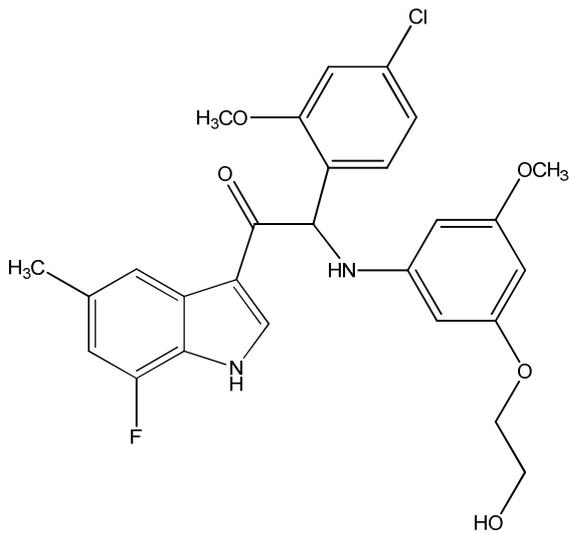
2. Un compuesto o su forma estereoisomérica, una sal, un solvato o un polimorfo farmacéuticamente aceptables de este de conformidad con la reivindicación 1, donde el compuesto se selecciona entre el grupo:







o

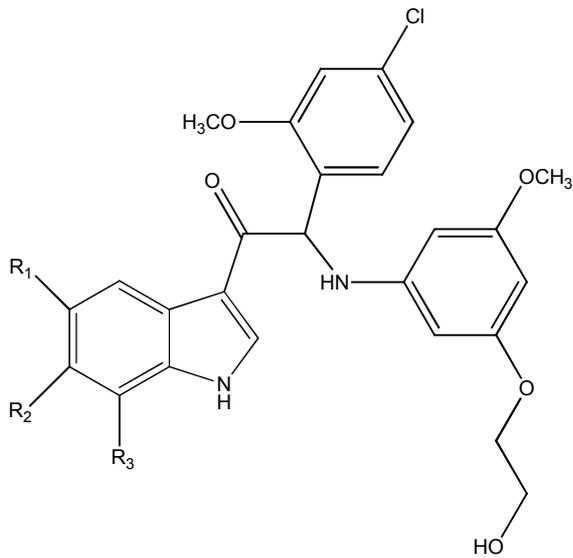


5 3. Una composición farmacéutica, que comprende un compuesto de fórmula (I) o una forma estereoisomérica, una sal, un solvato o un polimorfo farmacéuticamente aceptables de este de conformidad con la reivindicación 1 o 2, junto con uno o más excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

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 estos, que comprende un grupo indol mono- o disustituido; dicho compuesto se selecciona de un grupo donde:

R<sub>1</sub> es H, R<sub>2</sub> es F y R<sub>3</sub> es H, F o CH<sub>3</sub>;

5 R<sub>1</sub> es F o CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> es OCH<sub>3</sub> y R<sub>3</sub> es H;

R<sub>1</sub> es F, R<sub>2</sub> es H y R<sub>3</sub> es CH<sub>3</sub>;

R<sub>1</sub> es H, R<sub>2</sub> es OCH<sub>3</sub> y R<sub>3</sub> es H;

R<sub>1</sub> es H, R<sub>2</sub> es Cl y R<sub>3</sub> es H o CH<sub>3</sub>;

R<sub>1</sub> es F, R<sub>2</sub> es F y R<sub>3</sub> es H; o

10 R<sub>1</sub> es CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub> es H y R<sub>3</sub> es F.

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

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

15 8. Un compuesto para uso de conformidad con la reivindicación 7 donde dicho agente terapéutico adicional es seleccionado de un agente antiviral o vacuna contra el dengue, o ambos.