

DERIVADOS DE INDOLINA SUSTITUIDOS COMO INHIBIDORES DE LA REPLICACIÓN VÍRICA DE DENGUE

La presente invención se refiere a derivados de indolina sustituidos, a métodos para prevenir o tratar infecciones virales por dengue mediante el uso de dichos compuestos y también se refiere a dichos compuestos para su uso como medicamento, más preferentemente, para su uso como medicamento para tratar o prevenir infecciones virales por dengue. La presente invención se refiere además a composiciones farmacéuticas o preparados combinados de los compuestos, a las composiciones o preparados para su uso como un medicamento, más preferentemente para la prevención o el tratamiento de infecciones virales por dengue. La invención también se refiere a procesos para la preparación de los compuestos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los flavivirus, los cuales son transmitidos por mosquitos o garrapatas, provocan infecciones potencialmente letales para el hombre, tales como la encefalitis y la fiebre hemorrágica. Se conocen cuatro serotipos distintos, pero estrechamente relacionados, del flavivirus dengue, denominados DENV-1, -2, -3 y -4. El dengue es endémico en la mayoría de las regiones tropicales y subtropicales en todo el mundo, predominantemente en áreas urbanas y semiurbanas. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), 2500 millones de personas, de las cuales mil millones son niños, corren el riesgo de sufrir una infección por VDEN (OMS, 2002). Se estima que en todo el mundo se producen cada año de 50 a 100 millones de casos de fiebre por dengue [FD], medio millón de casos de enfermedad por dengue grave (es decir, fiebre hemorrágica por dengue [FHD] y síndrome de choque por dengue [SCD]) y más de 20,000 muertes. La FHD se ha convertido en una de las principales causas de hospitalización y fallecimiento entre los niños en regiones endémicas. Por todo ello, el dengue representa la causa más común de enfermedad arboviral. Debido a grandes brotes recientes en países situados en América Latina, sudeste asiático y Pacífico Occidental que incluye Brasil, Puerto Rico, Venezuela, Camboya, Indonesia, Vietnam, Tailandia), el número de casos de dengue ha aumentado drásticamente en los últimos años. No es solo el hecho de que el número de casos de dengue aumente a medida que la enfermedad se propaga a nuevas áreas, sino que los brotes tienden a ser más graves.

Aunque se han hecho progresos en el desarrollo de vacunas contra el dengue con la disponibilidad de la vacuna Dengvaxia®, se han encontrado muchas dificultades. Estas incluyen la existencia de un fenómeno denominado potenciación dependiente de anticuerpos (PDA). La recuperación de una infección provocada por un serotipo

proporciona inmunidad de por vida frente a ese serotipo pero únicamente confiere una protección parcial y transitoria frente a una infección posterior provocada por uno de los otros tres serotipos.

5

Después de la infección con otro serotipo, los anticuerpos heterólogos preexistentes forman complejos con el serotipo de virus del dengue que provoca la nueva infección pero no neutralizan el patógeno. En su lugar, se cree que se facilita la entrada del virus en las células, lo cual da como resultado una replicación incontrolada del virus y títulos virales máximos mayores. Tanto en infecciones primarias como secundarias, unos títulos virales mayores están asociados con una enfermedad del dengue más grave. Puesto que los anticuerpos maternos pueden transmitirse fácilmente a los niños por la lactancia materna, esta podría ser una de las razones por las que los niños se ven más afectados que los adultos por la enfermedad grave por dengue.

10

15

En lugares en los que circulan simultáneamente dos o más serotipos, que también se denominan regiones hiperendémicas, el riesgo de enfermedad severa por dengue es significativamente superior debido a que existe un riesgo mayor de experimentar una infección secundaria más grave. Además, en una situación de hiperendemia, la probabilidad de que emerjan cepas más virulentas aumenta, lo cual a su vez aumenta la probabilidad de fiebre hemorrágica por dengue (FHD) o síndrome de choque por dengue.

20

25

Los mosquitos portadores del dengue, que incluyen *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* (mosquito tigre), se están desplazando hacia el norte del globo. Según los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CCPE) de los Estados Unidos (EE. UU.), en la actualidad ambos mosquitos son omnipresentes en el sur de Texas. La propagación hacia el norte de los mosquitos portadores del dengue no está confinada a los EE. UU., sino que también se ha observado en Europa.

30

Dengvaxia®, la vacuna para el dengue producida por Sanofi Pasteur se aprobó en primer lugar en México y mientras tanto, ha sido aprobada en más países. Sin embargo, la vacuna se puede mejorar considerablemente debido a que presenta una eficacia limitada, especialmente contra VDEN-1 y -2, una eficacia baja en sujetos no expuestos previamente al flavivirus y una pauta posológica prolongada.

35

Pese a estas limitaciones, la vacuna supone un punto de inflexión en las zonas endémicas puesto que ofrecerá protección a gran parte de la población, aunque probablemente no a bebés muy pequeños, quienes se ven muy afectados por el dengue. Además, la pauta posológica y la eficacia muy limitada en sujetos no expuestos previamente al flavivirus hacen que sea inadecuada y que probablemente

no merezca la pena/no sea rentable para personas que viajen de zonas no endémicas a zonas endémicas de dengue. Las limitaciones mencionadas anteriormente de las vacunas contra el dengue son la razón por la que se necesita un agente antiviral contra el dengue que sea profiláctico y se pueda aplicar previamente a la exposición.

Además, a día de hoy, no se dispone de fármacos antivirales específicos para el tratamiento o la prevención de una infección por el virus de la fiebre del dengue. Claramente, todavía existe una gran demanda médica no satisfecha de sustancias terapéuticas para la prevención o tratamiento de infecciones víricas en animales, más particular en humanos y especialmente para infecciones víricas provocadas por flavovirus, más en particular virus de Dengue. Es indispensable disponer de compuestos con una potencia antiviral satisfactoria, niveles bajos o nulos de efectos secundarios, una actividad de amplio espectro contra múltiples serotipos del virus del Dengue, una baja toxicidad y/o unas propiedades farmacocinéticas o farmacodinámicas satisfactorias.

El documento WO-2010/021878 divulga derivados de 2-fenilpirrolidina e indolina como antagonistas del receptor de mentol frío para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y centrales. El documento WO-2013/045516 divulga derivados de indol e indolina para su uso en el tratamiento de infecciones virales por dengue.

A continuación, la presente invención proporciona compuestos, derivados de indolina sustituidos, que muestran una elevada y potente actividad contra los cuatro (4) serotipos del virus del dengue.

COMPENDIO DE LA INVENCION

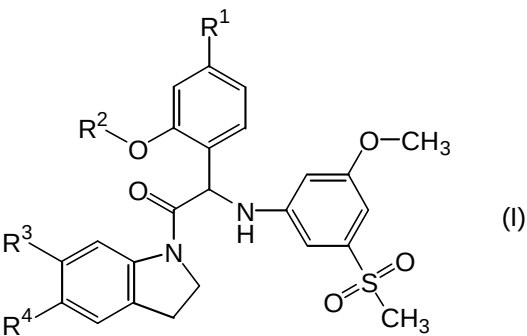
La presente invención se basa en el descubrimiento inesperado de que al menos uno de los problemas mencionados anteriormente se puede resolver mediante los compuestos actuales de la invención.

La presente invención proporciona compuestos que se ha observado que poseen una potente actividad antiviral contra los cuatro (4) serotipos conocidos actualmente. La presente invención demuestra además que estos compuestos inhiben eficazmente la proliferación del virus del Dengue (VDEN). Por lo tanto, estos compuestos constituyen una clase útil de compuestos potentes que se pueden 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 con virus del Dengue.

La presente invención se refiere además al uso de tales compuestos como medicamentos y a su uso para la elaboración de medicamentos para tratar y/o prevenir infecciones virales, en particular con virus que pertenecen a la familia de los virus del Dengue en animales o mamíferos, más en particular en seres humanos. La invención también se refiere a métodos para preparar todos estos compuestos y a composiciones farmacéuticas que los comprenden en una cantidad eficaz.

La presente invención también se refiere a un método para el tratamiento o la prevención de infecciones virales por dengue en seres humanos mediante la administración de una cantidad eficaz de uno o más de tales compuestos, o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, opcionalmente combinado con uno o más medicamentos diferentes, como otro agente antiviral, a un paciente que lo necesite.

Un aspecto de la invención es el suministro de compuestos de fórmula (I), incluyendo una forma estereoquímicamente isómera de los mismos,:



donde

R¹ es fluoro, R² es -CH₂CH₂OH, R³ es trifluorometilo, y R⁴ es hidrógeno, o

R¹ es fluoro, R² es -CH₂CH₂OH, R³ es trifluorometilo, y R⁴ es metoxi, o

R¹ es fluoro, R² es -CH₂CH₂OH, R³ es trifluorometoxi, y R⁴ es hidrógeno, o

R¹ es cloro, R² es -CH₂CH₂OH, R³ es trifluorometilo, y R⁴ es hidrógeno, o

R¹ es cloro, R² es -CH₂CH₂OH, R³ es trifluorometilo, y R⁴ es metoxi, o

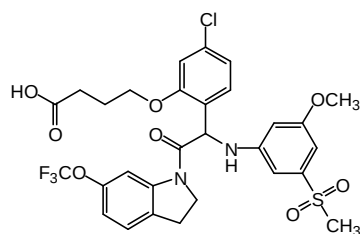
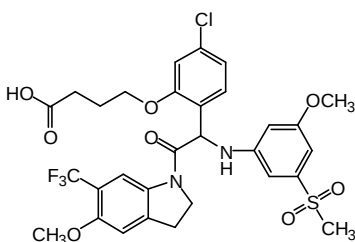
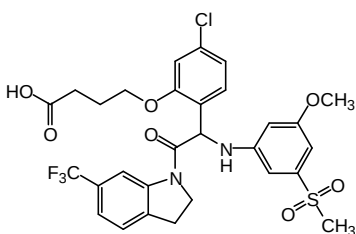
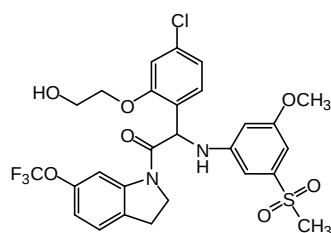
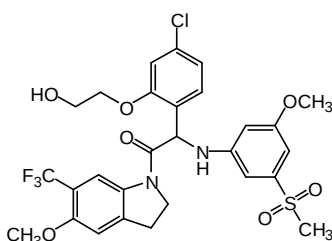
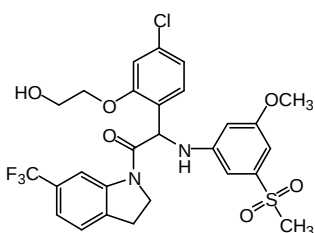
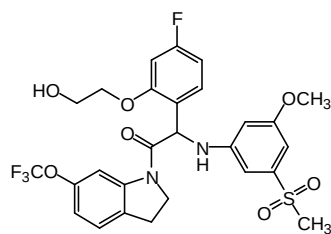
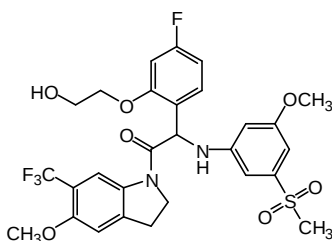
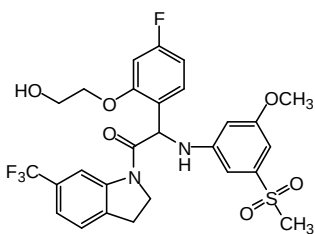
R¹ es cloro, R² es -CH₂CH₂OH, R³ es trifluorometoxi, y R⁴ es hidrógeno, o

R¹ es cloro, R² es -(CH₂)₃COOH, R³ es trifluorometilo, y R⁴ es hidrógeno, o

R¹ es cloro, R² es -(CH₂)₃COOH, R³ es trifluorometilo, y R⁴ es metoxi, o

R¹ es cloro, R² es -(CH₂)₃COOH, R³ es trifluorometoxi, y R⁴ es hidrógeno;

5



30

35

Se entiende que las sales de ácido farmacéuticamente aceptables mencionadas anteriormente comprenden las formas activas de sal de adición de ácido no tóxica que los compuestos de fórmula (I) son capaces de formar. Estas sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables se pueden obtener de manera conveniente tratando la forma de base con un ácido adecuado de este tipo. Los ácidos apropiados

comprenden, por ejemplo, ácidos inorgánicos tales como ácido hidrohálico, por ejemplo, clorhídrico o bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico y similares; o ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, acético, propanoico, hidroxiacético, láctico, 5 pirúvico, oxálico (es decir, etanodioico), malónico, succínico (es decir, ácido butanodioico), maleico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, p-toluensulfónico, ciclámico, salicílico, p-amino-salicílico, ácido pamoico y ácidos similares.

10 Los compuestos de la invención también pueden existir en formas sin solvatar y solvatadas. El término "solvato" se utiliza en la presente para describir un complejo molecular que comprende el compuesto de la invención y una o más moléculas de un disolvente farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, etanol.

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

Los compuestos de la presente invención se pueden administrar como productos 20 amorfos o cristalinos. Se pueden obtener, por ejemplo, como masas compactas sólidas, polvos o películas mediante métodos tales como la precipitación, cristalización, liofilización, secado por pulverización o secado por evaporación. Se pueden administrar solos o combinados con uno o más compuestos de la invención diferentes o combinados con uno o más fármacos diferentes. En general, se administrarán como 25 una formulación asociados con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. El término "excipiente" se utiliza en la presente para describir cualquier ingrediente que no sea el o los compuestos de la invención. La selección del excipiente depende en gran medida de factores tales como el modo particular de administración, el efecto 30 del excipiente sobre la solubilidad y estabilidad, y la naturaleza de la forma farmacéutica.

Los compuestos de la presente invención o cualquiera de sus subgrupos se pueden 35 formular en varias formas farmacéuticas con el fin de poderlos administrar. Como composiciones adecuadas, se pueden citar todas las composiciones empleadas normalmente para administrar fármacos por vía sistémica. Para preparar las composiciones farmacéuticas de esta invención, se combina una cantidad eficaz del compuesto particular, opcionalmente en forma de sal de adición, como principio activo, en mezcla íntima con un portador farmacéuticamente aceptable, pudiendo adoptar dicho portador una gran variedad de formas dependiendo de la forma del preparado que se desee para la administración. Estas composiciones farmacéuticas se encuentran deseablemente en una forma farmacéutica unitaria adecuada, por ejemplo, para administración oral o rectal. Por ejemplo, en la preparación de las composiciones

en una forma farmacéutica oral, se puede emplear cualquiera de los medios farmacéuticos habituales tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes y similares en el caso de preparados líquidos orales tales como suspensiones, jarabes, 5 elixires, emulsiones y soluciones; o portadores sólidos tales como almidones, azúcares, caolín, diluyentes, lubricantes, aglutinantes, agentes desintegrantes y similares en el caso de polvos, pastillas, cápsulas y comprimidos. Debido a su fácil administración, los comprimidos y las cápsulas representan las formas farmacéuticas 10 unitarias orales más convenientes, en cuyo caso se emplean obviamente portadores farmacéuticos sólidos. También se incluyen los preparados en forma sólida que se pueden convertir, poco antes de su uso, en formas líquidas.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones farmacéuticas mencionadas 15 anteriormente en forma farmacéutica unitaria por su facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La expresión "forma farmacéutica unitaria", tal como se utiliza en la presente, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias, donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada de principio 20 activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado asociado con el portador farmacéutico requerido. Ejemplos de formas de dosificación unitaria de este tipo son comprimidos (incluyendo comprimidos con muesca o revestidos), cápsulas, píldoras, paquetes de polvos, obleas, supositorios, disoluciones o suspensiones inyectables y similares, y múltiples segregados de las mismas.

Los expertos en el tratamiento de enfermedades infecciosas serán capaces de 25 determinar la cantidad eficaz a partir de los resultados de las pruebas que se presentan posteriormente en la presente. En general, se considera que una cantidad diaria eficaz sería de 0.01 mg/kg a 50 mg/kg de peso corporal, más preferentemente 30 de 0.1 mg/kg a 10 mg/kg de peso corporal. Puede resultar apropiado administrar la dosis requerida como dos, tres, cuatro o más subdosis en intervalos adecuados a lo largo del día. Dichas subdosis se pueden formular como formas farmacéuticas unitarias, por ejemplo, que contengan de 1 a 1000 mg y, en particular, de 5 a 200 mg 35 de principio activo por forma farmacéutica unitaria.

La dosis exacta y la frecuencia de administración dependen del compuesto particular de la invención utilizado, la afección particular que se esté tratando, la gravedad de la afección que se esté tratando, la edad, el peso y el estado físico general del paciente particular, así como también de otra medicación que pueda estar tomando el individuo, como bien sabrán los expertos en la técnica. Además, es obvio que la cantidad eficaz se puede reducir o incrementar dependiendo de la respuesta del sujeto tratado y/o dependiendo de la evaluación del médico que prescriba los compuestos de la presente

invención. Por consiguiente, los intervalos de la cantidad eficaz que se han mencionado anteriormente son solamente orientativos y no se pretende que limiten el alcance ni el uso de la invención de ningún modo.

5

También se pretende que la presente exposición incluya cualquiera de los isótopos de los átomos presentes 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.

10

Los presentes compuestos utilizados en la presente invención también pueden existir en su forma estereoquímicamente isomérica, que define todos los posibles compuestos constituidos por los mismos átomos enlazados mediante la misma secuencia de enlaces pero que tienen estructuras tridimensionales diferentes, que no son intercambiables. A menos que se mencione o indique lo contrario, la designación química de los compuestos engloba la mezcla de todas las formas estereoquímicamente isoméricas posibles que dichos compuestos puedan poseer.

15

20

Dicha mezcla puede contener todos los diastereómeros y/o enantiómeros de la estructura molecular básica de dicho compuesto. Se pretende que todas las formas estereoquímicamente isoméricas de los compuestos utilizados en la presente invención, tanto en forma pura como mezcladas con las otras, queden englobadas dentro del alcance de la presente invención, incluyendo cualquiera de las mezclas racémicas o racematos.

25

30

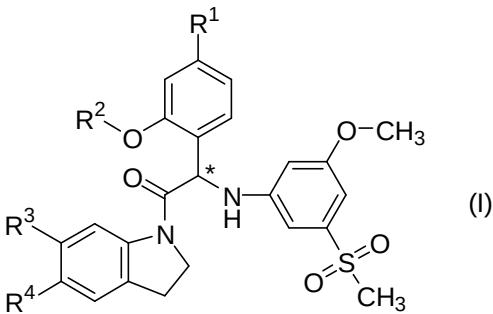
35

Las formas estereoisoméricas puras de los compuestos y los intermedios que se mencionan en la presente se definen como isómeros sustancialmente exentos de otras formas enantioméricas o diastereoméricas de la misma estructura molecular básica de dichos compuestos o intermedios. En particular, la expresión "estereoisoméricamente puro" se refiere a compuestos o intermedios que tienen un exceso estereoisomérico de al menos un 80% (es decir, un mínimo de un 90% de un isómero y un máximo de un 10% de los otros isómeros posibles) y hasta un exceso estereoisomérico de un 100% (es decir, un 100% de un isómero y nada de los demás), más concretamente, compuestos o intermedios que tienen un exceso estereoisomérico desde un 90% hasta un 100%, aún más concretamente que tienen un exceso estereoisomérico desde un 94% hasta un 100% y, aún más concretamente, que tienen un exceso estereoisomérico desde un 97% hasta un 100%. Las expresiones "enantioméricamente puro" y "diastereoméricamente puro" se deben interpretar de un modo similar, pero entonces haciendo referencia al exceso enantiomérico y el exceso diastereomérico de la mezcla en cuestión, respectivamente.

Pueden obtenerse formas estereoisoméricas puras de compuestos e intermedios

utilizados en esta invención mediante la aplicación de procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, los enantiómeros se pueden separar unos de otros mediante la cristalización selectiva de sus sales diastereoméricas con ácidos o bases ópticamente
5 activos. Algunos ejemplos de estos son el ácido tartárico, ácido dibenzoiltartárico, ácido ditoluoiltartárico y ácido alcanforsulfónico. Como alternativa, los enantiómeros se pueden separar mediante técnicas cromatográficas utilizando fases estacionarias quirales. Dichas formas estereoquímicamente isoméricas puras también pueden derivarse de las formas estereoquímicamente isoméricas puras correspondientes de
10 los materiales de partida apropiados, siempre que la reacción se produzca de manera estereoespecífica. Preferentemente, si se desea obtener un estereoisómero específico, dicho compuesto se sintetizará mediante métodos de preparación estereoespecíficos. Estos métodos emplearán ventajosamente materiales de partida
15 enantioméricamente puros.

Los compuestos de fórmula (I) de la presente invención tienen todos al menos un átomo de carbono quiral como se indica en la figura siguiente mediante el átomo de
20 carbono marcado con *:



Debido a la presencia de dicho átomo de carbono quiral, un "compuesto de fórmula
30 (I)" puede ser el enantiómero (R), el enantiómero (S), la forma racémica, o cualquier combinación posible de los dos enantiómeros individuales en cualquier proporción. Cuando la configuración absoluta (R) o (S) de un enantiómero no es conocida, este enantiómero también puede identificarse indicando si el enantiómero es dextrógiro (+)
35 o levógiro(-) después de medir la rotación óptica específica de dicho enantiómero particular.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un primer grupo de un compuesto de fórmula (I) donde los compuestos de fórmula (I) tienen la rotación específica (+).

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un segundo grupo de compuestos de fórmula (I) donde los compuestos de fórmula (I) tienen la rotación específica (-).

Ejemplos

Métodos de LC/MS

5 La medición por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) se realizó utilizando una bomba de CL, un haz de diodos (DAD) o un detector de UV y una columna, según se especifique en los métodos respectivos. Cuando fue necesario, se incluyeron detectores adicionales (véase la tabla de los métodos a continuación).

10 El flujo procedente de la columna se introdujo en un espectrómetro de masas (MS), que estaba configurado con una fuente de iones a presión atmosférica. Es parte del conocimiento de un experto en la materia ajustar los parámetros ajustables (por ejemplo, intervalo de barrido, tiempo de permanencia, etc.) con el fin de obtener iones
15 que permitan la identificación del peso molecular (PM) monoisotópico nominal del compuesto. La adquisición de datos se llevó a cabo con el software adecuado.

Los compuestos se describen según sus tiempos de retención (T_r) experimentales e iones. Si no se especifica de otro modo en la tabla de datos, el ion molecular descrito
20 corresponde a $[M+H]^+$ (molécula protonada) y/o $[M-H]^-$ (molécula desprotonada). En el caso de que el compuesto no se pueda ionizar directamente, se especifica el tipo de aducto (es decir, $[M+NH_4]^+$, $[M+HCOO]^-$, etc.). Para moléculas con patrones isotópicos múltiples (Br, Cl), el valor indicado es el obtenido para la masa isotópica más baja.
25 Todos los resultados se obtuvieron con incertidumbres experimentales que están habitualmente asociadas al método usado.

En lo sucesivo en la presente, "SQD" significa detector de cuadrupolo único, "MSD" detector selectivo de masas, "TA" temperatura ambiente, "BEH" híbrido con puente de
30 etilsiloxano/sílice, "DAD" detector de haz de diodos, "HSS" sílice de alta resistencia.

Códigos del método LC/MS (Flujo expresado en ml/min; temperatura de columna (T) en °C; tiempo de análisis en minutos).

35

5

10

15

20

25

30

35

Código del método	Instrumento	Columna	Fase móvil	Gradiente	Flujo ----- T col	Tiempo de ejecución (min)
LC-A	Waters: Acquity® UPLC® - DAD- Quattro Micro™	Waters: BEH® C18 (1.7 µm, 2.1 x 100 mm)	A: 95% CH ₃ COONH ₄ 7mM / 5% CH ₃ CN, B: CH ₃ CN	del 84.2% de A durante 0.49 min, al 10.5% de A en 2.18 min, mantenido durante 1.94 min, de nuevo al 84.2% A en 0.73 min, mantenido durante 0.73 min.	0.343 mL/min ----- 40°C	6.2
LC-B	Waters: Acquity® H-Class - DAD y SQD2™	Waters: BEH® C18 (1.7 µm, 2.1 x 100 mm)	A: 95% CH ₃ COONH ₄ 7mM / 5% CH ₃ CN, B: CH ₃ CN	84.2 % de A/15.8 % de B a 10.5 % de A en 2.18 min, mantenido durante 1.96 min, de nuevo a 84.2 % de A/15.8 % de B en 0.73 min, mantenido durante 0.49 min.	0.343 mL/min ----- 40°C	6.1
LC-C	Waters: Acquity® UPLC® - detector DAD- Acquity® TQ	Waters: UPLC HSS C18 (1.8 µm, 2.1 x 50 mm)	A: 0.1% HCOOH B: CH ₃ CN	Desde un 50% de A hasta un 10% de A en 3.5 min, se mantiene durante 1.5 min.	0.5 mL/min ----- 40°C	5

Código del método	Instrumento	Columna	Fase móvil	Gradiente	Flujo ----- T col	Tiempo de ejecución (min)
LC-D	Waters: Acquity® UPLC® - DAD-SQD	Waters: BEH C18 (1.7 µm, 2.1 x 50 mm)	A: 10mM CH ₃ COONH ₄ en 95% H ₂ O + 5% CH ₃ CN B: CH ₃ CN	Desde un 95% de A hasta un 5% de A en 1.3 min, se mantiene durante 0.7 min.	0.8 mL/min ----- 55°C	2

Métodos de SFC/MS

La medición de SFC se llevó a cabo utilizando un sistema de cromatografía analítica de fluidos supercríticos (SFC) compuesto por una bomba binaria para suministrar dióxido de carbono (CO₂) y un modificador, un dispositivo automático de toma de muestra, un horno para la columna, un detector de haz de diodos dotado de una celda de flujo de alta presión que resiste una presión de hasta 400 bar. Si se configura con un espectrómetro de masas (MS) el flujo desde la columna se lleva al (MS). Es parte del conocimiento de un experto en la materia ajustar los parámetros ajustables (por ejemplo, intervalo de barrido, tiempo de permanencia, etc.) con el fin de obtener iones que permitan la identificación del peso molecular (PM) monoisotópico nominal del compuesto. La adquisición de datos se llevó a cabo con el software adecuado.

Métodos analíticos de SFC/MS (flujo expresado en ml/min; temperatura de la columna (T) en °C; tiempo de análisis en minutos, contrapresión (BPR) en bar).

Código del método	columna	Fase móvil	Gradiente	Flujo ----- T col	Tiempo de ejecución ----- BPR
SFC-A	Columna Daicel Chiralpak® AD-H (5 µm,	A:CO ₂	Un 20% de B mantenido 7 min,	3 ----- 35	7 ----- 100

5

10

15

20

25

30

35

Código del método	columna	Fase móvil	Gradiente	Flujo ----- T col	Tiempo de ejecución ----- BPR
	150 x 4.6 mm)	B: EtOH (+0.3% iPrNH ₂)			
SFC-B	Columna Regis Whelk O1®(S,S) (3 µm, 100 x 4.6 mm)	A:CO ₂ B: EtOH (+0.3% iPrNH ₂)	Un 50% de B mantenido 3 min,	3.5 ----- 35	3 ----- 103
SFC-C	Columna Daicel Chiralpak® AD-H (5 µm, 150 x 4.6 mm)	A:CO ₂ B: EtOH (+0.3% iPrNH ₂)	Un 30% de B mantenido 7 min,	3 ----- 35	7 ----- 100
SFC-D	Columna Daicel Chiralpak® IC-3 (3 µm, 100 x 4.6 mm)	A:CO ₂ B: EtOH (+0.3% iPrNH ₂)	40 % de B mantenido 3min,	3.5 ----- 35	3 ----- 103
SFC-E	Columna Daicel Chiralpak® IA (5 µm, 150 x 4.6 mm)	A:CO ₂ B: iPrOH (+0.3% iPrNH ₂)	Un 30% de B mantenido 7 min,	3.5 ----- 35	7 ----- 103

5

10

15

20

25

30

35

Código del método	columna	Fase móvil	Gradiente	Flujo ----- T col	Tiempo de ejecución ----- BPR
SFC-F	Columna Daicel Chiralpak® IC (5 µm, 150 x 4.6 mm)	A:CO ₂ B: MeOH	Un 30% de B mantenido 7 min,	3 ----- 35	7 ----- 100
SFC-G	Columna Daicel Chiralpak® IC-3 (3 µm, 100 x 4.6 mm)	A:CO ₂ B: iPrOH (+0.3% iPrNH ₂)	40 % de B mantenido 5min,	3.5 ----- 35	5 ----- 103
SFC-H	Columna Daicel Chiralpak® IC (5 µm, 150 x 4.6 mm)	A:CO ₂ B: EtOH / iPrOH 50/50 (+0.3% iPrNH ₂)	Un 25% de B mantenido 7 min,	3 ----- 35	7 ----- 100
SFC-I	Columna Daicel Chiralpak® AS3 (3.0 µm, 150 x 4.6 mm)	A:CO ₂ B: EtOH (+0.2% iPrNH ₂ +3% H ₂ O)	10%-50% de B en 6 min, se mantiene 3.5 min	2.5 ----- 40	9.5 ----- 110

Puntos de fusión

Los valores son valores pico o intervalos de fusión y se obtienen con incertidumbres experimentales que están comúnmente asociadas con este método analítico.

DSC823e (indicado como DSC)

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

Rotaciones ópticas:

Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro Perkin-Elmer 341 con una lámpara de sodio y se expresaron tal como se indica a continuación: $[\alpha]^\circ (\lambda, c \text{ g/100ml, disolvente, } T^\circ\text{C})$.

$[\alpha]_\lambda^T = (100\alpha) / (l \times c)$: donde l es la longitud del recorrido en dm y c es la concentración en g/100 ml para una muestra a una temperatura T (°C) y una longitud de onda λ (en nm). Si la longitud de onda de la luz utilizada es de 589 nm (la línea D del sodio), entonces podría utilizarse el símbolo D en su lugar. El signo de la rotación (+ o -) debería proporcionarse siempre. Cuando se utiliza esta ecuación, la concentración y el disolvente siempre se proporcionan entre paréntesis después de la rotación. La rotación se indica utilizando grados y no se proporcionan unidades de concentración (se asume que son g/100 ml).

Abreviaturas usadas en la parte experimental

(M+H) ⁺	ion molecular protonado	HCl	ácido clorhídrico
ac.	acuoso	HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
Boc	<i>tert</i> -butiloxicarbonilo	iPrNH ₂	isopropilamina
Boc ₂ O	dicarbonato de di- <i>tert</i> -butilo	iPrOH	2-propanol
a	ancho	K ₂ CO ₃	carbonato de potasio
CH ₃ CN	acetonitrilo	LiAlH ₄	hidruro de litio y aluminio
CHCl ₃	cloroformo	m/z	relación de la masa con respecto

5

10

15

20

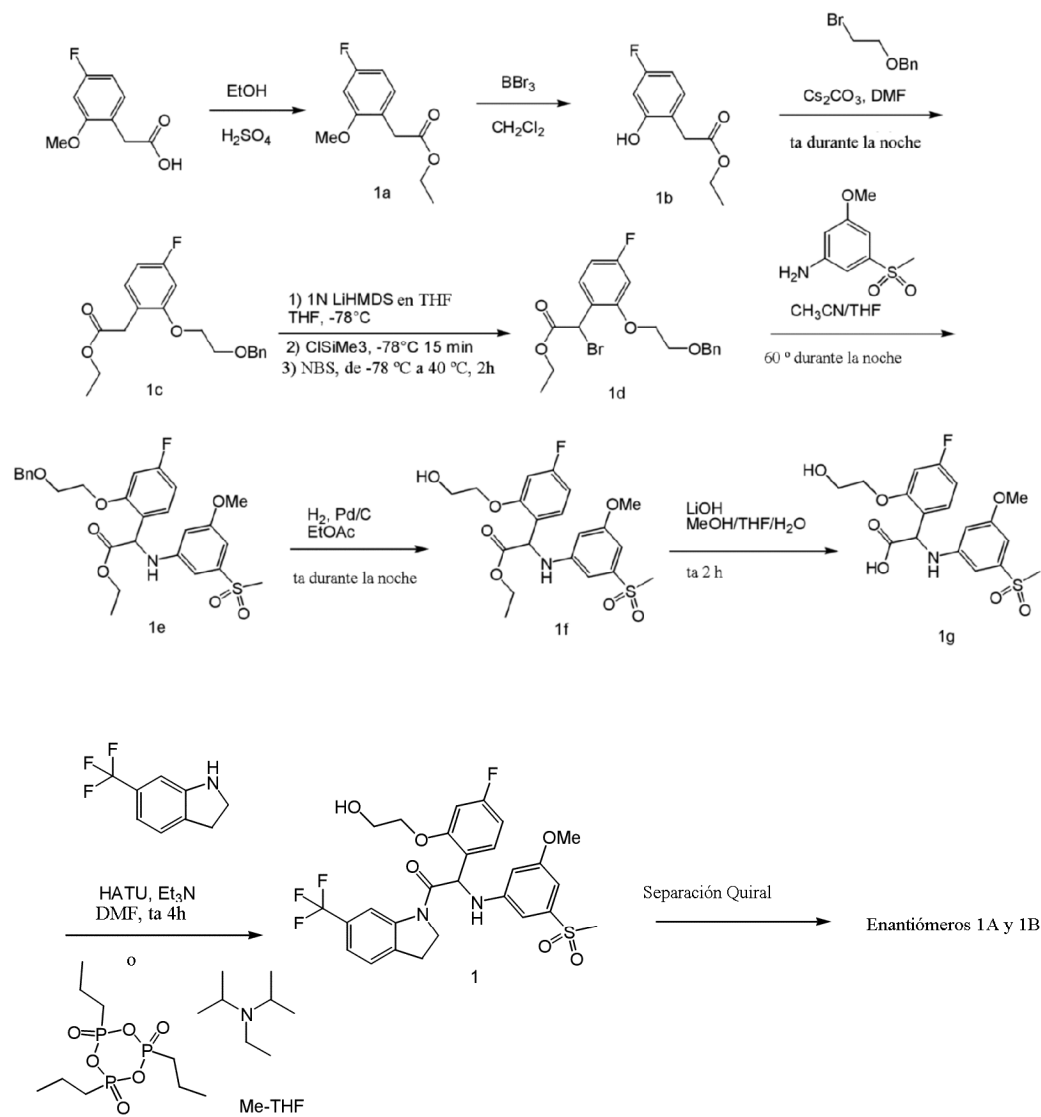
25

30

35

			a la carga
CH ₂ Cl ₂	diclorometano	Me	metilo
CH ₃ OH	metanol	MeOH	metanol
CO ₂	dióxido de carbono	MgSO ₄	sulfato de magnesio
d	doblete	min	minuto(s)
DCM	diclorometano	N ₂	nitrógeno
DIEA	diisopropiletilamina	Na ₂ CO ₃	carbonato de sodio
DIPE	Éter diisopropílico	Na ₂ SO ₄	sulfato de sodio
DMA	dimetilacetamida	NaBH ₄	borohidruro de sodio
DMAP	4-dimetilaminopiridina	NaHCO ₃	bicarbonato de sodio
DME	1,2-dimetoxietano	NaOH	hidróxido de sodio
DMF	dimetilformamida	NH ₄ Cl	cloruro de amonio
DMSO	Sulfóxido de dimetilo	c	cuartete
eq.	equivalente	ta o TA	temperatura ambiente
Et ₂ O	Éter dietílico	s	singlete
Et ₃ N	triethylamina	t	triplete
EtOAc	acetato de etilo	tBuOK	<i>terc</i> -butanolato de potasio
EtOH	etanol	TEA	triethylamina
H ₂ O	agua	TFA	ácido trifluoroacético
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico	THF	tetrahidrofurano
HATU	O-hexafluorofosfato de (7-aza-1H-benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametiluronio- CAS [148893-10-1]	TMSCl	cloruro de trimetilsililo

Ejemplo 1: síntesis de 2-(4-fluoro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometil)indolin-1-il)etan-1-ona (Compuesto 1) y separación quiral en los Enantiómeros **1A** y **1B**.



Síntesis del intermedio 1a:

Se calentó a reflujo una disolución de ácido 4-fluoro-2-metoxifenilacético [CAS 886498-61-9] (10 g, 54.30 mmol) en EtOH (200 ml) y H₂SO₄ (2 ml) durante 12 horas. Se añadió agua y se concentró la mezcla a presión reducida hasta la mitad del volumen original. Se añadió hielo, se basificó la disolución con K₂CO₃ y se extrajo con EtOAc. Se lavó la fase orgánica con salmuera, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró el disolvente a presión reducida para proporcionar 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)acetato de etilo **1a** (11.6 g). Se usó el compuesto en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Síntesis del intermediario 1b:

Se añadió tribromuro de boro (109.3 ml, 109.3 mmol) gota a gota a una disolución
enfriada (-30 °C) de 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)acetato de etilo **1a** (11.6 g, 54.7 mmol) en
CH₂Cl₂ (300 ml). La reacción se agitó a -20 °C durante 1 h y se inactivó con CH₃OH.
Se ajustó el pH a 8 mediante la adición de una disolución acuosa saturada de NaHCO₃.
Se extrajo la disolución con CH₂Cl₂ y se secaron las fases orgánicas combinadas
sobre MgSO₄, se filtró y se concentró el disolvente a presión reducida para
proporcionar 2-(4-fluoro-2-hidroxifenil)acetato de etilo **1b** (10.8 g). Se usó el
compuesto en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Síntesis del intermediario 1c:

A una mezcla de 2-(4-fluoro-2-hidroxifenil)acetato de etilo **1b** (1.24 g, 6.26 mmol) y
carbonato de cesio (4.08 g, 12.5 mmol) en DMF (20 ml), se añadió el éter bencil
2-bromoetilico [CAS 1462-37-9] (1.61 g, 7.51 mmol). La mezcla de reacción se agitó a
temperatura ambiente durante toda la noche. Se agregó agua y la mezcla se extrajo
con EtOAc. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión
reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía flash en gel de sílice utilizando
un gradiente de CH₂Cl₂ (de un 15% a un 100%) en heptano para obtener 2-(2-(2-
(benciloxi)etoxi)-4-fluorofenil)acetato de etilo **1c** (1.55 g).

Síntesis del intermediario 1d:

A una disolución enfriada (-78 °C) de bis(trimetilsilil)amida de litio 1 M en THF (4.51
ml, 4.51 mmol), se añadió una disolución de 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-
fluorofenil)acetato de etilo **1c** (0.750 g, 2.26 mmol) en THF (4 ml). Tras 1 hora a -78 °C,
se añadió clorotrimetilsilano (0.458 ml, 3.61 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a -
78 °C durante 15 minutos. Se añadió *N*-bromosuccinimida (0.482 g, 2.71 mmol) y se
continuó la agitación a -40 °C durante 2 horas. Se vertió la mezcla de reacción en H₂O
y se extrajo dos veces con EtOAc. Se combinaron las fases orgánicas, se secaron
sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar 2-(2-(2-
(benciloxi)etoxi)-4-fluorofenil)-2-bromoacetato de etilo **1d** (0.920 g) que se usó en la
siguiente etapa sin purificación adicional.

Síntesis del intermediario 1e:

Una mezcla de 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-fluorofenil)-2-bromoacetato de etilo **1d**
(0.920 g, 2.24 mmol) y 3-metoxi-5-(metilsulfonil)anilina [CAS 62606-02-4] (1.35 g, 6.71

mmol) en CH₃CN (5 ml) y THF (5 ml) se agitó a 60 °C durante la noche. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con HCl 1 N. La fase orgánica se lavó con HCl 1 N, una solución acuosa saturada de NaHCO₃, H₂O y salmuera, se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en gel de sílice utilizando un gradiente de EtOAc (de un 5 % a un 50 %) en heptano para obtener 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-fluorofenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)acetato de etilo **1e** (0.870 g).

Síntesis del intermedio 1f:

Una mezcla de 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-fluorofenil)-2-(3-metoxi-5(metilsulfonil)fenil)amino)acetato de etilo **1e** (0.868 g, 1.63 mmol) y 10 % de paladio sobre carbón (0.180 g) en EtOAc (30 ml) se agitó a temperatura ambiente durante la noche bajo atmósfera de H₂. La mezcla de reacción se filtró a través de celite®. El filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en gel de sílice utilizando un gradiente de EtOAc (de un 30 % a un 100 %) en heptano para obtener 2-(4-fluoro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)acetato de etilo **1f**.

Síntesis del intermedio 1g:

A una disolución de 2-(4-fluoro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)acetato de etilo **1f** (0.910 g, 2.06 mmol) en THF (6 ml), MeOH (6 ml) y H₂O (6 ml) se añadió hidróxido de litio monohidratado (0.432 g, 10.3 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. La mezcla de reacción se concentró parcialmente a presión reducida para eliminar TFH y MeOH. El residuo se acidificó con HCl 1 N y se extrajo con CH₂Cl₂. Se secó la fase orgánica sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar ácido 2-(4-fluoro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)acético **1g** (0.736 g) que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Síntesis del Compuesto 1 y separación quiral en los Enantiómeros 1A y 1B:

Método 1: A una disolución de ácido 2-(4-fluoro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)acético **1g** (0.200 g, 0.484 mmol) en DMF (4 ml) se añadieron HATU (0.184 g, 0.484 mmol), trietilamina (0.267 ml, 1.94 mmol) y 6-(trifluorometil)indolina [CAS 181513-29-1] (0.091 g, 0.484 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc y se lavó con HCl 1 N. La fase orgánica se lavó con una solución acuosa saturada de NaHCO₃, H₂O y salmuera, se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró a

presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía flash en gel de sílice utilizando un gradiente de EtOAc (de un 2% a un 40%) en CH₂Cl₂. Las fracciones que

5 El residuo se purificó mediante TLC de preparación usando una mezcla de EtOAc (de un 50 %) en CH₂Cl₂ como eluyente. Purificación posterior por medio de HPLC de preparación (Columna: X-Bridge® C18 – 5 µm 100 x 19 mm, fase móvil: pH 10 disolución de NH₄OAc en H₂O, CH₃CN) 2-(4-fluoro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometil)indolin-1-il)etanona
10 proporcionada (Compuesto **1**, 0.043 g) en forma de mezcla racémica.

Método 2: A una disolución de ácido 2-(4-fluoro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)acético **1g** (0.300 g, 0.726 mmol) en Me-THF (5.4 ml) bajo
15 flujo de N₂, se añadieron 6-(trifluorometil)indolina [CAS 181513-29-1] (0.136 g, 0.726 mmol), N-diisopropiletilamina (264 µl, 1.596 mmol) y anhídrido propilfosfónico (653 µl, 1.09 mmol). La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 16 h. La mezcla se vertió sobre agua y se extrajo con EtOAc. Se lavaron las fases orgánicas combinadas
20 con una disolución de K₂CO₃ al 10 % en agua y con agua. Se secó la fase orgánica sobre MgSO₄, se filtró y se concentró el disolvente a presión reducida. Se combinó esta fracción (0.47 g) con un segundo lote (cantidad total: 0.585 g) y se purificó por medio de cromatografía en columna sobre gel de sílice (15-40 µM, 24 g, CH₂Cl₂/MeOH 99.5/0.5). Se combinaron las fracciones puras y se concentró a presión reducida para
25 proporcionar 2-(4-fluoro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometil)indolin-1-il)etanona (Compuesto **1**, 0.160 g) en forma de mezcla racémica.

30 Se separaron los enantiómeros del Compuesto **1** (160 mg) por medio de SFC Quiral de Preparación (Fase estacionaria: Chiralpak® AD-H 5 µm 250 x 20 mm, Fase móvil: 75 % de CO₂, 25 % de EtOH (+0.3 % de iPrNH₂)). El primer producto eluido (72 mg) se solidificó en heptano/éter diisopropílico para dar el Enantiómero **1A** (50 mg). El segundo enantiómero eluido (80 mg) se solidificó en heptano/éter diisopropílico para
35 dar el Enantiómero **1B** (43 mg).

Compuesto **1**:

¹H RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.10 (s, 3 H) 3.22 (m, 2 H) 3.62 - 3.92 (m, 5 H) 3.97 - 4.22 (m, 3 H) 4.46 (m, 1 H) 4.98 (s a, 1 H) 5.82 (d, *J*=7.9 Hz, 1 H) 6.56 (s, 1 H) 6.62 (s, 1 H) 6.80 (t, *J*=7.7 Hz, 1 H) 6.92 (s, 1 H) 6.95 - 7.11 (m, 2 H) 7.29 - 7.53 (m, 3 H) 8.39 (s, 1 H)

LC-MS (método LC-C): TR 1.37 min, MH⁺ 583

Enantiómero 1A:

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.10 (s, 3 H) 3.14 - 3.29 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H)
 3.75 - 3.78 (m, 1 H) 3.78 - 3.89 (m, 1 H) 3.98 - 4.23 (m, 3 H) 4.37 - 4.55 (m, 1 H) 4.97
 (t, *J* = 5.4 Hz, 1 H) 5.82 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H) 6.56 (s, 1 H) 6.62 (s, 1 H) 6.79 (dt, *J* = 2.2,
 8.5 Hz, 1 H) 6.91 (s, 1 H) 6.98 - 7.04 (m, 2 H) 7.32 - 7.43 (m, 2 H) 7.46 (d, *J* = 7.9 Hz,
 1 H) 8.39 (s, 1 H).

LC/MS (método LC-A): TR 3.04 min, MH⁺ 583

[α]_D²⁰: -49.6° (c 0.25, DMF)

SFC quiral (método SFC-A): TR 2.76 min, MH⁺ 583, pureza quiral 100%.

Enantiómero 1B:

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.10 (s, 3 H) 3.14 - 3.29 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H)
 3.75 - 3.78 (m, 1 H) 3.78 - 3.89 (m, 1 H) 3.98 - 4.23 (m, 3 H) 4.37 - 4.55 (m, 1 H) 4.97
 (t, *J* = 5.4 Hz, 1 H) 5.82 (d, *J* = 8.2 Hz, 1 H) 6.56 (s, 1 H) 6.62 (s, 1 H) 6.79 (dt, *J* = 2.2,
 8.5 Hz, 1 H) 6.91 (s, 1H) 6.98 - 7.04 (m, 2 H) 7.32 - 7.43 (m, 2 H) 7.46 (d, *J* = 7.9 Hz,
 1 H) 8.39 (s, 1 H).

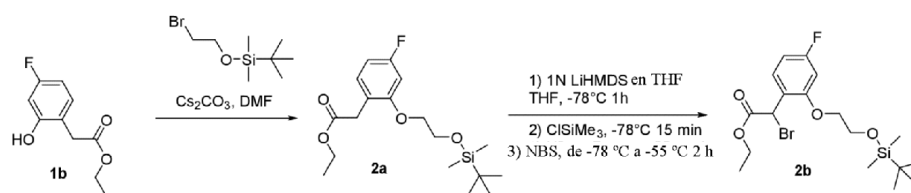
LC/MS (método LC-A): TR 3.04 min, MH⁺ 583

[α]_D²⁰: +51.7° (c 0.23, DMF)

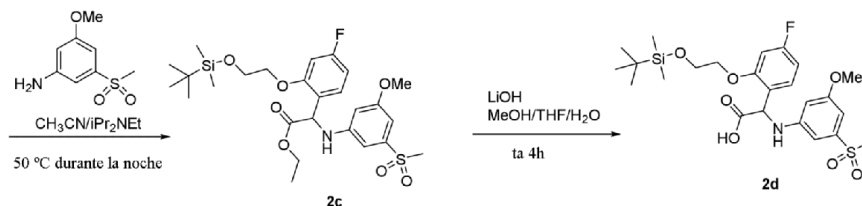
SFC quiral (método SFC-A): TR 4.16 min, MH⁺ 583, pureza quiral 100%.

Ejemplo 2: síntesis de 2-(4-fluoro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-1-(5-metoxi-6-(trifluorometil)indolin-1-il)etanona (Compuesto 2) y separación quiral en los Enantiómeros **2A** y **2B**.

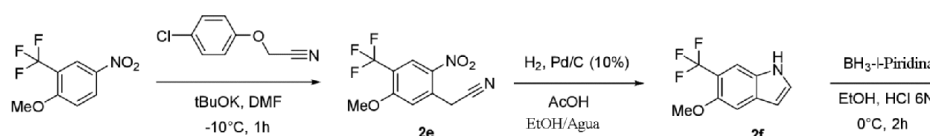
5



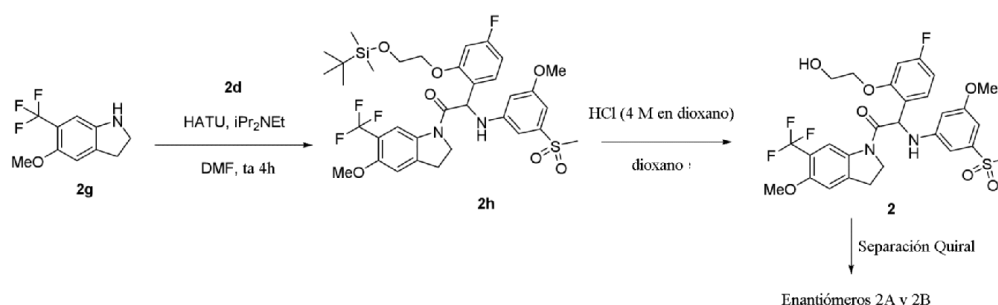
10



15



20



Síntesis del intermedio 2a:

25

A una mezcla de 2-(4-fluoro-2-hidroxifenil)acetato de etilo **1b** (10.6 g, 53.5 mmol) y carbonato de cesio (34.8 g, 106.9 mmol) en DMF (200 ml) a 10 °C, se añadió (2-bromoetoxi)(*terc*-butil)dimetilsilano [CAS 86864-60-0] (13.8 ml, 64.2 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. Se añadió H₂O y la mezcla de reacción se extrajo con EtOAc. La fase orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. Se purificó el residuo por medio de cromatografía instantánea sobre gel de sílice (15-40 μ M, 40 g, heptano/EtOAc 80/20). Se combinaron las fracciones puras y se retiró el disolvente a presión reducida para proporcionar 2-(2-(2-((*terc*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-fluorofenil)acetato de etilo **2a** (17.7 g).

35

Síntesis del intermedio 2b:

A una disolución 1 M de bis(trimetilsilil)amida de litio en THF (28.05 ml, 28.05 mmol), enfriada a -78 °C, se añadió una disolución de 2-(2-(2-((*terc*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-fluorofenil)acetato de etilo **2a** (5 g, 14.03 mmol) en THF (30 ml). Tras agitar durante 1 horas a -78 °C, se añadió clorotrimetilsilano (2.85 ml, 22.44 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a -78 °C durante 15 minutos. Se añadió *N*-bromosuccinimida (3 g, 16.83 mmol) en THF (30 ml) y se continuó la agitación a -55 °C durante 2 horas. Se

vertió la mezcla de reacción en H₂O y se extrajo dos veces con EtOAc. Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar 2-bromo-2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-fluorofenil)acetato de etilo **2b** (6.57 g) que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Síntesis del intermedio 2c:

Se agitó una mezcla de 2-bromo-2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-fluorofenil)acetato de etilo **2b** (3 g, 6.89 mmol), 3-metoxi-5-(metilsulfonil)anilina [CAS 62606-02-4] (2.08 g, 10.3 mmol) y diisopropiletilamina (2.37 ml, 13.8 mmol) en CH₃CN (60 ml) a 50°C durante la noche. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida. Se introdujo el residuo en EtOAc y se lavó con HCl 0.5 N y agua. La fase orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. Se purificó el residuo por medio de cromatografía instantánea sobre gel de sílice (15-40 µM, 120 g, gradiente de heptano/EtOAc de 90/10 a 80/20) para proporcionar 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-fluorofenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)acetato de etilo **2c** (2.6 g).

Síntesis del intermedio 2d:

Se añadió hidróxido de litio monohidratado (205 mg, 4.8 mmol) gota a gota a una disolución de 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-fluorofenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)acetato de etilo **2c** (2.227 g, 4.09 mmol) en THF/CH₃OH/H₂O (1/1/1) (100 ml) a 10°C. Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 4 horas, y se diluyó con agua. Tras enfriar a 0 °C, se acidificó lentamente la disolución a pH 6 con HCl 0.5 N, y se extrajo con EtOAc. Se secó la fase orgánica sobre MgSO₄, se filtró y se concentró el disolvente a presión reducida para proporcionar ácido 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-fluorofenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)acético **2d** (2 g). Se usó el compuesto en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Síntesis del intermedio 2e:

Una mezcla de 1-metoxi-4-nitro-2-(trifluorometil)benceno [CAS 654-76-2] (24.5 g, 110.8 mmol) y 4-clorofenoxiacetonitrilo [CAS 3598-13-8] (20.4 g, 121.9 mmol) en DMF (100 ml) se añadió gota a gota durante 30 min a una solución agitada de tBuOK (27.35 g, 243.7 mmol) en DMF (100 ml) a -10 °C. Después de la adición, la solución de color púrpura se mantuvo a -10 °C durante 1 h. Se añadieron 500 ml de hielo-agua y 500 ml de HCl 6 N y el precipitado se retiró por filtración, se lavó con agua y se secó a

presión reducida para proporcionar 40.4 g de 2-(5-metoxi-2-nitro-4-(trifluorometil)fenil)acetonitrilo **2e** (usado como tal en la siguiente etapa).

5 Síntesis del intermedio 2f:

Una solución de 2-(5-metoxi-2-nitro-4-(trifluorometil)fenil)acetonitrilo **2e** (26 g , 99.9 mmol) en etanol/agua (9/1) (500 ml) y AcOH (5.2 ml) se hidrogenó durante 1 h a una presión de 3.5 Bar con Pd al 10%/C (15.3 g) como catalizador. Se filtró la mezcla de reacción a través de un lecho de celite® y se lavó la torta filtrante con una mezcla de disolventes de CH₂Cl₂ y CH₃OH. El filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se filtró a través de un filtro de vidrio cargado con sílice 60-200 µm usando 80/20 de heptano/EtOAc como eluyente. Las fracciones que contenían el compuesto esperado se combinaron y el disolvente se concentró a presión reducida para dar 5-metoxi-6-(trifluorometil)-1*H*-indol **2f** (15.6 g).

Síntesis del intermedio 2g:

A 0 °C, se añadió gota a gota BH₃-Piridina (23.5 ml, 232.4 mmol) a una solución de 5-metoxi-6-(trifluorometil)-1*H*-indol **2f** (10 g, 46.5 mmol) en EtOH (60 ml). Se añadió lentamente HCl 6 N (140 ml) mientras se mantenía la temperatura por debajo de 10 °C. La mezcla se agitó a 0 °C durante 2 h. Se añadió agua (200 ml) y la mezcla se basificó a pH 8-9 con una solución acuosa concentrada de NaOH (la temperatura de reacción se mantuvo por debajo de 20 °C). El precipitado se retiró por filtración, se lavó con agua (dos veces) y se co-evaporó a presión reducida con tolueno para dar 5-metoxi-6-(trifluorometil)indolina **2g** (9 g).

Síntesis del intermedio 2h:

A una disolución de ácido 2-(2-(2-((*terc*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-fluorofenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)acético **2d** (1 g, 1.90 mmol) en DMF (10 ml), se añadieron HATU (1.08 g, 2.84 mmol), diisopropiletilamina (940 µl, 5.69 mmol) y 5-metoxi-6-(trifluorometil)indolina **2g** (412 mg, 1.90 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 4 h. Se diluyó la mezcla de reacción con agua. Se filtró el precipitado, se lavó con agua y se introdujo en EtOAc. Se lavó la fase orgánica con HCl 1N, agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró el disolvente a presión reducida para proporcionar 2-(2-(2-((*terc*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-fluorofenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-1-(5-metoxi-6-(trifluorometil)indolin-1-il)etanona **2h** (1.36 g, pureza por LC: 70 %). El compuesto crudo se utilizó directamente en el siguiente paso de reacción.

Síntesis del Compuesto 2 y separación quiral en los Enantiómeros 2A y 2B:

Se agitó una disolución de 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-fluorofenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonyl)fenil)amino)-1-(5-metoxi-6-(trifluorometil)indolin-1-il)etanona **2h** (1.29 g, 1.77 mmol) en HCl 4M en dioxano (30 ml) y dioxano (100 ml), a temperatura ambiente durante 1 hora. Se retiró el disolvente a presión reducida. Se añadieron EtOAc y una solución acuosa al 10% de K₂CO₃. Se separó la fase orgánica, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró el disolvente a presión reducida. Se purificó el residuo por medio de cromatografía instantánea sobre gel de sílice (15-40 µm, 80 g, CH₂Cl₂/MeOH/NH₄OH 99/1/0.1) para proporcionar, tras cristalización a partir de CH₃CN, 2-(4-fluoro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonyl)fenil)amino)-1-(5-metoxi-6-(trifluorometil)indolin-1-il)etanona (Compuesto **2**, 595 mg) en forma de racemato.

Se separaron los enantiómeros del Compuesto **2** (560 mg) por medio de SFC Quiral de Preparación (Fase estacionaria: Whelk O1 (S,S)[®] 5 µm 250 x 21.1 mm, fase móvil: 50 % de CO₂, 50 % de EtOH (+0.3 % de *i*PrNH₂)). El primer enantiómero eluido (288 mg) se cristalizó a partir de CH₃CN/éter diisopropílico para dar el Enantiómero **2A** (240 mg). El segundo enantiómero eluido (293 mg) se cristalizó a partir de CH₃CN/éter diisopropílico para dar el Enantiómero **2B** (232 mg).

Compuesto 2:

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.09 (s, 3 H) 3.12 - 3.29 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H) 3.74 - 3.80 (m, 1 H) 3.80 - 3.90 (m, 4 H) 4.02 (td, *J*=10.4, 7.2 Hz, 1 H) 4.05 - 4.17 (m, 2 H) 4.42 (td, *J*=10.4, 6.2 Hz, 1 H) 4.97 (t, *J*= 5.7 Hz, 1 H) 5.79 (d, *J*=8.20 Hz, 1 H) 6.56 (s, 1 H) 6.61 (s, 1 H) 6.78 (td, *J*=8.51, 2.52 Hz, 1 H) 6.90 (s, 1 H) 6.95 - 7.04 (m, 2 H) 7.24 (s, 1 H) 7.37 (dd, *J*=8.67, 6.78 Hz, 1 H) 8.35 (s, 1 H)

LC-MS (método LC-A): TR 3.02 min, MH⁺ 613

Punto de fusión: 215°C

Enantiómero 2A:

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.09 (s, 3 H) 3.12 - 3.29 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H) 3.74 - 3.80 (m, 1 H) 3.80 - 3.90 (m, 4 H) 4.02 (td, *J*=10.4, 7.2 Hz, 1 H) 4.05 - 4.17 (m, 2 H) 4.42 (td, *J*=10.4, 6.2 Hz, 1 H) 4.97 (t, *J*= 5.7 Hz, 1 H) 5.79 (d, *J*=8.20 Hz, 1 H) 6.56 (s, 1 H) 6.61 (s, 1 H) 6.78 (td, *J*=8.51, 2.52 Hz, 1 H) 6.90 (s, 1 H) 6.95 - 7.04 (m, 2 H) 7.24 (s, 1 H) 7.37 (dd, *J*=8.67, 6.78 Hz, 1 H) 8.35 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 3.00 min, MH⁺ 613

$[\alpha]_D^{20}$: +53.5°(c 0.2392, DMF)

SFC quiral (método SFC-B): TR 1.43 min, MH⁺ 613, pureza quiral 100%.

5

Punto de fusión: 204°C

Enantiómero 2B:

10

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.09 (s, 3 H) 3.12 - 3.29 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H) 3.74 - 3.80 (m, 1 H) 3.80 - 3.90 (m, 4 H) 4.02 (td, *J*=10.4, 7.2 Hz, 1 H) 4.05 - 4.17 (m, 2 H) 4.42 (td, *J*=10.4, 6.2 Hz, 1 H) 4.97 (t, *J*= 5.7 Hz, 1 H) 5.79 (d, *J*=8.20 Hz, 1 H) 6.56 (s, 1 H) 6.61 (t, *J*=1.73 Hz, 1 H) 6.78 (td, *J*=8.51, 2.52 Hz, 1 H) 6.90 (s, 1 H) 6.95 - 7.04 (m, 2 H) 7.24 (s, 1 H) 7.37 (dd, *J*=8.67, 6.78 Hz, 1 H) 8.35 (s, 1 H)

15

LC/MS (método LC-A): TR 3.00 min, MH⁺ 613

$[\alpha]_D^{20}$: -56.5°(c 0.255, DMF)

20

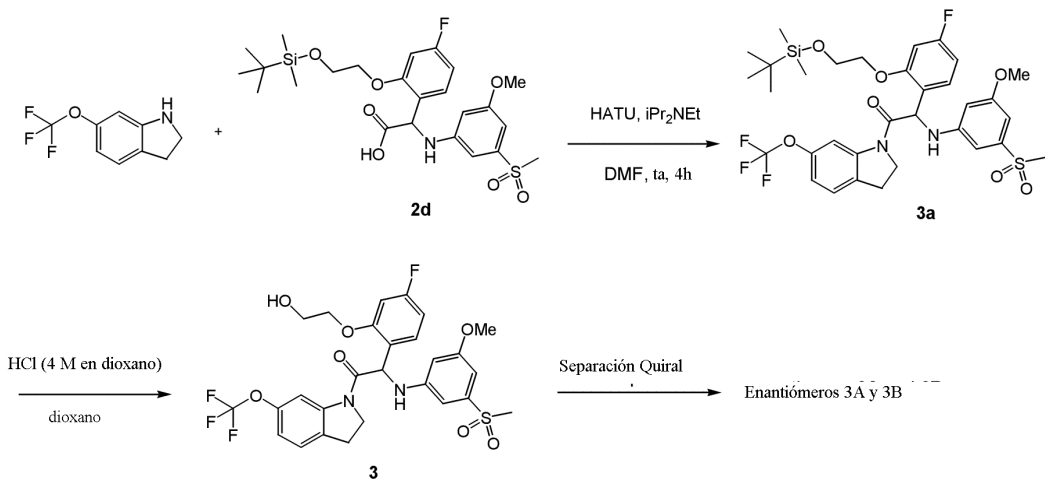
SFC quiral (método SFC-B): TR 1.72 min, MH⁺ 613, pureza quiral 99.8%.

Punto de fusión: 206°C

25

Ejemplo 3: síntesis de 2-(4-fluoro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etanona (Compuesto 3) y separación quiral en los Enantiómeros **3A** y **3B**.

30



35

Síntesis del intermedio 3a:

A una disolución de ácido 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-fluorofenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)acético **2d** (1 g, 1.90 mmol) en DMF (10 ml), se añadieron HATU (1.08 g, 2.84 mmol), diisopropiletilamina (940 µl, 5.69 mmol) y 6-(trifluorometoxi)indolina [CAS 959235-95-1] (385 mg, 1.90 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 4 h. Se diluyó la mezcla de reacción con

agua. Se filtró el precipitado, se lavó con agua y se introdujo en EtOAc. Se lavó la fase orgánica con una disolución de K_2CO_3 al 10 % en agua, una disolución saturada de NaCl, agua, se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-fluorofenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etanona **3a** (1.32 g). Se usó el compuesto bruto sin purificación en la siguiente etapa de reacción.

Síntesis del Compuesto 3 y separación quiral en los Enantiómeros **3A** y **3B**:

Se agitó una disolución de 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-fluorofenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etanona **3a** (1.17 g, 1.64 mmol) en HCl 4M en dioxano (3.3 ml) y dioxano (50 ml) a temperatura ambiente durante 1 hora. Se retiró el disolvente por medio de evaporación a presión reducida. Se añadieron EtOAc y una solución acuosa al 10 % de K_2CO_3 . Se separó la fase orgánica, se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se concentró el disolvente a presión reducida. Se purificó el residuo por medio de cromatografía instantánea sobre gel de sílice (15-40 μm , 40 g, $CH_2Cl_2/MeOH$ 99.5/0.5) para proporcionar 2-(4-fluoro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-1-(6-trifluorometoxi)indolin-1-il)etanona (Compuesto **3**, 508 mg) en forma de racemato. Se solidificó una muestra analítica del Compuesto **3** a partir de CH_3CN /éter diisopropílico (35 mg). Se usó la cantidad restante para separar los enantiómeros del Compuesto **3** por medio de SFC Quiral de Preparación (Fase estacionaria: Chiralpak® AD-H 5 μm 250 x 20 mm, Fase móvil: 70 % de CO_2 , 30 % de EtOH (+0.3 % de $iPrNH_2$)). El primer enantiómero eluido (166 mg) se solidificó en heptano/éter diisopropílico para dar el Enantiómero **3A** (130 mg). El segundo enantiómero eluido (165 mg) se solidificó en heptano/éter diisopropílico para dar el Enantiómero **3B** (110 mg).

Compuesto 3:

^1H RMN (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm 3.10 (s, 3 H) 3.11 - 3.25 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H) 3.74 - 3.79 (m, 1 H) 3.79 - 3.88 (m, 1 H) 3.96 - 4.19 (m, 3 H) 4.45 (dt, $J=6.3, 10.4$ Hz, 1 H) 4.95 (t, $J=5.52$ Hz, 1 H) 5.81 (d, $J=8.51$ Hz, 1 H) 6.57 (s, 1 H) 6.62 (t, $J=1.89$ Hz, 1 H) 6.80 (td, $J=8.43, 2.36$ Hz, 1 H) 6.91 (s, 1 H) 6.96 - 7.05 (m, 3 H) 7.28 - 7.46 (m, 2 H) 8.05 (s, 1 H)

LC-MS (método LC-A): TR 3.15 min, MH^+ 599

Enantiómero 3A:

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.10 (s, 3 H) 3.11 - 3.25 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H)
3.74 - 3.79 (m, 1 H) 3.79 - 3.88 (m, 1 H) 3.96 - 4.19 (m, 3 H) 4.45 (dt, *J*=6.3, 10.4 Hz,
1 H) 4.97 (t, *J*=5.52 Hz, 1 H) 5.81 (d, *J*=8.51 Hz, 1 H) 6.57 (s, 1 H) 6.62 (t, *J*=1.89 Hz,
1 H) 6.80 (td, *J*=8.43, 2.36 Hz, 1 H) 6.91 (s, 1 H) 6.96 - 7.11 (m, 3 H) 7.28 - 7.46 (m, 2
H) 8.05 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 3.13 min, MH⁺ 599

[α]_D²⁰: -59.0° (c 0.2542, DMF)

SFC quiral (método SFC-C): TR 1.87 min, MH⁺ 599, pureza quiral 100%.

Enantiómero 3B:

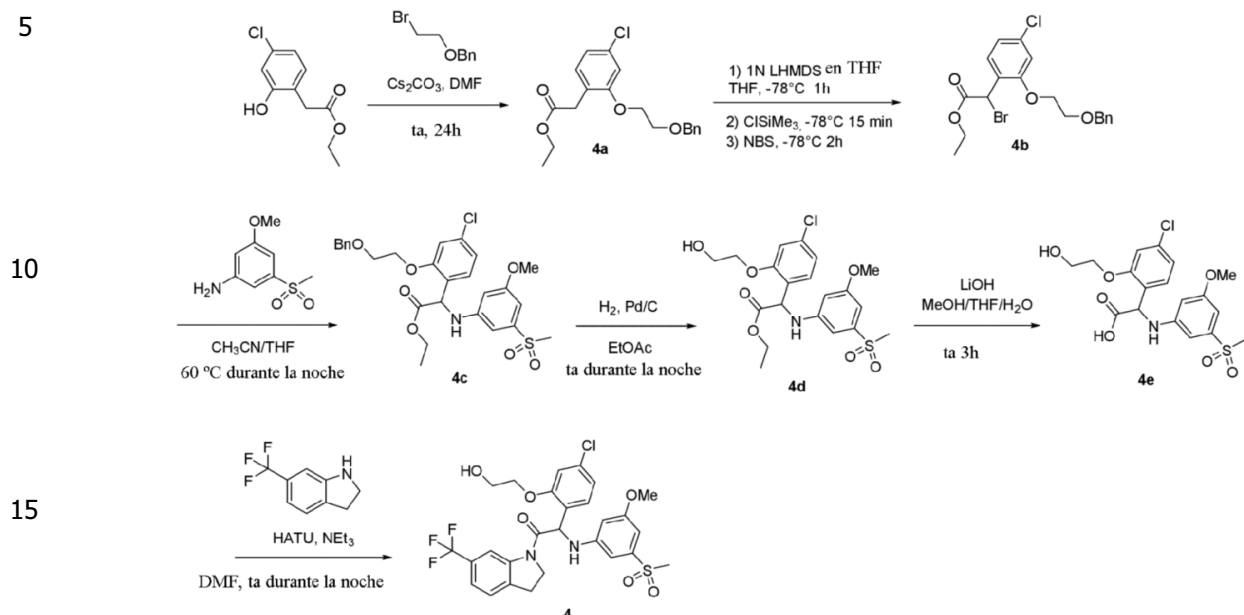
¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.10 (s, 3 H) 3.11 - 3.25 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H)
3.74 - 3.79 (m, 1 H) 3.79 - 3.88 (m, 1 H) 3.96 - 4.19 (m, 3 H) 4.45 (dt, *J*=6.3, 10.4 Hz,
1 H) 4.97 (t, *J*=5.52 Hz, 1 H) 5.81 (d, *J*=8.51 Hz, 1 H) 6.57 (s, 1 H) 6.62 (t, *J*=1.89 Hz,
1 H) 6.80 (td, *J*=8.43, 2.36 Hz, 1 H) 6.91 (s, 1 H) 6.96 - 7.11 (m, 3 H) 7.28 - 7.46 (m, 2
H) 8.05 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 3.13 min, MH⁺ 599

[α]_D²⁰: +56.8° (c 0.2467, DMF)

SFC quiral (método SFC-C): TR 2.34 min, MH⁺ 599, pureza quiral 100%.

Ejemplo 4 (método 1): síntesis de 2-(4-cloro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometil)indolin-1-il)etanona (Compuesto **4**)



Síntesis del intermedio 4a:

A una mezcla de 2-(4-cloro-2-hidroxifenil)acetato de etilo [CAS 1261826-30-5] (2.82 g, 3.28 mmol) y carbonato de cesio (8.56 g, 26.3 mmol) en DMF (50 ml), se añadió el éter bencil 2-bromoetílico [CAS 1462-37-9] (2.29 g, 14.5 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Se añadió H₂O y la mezcla de reacción se extrajo con EtOAc. La fase orgánica se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía flash en gel de sílice utilizando un gradiente de EtOAc (de un 2% a un 20%) en heptano para obtener 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)acetato de etilo **4a** (4.17 g).

Síntesis del intermedio 4b:

A una disolución enfriada (-78 °C) de bis(trimetilsilil)amida de litio 1 M en THF (11.0 ml, 11.0 mmol), se añadió una disolución de 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)acetato de etilo **4a** (1.82 g, 5.22 mmol) en THF (9 ml). Tras agitar durante 1 hora a -78 °C, se añadió clorotrimetilsilano (1.1 ml, 8.67 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a -78 °C durante 15 minutos. Se añadió *N*-bromosuccinimida (1.11 g, 8.67 mmol) y se continuó la agitación a -78 °C durante 2 horas. Se vertió la mezcla de reacción en H₂O y se extrajo dos veces con EtOAc. Se secó la fase orgánica sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-bromoacetato de etilo **4b** (2.23 g) que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Síntesis del intermedio 4c:

A una disolución de 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-bromoacetato de etilo **4b** (2.23 g, 5.22 mmol) en CH₃CN (22.5 ml) y THF (22.5 ml), se añadió 3-metoxi-5-(metilsulfonil)anilina [CAS 62606-02-4] (3.12 g, 15.5 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a 60 °C durante toda la noche. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida. El residuo se repartió entre EtOAc y HCl 1 N. La fase acuosa se extrajo con EtOAc. Las fases orgánicas se combinaron, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en gel de sílice utilizando un gradiente de EtOAc (de un 0 % a un 40 %) en heptano para obtener 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)acetato de etilo **4c** (1.57 g).

Síntesis del intermedio 4d:

Una mezcla de 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-(3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)acetato de etilo **4c** (1.57 g, 2.86 mmol) y 10 % de paladio sobre carbón (0.320 g) en EtOAc (40 ml) se agitó a temperatura ambiente durante la noche bajo atmósfera de H₂. La mezcla de reacción se filtró a través de celite®. El filtrado se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en gel de sílice utilizando un gradiente de EtOAc (de un 30 % a un 100 %) en heptano para obtener 2-(4-cloro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)acetato de etilo **4d** (1.13 g).

Síntesis del intermedio 4e:

A una disolución de 2-(4-cloro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)acetato de etilo **4d** (1.14 g, 2.49 mmol) en THF (8 ml), MeOH (8 ml) y H₂O (8 ml) se añadió hidróxido de litio monohidratado (0.522 g, 12.5 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 3 horas. Se añadieron HCl 1 N y EtOAc y se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo con EtOAc. Se combinaron las fases orgánicas, se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar cuantitativamente ácido 2-(4-cloro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)acético **4e** que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Síntesis del Compuesto 4:

A una disolución de 6-trifluorometilindolina [CAS 181513-29-1] (0.200 g, 1.07 mmol), ácido 2-(4-cloro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)acético **4e** (0.478 g, 1.11 mmol) y trietilamina (0.593 ml, 4.28 mmol) en DMF (10 ml)

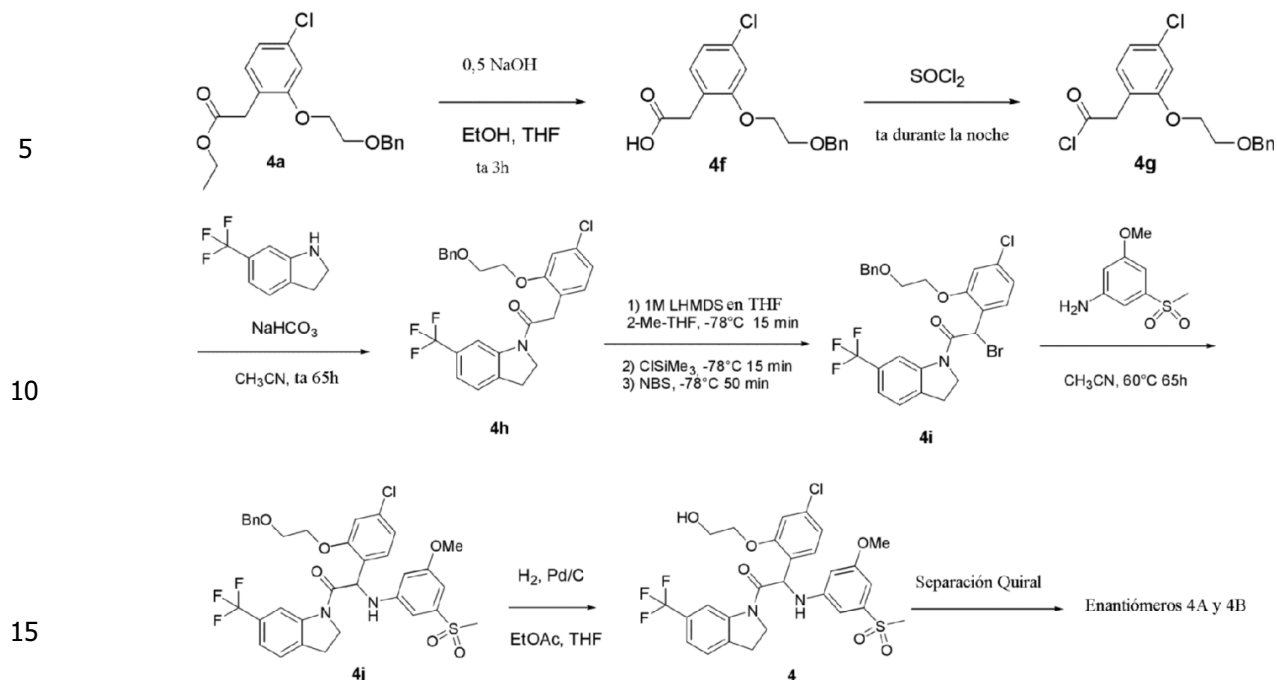
se añadió HATU (0.406 g, 1.07 mmol). La mezcla de reacción se agitó durante toda la noche. Se diluyó la mezcla de reacción con H₂O y se sometió a extracción con acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con HCl 1 N, una solución acuosa saturada de NaHCO₃ y salmuera, se secó con MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía flash en gel de sílice utilizando un gradiente de EtOAc (de un 60% a un 70%) en heptano. Las fracciones que contenían el producto deseado se combinaron y se concentraron a presión reducida. Se purificó el residuo por medio de cromatografía instantánea sobre gel de sílice usando un gradiente de EtOAc (de un 0 % a un 25 %) en CH₂Cl₂ para proporcionar 2-(4-cloro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometil)indolin-1-il)etan-1-ona (Compuesto **4**, 0.162 g) en forma de mezcla racémica.

Compuesto 4:

¹H RMN (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.11 (s, 3 H) 3.22 (m, 2 H) 3.67 - 3.88 (m, 5 H) 4.00 - 4.22 (m, 3 H) 4.44 (m, 1 H) 4.98 (t, *J*=5.5 Hz, 1 H) 5.83 (d, *J*=8.3 Hz, 1 H) 6.56 (s, 1 H) 6.63 (s, 1 H) 6.92 (s, 1 H) 7.04 (m, 2 H) 7.17 (m, 1 H) 7.31-7.50 (m, 3 H) 8.38 (s, 1 H)

LC-MS (método LC-C): TR 1.89 min, MH⁺ 599

Ejemplo 4 (método 2): síntesis de 2-(4-cloro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometil)indolin-1-il)etanona (Compuesto **4**) y separación quiral en los Enantiómeros **4A** y **4B**.



Síntesis del intermedio 4f:

A una solución de 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)acetato de etilo **4a** (4.17 g, 12.0 mmol) en una mezcla de EtOH (80 ml) y THF (40 ml), se añadió NaOH 0.5 N (72 ml, 36.0 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h. La mezcla de reacción se concentró parcialmente a presión reducida para eliminar los disolventes orgánicos. El residuo se acidificó hasta un pH de 2-3 con HCl 1 N y la mezcla se extrajo con EtOAc. La fase orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida para obtener el ácido 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)acético **4f** (3.83 g).

Síntesis del intermedio 4g:

Una solución del ácido 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)acético **4f** (7.12 g, 22.2 mmol) en cloruro de tionilo (50 ml, 689 mmol) se agitó a temperatura ambiente durante 18 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida y se evaporó conjuntamente con tolueno para obtener el cloruro de 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)acetilo **4g** (7.53 g), el cual se utilizó en el siguiente paso sin purificación adicional.

Síntesis del intermedio 4h:

Una disolución de cloruro de 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)acetilo **4g** (5.29 g, 15.6 mmol) en CH₃CN (50 ml), se añadió gota a gota bajo atmósfera de N₂-atm, a una mezcla en agitación de 6-(trifluorometil)indolina [CAS 181513-29-1] (2.92 g, 15.6 mmol) y bicarbonato de sodio (1.44 g, 17.1 mmol) en CH₃CN (50 ml). Se agitó la mezcla de

reacción a temperatura ambiente durante 65 h y se vertió en agua (500 ml). Se extrajo el producto (2x) con Et₂O. Las fases orgánicas combinadas se lavaron con salmuera, se secaron con MgSO₄, se filtraron y se evaporaron a presión reducida. El residuo solidificó tras el reposo. Se agitó el producto en éter diisopropílico (25 ml), se filtró, se lavó (3x) con éter diisopropílico, y se secó a vacío a 45 °C para proporcionar 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)-1-(6-(trifluorometil)indolin-1-il)etanona **4h** (6.97 g).

Síntesis del intermedio 4i:

Se agitó una disolución de 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)-1-(6-(trifluorometil)indolin-1-il)etanona **4h** (1.0 g, 2.04 mmol) en 2-Me-THF (100 ml), se agitó bajo flujo de N₂ y se enfrió a -78 °C. Se añadió, gota a gota, una disolución 1 M de bis(trimetilsilil)amida de litio en THF (4.08 ml, 4.08 mmol) y se agitó la mezcla resultante a -78 °C durante 15 minutos. Se añadió clorotrimetilsilano (417 µl 3.27 mmol) gota a gota y la mezcla se agitó a -78 °C durante 15 min. Se añadió gota a gota una disolución de *N*-bromosuccinimida (400 mg, 2.25 mmol) en 2-Me-THF (25 ml) y se agitó la mezcla de reacción a -78 °C durante 50 minutos. Se añadió una disolución acuosa saturada de NH₄Cl (40 ml) de una vez, y se agitó la mezcla resultante sin enfriamiento hasta que la temperatura alcanzó 0 °C. Se añadió agua (10 ml) y se separaron las fases. Se secó la fase orgánica sobre MgSO₄, se filtró, se evaporó a presión reducida, y se co-evaporó con CH₃CN para proporcionar 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-bromo-1-(6-(trifluorometil)indolin-1-il)etanona **4i** (1.16 g). Se usó el producto sin purificación adicional en la siguiente etapa.

Síntesis del intermedio 4j:

A una disolución agitada de 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-bromo-1-(6-(trifluorometil)indolin-1-il)etanona **4i** (1.16 g, 2.04 mmol) en CH₃CN (50 ml) bajo atmósfera de N₂, se añadieron 3-metoxi-5-(metilsulfonil)anilina [CAS 62606-02-4] (0.82 mg, 4.08 mmol), y diisopropiletilamina (703 µl, 4.08 mmol) y se agitó la mezcla de reacción a 60 °C durante 65 horas. Se enfrió la mezcla a temperatura ambiente y se vertió en el interior de H₂O en agitación (250 ml). Se extrajo el producto (2x) con Et₂O. Las fases orgánicas combinadas se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se evaporaron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en gel de sílice (40 g) utilizando un gradiente de heptano/EtOAc/EtOH de 100/0/0 a 40/45/15. Se combinaron las fracciones deseadas y se evaporó el disolvente a presión reducida en un evaporador rotatorio® hasta un volumen residual de 35 ml. Se cristalizó el producto en reposo. El precipitado se filtró, se lavó (3x) con EtOAc/heptano 1/1 y se secó a vacío a 45°C para proporcionar 2-(2-(2-

(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometil)indolin-1-il)etanona **4j** (870 mg).

5 **Síntesis del Compuesto 4 y separación quiral en los Enantiómeros 4A y 4B:**

Se añadió una disolución de 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometil)indolin-1-il)etanona **4j** (210 mg, 0.28 mmol) en THF (30 ml), a una mezcla en agitación de Pd/C (0.5 g) en EtOAc (10 ml).
 10 Se hidrógeno la mezcla durante 10 minutos a temperatura ambiente a presión atmosférica. Se retiró el catalizador por medio de filtración sobre dicalite® y se evaporaron los disolventes a presión reducida. Se combinó el residuo con otro lote (cantidad total: 1.0 g) y se purificó por medio de HPLC de fase inversa (fase
 15 estacionaria: Kromasil C18 100A 5 μ m (Eka Nobel), fase móvil: Gradiente de un 50 % de bicarbonato de amonio (0.25 % en agua), 50 % de acetonitrilo a un 20 % de bicarbonato de amonio (0.25 % en agua), 80 % de acetonitrilo) dando lugar a un Compuesto **4** (700 mg). Se separaron los enantiómeros del Compuesto **4** (700 mg) por medio de separación Quiral en Fase Normal (Fase estacionaria: Whelk-O1 (SS) 5
 20 μ m con técnica de ahorro de pico de reciclaje, fase móvil: 100 % de etanol). Se combinaron las fracciones que contenían el primer enantiómero eluido y se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en gel de sílice (4 g) utilizando un gradiente de heptano/EtOAc/EtOH de 100/0/0 a 40/45/15. Las
 25 fracciones deseadas se combinaron y se evaporaron, y se co-evaporaron con MeOH. Se trituró el residuo a 45 °C en H₂O (4 ml) y MeOH (1 ml), se filtró el precipitado, se lavó (3x) con H₂O/MeOH 4/1 y se secó a vacío a 45 °C para proporcionar el Enantiómero **4A** (197 mg). Se combinaron las fracciones que contenían el segundo enantiómero eluido y se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó mediante
 30 cromatografía instantánea en gel de sílice (4 g) utilizando un gradiente de heptano/EtOAc/EtOH de 100/0/0 a 40/45/15. Las fracciones deseadas se combinaron y se evaporaron, y se co-evaporaron con MeOH/agua. Se agitó al residuo en H₂O (4 ml) y MeOH (1 ml), se filtró el precipitado, se lavó (3x) con H₂O/MeOH 4/1, y se secó
 35 a vacío a 45 °C para proporcionar el Enantiómero **4B** (209 mg).

Enantiómero 4A:

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.10 (s, 3 H) 3.16 - 3.27 (m, 2 H) 3.68 - 3.85 (m, 5 H) 4.04 - 4.20 (m, 3 H) 4.44 (td, *J*=10.2, 6.6 Hz, 1 H) 4.94 (t, *J*=5.6 Hz, 1 H) 5.83 (d, *J*=8.4 Hz, 1 H) 6.56 (t, *J*=2.1 Hz, 1 H) 6.63 (t, *J*=1.8 Hz, 1 H) 6.91 (t, *J*=1.4 Hz, 1 H) 6.97 - 7.08 (m, 2 H) 7.17 (d, *J*=2.0 Hz, 1 H) 7.36 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 7.39 (dd, *J*=7.9, 0.9 Hz, 1 H) 7.43 - 7.49 (m, 1 H) 8.38 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-D): TR 1.17 min, MH⁺ 599

[α]_D²⁰: +59.8°(c 0.435, DMF)

5 SFC quiral (método SFC-I): TR 2.84 min, MH⁺ 599, pureza quiral 100%.

Enantiómero 4B:

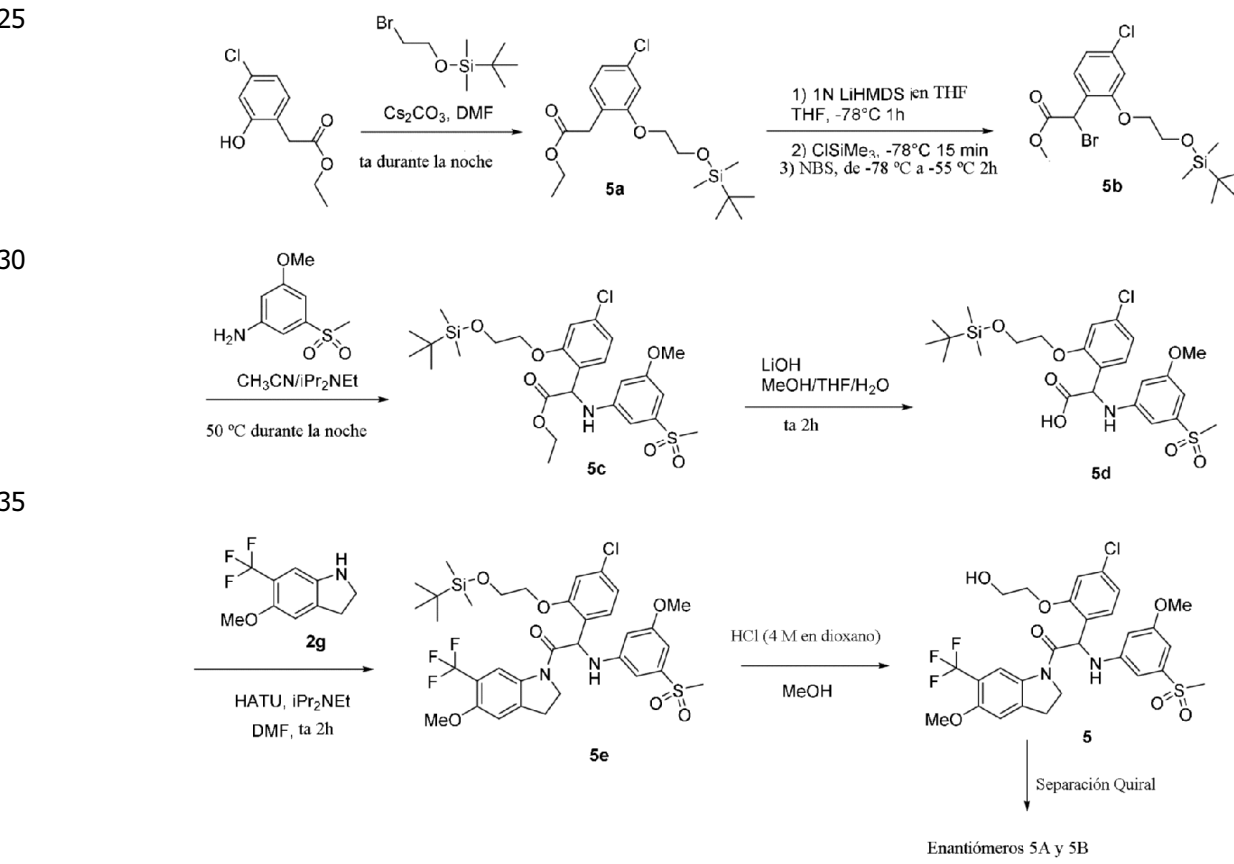
10 ¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.10 (s, 3 H) 3.16 - 3.26 (m, 2 H) 3.70 - 3.85 (m, 5 H) 4.02 - 4.19 (m, 3 H) 4.44 (td, *J*=10.2, 6.4 Hz, 1 H) 4.94 (t, *J*=5.6 Hz, 1 H) 5.83 (d, *J*=8.4 Hz, 1 H) 6.56 (t, *J*=2.0 Hz, 1 H) 6.63 (t, *J*=1.8 Hz, 1 H) 6.91 (t, *J*=1.7 Hz, 1 H) 6.99 - 7.07 (m, 2 H) 7.16 (d, *J*=2.0 Hz, 1 H) 7.36 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 7.37 - 7.41 (m, 1 H) 7.44 - 7.48 (m, 1 H) 8.38 (s, 1 H)

15 LC/MS (método LC-D): TR 1.17 min, MH⁺ 599

[α]_D²⁰: -56.4°(c 0.47, DMF)

20 SFC quiral (método SFC-I): TR 3.14 min, MH⁺ 599, pureza quiral 97.0%.

Ejemplo 5: síntesis de 2-(4-cloro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-1-(5-metoxi-6-(trifluorometil)indolin-1-il)etanona (Compuesto 5) y separación quiral en los Enantiómeros 5A y 5B.



Síntesis del intermediario 5a:

A una mezcla de 2-(4-cloro-2-hidroxifenil)acetato de etilo [CAS 1261826-30-5] (5.2 g, 24.2 mmol) y carbonato de cesio (15.8 g, 48.5 mmol) en DMF (90 ml) a 10 °C, se
 5 añadió (2-bromoetoxi)(*terc*-butil)dimetilsilano [CAS 86864-60-0] (6.26 ml, 29.1 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. Se agregó agua y la mezcla se extrajo con EtOAc. La fase orgánica se secó con MgSO₄,
 10 se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (15-40 µm, 80 g, heptano/EtOAc 80/20). Se combinaron las fracciones puras y se retiró el disolvente a presión reducida para proporcionar 2-(2-(2-((*terc*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-clorofenil)acetato de etilo **5a** (7.8 g).

Síntesis del intermediario 5b:

A una disolución enfriada (-78 °C) de bis(trimetilsilil)amida de litio 1 M en THF (41.8 ml, 41.8 mmol), se añadió una disolución de 2-(2-(2-((*terc*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-
 20 clorofenil)acetato de etilo **5a** (7.8 g, 20.9 mmol) en THF (45 ml). Tras 1 hora a -70 °C, se añadió clorotrimetilsilano (4.24 ml, 33.5 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a -70 °C durante 15 minutos. Se añadió *N*-bromosuccinimida (4.46 g, 25.1 mmol) en THF (45 ml) y se continuó la agitación a -55 °C durante 2 horas. Se vertió la mezcla de
 25 reacción en H₂O y se extrajo dos veces con EtOAc. Se combinaron las fases orgánicas, se secaron sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar 2-bromo-2-(2-(2-((*terc*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-clorofenil)acetato de etilo **5b** (10.1 g) que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Síntesis del intermediario 5c:

Se agitó una mezcla de 2-bromo-2-(2-(2-((*terc*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-clorofenil)acetato de etilo **5b** (4.75 g, 10.5 mmol), 3-metoxi-5-(metilsulfonil)anilina [CAS 62606-02-4] (3.17 g, 15.8 mmol) y diisopropiletilamina (3.62 ml, 21.0 mmol) en
 35 CH₃CN (90 ml) a 50 °C durante la noche. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida. Se introdujo el residuo en EtOAc y se lavó con HCl 0.5 N y agua. La fase orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. Se purificó el residuo por medio de cromatografía instantánea sobre gel de sílice (15-40 µm, 120 g, gradiente de heptano/EtOAc de 90/10 a 80/20) para proporcionar 2-(2-(2-((*terc*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)acetato de etilo **5c** (3.5 g).

Síntesis del intermedio 5d:

Se añadió por partes hidróxido de litio monohidratado (513 mg, 12.2 mmol) a una
 5 disolución de 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)acetato de etilo **5c** (3.5 g, 6.12 mmol) en THF/CH₃OH/H₂O (1/1/1) (75 ml) a 10 °C. Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 2 h, se diluyó con agua y se enfrió a 0 °C. Se acidificó la disolución lentamente con HCl 0.5 N hasta pH 6, y se extrajo con EtOAc. Se secó la fase orgánica sobre MgSO₄, se filtró y
 10 se concentró el disolvente a presión reducida para proporcionar ácido 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-fluorofenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)acético **5d** (2.85 g). Se usó el compuesto sin purificación adicional en la siguiente etapa.

Síntesis del intermedio 5e:

A una disolución de ácido 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)acético **5d** (1 g, 1.84 mmol) en DMF (10 ml), se añadieron HATU (1.05 g, 2.76 mmol), diisopropiletilamina (913 µl, 5.53 mmol) y 5-
 20 metoxi-6-(trifluorometil)indolina **2g** (412 mg, 1.90 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 h. Se diluyó la mezcla de reacción con agua. Se filtró el precipitado, se lavó con agua y se introdujo en EtOAc. Se lavó la fase orgánica con una disolución al 10 % de K₂CO₃ y agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró el disolvente a presión reducida para proporcionar 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-1-(5-
 25 metoxi-6-(trifluorometil)indolin-1-il)etanona **5e** (1.4 g). Se usó el compuesto sin purificación adicional en la siguiente etapa de reacción.

Síntesis del Compuesto 5 y separación quiral en los Enantiómeros 5A y 5B:

Bajo un flujo de N₂, a 5°C, se añadió gota a gota HCl 4M en dioxano (4.71 ml, 18.8 mmol) a una disolución de 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-1-(5-metoxi-6-(trifluorometil)indolin-1-il)etanona **5e**
 35 (1.4 g, 1.88 mmol) en MeOH (25 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 h. Se enfrió la mezcla a 0 °C, se basificó con una disolución acuosa al 10 % de K₂CO₃ y se extrajo con EtOAc. Se separó la fase orgánica, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en gel de sílice (15-40 µm, 40 g, CH₂Cl₂/heptano: 98.5/1.5). Se combinaron las fracciones puras y se concentró a presión reducida para proporcionar 2-(4-cloro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-1-(5-metoxi-6-(trifluorometil)indolin-1-il)etanona (Compuesto **5**, 1.0 g) en forma de racemato. Se cristalizó una muestra analítica del Compuesto **5** a partir de MeOH

(60 mg). Se usó la cantidad restante para separar los enantiómeros por medio de SFC Quiral de Preparación (Fase estacionaria: Chiralpak® IC 5 µm 250 x 30 mm, Fase móvil: 70 % de CO₂, 30 % de EtOH (+0.3 % de iPrNH₂)). El primer enantiómero eluido (400 mg) se solidificó en éter diisopropílico para dar el Enantiómero **5A** (351 mg). El segundo enantiómero eluido (430 mg) se solidificó en éter diisopropílico para dar el Enantiómero **5B** (336 mg).

Compuesto 5:

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.10 (s, 3 H) 3.13 – 3.27 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H) 3.73 - 3.78 (m, 1 H) 3.78 - 3.84 (m, 1 H) 3.84 (s, 3 H) 3.98 - 4.22 (m, 3 H) 4.41 (dt, *J*=6.1, 10.1 Hz, 1 H) 4.95 (t, *J*=5.6 Hz, 1 H) 5.80 (d, *J*=8.08 Hz, 1 H) 6.55 (s, 1 H) 6.61 (s, 1 H) 6.90 (s, 1 H) 6.96 - 7.05 (m, 2 H) 7.16 (d, *J*=1.52 Hz, 1 H) 7.24 (s, 1 H) 7.35 (d, *J*=8.08 Hz, 1 H) 8.34 (s, 1 H)

LC-MS (método LC-A): TR 3.15 min, MH⁺ 629

Punto de fusión: 220°C

Enantiómero 5A:

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.10 (s, 3 H) 3.13 – 3.27 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H) 3.73 - 3.78 (m, 1 H) 3.78 - 3.84 (m, 1 H) 3.84 (s, 3 H) 3.98 - 4.22 (m, 3 H) 4.41 (dt, *J*=6.1, 10.1 Hz, 1 H) 4.95 (t, *J*=5.6 Hz, 1 H) 5.80 (d, *J*=8.08 Hz, 1 H) 6.55 (s, 1 H) 6.61 (s, 1 H) 6.90 (s, 1 H) 6.96 - 7.05 (m, 2 H) 7.16 (d, *J*=1.52 Hz, 1 H) 7.24 (s, 1 H) 7.35 (d, *J*=8.08 Hz, 1 H) 8.34 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 3.13 min, MH⁺ 629

[α]_D²⁰: -60.4° (c 0.28, DMF)

SFC quiral (método SFC-D): TR 1.02 min, MH⁺ 629, pureza quiral 100%.

Enantiómero 5B:

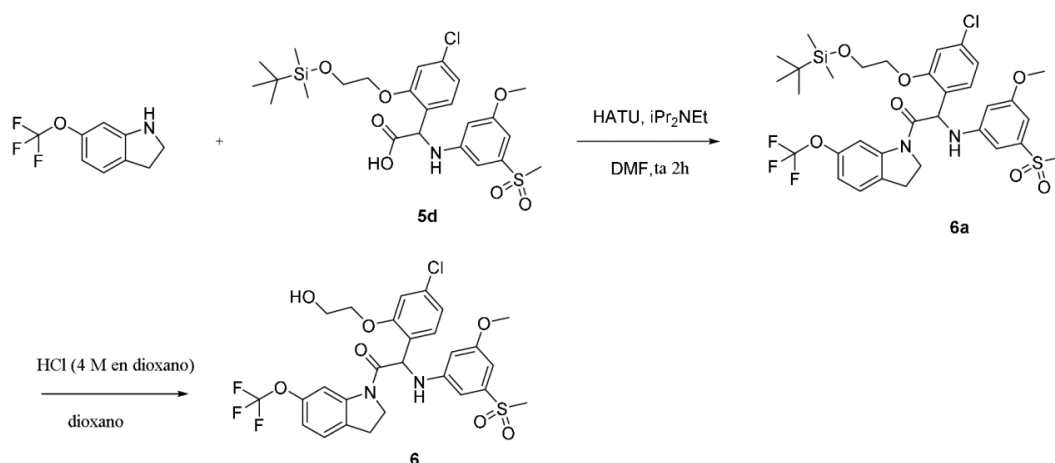
¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.10 (s, 3 H) 3.13 – 3.27 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H) 3.73 - 3.78 (m, 1 H) 3.78 - 3.84 (m, 1 H) 3.84 (s, 3 H) 3.98 - 4.22 (m, 3 H) 4.41 (dt, *J*=6.1, 10.1 Hz, 1 H) 4.95 (t, *J*=5.6 Hz, 1 H) 5.80 (d, *J*=8.08 Hz, 1 H) 6.55 (s, 1 H) 6.61 (s, 1 H) 6.90 (s, 1 H) 6.96 - 7.05 (m, 2 H) 7.16 (d, *J*=1.52 Hz, 1 H) 7.24 (s, 1 H) 7.35 (d, *J*=8.08 Hz, 1 H) 8.34 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 3.15 min, MH⁺ 629

$[\alpha]_D^{20}$: +56.7° (c 0.3, DMF)

SFC quiral (método SFC-D): TR 1.22 min, MH^+ 629, pureza quiral 99.7%.

Ejemplo 6 (método 1): síntesis de 2-(4-cloro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etanona (Compuesto 6)



Síntesis del intermedio 6a:

A una disolución de ácido 2-(2-(2-((*tert*-butyldimethylsilyl)ethoxy)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)acético **5d** (1.07 g, 1.97 mmol) en DMF (10 ml), se añadieron HATU (1.12 g, 2.95 mmol), diisopropiletilamina (976 μ l, 5.91 mmol) y 6-(trifluorometoxi)indolina [CAS 959235-95-1] (400 mg, 1.97 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 2 h. Se diluyó la mezcla de reacción con agua. Se filtró el precipitado, se lavó con agua y se introdujo en EtOAc. Se lavó la fase orgánica con una disolución al 10 % de K_2CO_3 , agua, se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se concentró el disolvente a presión reducida para proporcionar 2-(2-(2-((*tert*-butyldimethylsilyl)ethoxy)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etanona **6a** (1.36 g). Se usó el compuesto bruto sin purificación en la siguiente etapa de reacción.

Síntesis del Compuesto 6:

Bajo un flujo de N_2 , a 5°C, se añadió gota a gota HCl 4M en dioxano (4.66 ml, 18.6 mmol) a una disolución de 2-(2-(2-((*tert*-butyldimethylsilyl)ethoxy)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etanona **6a** (1.36 g, 1.87 mmol) en MeOH (25 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 1 h. Se enfrió la mezcla a 0 °C, se basificó con una disolución acuosa al 10 % de K_2CO_3 y se extrajo con EtOAc. Se separó la fase orgánica, se secó sobre $MgSO_4$, se filtró y se concentró el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en gel de sílice (15-40 μ m, 40 g, CH_2Cl_2 /heptano: 99.5/0.5).

Se combinaron las fracciones puras y se retiró el disolvente a presión reducida para proporcionar 2-(4-cloro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etanona (Compuesto **6**, 540 g) en forma de racemato. Se obtuvo una muestra analítica del Compuesto **6** por medio de cristalización a partir de MeOH (34 mg).

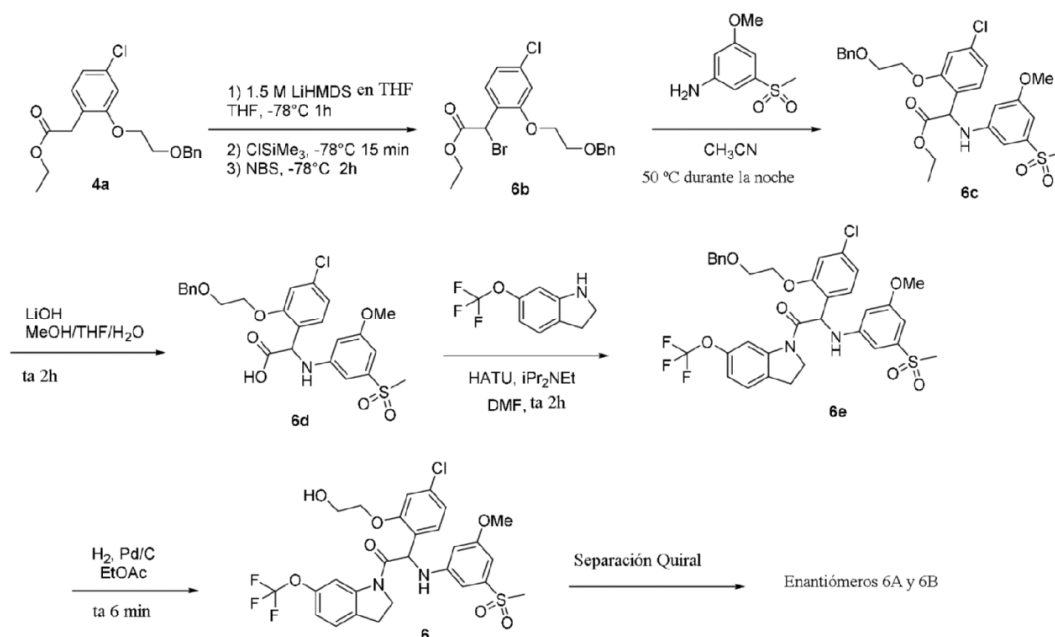
Compuesto 6:

^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 3.07 - 3.23 (m, 5 H) 3.70 - 3.83 (m, 5 H) 4.06 - 4.19 (m, 3 H) 4.42 (td, $J=10.23, 6.32$ Hz, 1 H) 4.92 (t, $J=5.31$ Hz, 1 H) 5.81 (d, $J=8.59$ Hz, 1 H) 6.56 (s, 1 H) 6.61 (s, 1 H) 6.90 (s, 1 H) 6.99 - 7.05 (m, 3 H) 7.16 (d, $J=2.02$ Hz, 1 H) 7.30 - 7.40 (m, 2 H) 8.03 (s, 1 H)

LC-MS (método LC-A): TR 3.28 min, MH^+ 615

Punto de fusión: 191°C

Ejemplo 6 (método 2): síntesis de 2-(4-cloro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etanona (Compuesto **6**) y separación quiral en los Enantiómeros **6A** y **6B**.



Síntesis del intermedio 6b:

A una disolución enfriada (-70 °C) de bis(trimetilsilil)amida de litio 1.5 M en THF (23 ml, 34.4 mmol) bajo flujo de N_2 , se añadió una disolución de 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)acetato de etilo **4a** (6 g, 17.2 mmol) en THF (35 ml). Tras 1 hora a -70 °C, se añadió clorotrimetilsilano (3.5 ml, 27.5 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a -70

°C durante 15 minutos. Se añadió *N*-bromosuccinimida (3.7 g, 20.6 mmol) en THF (35 ml) y se continuó la agitación a -70 °C durante 2 horas. Se vertió la mezcla de reacción en H₂O y se extrajo dos veces con EtOAc. Se combinaron las fases orgánicas, se
 5 secaron sobre MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida para proporcionar 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-bromoacetato de etilo **6b** (8.2 g) que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Síntesis del intermediario 6c:

Se agitó una mezcla de 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-bromoacetato **6b** (7.36 g, 17.2 mmol), 3-metoxi-5-(metilsulfonil)anilina [CAS 62606-02-4] (5.2 g, 25.8 mmol) y diisopropiletilamina (5.9 ml, 25.8 mmol) en CH₃CN (150 ml) a 50°C durante la noche.
 15 Se concentró el disolvente a presión reducida. El residuo se diluyó con EtOAc, se lavó con HCl 0.5 N y agua. La capa orgánica se secó con MgSO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en gel de sílice (15-40 µm, 220 g, CH₂Cl₂/heptano: 99/1). Se combinaron las fracciones puras y se retiró el disolvente a presión reducida para proporcionar 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-
 20 4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)acetato de etilo **6c** (5.52 g).

Síntesis del intermediario 6d:

A 10 °C, se añadió hidróxido de litio monohidratado (845 mg, 20.1 mmol) a una
 25 disolución de 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)acetato de etilo **6c** (5.52 g, 10.1 mmol) en MeOH/THF/agua (1/1/1) (90 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 2 h. Se diluyó la mezcla con agua con hielo y se enfrió a 0 °C. Se acidificó la mezcla resultante hasta pH 6-7 con HCl 0.5
 30 N y se extrajo con EtOAc. Se combinaron las fases orgánicas, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró el disolvente a presión reducida para proporcionar ácido 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)acético **6d** (5.26 g). El compuesto se usó en la siguiente etapa de reacción sin purificación
 35 adicional.

Síntesis del intermediario 6e:

Se agitó una mezcla de 6-(trifluorometoxi)indolina [CAS 959235-95-1] (1.85 mg, 9.12 mmol), ácido 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)acético **6c** (5.69 g, 10.9 mmol), HATU (5.2 g, 13.7 mmol) y diisopropiletilamina (4.52 ml, 27.4 mmol) en DMF (40 ml), a temperatura ambiente durante 2 horas. Se diluyó la mezcla con agua. El precipitado se separó por filtración y se lavó con agua. Se introdujo el precipitado en EtOAc, se lavó con una disolución de K₂CO₃ al 10% en

agua, agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se evaporó el disolvente a presión reducida. La purificación se llevó a cabo mediante cromatografía flash en gel de sílice (15-40 µm, 220 g, heptano/EtOAc 70/30). Las fracciones puras se combinaron y se concentró a sequedad para proporcionar 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometoxi)-indolin-1-il)etanona **6e** (5.6 g).

Síntesis del Compuesto 6 y separación quiral en los Enantiómeros 6A y 6B:

Se hidrogenó una mezcla de 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etanona **6e** (5.6 g, 7.94 mmol) en EtOAc (100 ml) se hidrogenó a presión atmosférica de H₂ en presencia de Pd/C al (10 %) (1.7 mg, 1.59 mmol) como catalizador durante 6 minutos (hasta el fin del consumo de H₂). La reacción se diluyó con EtOAc y se filtró a través de un lecho de celite®. El filtrado se concentró a presión reducida para proporcionar 2-(4-cloro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometoxi)-indolin-1-il)etanona (Compuesto **6**) en forma de racemato (4.6 g, compuesto bruto). Los enantiómeros del Compuesto **6** se separaron mediante SFC quiral (Fase estacionaria: Chiralcel® OJ-H 5 µm 250 x 20 mm, fase móvil: 80 % de CO₂, 20 % de MeOH (+0.3 % de iPrNH₂)). El primer enantiómero eluido (1.96 g) se purificó posteriormente mediante SFC quiral (fase estacionaria: Chiralpak® IA 5 µm 250 x 20 mm, Fase móvil: 74 % de CO₂, 26 % de iPrOH (+0.3 % de iPrNH₂)), para proporcionar tras la precipitación a partir de heptano/éter diisopropílico, Enantiómero **6A** (1.527 g). El segundo enantiómero eluido (2.10 mg) se solidificó en heptano/éter diisopropílico para dar el Enantiómero **6B** (1.708 mg).

Enantiómero 6A:

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.08 - 3.18 (m, 5 H) 3.70 - 3.83 (m, 5 H) 4.05 - 4.19 (m, 3 H) 4.43 (td, *J*=10.32, 6.46 Hz, 1 H) 4.97 (t, *J*=5.52 Hz, 1 H) 5.82 (d, *J*=8.20 Hz, 1 H) 6.56 (s, 1 H) 6.62 (s, 1 H) 6.91 (s, 1 H) 7.00 - 7.08 (m, 3 H) 7.16 (d, *J*=1.58 Hz, 1 H) 7.34 (d, *J*=8.20 Hz, 2 H) 8.04 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 3.32 min, MH⁺ 615

[α]_D²⁰: +64.3°(c 0.305, DMF)

SFC quiral (método SFC-E): TR 2.82 min, MH⁺ 615, pureza quiral 100%.

Enantiómero 6B:

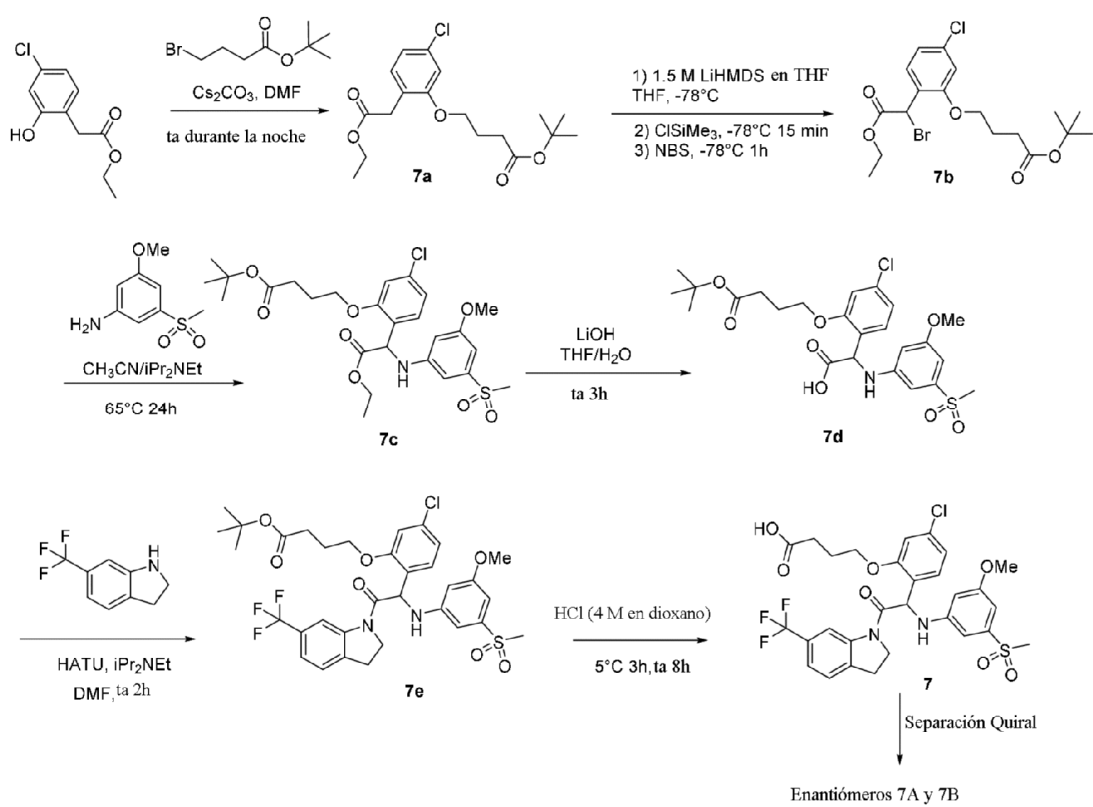
¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.08 - 3.18 (m, 5 H) 3.70 - 3.83 (m, 5 H) 4.05 - 4.19 (m, 3 H) 4.43 (td, *J*=10.32, 6.46 Hz, 1 H) 4.97 (t, *J*=5.52 Hz, 1 H) 5.82 (d, *J*=8.20 Hz, 1 H) 6.56 (s, 1 H) 6.62 (s, 1 H) 6.91 (s, 1 H) 7.00 - 7.08 (m, 3 H) 7.16 (d, *J*=1.58 Hz, 1 H) 7.34 (d, *J*=8.20 Hz, 2 H) 8.04 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 3.31 min, MH⁺ 615

[α]_D²⁰: -53.7° (c 0.3, DMF)

SFC quiral (método SFC-E): TR 3.34 min, MH⁺ 615, pureza quiral 95.7%.

Ejemplo 7: síntesis de ácido 4-(5-cloro-2-(1-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)-amino)-2-oxo-2-(6-(trifluorometil)indolin-1-il)etil)fenoxi)butanoico (Compuesto **7**) y separación quiral en los Enantiómeros **7A** y **7B**.



Síntesis del intermedio 7a:

A una suspensión de 2-(4-cloro-2-hidroxifenil)acetato de etilo [CAS 1261826-30-5] (8.5 g, 39.6 mmol) y Cs₂CO₃ (25.8 g, 79.2 mmol) en DMF (130 ml) a 10°C, se añá dí gota a gota 4-bromobutanoato de *terc*-butilo [CAS 110611-91-1] (7 ml, 39.6 mmol). La mezcla se agitó a la temperatura ambiente durante toda la noche. Se diluyó la mezcla con EtOAc y agua. Las fases se separaron. Se lavó la fase orgánica con agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró el disolvente a presión reducida. La

purificación se llevó a cabo mediante cromatografía flash en gel de sílice (15-40 μm , 120 g, heptano/EtOAc 90/10). Se combinaron las fracciones puras y se concentró a sequedad para proporcionar 4-(5-cloro-2-(2-etoxi-2-oxoetil)fenoxi)butanoato de *terc*-butilo **7a** (12.7 g).

Síntesis del intermedio 7b:

Se introdujo LiHMDS 1.5 M en THF (23.5 ml, 35.3 mmol) en un matraz, bajo flujo de N_2 y se enfrió a -78°C . Se añadió gota a gota una disolución de 4-(5-cloro-2-(2-etoxi-2-oxoetil)fenoxi)butanoato de *terc*-butilo **7a** (6.3 g, 17.6 mmol) en THF (60 ml) y se agitó la mezcla a -78°C durante 15 minutos. Se añadió clorotrimetilsilano (3.6 ml, 28.3 mmol). Transcurridos 15 minutos a -78°C , se añadió *N*-bromosuccinimida (3.77 g, 21.2 mmol) en THF (40 ml) y se agitó la mezcla a -70°C durante 1 hora. Se inactivó la reacción con agua y se extrajo con EtOAc. Se lavó la fase orgánica con agua, se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró el disolvente a presión reducida para proporcionar 4-(2-(1-bromo-2-etoxi-2-oxoetil)-5-clorofenoxi)butanoato de *terc*-butilo **7b** (7.6 g). El compuesto se usó en la siguiente etapa de reacción sin purificación adicional.

Síntesis del intermedio 7c:

A una disolución de 4-(2-(1-bromo-2-etoxi-2-oxoetil)-5-clorofenoxi)butanoato de *terc*-butilo **7b** (7.6 g, 17.4 mmol) en CH_3CN (140 ml) a temperatura ambiente, se añadió diisopropiletilamina (4.8 ml, 27.9 mmol) y posteriormente 3-metoxi-5-(metilsulfonil)anilina [CAS 62606-02-4] (4.2 g, 20.9 mmol). Se agitó la mezcla a 65°C durante 24 horas. Se diluyó la mezcla con EtOAc, se lavó con HCl 0.5 N (dos veces) y agua. Se secó la fase orgánica sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró el disolvente a presión reducida. La purificación se llevó a cabo mediante cromatografía flash en gel de sílice (15-40 μm , 120 g, heptano/EtOAc de 85/15 a 70/30). Se combinaron las fracciones puras y se concentró a sequedad para proporcionar 4-(5-cloro-2-(2-etoxi-1-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-2-oxoetil)fenoxi)butanoato de *terc*-butilo **7c** (7.3 g).

Síntesis del intermedio 7d:

Se agitó una mezcla de 4-(5-cloro-2-(2-etoxi-1-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-2-oxoetil)fenoxi)butanoato de *terc*-butilo **7c** (7.3 g, 13.1 mmol) e hidróxido de litio monohidratado (1.65 g, 39.4 mmol) en THF/agua (1/1) (180 ml), a temperatura ambiente durante 3 horas. Se diluyó la mezcla con agua. Se acidificó lentamente la fase acuosa con HCl 3 N y se extrajo con EtOAc. Se secaron las fases orgánicas

combinadas sobre MgSO₄, se filtró y se concentró el disolvente a presión reducida para proporcionar ácido 2-(2-(4-((*terc*-butoxi)-4-oxobutoxi)-4-clorofenil)-2-(3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)acético **7d** (6.9 g). El producto se utilizó en el siguiente paso sin purificación adicional.

Síntesis del intermedio 7e:

Se agitó una mezcla de 6-(trifluorometil)indolina [CAS 181513-29-1] (390 mg, 2.08 mmol), ácido 2-(2-(4-((*terc*-butoxi)-4-oxobutoxi)-4-clorofenil)-2-(3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)acético **7d** (1.1 g, 2.08 mmol), HATU (1.2 g, 3.12 mmol) y diisopropiletilamina (1 ml, 6.25 mmol) en DMF (40 ml), a temperatura ambiente durante 2 horas. Se diluyó la mezcla con agua. El precipitado se separó por filtración y se lavó con agua. Se introdujo el precipitado en EtOAc, se lavó con una disolución de K₂CO₃ al 10%, agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró el disolvente a presión reducida. Se purificó el residuo por medio de cromatografía instantánea sobre gel de sílice (15-40 µm, 80 g, CH₂Cl₂/MeOH/ 99.5/0.5) para proporcionar, tras cristalización a partir de CH₃CN, 4-(5-cloro-2-(1-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-2-oxo-2-(6-(trifluorometil)indolin-1-il)etil)fenoxi)butanoato de *terc*-butilo **7e** (700 mg).

Síntesis del Compuesto 7 y separación quiral en los Enantiómeros 7A y 7B:

Se agitó una disolución de 4-(5-cloro-2-(1-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-2-oxo-2-(6-(trifluorometil)indolin-1-il)etil)fenoxi)butanoato de *terc*-butilo **7e** (0.6 mg, 0.143 mmol) en HCl 4 M en dioxano (6 ml) a 5 °C durante 3 horas y a temperatura ambiente durante 8 horas. Se retiró el disolvente a presión reducida y se cristalizó el producto a partir de éter diisopropílico para dar lugar a ácido 4-(5-cloro-2-(1-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-2-oxo-2-(6-(trifluorometil)indolin-1-il)etil)fenoxi)butanoico (Compuesto **7**, 530 mg) en forma de racemato. Los Enantiómeros se separaron mediante SFC quiral preparativa (Fase estacionaria: Chiralpak® IC 5 µm 250 x 30 mm, Fase móvil: 65 % de CO₂, 35 % de MeOH). El primer enantiómero eluido (264 mg) se cristalizó a partir de CH₃CN/éter diisopropílico para dar el Enantiómero **7A** (207 mg). El segundo enantiómero eluido (269 mg) se cristalizó a partir de CH₃CN/éter diisopropílico para dar el Enantiómero **7B** (212 mg).

Compuesto 7:

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.90 - 2.09 (m, 2 H) 2.31 - 2.43 (m, 2 H) 3.12 (s, 3 H) 3.17 - 3.28 (m, 2 H) 3.74 (s, 3 H) 3.88 - 4.07 (m, 1 H) 4.07 - 4.15 (m, 2 H) 4.35 - 4.45 (m, 1 H) 5.73 (d a, *J*=7.88 Hz, 1 H) 6.55 (s a, 1 H) 6.64 (s a, 1 H) 6.90 (s a, 1 H)

7.04 (s a, 2 H) 7.16 (s a, 1 H) 7.31 (d a, $J=7.88$ Hz, 1 H) 7.39 (d a, $J=7.25$ Hz, 1 H)
7.46 (d a, $J=7.25$ Hz, 1 H) 8.39 (s a, 1 H) 12.12 (s a, 1 H)

5 LC-MS (método LC-A): TR 2.73 min, MH^+ 641

Punto de fusión: 210°C

Enantiómero 7A:

10 ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.99 (dq, $J=13.26$, 6.86 Hz, 2 H) 2.30 - 2.46 (m, 2 H) 3.10 (s, 3 H) 3.15 - 3.37 (m, 2 H) 3.74 (s, 3 H) 3.95 - 4.06 (m, 1 H) 4.07 - 4.17 (m, 2 H) 4.34 - 4.43 (m, 1 H) 5.72 (d, $J=8.08$ Hz, 1 H) 6.54 (s, 1 H) 6.63 (s, 1 H) 6.89 (s, 1 H) 6.99 - 7.05 (m, 2 H) 7.14 (d, $J=1.52$ Hz, 1 H) 7.31 (d, $J=8.08$ Hz, 1 H) 7.38 (d, 15 $J=7.58$ Hz, 1 H) 7.45 (d, $J=8.08$ Hz, 1 H) 8.38 (s, 1 H) 12.09 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 2.73 min, MH^+ 641

$[\alpha]_D^{20}$: -49.8° (c 0.225, DMF)

20 SFC quiral (método SFC-F): TR 3.13 min, no MS response, pureza quiral 100%.

Punto de fusión: 182°C

Enantiómero 7B:

25 ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.99 (dq, $J=13.26$, 6.86 Hz, 2 H) 2.30 - 2.46 (m, 2 H) 3.10 (s, 3 H) 3.15 - 3.37 (m, 2 H) 3.74 (s, 3 H) 3.95 - 4.06 (m, 1 H) 4.07 - 4.17 (m, 2 H) 4.34 - 4.43 (m, 1 H) 5.72 (d, $J=8.08$ Hz, 1 H) 6.54 (s, 1 H) 6.63 (s, 1 H) 6.89 (s, 1 H) 6.99 - 7.05 (m, 2 H) 7.14 (d, $J=1.52$ Hz, 1 H) 7.31 (d, $J=8.08$ Hz, 1 H) 7.38 (d, 30 $J=7.58$ Hz, 1 H) 7.45 (d, $J=8.08$ Hz, 1 H) 8.38 (s, 1 H) 12.09 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 2.73 min, MH^+ 641

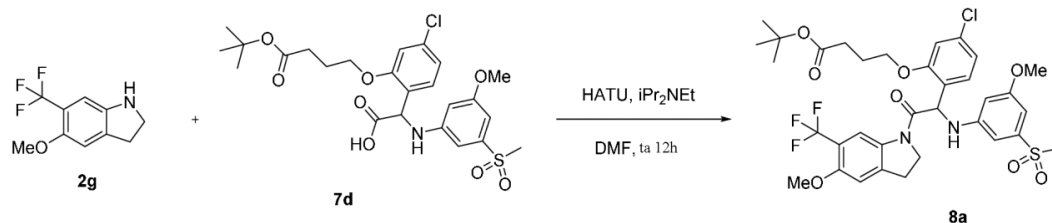
$[\alpha]_D^{20}$: +49.3° (c 0.2333, DMF)

35 SFC quiral (método SFC-F): TR 4.34 min, Sin respuesta MS, pureza quiral 100%.

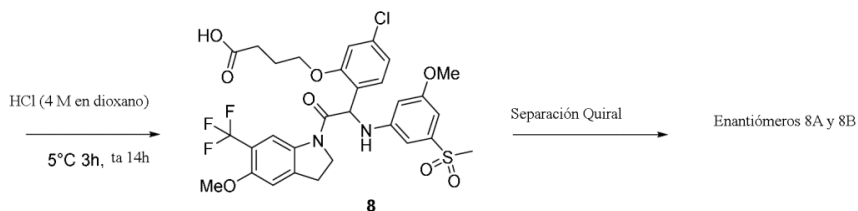
Punto de fusión: 180°C

Ejemplo 8: síntesis de ácido 4-(5-cloro-2-(1-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)-amino)-2-(5-metoxi-6-(trifluorometil)indolin-1-il)-2-oxoetil)fenoxi)-butanoico (Compuesto **8**) y separación quiral en los Enantiómeros **8A** y **8B**.

5



10



Síntesis del intermedio 8a:

15

Se agitó una mezcla de 5-metoxi-6-(trifluorometil)indolina **2g** (617 mg, 2.84 mmol), ácido 2-(2-(4-(*terc*-butoxi)-4-oxobutoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)acético **7d** (1.5 g, 2.84 mmol), HATU (1.62 g, 4.26 mmol) y diisopropiletilamina (1.4 ml, 8.5 mmol) en DMF (60 ml), a temperatura ambiente durante 12 horas. Se diluyó la mezcla con agua. El precipitado se separó por filtración y se lavó con agua. Se introdujo el precipitado en EtOAc, se lavó con una disolución de K₂CO₃ al 10%, agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró el disolvente a presión reducida. Se purificó el residuo por medio de cromatografía instantánea sobre gel de sílice (15-40 µm, 120 g, heptano/EtOAc 60/40) para proporcionar, tras cristalización a partir de éter de petróleo/éter diisopropílico, 4-(5-cloro-2-(1-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-2-(5-metoxi-6-(trifluorometil)indolin-1-il)-2-oxoetil)fenoxi)butanoato de *terc*-butilo **8a** (1.36 mg).

25

Síntesis del Compuesto 8 y separación quiral en los Enantiómeros 8A y 8B:

30

Se agitó una disolución de 4-(5-cloro-2-(1-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-2-(5-metoxi-6-(trifluorometil)indolin-1-il)-2-oxoetil)fenoxi)butanoato de *terc*-butilo **8a** (1.36 mg, 1.87 mmol) en HCl 4 M en dioxano (12 ml) a 5 °C durante 3 horas y a temperatura ambiente durante 14 horas. Se filtró el precipitado y se lavó con dioxano/éter diisopropílico para dar lugar a ácido 4-(5-cloro-2-(1-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-2-(5-metoxi-6-(trifluorometil)indolin-1-il)-2-oxoetil)fenoxi)butanoico (Compuesto **8**, 1.2 mg) en forma de racemato (contaminado con el 2.2 % de intermedio **8a**). Se purificó de forma adicional una pequeña parte (40 mg) por medio de SFC aquiral (Fase estacionaria: 2-etilpiridina 6 µm 150 x 21.2 mm, fase móvil: 60 % de CO₂, 40 % de iPrOH) para dar lugar, tras cristalización a partir de CH₃CN/éter diisopropílico, 28 mg del compuesto **8**. Se usó la cantidad restante del Compuesto **8** para separar los enantiómeros por medio de SFC Quiral de Preparación (Fase estacionaria: Chiralpak® IC 5 µm 250 x 30 mm, Fase móvil: 60 % de CO₂, 40 % de

35

MeOH). El primer enantiómero eluido (340 mg) se solidificó en éter de petróleo/éter diisopropílico para dar el Enantiómero **8A** (285 mg). El segundo enantiómero eluido (334 mg) se solidificó en éter de petróleo/éter diisopropílico para dar el Enantiómero **8B** (210 mg).

Compuesto 8:

^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.95 - 2.08 (m, 2 H) 2.32 - 2.44 (m, 2 H) 3.08 - 3.27 (m, 5 H) 3.73 (s, 3 H) 3.84 (s, 3 H) 3.92 - 4.00 (m, 1 H) 4.12 (d a, $J=3.54$ Hz, 2 H) 4.32 - 4.40 (m, 1 H) 5.69 (d a, $J=8.08$ Hz, 1 H) 6.54 (s a, 1 H) 6.62 (s, 1 H) 6.87 (s, 1 H) 6.98 - 7.04 (m, 2 H) 7.14 (s, 1 H) 7.22 (s, 1 H) 7.31 (d, $J=8.08$ Hz, 1 H) 8.34 (s, 1 H) 12.07 (s a, 1 H)

LC-MS (método LC-A): TR 2.74 min, MH^+ 671

Punto de fusión: 232°C

Enantiómero 8A:

^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.95 - 2.07 (m, 2 H) 2.35 - 2.47 (m, 2 H) 3.11 (s, 3 H) 3.15 - 3.31 (m, 2 H) 3.74 (s, 3H) 3.85 (s, 3 H) 3.91 - 4.02 (m, 1 H) 4.06 - 4.19 (m, 2 H) 4.37 (td, $J=10.25$, 6.31 Hz, 1 H) 5.70 (d, $J=8.20$ Hz, 1 H) 6.54 (s, 1 H) 6.63 (s, 1 H) 6.88 (s, 1 H) 7.02 (d, $J=8.20$ Hz, 2 H) 7.12 - 7.17 (m, 1 H) 7.23 (s, 1 H) 7.31 (d, $J=8.20$ Hz, 1 H) 8.34 (s, 1 H) 12.13 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 2.75 min, MH^+ 671

$[\alpha]_D^{20}$: -52.9° (c 0.28, DMF)

SFC quiral (método SFC-G): TR 2.50 min, MH^+ 671, pureza quiral 100%.

Enantiómero 8B:

^1H RMN (500 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 1.95 - 2.07 (m, 2 H) 2.35 - 2.47 (m, 2 H) 3.11 (s, 3 H) 3.15 - 3.31 (m, 2 H) 3.74 (s, 3H) 3.85 (s, 3 H) 3.91 - 4.02 (m, 1 H) 4.06 - 4.19 (m, 2 H) 4.37 (td, $J=10.25$, 6.31 Hz, 1 H) 5.70 (d, $J=8.20$ Hz, 1 H) 6.54 (s, 1 H) 6.63 (s, 1 H) 6.88 (s, 1 H) 7.02 (d, $J=8.20$ Hz, 2 H) 7.12 - 7.17 (m, 1 H) 7.23 (s, 1 H) 7.31 (d, $J=8.20$ Hz, 1 H) 8.34 (s, 1 H) 11.44 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 2.73 min, MH^+ 671

$[\alpha]_D^{20}$: +46.4° (c 0.28, DMF)

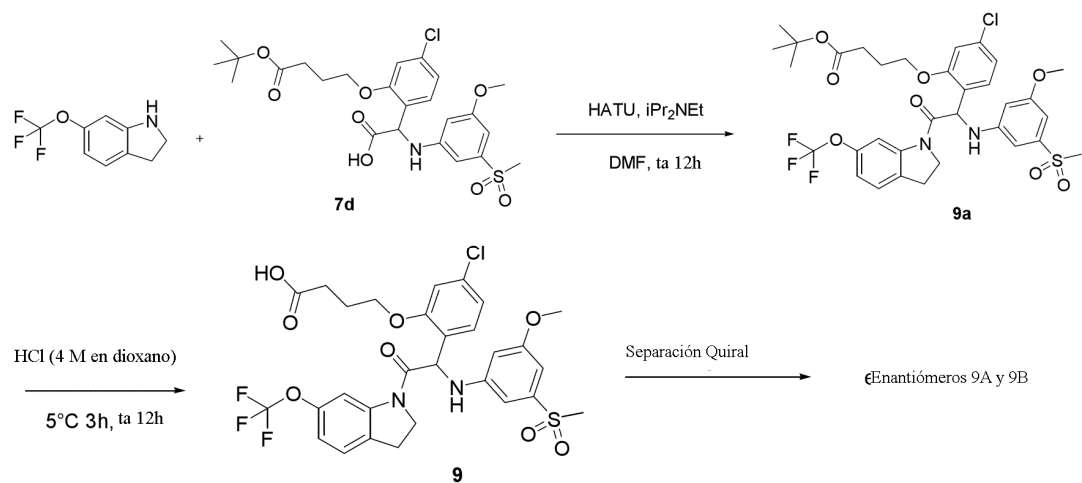
SFC quiral (método SFC-G): TR 3.31 min, MH^+ 671, pureza quiral 100%.

Ejemplo 9: síntesis de ácido 4-(5-cloro-2-(1-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)-amino)-2-oxo-2-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etil)fenoxi)butanoico (Compuesto **9**) y separación quiral en los Enantiómeros **9A** y **9B**.

5

10

15



Síntesis del intermedio 9a:

20

25

30

35

Se agitó una mezcla de 6-(trifluorometoxi)indolina [CAS 959235-95-1] (577 mg, 2.84 mmol), ácido 2-(2-(4-(*tert*-butoxi)-4-oxobutoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)acético **7d** (1.5 g, 2.84 mmol), HATU (1.62 g, 4.26 mmol) y diisopropiletilamina (1.4 ml, 8.5 mmol) en DMF (60 ml), a temperatura ambiente durante 12 horas. Se diluyó la mezcla con agua. El precipitado se separó por filtración y se lavó con agua. Se introdujo el precipitado en EtOAc, se lavó con una disolución de K₂CO₃ al 10%, agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró el disolvente a presión reducida. Se purificó el residuo por medio de cromatografía instantánea sobre gel de sílice (15-40 µm, 120 g, heptano/EtOAc 60/40) para proporcionar, tras cristalización a partir de éter de petróleo/éter diisopropílico, 4-(5-cloro-2-(1-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-2-oxo-2-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)-etil)fenoxi)butanoato de *tert*-butilo **9a** (1.02 mg).

Síntesis del Compuesto 9 y separación quiral en los Enantiómeros 9A y 9B:

Se agitó una disolución de 4-(5-cloro-2-(1-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-2-oxo-2-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)-etil)fenoxi)butanoato de *tert*-butilo **9a** (1.02 mg, 1.43 mmol) en HCl 4 M en dioxano (10 ml) a 5 °C durante 3 horas y a temperatura ambiente durante 12 horas. Se filtró el precipitado y se lavó con dioxano/éter diisopropílico para dar lugar a ácido 4-(5-cloro-2-(1-((3-metoxi-5-(metilsulfonil)fenil)amino)-2-oxo-2-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)-etil)fenoxi)butanoico (Compuesto **9**, 930 mg, 0.78 equivalentes. HCl, 0.08 equivalente. H₂O, 0.162

equivalentes, dioxano (determinado por medio de valoración) en forma de racemato. Los Enantiómeros se separaron mediante SFC quiral preparativa (Fase estacionaria: Chiralpak® IC 5 µm 250 x 30 mm, Fase móvil: 70 % de CO₂, 30% de EtOH/iPrOH (50/50)). Se agitó el primer enantiómero eluido en una mezcla de HCl 1 N y EtOAc. Se separó la fase orgánica, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró el disolvente a presión reducida. El compuesto se cristalizó a partir de CH₃CN/éter diisopropílico para dar el Enantiómero **9A** (145 mg). Se agitó el segundo enantiómero eluido en una mezcla de HCl 1 N y EtOAc. Se separó la fase orgánica, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró el disolvente a presión reducida. El compuesto se cristalizó a partir de CH₃CN/éter diisopropílico para dar el Enantiómero **9B** (156 mg).

Compuesto 9:

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.99 (dq, *J*=13.71, 7.05 Hz, 2 H) 2.32 - 2.46 (m, 2 H) 3.08 - 3.20 (m, 5 H) 3.74 (s, 3 H) 4.00 (td, *J*=10.23, 7.33 Hz, 1 H) 4.07 - 4.15 (m, 2 H) 4.38 (td, *J*=10.23, 6.82 Hz, 1 H) 5.70 (s, 1 H) 6.54 (s, 1 H) 6.63 (s, 1 H) 6.88 (s, 1 H) 6.95 - 7.09 (m, 2 H) 7.14 (d, *J*=1.52 Hz, 1 H) 7.30 (d a, *J*=8.08 Hz, 1 H) 7.33 (d a, *J*=8.59 Hz, 1 H) 8.03 (s, 1 H)

LC-MS (método LC-A): TR 2.87 min, MH⁺ 657

Punto de fusión: 173°C

Enantiómero 9A:

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.91 - 2.06 (m, 2 H) 2.32 - 2.44 (m, 2 H) 3.09 - 3.23 (m, 5 H) 3.74 (s, 3 H) 3.98 - 4.16 (m, 3 H) 4.39 (td, *J*=10.17, 6.78 Hz, 1 H) 5.71 (d, *J*=8.20 Hz, 1 H) 6.55 (s, 1 H) 6.63 (s, 1 H) 6.89 (s, 1 H) 7.00 - 7.08 (m, 2 H) 7.15 (s, 1 H) 7.30 (d, *J*=8.20 Hz, 1 H) 7.34 (d, *J*=8.20 Hz, 1 H) 8.04 (s, 1 H) 12.11 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 2.86 min, MH⁺ 657

[α]_D²⁰: -56.5° (c 0.255, DMF)

SFC quiral (método SFC-H): TR 4.85 min, MH⁺ 657, pureza quiral 100%.

Punto de fusión: 154°C

Enantiómero 9B:

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.91 - 2.06 (m, 2 H) 2.32 - 2.44 (m, 2 H) 3.09 - 3.23 (m, 5 H) 3.74 (s, 3 H) 3.98 - 4.16 (m, 3 H) 4.39 (td, *J*=10.17, 6.78 Hz, 1 H) 5.71

(d, $J=8.20$ Hz, 1 H) 6.55 (s, 1 H) 6.63 (s, 1 H) 6.89 (s, 1 H) 7.00 - 7.08 (m, 2 H) 7.15 (s, 1 H) 7.30 (d, $J=8.20$ Hz, 1 H) 7.34 (d, $J=8.20$ Hz, 1 H) 8.04 (s, 1 H) 12.11 (s a, 1 H)

5 LC/MS (método LC-A): TR 2.86 min, MH^+ 657

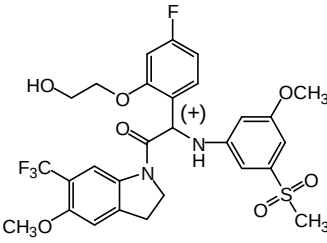
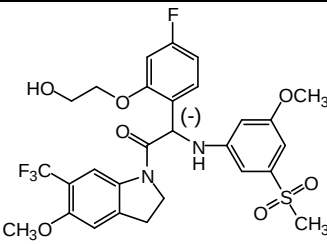
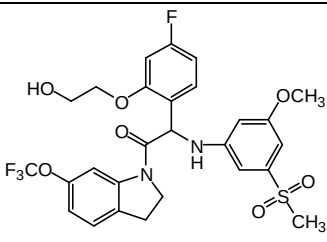
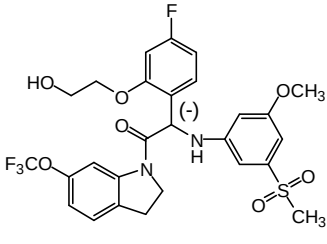
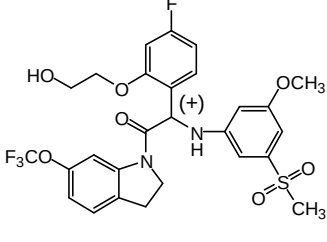
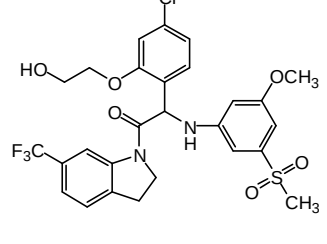
$[\alpha]_D^{20}$: +55.3° (c 0.302, DMF)

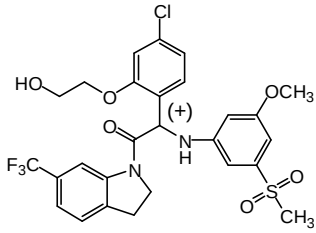
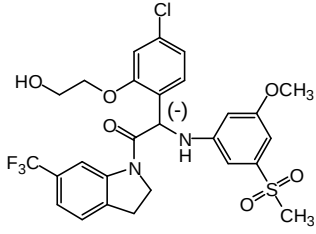
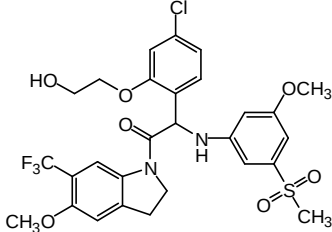
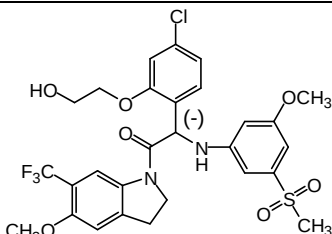
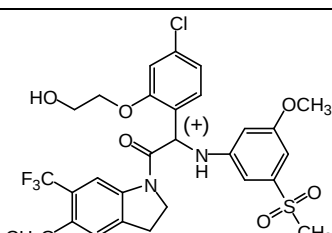
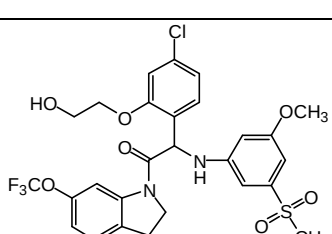
SFC quiral (método SFC-H): TR 6.34 min, MH^+ 657, pureza quiral 100%.

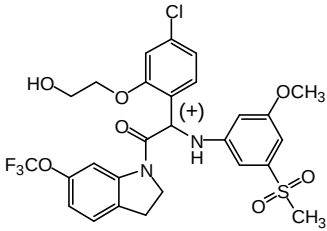
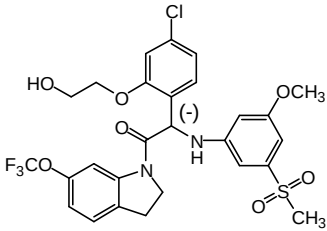
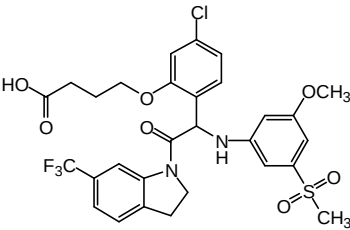
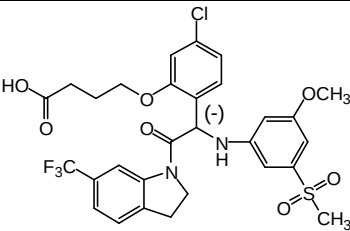
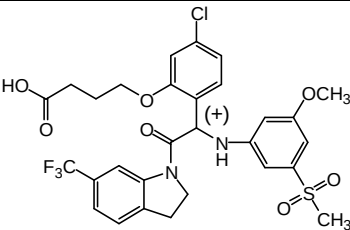
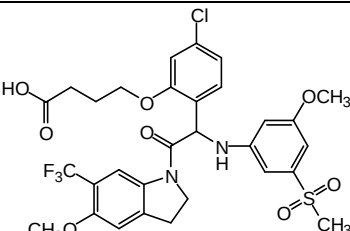
10 Punto de fusión: 155°C

Tabla: compuestos preparados como se ha descrito anteriormente

15	Compuesto	Estructura	Rotación óptica
20	1		racémico
25	1A		$[\alpha]_D^{20} = -49.6^\circ$
30	1B		$[\alpha]_D^{20} = +51.7^\circ$
35	2		racémico

Compuesto	Estructura	Rotación óptica
2A		$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +53.5^{\circ}$
2B		$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -56.5^{\circ}$
3		racémico
3A		$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -59.0^{\circ}$
3B		$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +56.8^{\circ}$
4		racémico

Compuesto	Estructura	Rotación óptica
4A		$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +59.8^{\circ}$
4B		$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -56.4^{\circ}$
5		racémico
5A		$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -60.4^{\circ}$
5B		$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +56.7^{\circ}$
6		racémico

Compuesto	Estructura	Rotación óptica
5 6A		$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +64.3^{\circ}$
10 6B		$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -53.7^{\circ}$
15 7		racémico
20 7A		$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -49.8^{\circ}$
25 7B		$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +49.3^{\circ}$
30 8		racémico

Compuesto	Estructura	Rotación óptica
8A		$[\alpha]_D^{20} = -52.9^\circ$
8B		$[\alpha]_D^{20} = +46.4^\circ$
9		racémico
9A		$[\alpha]_D^{20} = -56.5^\circ$
9B		$[\alpha]_D^{20} = +55.3^\circ$

ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE LOS COMPUESTOS DE LA INVENCIÓN

Ensayo antiviral del VDEN-2

Se evaluó la actividad antiviral de todos los compuestos de la invención frente a la cepa 16681 del VDEN-2, la cual se marcó con la proteína fluorescente verde potenciada (eGPF). El medio de cultivo consiste en un medio esencial mínimo complementado con un 2% de suero bovino fetal inactivado térmicamente, un 0.04% de gentamicina (50 mg/ml) y L-glutamina 2 mM. Se suspendieron células Vero,

obtenidas de ECACC, en el medio de cultivo y se añadieron 25 µL a placas de 384 pocillos (2500 células/pocillo), que ya contenían los compuestos antivirales. Habitualmente, estas placas contienen diluciones en serie con un factor de 5, de 9 etapas de dilución del compuesto de prueba con 200 veces la concentración final en DMSO al 100% (200 nl). Además, cada concentración del compuesto se evalúa por cuadruplicado (intervalo de concentración final: 25 µM – 0.000064 µM o 2.5 µM – 0.0000064 µM para los compuestos más activos). Finalmente, cada placa contiene pocillos que se han asignado como controles del virus (que contienen células y virus en ausencia del compuesto), controles de las células (que contienen células en ausencia de virus y compuesto) y controles del medio (que contiene medio en ausencia de células, virus y compuestos). A los pocillos asignados como control del medio, se añadieron 25 µL de 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 distribuyeran de manera homogénea dentro de los pocillos. A continuación, las placas se incubaron en una incubadora totalmente humidificada (37 °C, 5% de CO₂) hasta el día siguiente. Después, se añadió la cepa 16681 del VDEN-2, marcada con eGFP, con una multiplicidad de infección (MDI) de 0.5. Por lo tanto, se añadieron 15 µl de suspensión del virus a todos los pocillos que contenían compuesto de prueba y a los pocillos asignados como control del virus. En paralelo, se añadieron 15 µL de medio de cultivo a los controles del medio y de las células. A continuación, las placas se incubaron durante 3 días en una incubadora totalmente humidificada (37 °C, 5% de CO₂). El día de la lectura, se midió la fluorescencia de eGFP utilizando un microscopio de fluorescencia automático a 488 nm (láser azul). Utilizando un sistema de LIMS propio, se calcularon las curvas de respuesta a la dosis de inhibición para cada compuesto y se determinó la concentración eficaz que produce la mitad del efecto máximo (CE₅₀). Por lo tanto, la inhibición porcentual (I) para cada concentración de prueba se calcula utilizando la siguiente fórmula: $I = 100 \cdot (S_T - S_{CC}) / (S_{VC} - S_{CC})$; S_T, S_{CC} y S_{VC} son las cantidades de señal de eGFP en los pocillos del compuesto de prueba, control de las células y control del virus, respectivamente. La CE₅₀ representa la concentración de un compuesto con la que se inhibe la replicación del virus en un 50%, que se mide como una reducción del 50% de la intensidad de fluorescencia de eGFP en comparación con el control del virus. La CE₅₀ se calcula utilizando una interpolación lineal (Tabla 1).

En paralelo, se evaluó la toxicidad de los compuestos en las mismas placas. Una vez que se realizó la lectura de la señal de eGFP, se añadieron 40 µL de ATPlite, un tinte de viabilidad celular, a todos los pocillos de las placas de 384 pocillos. El ATP está

presente en todas las células metabólicamente activas y su concentración se reduce muy rápidamente cuando las células experimentan necrosis o apoptosis. El sistema de ensayo ATPLite se basa en la producción de luz provocada por la reacción de ATP con luciferasa y D-luciferina añadidas. Las placas se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las placas se midieron en un ViewLux. También se determinó la concentración que produce la mitad del efecto citotóxico máximo (CC₅₀), definida como la concentración requerida para reducir la señal de luminiscencia en un 50% en comparación con la de los pocillos de control de las células. Finalmente, se determinó el índice de selectividad (IS) para los compuestos, que se calculó de la siguiente manera: $IS = CC_{50}/CE_{50}$.

Tabla 1: CE₅₀, CC₅₀ e IS para los compuestos de la invención en el ensayo antiviral del VDEN-2

compuesto	EC ₅₀ (μM)		CC ₅₀ (μM)		IS	
n.º		N		N		N
1	0.0032	4	14	4	4397	4
1A	2.4	3	12	3	4.8	3
1B	0.0014	3	3.4	3	>1980	3
2	0.0010	4	12	4	13700	4
2A	0.00093	3	9.6	4	16400	3
2B	0.17	3	18	3	105	3
3	0.00074	3	7.9	3	10700	3
3A	0.57	3	11	3	19	3
3B	0.00061	3	8.7	3	16300	3
4	0.00066	3	7.7	3	11600	3
4A	0.00041	7	6.0	7	15000	7
4B	0.016	6	11	7	693	6
5	0.00070	3	11	3	15700	3
5A	0.076	3	16	3	210	3

compuesto		EC ₅₀ (μM)		CC ₅₀		IS	
n.º		N		(μM)		N	
5	5B	0.00023	4	8.5	4	>16800	4
	6	0.00043	4	3.6	4	7070	4
	6A	0.00023	7	7.3	8	>12000	7
10	6B	0.020	5	10	6	492	5
	7	0.00058	3	13	3	21800	3
	7A	0.069	3	11	4	165	3
15	7B	0.00025	5	11	7	90600	5
	8	0.0019	3	14	3	7460	3
	8A	0.095	4	12	5	126	4
20	8B	0.0012	3	14	3	6780	3
	9	0.00031	3	12	3	40200	3
	9A	0.12	3	12	3	93	3
25	9B	0.00015	4	13	4	83000	4

N = el número de experimentos independientes en los que se evaluaron los compuestos.

Ensayo de PCR cuantitativa con retrotranscriptasa tetraivalente (RT-qPCR)

Se evaluó la actividad antiviral de los compuestos de la invención frente a la cepa TC974#666 del VDEN-1 (NCPV), la cepa 16681 del VDEN-2, la cepa H87 del VDEN-3 (NCPV) y la cepa H241 (NCPV) del VDEN-4 en un ensayo de RT-qPCR. Por lo tanto, se infectaron células Vero con el VDEN-1 o -2 o -3 o -4 en presencia o ausencia de compuestos de prueba. El día 3 después de la infección, las células se sometieron a lisis y los lisados celulares se utilizaron para preparar ADNc de tanto una diana viral (la 3'UTR del VDEN; Tabla 2) como un gen de referencia celular (β-actina, Tabla 2). Posteriormente, se realizó una PCR doble a tiempo real en un instrumento Lightcycler480. El valor de Cp generado es inversamente proporcional a la cantidad de expresión de ARN de estas dianas. La inhibición de la replicación del VDEN por un compuesto de prueba da como resultado un desplazamiento de Cp para el gen 3'UTR.

Por otra parte, si un compuesto de prueba es tóxico para las células, se observará un efecto similar en la expresión de β -actina. El método de $\Delta\Delta C_p$ comparativo se utiliza para calcular CE_{50} , que se basa en la expresión génica relativa del gel diana (3'UTR) normalizada con el gen constitutivo celular (β -actina). Además, los valores de CC_{50} se determinan basándose en los valores de C_p adquiridos para el gen constitutivo de β -actina.

Tabla 2: Cebadores y sondas utilizados para la RT-PCR cuantitativa a tiempo real.

Cebador/sonda	Diana	Secuencia ^{a, b}
F3utr258	3'-UTR del VDEN	5'-CGGTTAGAGGAGACCCCTC-3'
R3utr425	3'-UTR del VDEN	5'-GAGACAGCAGGATCTCTGGTC-3'
P3utr343	3'-UTR del VDEN	FAM -5'-AAGGACTAG- ZEN -AGGTTAGAGGAGACCCCCC-3'- IABkFQ
Factin743	β -actina	5'-GGCCAGGTCATCACCATT-3'
Ractin876	β -actina	5'-ATGTCCACGTCACACTTCATG-3'
Pactin773	β -actina	HEX -5'-TTCCGCTGC- ZEN -CCTGAGGCTCTC-3'- IABkFQ

^a Los colorantes marcadores (FAM, HEX) y los elementos inactivadores (ZEN y IABkFQ) están indicados en negrita y en cursiva.

^b Las secuencias de nucleótidos de los cebadores y de las sondas se seleccionaron a partir de la región conservada en la región de 3'UTR del genoma del virus del dengue, basándose en la alineación 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 consistió en un medio esencial mínimo complementado con un 2% de suero bovino fetal inactivado térmicamente, un 0.04 % de gentamicina (50 mg/ml) y L-glutamina 2 mM. Se suspendieron células Vero, obtenidas de ECACC, en el medio de cultivo y se añadieron 75 μ L/pocillo en placas de 96 pocillos (10 000 células/pocillo), que ya contenían los compuestos antivirales. Habitualmente, estas placas contienen una dilución en serie con un factor de 5, de 9 etapas de dilución del compuesto de

prueba con 200 veces la concentración final en DMSO al 100% (500 nL; intervalo de concentración final: 25 μ M – 0.000064 μ M o 2.5 μ M – 0.0000064 μ M para los compuestos más activos). Además, cada placa contiene pocillos que se han asignado como controles del virus (que contienen células y virus en ausencia de compuesto) y controles de las células (que contienen células en ausencia de virus y compuesto). Una vez se añadieron las células a las placas, las placas se incubaron en una incubadora totalmente humidificada (37 °C, 5% de CO₂) hasta el día siguiente. Se diluyeron los serotipos 1, 2, 3 y 4 de los virus del dengue con el fin de obtener un Cp de ~22-24 en el ensayo. Por lo tanto, se añadieron 25 μ L de suspensión de virus a todas las placas que contenían compuesto de ensayo y a los pocillos asignados como control de virus. En paralelo, se añadieron 25 μ L de medio de cultivo a los controles de las células. A continuación, las placas se incubaron durante 3 días en una incubadora totalmente humidificada (37 °C, 5% de CO₂). Después de 3 días, se retiró el sobrenadante de los pocillos y las células se lavaron dos veces con PBS enfriado con hielo (~100 μ L). Los sedimentos de células dentro de las placas de 96 pocillos se almacenaron a -80 °C durante al menos 1 día. A continuación, se extrajo el ARN utilizando el kit de lisis Cells-to-CT™, de acuerdo con las directrices del fabricante (Life Technologies). Los lisados celulares pueden almacenarse a -80 °C o utilizarse inmediatamente en la etapa de retrotranscripción.

En la preparación de la etapa de retrotranscripción, se preparó la mezcla A (tabla 3A) y se dispensaron 7.57 μ L/pocillo en una placa de 96 pocillos. Después de la adición de 5 μ L de los lisados celulares, se realizó una etapa de desnaturalización de cinco minutos a 75 °C (tabla 3B). Posteriormente, se añadieron 7.43 μ L de mezcla B (tabla 3C) y se inició la etapa de retrotranscripción (tabla 3D) para generar ADNc.

Finalmente, se preparó una mezcla de RT-qPCR, mezcla C (tabla 4A), y se dispensaron 22.02 μ L/pocillo en placas LightCycler qPCR de 96 pocillos en las que se añadieron 3 μ L de ADNc y la qPCR se realizó de acuerdo con las condiciones de la tabla 4B en un LightCycler 480.

Utilizando el software LightCycler y un sistema LIMS propio, se calcularon las curvas de respuesta a la dosis para cada compuesto y se determinaron la concentración eficaz que produce la mitad del efecto máximo (CE₅₀) y la concentración que produce la mitad del efecto citotóxico máximo (CC₅₀) (Tablas 5-8).

Tabla 3: Síntesis de ADNc usando la Mezcla A, desnaturalización, la Mezcla B y retrotranscripción.

Mezcla A

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

Etapa de B desnaturalización

Etapa	Temp	Tiempo
Desnatura- lización	75°C	5'
Mantenimiento	4°C	Mantenimiento

C Mezcla B

5

10

15

20

Muestras	864				
Elemento de mezcla	Concentración			Volumen para (µL)	
	Unidad	Patrón	Final	1 muestra	x muestras
Tampón 2 Expand HIFI	X	10.00	1.00	2.00	1728.0
MgCl ₂	mM	25.00	3.50	2.80	2419.2
dNTPs	mM	10.00	1.00	2.00	1728.0
Inhibidor de RNasa	U/µl	40.00	1.00	0.50	432.0
TA expandida	U/µl	50.00	0.33	0.13	112.3
Volumen total de la mezcla (µl)				7.43	

25

D Protocolo de síntesis de ADNc

30

35

Etap	Temp	Tiempo
Retro-transc.	42°C	30'
Desnaturalización	99°C	5'
Mantenimiento	4°C	Mantenimiento

Tabla 4: Protocolo y mezcla de qPCR.

A Mezcla C

5	Muestras	833			Vol. de reacción (µL)	25
10	Elemento de mezcla	Concentración			Volumen para (µL)	
15		Unidad	Patrón	Final	1 muestra	x muestras
20	H ₂ O calidad PCR de Roche				7.74	6447.42
	Mezcla Roche 2xMM	X	2	1	12.50	10412.50
	F3utr258	µM	20	0.3	0.38	316.54
25	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
30	Ractin876	µM	20	0.3	0.38	316.54
	Pactin773	µM	20	0.1	0.13	108.29
35			Volumen de mezcla / tubo (µL)		22.02	
			ADNc		3.00	

B Protocolo qPCR3

5					
10					
15					

Tabla 5: CE₅₀, CC₅₀ e IS para los compuestos frente al serotipo 1 en los ensayos de RT-qPCR

		RT-qPCR para TC974#666 del serotipo 1					
	compuesto	EC ₅₀		CC ₅₀		IS	
	n.º	(µM)	N	(µM)	N		N
25	1B	0.0015	3	>2.5	3	>2860	3
	2A	0.0046	5	>2.5	4	>981	4
30	3B	0.0011	3	>2.5	3	>3640	3
	4A	0.00075	3	>2.5	3	>5470	3
	5B	0.00094	4	5.1	4	8640	4
35	6A	0.00016	3	>2.5	3	>41300	3
	7B	0.00013	3	>2.5	3	>19200	3
	8B	0.0012	3	14	3	10500	3
	9B	0.00010	3	>2.5	3	>45500	3

N = el número de experimentos independientes en los que se evaluaron los compuestos.

Tabla 6: CE₅₀, CC₅₀ e IS para los compuestos frente al serotipo 2 en los ensayos de RT-qPCR

RT-qPCR para 16681 del serotipo 2						
compuesto n.º	EC ₅₀ (µM) N		CC ₅₀ (µM) N		IS N	
1B	0.0011	3	4.1	3	4670	3
2A	0.0013	4	12	4	4910	4
3B	0.00090	3	3.6	3	4760	3
4A	0.00045	3	2.7	3	11700	3
5B	0.00024	5	4.2	5	>17100	5
6A	0.00016	3	4.2	3	>12600	3
7B	0.00019	3	>2.5	2	>13500	2
8B	0.00030	3	16	2	54300	2
9B	0.000068	3	>2.5	3	>56500	3

N = el número de experimentos independientes en los que se evaluaron los compuestos.

Tabla 7: CE₅₀, CC₅₀ e IS para los compuestos frente al serotipo 3 en los ensayos de RT-qPCR

		RT-qPCR para H87 del serotipo 3					
compuesto		EC ₅₀		CC ₅₀		IS	
n.º		(µM)	N	(µM)	N		N
1B		0.020	3	>2.5	3	>127	3
2A		0.020	3	>2.5	3	>157	3
3B		0.013	3	>2.5	3	>444	3
4A		0.013	3	>2.5	3	>234	3
5B		0.0067	4	>2.5	4	>752	4
6A		0.0026	3	>2.5	3	>1480	3
7B		0.0052	3	>2.5	3	>473	3
8B		0.019	3	12	3	796	3
9B		0.0017	3	>2.5	3	>1840	3

N = el número de experimentos independientes en los que se evaluaron los compuestos.

Tabla 8: CE₅₀, CC₅₀ e IS para los compuestos frente al serotipo 4 en los ensayos de RT-qPCR

compuesto		RT-qPCR para H241 del serotipo 4					
n.º		EC ₅₀ (µM)	N	CC ₅₀ (µM)	N	IS	N
1B		0.13	3	>2.4	3	23	3
2A		0.10	3	2.8	3	35	3
3B		0.072	3	>2.3	3	>32	3
4A		0.044	4	2.2	4	69	4
5B		0.026	4	2.5	2	86	2
6A		0.026	4	2.3	4	119	4
7B		0.024	3	>2.5	3	>186	3
8B		0.084	3	7.4	3	88	3
9B		0.0072	3	5.0	2	1390	2

N = el número de experimentos independientes en los que se evaluaron los compuestos.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.