

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

5 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
10 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
15 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
20 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
25 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
30 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
35 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.

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.

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.

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.

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.

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 en 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

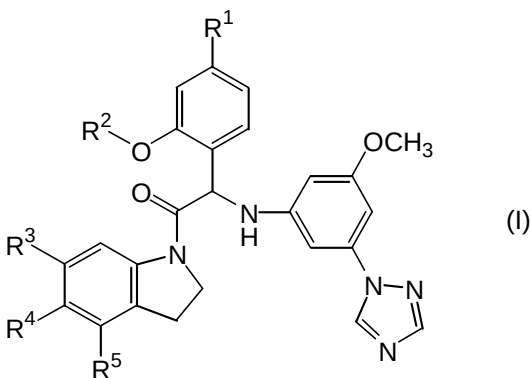
La presente invención se basa en el descubrimiento inesperado de que al menos uno de los problemas mencionados anteriormente se puede resolver mediante los compuestos actuales de la invención.

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 cloro o fluoro,

R² es -CH₂CH₂OH, o C₃₋₅alquilCOOH;

R³ es trifluorometilo, o trifluorometoxi;

R⁴ es hidrógeno, fluoro o metoxi; y

R⁵ es hidrógeno o metilo;

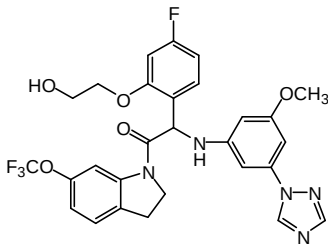
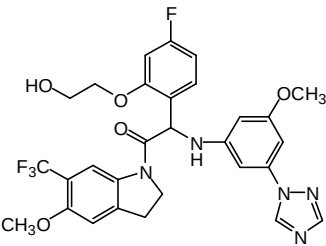
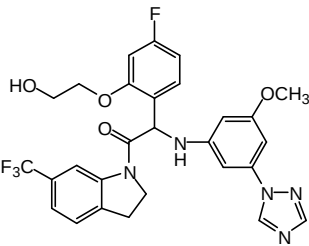
o una sal, solvato o polimorfo farmacéuticamente aceptable del mismo.

El término "C₃₋₅alquilo", tal y como se usa en la presente memoria, define radicales de hidrocarburo saturado de cadena lineal o ramificada que tienen de 3 a 5 átomos de carbono tales como, por ejemplo, propilo, butilo, pentilo, 1,1-dimetilpropilo, 2-metilpropilo, 2-metilbutilo y similares.

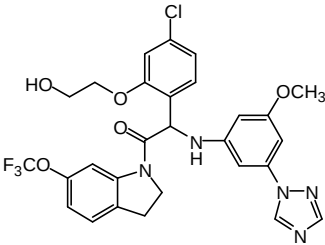
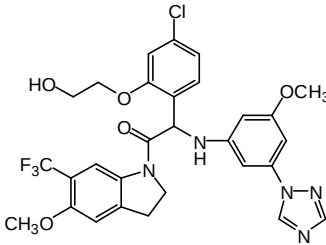
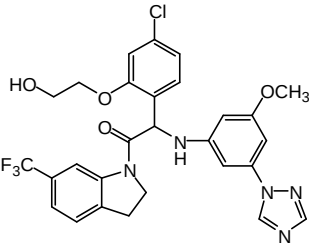
Se escogen los compuestos mencionados anteriormente de forma específica entre el grupo que comprende:

5

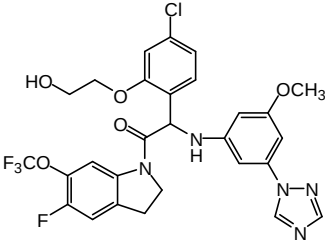
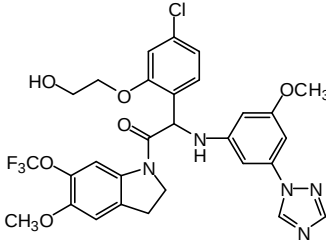
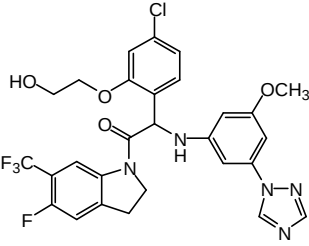
10



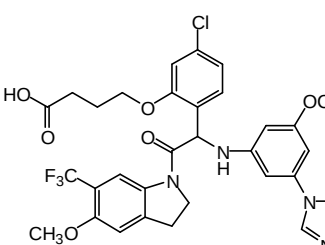
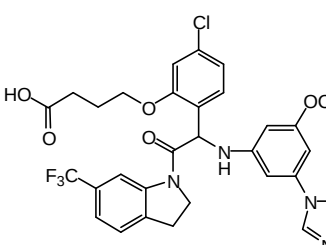
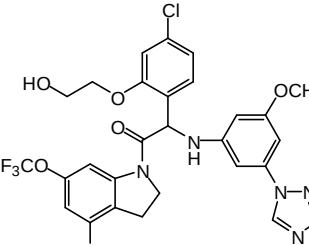
15



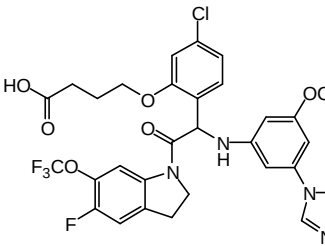
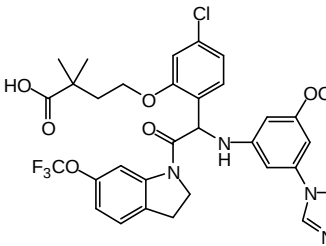
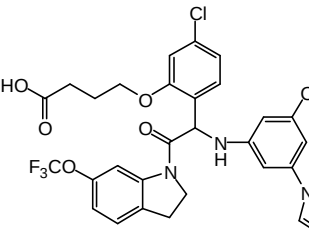
20



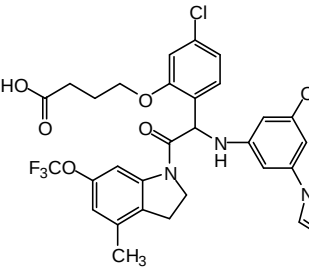
25



30



35



Parte de la invención actual es también una composición farmacéutica que comprende un compuesto mencionado anteriormente o una forma estereoisomérica, una sal, solvato o polimorfo farmacéuticamente aceptable del mismo, junto con uno o más excipientes, diluyentes o portadores farmacéuticamente aceptables.

Las sales farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos incluyen las sales de adición de ácidos y de bases de los mismos. Las sales de adición de ácido adecuadas se forman a partir de ácidos que forman sales atóxicas. Las sales de adición de base adecuadas se forman a partir de bases que forman sales atóxicas.

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, pirúvico, oxálico (es decir, etanodioico), malónico, succínico (es decir, ácido butano-dioico), maleico, fumárico, málico, tartárico, cítrico, metanosulfónico, etanosulfónico, bencenosulfónico, p-toluensulfónico, ciclámico, salicílico, p-amino-salicílico, ácido pamoico y ácidos similares.

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.

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 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 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 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 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, 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 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 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 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 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 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 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.

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.

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.

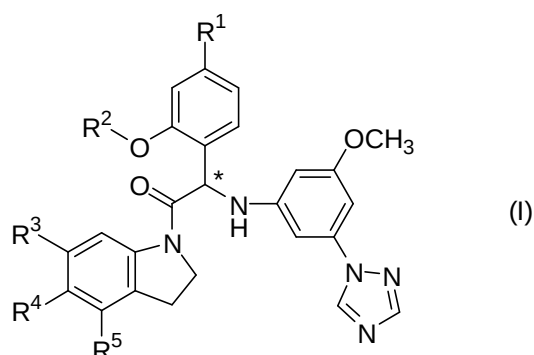
Dicha mezcla puede contener todos los diastereómeros y/o enantiómeros de la estructura molecular básica de dicho compuesto. Se pretende que todas las formas estereoquímicamente isoméricas de los compuestos utilizados en la presente invención, tanto en forma pura como mezcladas con las otras, queden englobadas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

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 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 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 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 carbono marcado con *:



Debido a la presencia de dicho átomo de carbono quiral, un "compuesto de fórmula (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 (+) 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

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).

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 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 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. 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 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).

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 CO ONH 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 CO ONH ₄ 7mM / 5% CH ₃ CN ,	84.2% A/15.8% B a 10.5% A en 2.18 min, mantenido durante 1.96 min,	0.343 mL/min ----- 40°C	6.1

5	Código del método	Instrumento	Columna	Fase móvil	Gradiente	Flujo ----- T col	Tiempo de ejecución (min)
10				B: CH ₃ CN	de nuevo a 84.2% A/15.8% B en 0.73 min, mantenido durante 0.49 min.		
15							
20	LC-C	Waters: Acquity® UPLC® - DAD-SQD	Waters: BEH C18 (1.7 µm, 2.1 x 50 mm)	A: 10mM CH ₃ CO ONH ₄ en 95% H ₂ O + 5% 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
25				B: CH ₃ CN			
30							
35	LC-D	Waters: Acquity® UPLC® - DAD-SQD	Waters: HSS T3 (1.8 µm, 2.1 x 100 mm)	A: 10mM CH ₃ CO ONH ₄ en 95% H ₂ O + 5% CH ₃ CN	Desde un 100% de A hasta un 5% de A en 2.10 min, hasta un 0% de A en 0.90 min, hasta un	0.7 mL/min ----- 55°C	3.5

5

10

Código del método	Instrumento	Columna	Fase móvil	Gradiente	Flujo ----- T col	Tiempo de ejecución (min)
			B: CH ₃ CN	5% de A en 0.5 min.		

Métodos de SFC/MS

15

20

25

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).

30

35

Código del método	columna	Fase móvil	Gradiente	Flujo ----- T col	Tiempo de ejecución ----- BPR
SFC-A	Columna Daicel Chiralpak ® IA (5	A:CO ₂ B: EtOH (+0.3% iPrNH ₂)	Un 30% de B mantenido 7 min	3 ----- 35	7 ----- 100

5	Código del método	columna	Fase móvil	Gradiente	Flujo ----- T col	Tiempo de ejecución ----- BPR
10		µm, 150 x 4.6 mm)				
15	SFC-B	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
20	SFC-C	Columna Daicel Chiralpak® AD-H (5 µm, 150 x 4.6 mm)	A:CO ₂ B: EtOH (+0.3% iPrNH ₂)	Un 40% de B mantenido 7 min	3 ----- 35	7 ----- 100
25						
30	SFC-D	Columna Daicel Chiralpak® IC (5 µm, 150 x 4.6 mm)	A:CO ₂ B: iPrOH (+0.3% iPrNH ₂)	Un 25% de B mantenido 7 min	3 ----- 35	7 ----- 100
35	SFC-E	Columna Daicel Chiralpak® IC (5 µm, 150 x 4.6 mm)	A:CO ₂ B: iPrOH (+0.3% iPrNH ₂)	Un 30% de B mantenido 7 min	3 ----- 35	7 ----- 100

5	Código del método	columna	Fase móvil	Gradiente	Flujo ----- T col	Tiempo de ejecución ----- BPR
10	SFC-F	Columna Daicel Chiralpak® AD-3 (3 µm, 100 x 4.6 mm)	A:CO ₂ B: iPrOH (+0.3% iPrNH ₂)	Un 30% de B mantenido 3 min	3.5 ----- 35	3 ----- 103
15	SFC-G	Columna Daicel Chiralpak® AD-H (5 µm, 150 x 4.6 mm)	A:CO ₂ B: EtOH	Un 30% de B mantenido 7 min	3 ----- 35	7 ----- 100
20	SFC-H	Columna Daicel Chiralpak® AS-3 (3 µm, 100 x 4.6 mm)	A:CO ₂ B: iPrOH (+0.3% iPrNH ₂)	Un 20% de B mantenido 10 min	3.5 ----- 35	10 ----- 103
25	SFC-I	Columna Daicel Chiralpak® AS-3 (3 µm, 100 x 4.6 mm)	A:CO ₂ B: EtOH (+0.3% iPrNH ₂)	Un 10% de B mantenido 10 min	3.5 ----- 35	10 ----- 103
30	SFC-J	Columna Daicel Chiralcel® OD-3 (3 µm, 100 x 4.6 mm)	A:CO ₂ B:MeOH (+0.3% iPrNH ₂)	Un 20% de B mantenido 6 min	3.5 ----- 35	6 ----- 103

5

10

15

20

Código del método	columna	Fase móvil	Gradiente	Flujo ----- T col	Tiempo de ejecución ----- BPR
	µm, 100 x 4.6 mm)				
SFC-K	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

25

30

Los valores son cualquier valor pico o intervalos de fusión, y se obtienen con incertidumbres experimentales que comúnmente se asocian a 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.

35

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: [α]^o (λ, c g/100ml, disolvente, T°C).

$[α]_{λ}^T = (100α) / (l \times c)$: 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),

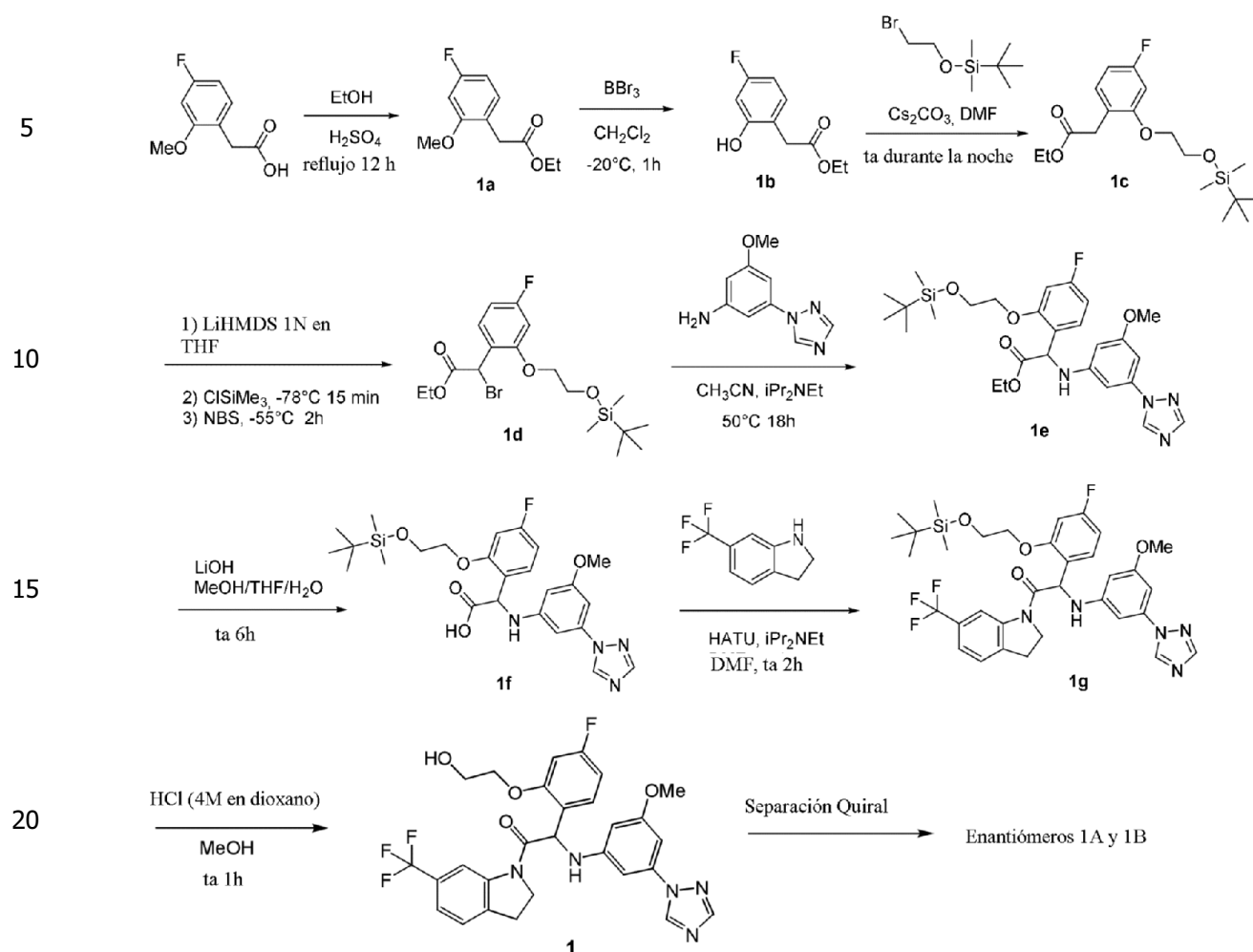
entonces podría utilizarse el símbolo D en su lugar. El signo de la rotación (+ o -) debería proporcionarse siempre. Cuando se utiliza esta ecuación, la concentración y el disolvente siempre se proporcionan entre paréntesis después de la rotación. La rotación se indica utilizando grados y no se proporcionan 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>terc</i> -butiloxicarbonilo	iPrNH ₂	isopropilamina
Boc ₂ O	dicarbonato de di- <i>terc</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 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	diisopropil éter	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
5	DMSO	Sulfóxido de dimetilo	c	cuartete
	eq.	equivalente	ta o TA	temperatura ambiente
	Et ₂ O	dietil éter	s	singlete
10	Et ₃ N	trietilamina	t	triplete
	EtOAc	acetato de etilo	tBuOK	<i>terc</i> -butanolato de potasio
	EtOH	etanol	TEA	trietilamina
15	H ₂ O	agua	TFA	ácido trifluoroacético
	H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico	THF	tetrahidrofurano
20	HATU	O-hexafluorofosfato de(7-aza-1H-benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametil-uronio - CAS [148893-10-1]	TMSCl	cloruro de trimetilsililo

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



25 Síntesis del intermedio 1a:

Se calentó a reflujo una disolución de ácido 4-fluoro-2-metoxifenilacético [CAS 886498-61-9] (10 g, 54.3 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 directamente en la siguiente etapa.

35 Síntesis del intermedio 1b:

Se añadió gota a gota una disolución 1 M de tribromuro de boro en CH₂Cl₂ (109.3 ml, 109.3 mmol) a una disolución de 2-(4-fluoro-2-metoxifenil)acetato de etilo **1a** (11.6, 54.7 mmol) en CH₂Cl₂ (300 ml) a -30 °C. Se agitó la reacción a -20 °C durante 1 horas, y posteriormente 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 directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional.

5

Síntesis del intermediario **1c**:

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)(*tert*-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 µM, 40 g, heptano/EtOAc 80/20). Se combinaron las fracciones puras y se retiró el disolvente a presión reducida para proporcionar 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-fluorofenil)acetato de etilo **1c** (17.7 g).

15

20

Síntesis del intermediario **1d**:

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-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-fluorofenil)acetato de etilo **1c** (5 g, 14.03 mmol) en THF (30 ml). Tras agitar durante 1 horas a -78 °C, se añadió clorotrimetilsilano (2.85 ml, 22.4 mmol). Se agitó la mezcla de reacción a -78 °C durante 15 minutos. Se añadió *N*-bromosuccinimida (3 g, 16.8 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 **1d** (6.57 g) que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

25

30

Síntesis del intermediario **1e**:

Se agitó una mezcla de 2-bromo-2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-fluorofenil)acetato de etilo **1d** (3.1 g, 7.12 mmol), 3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)anilina [CAS 1220630-56-7] (2.03 g, 10.7 mmol) y diisopropiletilamina (2.45 ml, 14.2 mmol) en CH₃CN (60 ml) a 50 °C durante 18 h. Se concentró la mezcla de reacción a presión reducida. Se introdujo el residuo en EtOAc y se lavó con HCl 0.5 N, agua y salmuera. 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 80/20 a 60/40) para

35

proporcionar 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-fluorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)acetato de etilo **1e** (2.5 g).

Síntesis del intermedio **1f**:

Se añadió por partes una disolución de hidróxido de litio monohidratado (226 mg, 5.397 mmol) en agua (25 ml) a una disolución de 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-fluorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)acetato de etilo **1e** (2.45 g, 4.498 mmol) en una mezcla de disolventes de THF/CH₃OH (1/1) (50 ml) a 10 °C. Se agitó la reacción a temperatura ambiente durante 6 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 se concentró el disolvente a presión reducida para proporcionar ácido 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-fluorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)acético **1f** (2.05 g). Se usó el compuesto directamente en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Síntesis del intermedio **1g**:

A una disolución de ácido 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-fluorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)acético **1f** (1.58 g, 3.06 mmol) en DMF (20 ml), se añadieron HATU (1.74 g, 4.60 mmol), diisopropiletilamina (1.5 ml, 9.17 mmol) y 6-(trifluorometil)indolina [CAS 181513-29-1] (572 mg, 3.06 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 en agua, 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-fluorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometil)indolin-1-il)etanona **1g** (2.1 g). El compuesto crudo se utilizó directamente en el siguiente paso.

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

Bajo flujo de N₂, a 5°C, se añadió gota a gota HCl 4 M en dioxano (7.65 ml, 30.6 mmol) a una disolución de 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-fluorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometil)indolin-1-il)etanona **1g** (2.1 g, 3.06 mmol) en MeOH (40 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. Se cristalizó el residuo a partir de CH₃CN/éter diisopropílico para proporcionar 2-(4-fluoro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-

((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometil)indolin-1-il)etanona **1** (800 mg) en forma de racemato.

Se separaron los enantiómeros del Compuesto **1** (720 mg) por medio de SFC Quiral de Preparación (Fase estacionaria: Chiralpak® IA 5 µm 250 x 20 mm, Fase móvil: 70% de CO₂, 30% de EtOH (+0.3% de iPrNH₂)). Se cristalizó el primer enantiómero sometido a elución (303 mg) a partir de Et₂O para proporcionar el Enantiómero **1A** (270 mg). Se cristalizó el segundo enantiómero sometido a elución (320 mg) a partir de Et₂O para proporcionar el Enantiómero **1B** (274 mg).

Compuesto **1**:

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.15 - 3.30 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H) 3.74 - 3.85 (m, 2 H) 4.06 - 4.17 (m, 3 H) 4.45 (td, *J*=10.3, 6.1 Hz, 1 H) 4.98 (t, *J*=5.4 Hz, 1 H) 5.83 (d, *J*=8.5 Hz, 1 H) 6.35 (s, 1 H) 6.66 (t, *J*=1.9 Hz, 1 H) 6.76 - 6.82 (m, 2 H) 6.84 (s, 1 H) 6.98 (dd, *J*=11.2, 2.4 Hz, 1 H) 7.37 - 7.42 (m, 2 H) 7.44 - 7.49 (m, 1 H) 8.16 (s, 1 H) 8.39 (s, 1 H) 9.13 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 3.06 min, MH⁺ 572

Punto de fusión: 151°C

Enantiómero **1A**:

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.15 - 3.29 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H) 3.74 - 3.86 (m, 2 H) 4.06 - 4.19 (m, 3 H) 4.45 (td, *J*=10.2, 6.3 Hz, 1 H) 4.97 (t, *J*=5.5 Hz, 1 H) 5.83 (d, *J*=8.8 Hz, 1 H) 6.36 (s, 1 H) 6.66 (t, *J*=1.9 Hz, 1 H) 6.76 - 6.82 (m, 2 H) 6.84 (s, 1 H) 6.98 (dd, *J*=11.3, 2.5 Hz, 1 H) 7.37 - 7.42 (m, 2 H) 7.46 (d, *J*=7.9 Hz, 1 H) 8.16 (s, 1 H) 8.39 (s, 1 H) 9.13 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 3.06 min, MH⁺ 572

[α]_D²⁰: -44.8° (c 0.2525, DMF)

SFC quiral (método SFC-A): TR 2.59 min, MH⁺ 572, pureza quiral 100%.

Punto de fusión: 163°C

Enantiómero **1B**:

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.15 - 3.30 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H) 3.74 - 3.85 (m, 2 H) 4.06 - 4.19 (m, 3 H) 4.45 (td, *J*=10.3, 6.1 Hz, 1 H) 4.97 (t, *J*=5.5 Hz, 1 H) 5.83 (d, *J*=8.5 Hz, 1 H) 6.36 (s, 1 H) 6.66 (t, *J*=1.9 Hz, 1 H) 6.76 - 6.82 (m, 2 H) 6.84 (s, 1 H)

6.98 (dd, $J=11.2, 2.4$ Hz, 1 H) 7.36 - 7.43 (m, 2 H) 7.46 (d, $J=7.9$ Hz, 1 H) 8.16 (s, 1 H)
8.39 (s, 1 H) 9.13 (s, 1 H)

5

LC/MS (método LC-A): TR 3.06 min, MH^+ 572

$[\alpha]_D^{20}$: +36.2° (c 0.2567, DMF)

10

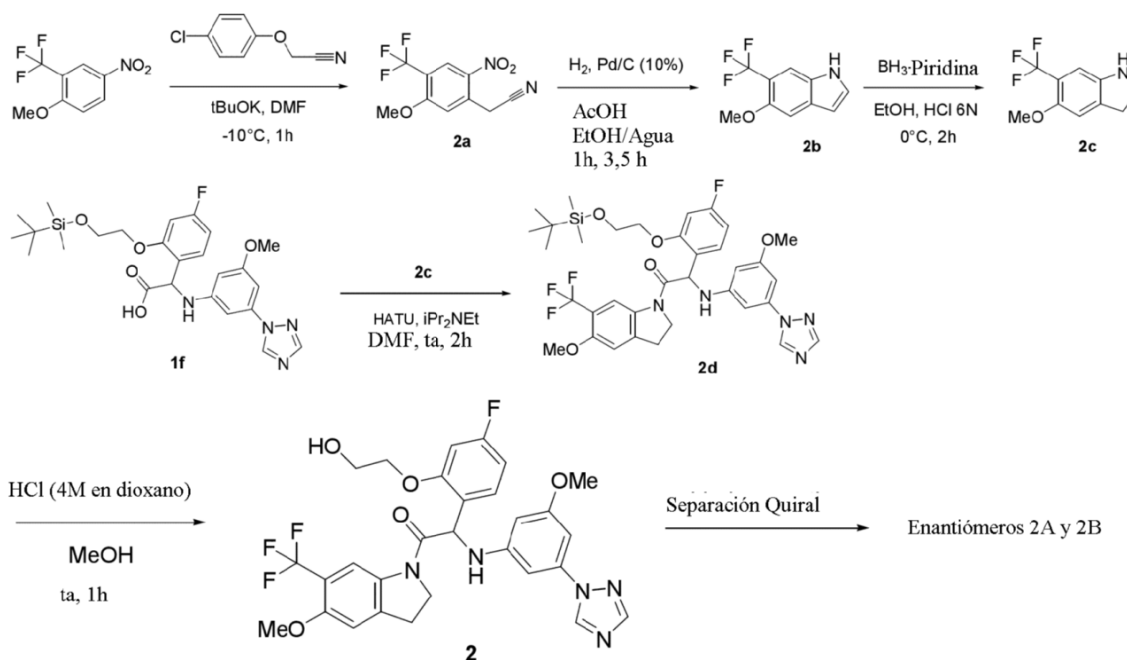
SFC quiral (método SFC-A): TR 3.15 min, MH^+ 572, pureza quiral 98.07%.

Punto de fusión: 162°C

15

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

20



25

30

Síntesis del intermedio 2a:

35

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 disolución agitada de *t*BuOK (27.35 g, 243.7 mmol) en DMF (100 ml) a -10 °C. Después de la adición, la disolución 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 **2a** (usado como tal en la siguiente etapa).

Síntesis del intermedio 2b:

Una disolución de 2-(5-metoxi-2-nitro-4-(trifluorometil)fenil)acetonitrilo **2a** (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 **2b** (15.6 g).

Síntesis del intermedio 2c:

A 0 °C, se añadió gota a gota BH₃-Piridina (23.5 ml, 232.4 mmol) a una disolución de 5-metoxi-6-(trifluorometil)-1*H*-indol **2b** (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 disolución 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 **2c** (9 g).

Síntesis del intermedio 2d:

A una disolución de ácido 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-fluorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)acético **1f** (1.02 g, 1.97 mmol) en DMF (10 ml), se añadieron HATU (1.13 g, 2.96 mmol), diisopropiletilamina (979 µl, 5.92 mmol) y 5-metoxi-6-(trifluorometil)indolina **2c** (429 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 K₂CO₃ en agua, 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-fluorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-1-(5-metoxi-6-(trifluorometil)indolin-1-il)etanona **2d** (1.36 g). El compuesto se utilizó como tal en el siguiente paso de reacción.

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

Bajo flujo de N₂, a 5°C, se añadió gota a gota HCl 4 M en dioxano (4.75 ml, 18.99 mmol) a una disolución de 2-(2-(2-((*terc*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-fluorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-1-(5-metoxi-6-(trifluorometil)indolin-1-il) etanona **2d** (1.36 g, 1.9 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. Se cristalizó el residuo a partir de MeOH para proporcionar 2-(4-fluoro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-1-(5-metoxi-6-(trifluorometil)indolin-1-il)etanona **2** (850 mg) en forma de racemato.

Se separaron los enantiómeros del Compuesto **2** (800 mg) por medio de SFC Quiral de Preparación (Fase estacionaria: Chiralpak® IA 5 µm 250 x 20 mm, Fase móvil: 6% de CH₂Cl₂, 70% de CO₂, 24% de EtOH (+0.3% de iPrNH₂)). El primer enantiómero eluido (370 mg) se solidificó por medio de trituración con éter diisopropílico para proporcionar el Enantiómero **2A** (329 mg). El segundo enantiómero eluido (400 mg) se purificó adicionalmente por cromatografía instantánea sobre gel de sílice (15-40 µm, 24 g, CH₂Cl₂/MeOH 99/1). Se combinaron las fracciones puras y se concentró el disolvente a presión reducida. Se solidificó el residuo (320 mg) por medio de trituración con éter diisopropílico para proporcionar el Enantiómero **2B** (262 mg).

Compuesto 2:

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.15 - 3.30 (m, 2 H) 3.72 (s, 3 H) 3.74 - 3.83 (m, 2 H) 3.84 (s, 3 H) 4.04 - 4.18 (m, 3 H) 4.43 (td, *J*=10.4, 6.3 Hz, 1 H) 4.99 (t, *J*=5.7 Hz, 1 H) 5.81 (d, *J*=8.5 Hz, 1 H) 6.35 (s, 1 H) 6.65 (t, *J*=1.9 Hz, 1 H) 6.75 - 6.81 (m, 2 H) 6.83 (s, 1 H) 6.98 (dd, *J*=11.2, 2.4 Hz, 1 H) 7.24 (s, 1 H) 7.39 (dd, *J*=8.5, 6.9 Hz, 1 H) 8.16 (s, 1 H) 8.35 (s, 1 H) 9.13 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 2.99 min, MH⁺ 602

Punto de fusión: 192°C

Enantiómero 2A:

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.16 - 3.28 (m, 2 H) 3.72 (s, 3 H) 3.74 - 3.83 (m, 2 H) 3.84 (s, 3 H) 4.03 - 4.18 (m, 3 H) 4.37 - 4.49 (m, 1 H) 4.97 (t, *J*=5.6 Hz, 1 H) 5.81 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 6.35 (s, 1 H) 6.65 (s, 1 H) 6.73 - 6.81 (m, 2 H) 6.83 (s, 1 H) 6.97 (dd,

$J=11.1, 2.0\text{ Hz}, 1\text{ H}$) 7.23 (s, 1 H) 7.39 (t, $J=7.6\text{ Hz}, 1\text{ H}$) 8.15 (s, 1 H) 8.35 (s, 1 H) 9.12 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 2.97 min, MH^+ 602

$[\alpha]_D^{20}$: -45.0° (c 0.2425, DMF)

SFC quiral (método SFC-A): TR 4.14 min, MH^+ 602, pureza quiral 100%.

Enantiómero 2B:

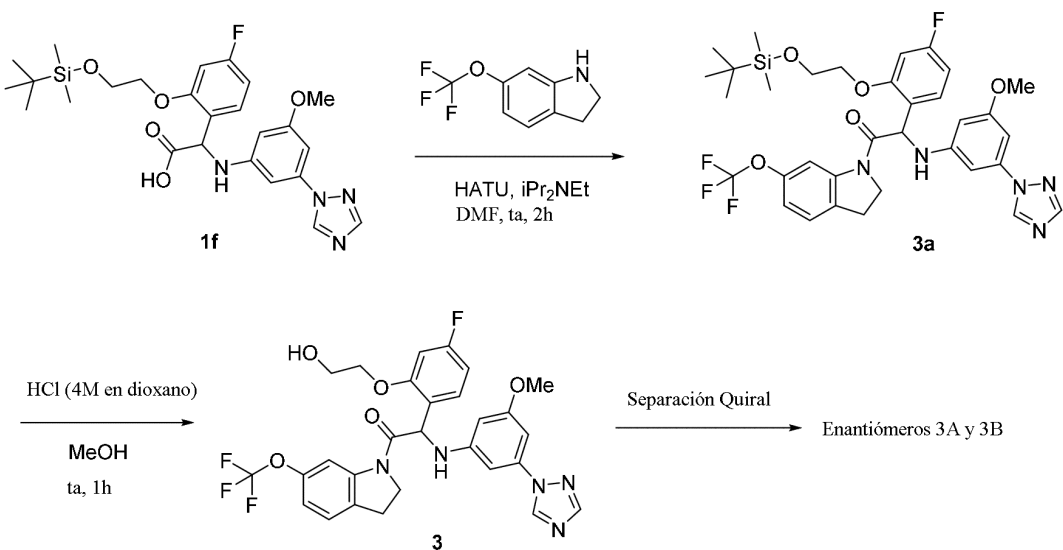
^1H RMN (400 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm 3.16 - 3.28 (m, 2 H) 3.72 (s, 3 H) 3.74 - 3.83 (m, 2 H) 3.84 (s, 3 H) 4.02 - 4.20 (m, 3 H) 4.42 (td, $J=10.2, 6.3\text{ Hz}, 1\text{ H}$) 4.97 (t, $J=5.6\text{ Hz}, 1\text{ H}$) 5.81 (d, $J=8.6\text{ Hz}, 1\text{ H}$) 6.35 (s, 1 H) 6.65 (s, 1 H) 6.73 - 6.81 (m, 2 H) 6.83 (s, 1 H) 6.97 (dd, $J=11.4, 2.3\text{ Hz}, 1\text{ H}$) 7.23 (s, 1 H) 7.36 - 7.43 (m, 1 H) 8.15 (s, 1 H) 8.35 (s, 1 H) 9.12 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 2.97 min, MH^+ 602

$[\alpha]_D^{20}$: $+43.4^\circ$ (c 0.2007, DMF)

SFC quiral (método SFC-A): TR 5.08 min, MH^+ 602, pureza quiral 100%.

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



Síntesis del intermedio 3a:

A una disolución de ácido 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-fluorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)acético **1f** (1.02 g, 1.974 mmol) en DMF (10 ml), se añadieron HATU (1.13 g, 2.96 mmol), diisopropiletilamina (979 μ l, 5.92 mmol) y 6-(trifluorometoxi)indolina [CAS 959235-95-1] (401 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 K₂CO₃ en agua, 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-fluorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etanona **3a** (1.34 g). El compuesto crudo se utilizó directamente en el siguiente paso de reacción.

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

Bajo flujo de N₂, a 5°C, se añadió gota a gota HCl 4 M en dioxano (4.27 ml, 17.1 mmol) a una disolución de 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-fluorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etanona **3a** (1.2 g, 1.71 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 μ m, 40 g, gradiente de CH₂Cl₂/heptano: de 99.5/0.5 a 99/1). Se combinaron las fracciones puras y se concentraron hasta sequedad a presión reducida para proporcionar 2-(4-fluoro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etanona **3** (550 mg) en forma de racemato. Se cristalizó parte de esta fracción a partir de MeOH para proporcionar el Compuesto **3** (36 mg).

Se usó el material restante para separar los enantiómeros del Compuesto 3 por medio de SFC Quiral de Preparación (fase estacionaria: Chiralpak® AD-H 5 μ m 250 x 20 mm, Fase móvil: 65% de CO₂, 35% de EtOH (+0.3% de iPrNH₂)). El primer enantiómero eluido (210 mg) se solidificó por medio de trituración con éter diisopropílico/heptano para proporcionar el Enantiómero **3A** (182 mg). El segundo enantiómero eluido (230 mg) se purificó adicionalmente por cromatografía instantánea sobre gel de sílice (15-40 μ m, 24 g, CH₂Cl₂/MeOH 99/1). Se combinaron las fracciones puras y se concentró el disolvente a presión reducida. Se solidificó el residuo (180 mg) por medio de

trituration con éter diisopropílico/heptano para proporcionar el Enantiómero **3B** (137 mg).

Compuesto 3:

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.06 - 3.25 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H) 3.75 - 3.86 (m, 2 H) 4.06 - 4.17 (m, 3 H) 4.38 - 4.50 (m, 1 H) 4.95 (s, 1 H) 5.81 (d, *J*=8.6 Hz, 1 H) 6.35 (s, 1 H) 6.65 (s, 1 H) 6.75 - 6.81 (m, 2 H) 6.83 (s, 1 H) 6.94 - 7.04 (m, 2 H) 7.33 (d, *J*=8.6 Hz, 1 H) 7.36 - 7.43 (m, 1 H) 8.04 (s, 1 H) 8.15 (s, 1 H) 9.11 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 3.13 min, MH⁺ 588

Punto de fusión: 178°C

Enantiómero 3A:

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.06 - 3.26 (m, 2 H) 3.72 (s, 3 H) 3.74 - 3.86 (m, 2 H) 4.05 - 4.18 (m, 3 H) 4.38 - 4.50 (m, 1 H) 4.97 (t, *J*=5.3 Hz, 1 H) 5.82 (d, *J*=8.6 Hz, 1 H) 6.35 (s, 1 H) 6.65 (s, 1 H) 6.74 - 6.86 (m, 3 H) 6.94 - 7.04 (m, 2 H) 7.34 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 7.36 - 7.42 (m, 1 H) 8.04 (s, 1 H) 8.15 (s, 1 H) 9.12 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 3.11 min, MH⁺ 588

[α]_D²⁰: -38.2° (c 0.28, DMF)

SFC quiral (método SFC-B): TR 3.38 min, MH⁺ 588, pureza quiral 100%.

Enantiómero 3B:

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.07 - 3.26 (m, 2H) 3.72 (s, 3 H) 3.74 - 3.86 (m, 2 H) 4.04 - 4.20 (m, 3 H) 4.38 - 4.50 (m, 1 H) 4.97 (t, *J*=5.6 Hz, 1 H) 5.81 (d, *J*=8.6 Hz, 1 H) 6.35 (s, 1 H) 6.65 (s, 1 H) 6.74 - 6.87 (m, 3 H) 6.94 - 7.03 (m, 2 H) 7.34 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 7.36 - 7.42 (m, 1 H) 8.04 (s, 1 H) 8.15 (s, 1 H) 9.12 (s, 1 H)

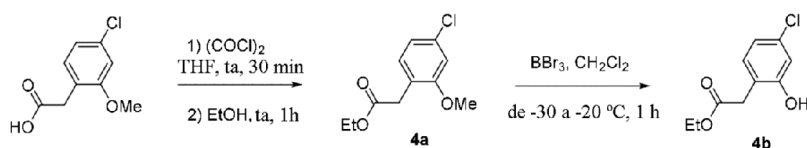
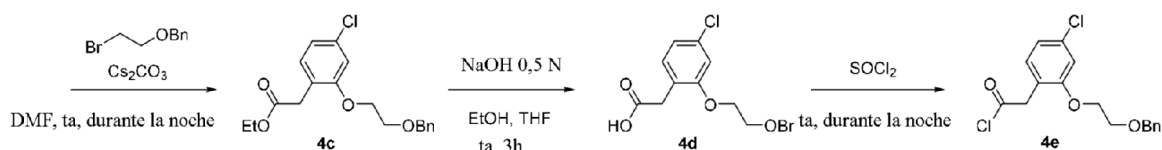
LC/MS (método LC-A): TR 3.11 min, MH⁺ 588

[α]_D²⁰: +40.9° (c 0.23, DMF)

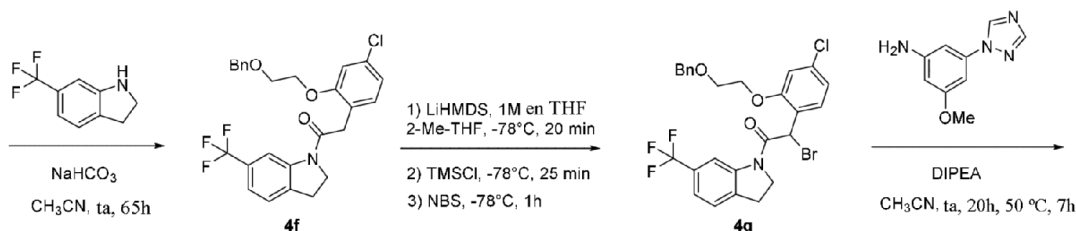
SFC quiral (método SFC-B): TR 5.31 min, MH⁺ 588, pureza quiral 100%.

Ejemplo 4: síntesis de 2-(4-cloro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometil)indolin-1-il)etanona (Compuesto **4**) y separación quiral en enantiómeros **4A** y **4B**.

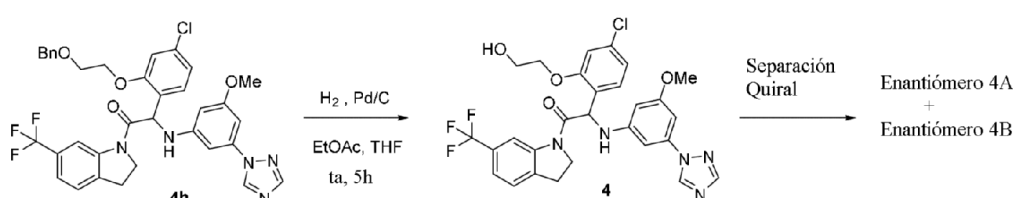
5

**4b****4d****4e**

10



15



20

Síntesis del intermedio 4a:

Se enfrió una disolución del ácido 2-(4-cloro-2-metoxifenil)acético [CAS 170737-95-8] (20 g, 101 mmol) en THF anhidro (300 ml) hasta 0 °C. Se añadió cloruro de oxalilo (18 ml, 202 mmol) y dos gotas de DMF. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 30 min. Se evaporó el disolvente a presión reducida. El residuo se disolvió en etanol (300 ml) y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. La mezcla de reacción se concentró a presión reducida para obtener el 2-(4-cloro-2-metoxifenil)acetato de etilo **4a** (23 g), el cual se utilizó en el siguiente paso sin purificación adicional.

Síntesis del intermedio 4b:

A una disolución de 2-(4-cloro-2-metoxifenil)acetato de etilo **4a** (10 g, 44 mmol) en CH₂Cl₂ (350 ml), enfriada a -30 °C, se añadió gota a gota una disolución 1M de BBr₃ en CH₂Cl₂ (87.5 ml, 87.5 mmol) a la vez que se mantenía la temperatura por debajo de -20 °C. La mezcla de reacción se agitó a -30 °C durante 1 h antes de inactivarla con metanol. El pH se ajustó hasta 8 mediante la adición de una disolución acuosa saturada de NaHCO₃. Se separaron las fases. La fase acuosa se extrajo con CH₂Cl₂. Las fases orgánicas se combinaron, se secaron con MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida para proporcionar 2-(4-cloro-2-hidroxifenil)acetato de etilo **4b** (9.5 g), el cual se utilizó en el siguiente paso sin purificación adicional.

Síntesis del intermediario 4c:

5 A una mezcla de 2-(4-cloro-2-hidroxifenil)acetato de etilo **4b** [CAS 1261826-30-5] (2.82 g, 13.1 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 instantánea 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 **4c** (4.17 g).

Síntesis del intermediario 4d:

15 A una disolución de 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)acetato de etilo **4c** (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 **4d** (3.83 g).

Síntesis del intermediario 4e:

25 Una disolución del ácido 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)acético **4d** (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 **4e** (7.53 g), el cual se utilizó en el siguiente paso sin purificación adicional.

Síntesis del intermediario 4f:

35 A una disolución de cloruro de 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)acetilo **4e** (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 **4f** (6.97 g).

Síntesis del intermedio 4g:

Se agitó una disolución de 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)-1-(6-(trifluorometil)indolin-1-il)etanona **4f** (1.5 g, 3.06 mmol) en 2-Me-THF (125 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 (6.12 ml, 6.12 mmol) y se agitó la mezcla resultante a -78 °C durante 20 minutos. Se añadió clorotrimetilsilano (626 µl, 4.90 mmol) y se agitó la mezcla a -78 °C durante 25 minutos. Se añadió gota a gota una disolución de *N*-bromosuccinimida (599 mg, 3.37 mmol) en 2-Me-THF (50 ml) y se agitó la mezcla de reacción a -78 °C durante 1 hora. Se añadió de una vez una disolución acuosa saturada de NH₄Cl (60 ml), y se agitó la mezcla resultante sin enfriamiento hasta que la temperatura alcanzó 0 °C. Se añadió agua (20 ml) y, tras agitar durante 30 minutos, 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 **4g** (1.16 g). Se usó el producto sin purificación adicional en la siguiente etapa.

Síntesis del intermedio 4h:

A una disolución agitada de 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-bromo-1-(6-(trifluorometil)indolin-1-il)etanona **4g** (1.74 g, 3.06 mmol) en CH₃CN (100 ml) bajo atmósfera de N₂, se añadieron 3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)anilina [CAS 1220630-56-7] (874 mg, 4.59 mmol), y diisopropiletilamina (1.06 ml, 6.12 mmol) y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 20 h y posteriormente a 50 °C durante 7 horas. Se enfrió la mezcla a temperatura ambiente y se vertió en el interior de H₂O en agitación (400 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. Las fracciones deseadas se combinaron y el disolvente se evaporó a presión reducida y se co-evaporó con tolueno. Se secó el residuo a vacío a 50 °C para proporcionar 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometil)indolin-1-il)etanona **4h** (1.43 g).

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

Una disolución de 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometil)indolin-1-il)etanona **4h** (1.43 g, 2.11 mmol) en una mezcla de disolventes de THF (15 ml) en EtOAc (75 ml), se hidrogenó durante 5 h a temperatura ambiente bajo presión atmosférica de H₂ usando Pd/C (0.5 g) como catalizador. Se retiró el catalizador por filtración sobre dicalite®. La torta filtrante se lavó varias veces con THF, y se evaporaron los filtrados combinados a presión reducida. Se agitó el residuo sólido en una mezcla de disolventes de CH₂Cl₂/EtOAc/MeOH 1/2/1. Se filtró el precipitado, se lavó (2x) con EtOAc, y se secó a vacío a 45 °C para proporcionar 2-(4-cloro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometil)indolin-1-il)etanona racémica (Compuesto **4**, 600 mg).

Se separaron los enantiómeros del Compuesto **4** (700 mg) por medio de SFC Quiral de Preparación (Fase estacionaria: Chiralpak® Diacel AD 20 x 250 mm, Fase móvil: CO₂, MeOH/iPrOH (50/50) + 0.4% iPrNH₂). Las fracciones de producto se combinaron y se evaporaron a presión reducida para proporcionar el Enantiómero **4A** como el primer producto eluido y el Enantiómero **4B** como el segundo producto eluido. Ambos enantiómeros se purificaron de forma adicional por medio de cromatografía instantánea sobre gel de sílice (4 g) usando un gradiente de heptano/EtOAc/EtOH 100/0/0 a 40/45/15. Las fracciones deseadas se combinaron y se evaporaron a presión reducida. Se agitó el residuo en agua (3 ml) y MeOH (0.75 ml). Se filtraron los sólidos, se lavaron (3x) con agua, y se secaron a vacío a 50 °C para proporcionar el Enantiómero **4A** (81 mg) y el Enantiómero **4B** (132 mg).

Enantiómero 4A:

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.18 - 3.28 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H) 3.74 - 3.84 (m, 2 H) 4.08 - 4.19 (m, 3 H) 4.44 (td, *J*=10.2, 6.7 Hz, 1 H) 4.96 (t, *J*=5.6 Hz, 1 H) 5.84 (d, *J*=8.6 Hz, 1 H) 6.35 (t, *J*=2.1 Hz, 1 H) 6.66 (t, *J*=1.7 Hz, 1 H) 6.79 - 6.87 (m, 2 H) 7.02 (dd, *J*=8.3, 1.9 Hz, 1 H) 7.15 (d, *J*=1.8 Hz, 1 H) 7.34 - 7.43 (m, 2 H) 7.43 - 7.51 (m, 1 H) 8.15 (s, 1 H) 8.38 (s a, 1 H) 9.12 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-C): TR 1.16 min, MH⁺ 588

[α]_D²⁰: -42.9° (c 0.515, DMF)

SFC quiral (método SFC-K): TR 2.91 min, MH⁺ 588, pureza quiral 100%.

Enantiómero 4B:

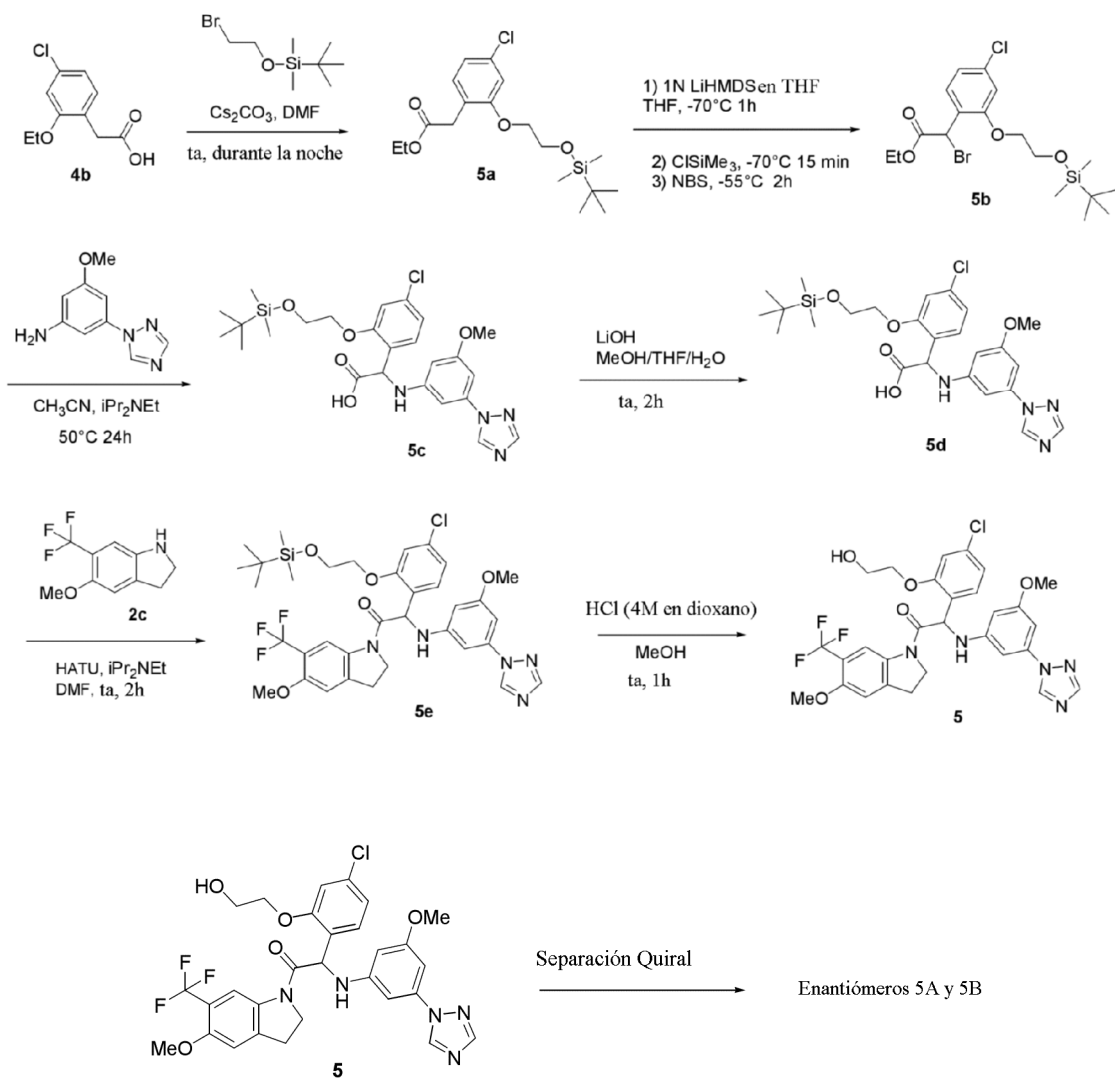
¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.15 - 3.28 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H) 3.74 - 3.84 (m, 2 H) 4.07 - 4.22 (m, 3 H) 4.44 (td, *J*=10.1, 6.6 Hz, 1 H) 4.96 (t, *J*=5.5 Hz, 1 H) 5.84 (d, *J*=8.6 Hz, 1 H) 6.35 (t, *J*=2.0 Hz, 1 H) 6.67 (t, *J*=1.9 Hz, 1 H) 6.79 - 6.87 (m, 2 H) 7.03 (dd, *J*=8.1, 2.0 Hz, 1 H) 7.15 (d, *J*=2.0 Hz, 1 H) 7.34 - 7.42 (m, 2 H) 7.43 - 7.49 (m, 1 H) 8.16 (s, 1 H) 8.38 (s a, 1 H) 9.13 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-C): TR 1.15 min, MH⁺ 588

[α]_D²⁰: +39.5°(c 0.595, DMF)

SFC quiral (método SFC-K): TR 2.78 min, MH⁺ 588, pureza quiral 100%.

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



Síntesis del intermediario 5a:

A una mezcla de 2-(4-cloro-2-hidroxifenil)acetato de etilo **4b** (5.2 g, 24.2 mmol) y carbonato de cesio (15.8 g, 48.5 mmol) en DMF (90 ml) a 10 °C, se 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 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. 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 1 M de bis(trimetilsilil)amida de litio en THF (41.8 ml, 41.8 mmol), enfriada a -70 °C, se añadió una disolución de 2-(2-(2-((*terc*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-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 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-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)anilina [CAS 1220630-56-7] (3 g, 15.8 mmol) y diisopropiletilamina (3.62 ml, 21.0 mmol) en CH₃CN (90 ml) a 50 °C durante 24 h. Se concentró la mezcla de reacción a presión reducida. Se introdujo el residuo en EtOAc y se lavó con HCl 0.5 N, agua y salmuera. 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 80/20 a 70/30) para proporcionar 2-(2-(2-((*terc*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)acetato de etilo **5c** (3.7 g).

Síntesis del intermediario 5d:

Se añadió por partes hidróxido de litio monohidratado (523 mg, 12.5 mmol) en agua (25 ml) a una disolución de 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)acetato de etilo **5c** (3.5 g, 6.24 mmol) en THF/CH₃OH (1/1) (50 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 se concentró el disolvente a presión reducida para proporcionar ácido 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)acético **5d** (3.1 g). El compuesto se usó como tal en la siguiente etapa.

Síntesis del intermediario 5e:

Se agitó una mezcla de ácido 5-metoxi-6-(trifluorometil)indolina **2c** (400 mg, 1.84 mmol), 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)acético **5d** (982 mg, 1.84 mmol), HATU (1.05 g, 2.76 mmol) y diisopropiletilamina (913 µl, 5.53 mmol) en DMF (10 ml) a temperatura ambiente durante 2 h. 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 concentró el disolvente a presión reducida para proporcionar 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-1-(5-metoxi-6-(trifluorometil)indolin-1-il)etanona **5e** (1.35 g). El compuesto se utilizó como tal en el siguiente paso 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 (4.6 ml, 18.4 mmol) a una disolución de 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-1-(5-metoxi-6-(trifluorometil)indolin-1-il)etanona **5e** (1.35 g, 1.84 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). Las fracciones puras se combinaron y se concentraron a sequedad a presión reducida. Se cristalizó el residuo (980 mg) a partir de MeOH para proporcionar 2-(4-cloro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-1-(5-metoxi-6-(trifluorometil)indolin-1-il)etanona **5** (805 mg) en forma de racemato.

Se separaron los enantiómeros del Compuesto **5** (771 mg) por medio de SFC Quiral de Preparación (Fase estacionaria: Chiralpak® IA 5 µm 250x20 mm, Fase móvil: 6% de CH₂Cl₂, 70% de CO₂, 24% de EtOH (+0.3% de iPrNH₂)). El primer enantiómero eluido (375 mg) se solidificó por medio de trituración con éter diisopropílico para proporcionar el Enantiómero **5A** (308 mg). El segundo enantiómero eluido (400 mg) se purificó adicionalmente por cromatografía instantánea sobre gel de sílice (15-40 µm, 24 g, CH₂Cl₂/MeOH 99/1). Se combinaron las fracciones puras y se concentró el disolvente a presión reducida. Se solidificó el residuo (340 mg) por medio de trituración con éter diisopropílico para proporcionar el Enantiómero **5B** (291 mg).

Compuesto 5:

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.15 - 3.30 (m, 2 H) 3.72 (s, 3 H) 3.74 - 3.83 (m, 2 H) 3.85 (s, 3 H) 4.06 - 4.20 (m, 3 H) 4.41 (td, *J*=10.2, 6.3 Hz, 1 H) 4.99 (t, *J*=5.5 Hz, 1 H) 5.82 (d, *J*=8.5 Hz, 1 H) 6.35 (s, 1 H) 6.65 (t, *J*=1.9 Hz, 1 H) 6.80 - 6.85 (m, 2 H) 7.02 (dd, *J*=8.2, 1.9 Hz, 1 H) 7.15 (d, *J*=2.2 Hz, 1 H) 7.24 (s, 1 H) 7.37 (d, *J*=8.5 Hz, 1 H) 8.16 (s, 1 H) 8.34 (s, 1 H) 9.13 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 3.13 min, MH⁺ 618

Punto de fusión: 228°C

Enantiómero 5A:

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.16 - 3.28 (m, 2 H) 3.72 (s, 3 H) 3.74 - 3.83 (m, 2 H) 3.84 (s, 3 H) 4.06 - 4.21 (m, 3 H) 4.35 - 4.46 (m, 1 H) 4.97 (t, *J*=5.6 Hz, 1 H) 5.81 (d, *J*=8.6 Hz, 1 H) 6.35 (s, 1 H) 6.65 (s, 1 H) 6.77 - 6.86 (m, 2 H) 7.02 (dd, *J*=8.3, 1.8 Hz, 1 H) 7.14 (d, *J*=1.5 Hz, 1 H) 7.24 (s, 1 H) 7.38 (d, *J*=8.6 Hz, 1 H) 8.15 (s, 1 H) 8.34 (s, 1 H) 9.12 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 3.11 min, MH⁺ 618

[α]_D²⁰: -40.3° (c 0.2383, DMF)

SFC quiral (método SFC-C): TR 2.75 min, MH⁺ 618, pureza quiral 100%.

Enantiómero 5B:

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.16 - 3.28 (m, 2 H) 3.72 (s, 3 H) 3.74 - 3.83 (m, 2 H) 3.84 (s, 3 H) 4.06 - 4.20 (m, 3 H) 4.36 - 4.46 (m, 1 H) 4.97 (t, *J*=5.6 Hz, 1 H) 5.81 (d, *J*=8.6 Hz, 1 H) 6.35 (s, 1 H) 6.65 (s, 1 H) 6.78 - 6.85 (m, 2 H) 7.01 (dd, *J*=8.3, 1.8

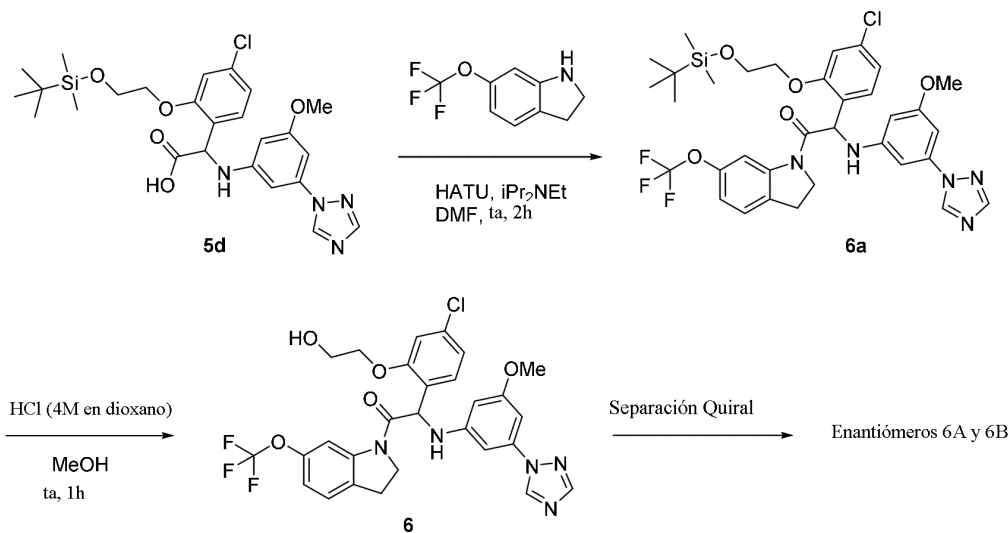
Hz, 1 H) 7.14 (d, J=1.5 Hz, 1 H) 7.24 (s, 1 H) 7.38 (d, J=8.1 Hz, 1 H) 8.15 (s, 1 H) 8.34 (s, 1 H) 9.12 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 3.11 min, MH⁺ 618

[α]_D²⁰: +40.0° (c 0.22, DMF)

SFC quiral (método SFC-C): TR 3.60 min, MH⁺ 618, pureza quiral 98.47%.

Ejemplo 6 (Método 1): síntesis de 2-(4-cloro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etanona (Compuesto **6**) y separación quiral en enantiómeros **6A** y **6B**.



Síntesis del intermedio 6a:

Se agitó una mezcla de ácido 6-(trifluorometoxi)indolina [CAS 959235-95-1] (837 mg, 4.12 mmol), 2-(2-(2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)acético **5d** (2.196 g, 4.12 mmol), HATU (2.35 g, 6.18 mmol) y diisopropiletilamina (2 ml, 12.36 mmol) en DMF (20 ml) a temperatura ambiente durante 2 h. Se diluyó la mezcla con agua. Se introdujo el material gomoso resultante en EtOAc, se lavó con una disolución de K₂CO₃ al 10% en agua, agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía instantánea sobre gel de sílice (15-40 μm, 80 g, gradiente de heptano/EtOAc de 70/30 a 60/40). Se combinaron las fracciones puras y se concentró el disolvente a presión reducida para dar 2-(2-(2-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etanona **6a** (1.65 g).

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

Bajo flujo de N₂, a 5°C, se añadió gota a gota HCl 4 M en dioxano (6.5 ml, 21.6 mmol) a una disolución de 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etanona **6a** (1.85 g, 2.58 mmol) en MeOH (40 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. Se cristalizó el compuesto a partir de CH₂Cl₂ para proporcionar 2-(4-cloro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etanona **6** (1.47 mg) en forma de racemato.

Los enantiómeros del Compuesto **6** se separaron mediante SFC quiral preparativa (Fase estacionaria: Chiralpak® IC 5 µm 250 x 30 mm, Fase móvil: 70% de CO₂, 30% de iPrOH (+0.3% de iPrNH₂)). Se purificó el primer enantiómero eluido (585 mg) por medio de cromatografía instantánea sobre gel de sílice (15-40 µm, 24 g, CH₂Cl₂/MeOH 99/1) para proporcionar, tras solidificación en MeOH/éter diisopropílico/heptano, el Enantiómero **6A** (491 mg). Se purificó el segundo enantiómero eluido (400 mg) por medio de cromatografía instantánea sobre gel de sílice (15-40 µm, 24 g, CH₂Cl₂/MeOH 99/1) para proporcionar, tras solidificación en MeOH/éter diisopropílico/heptano, el Enantiómero **6B** (467 mg).

Compuesto 6:

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.08 - 3.23 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H) 3.75 - 3.84 (m, 2 H) 4.07 - 4.22 (m, 3 H) 4.37 - 4.49 (m, 1 H) 4.94 (s a, 1 H) 5.82 (d, *J*=8.6 Hz, 1 H) 6.35 (s, 1 H) 6.64 - 6.68 (m, 1 H) 6.79 - 6.86 (m, 2 H) 6.98 - 7.05 (m, 2 H) 7.15 (d, *J*=2.0 Hz, 1 H) 7.34 (d, *J*=8.6 Hz, 1 H) 7.37 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 8.04 (s, 1 H) 8.15 (s, 1 H) 9.11 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 3.27 min, MH⁺ 604

Punto de fusión: 161°C

Enantiómero 6A:

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.10 - 3.25 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H) 3.74 - 3.84 (m, 2 H) 4.06 - 4.23 (m, 3 H) 4.39 - 4.48 (m, 1 H) 4.99 (t a, *J*=5.4 Hz, 1 H) 5.83 (d a, *J*=8.5 Hz, 1 H) 6.36 (s a, 1 H) 6.67 (s, 1 H) 6.84 (s, 1 H) 6.88 (d a, *J*=8.5 Hz, 1 H) 7.03 (t a,

$J=7.6$ Hz, 2 H) 7.16 (s, 1 H) 7.36 (dd, $J=11.8$, 8.4 Hz, 2 H) 8.04 (s a, 1 H) 8.17 (s, 1 H) 9.14 (s, 1 H)

5

LC/MS (método LC-A): TR 3.25 min, MH^+ 604

$[\alpha]_D^{20}$: +45.9° (c 0.29, DMF)

10

SFC quiral (método SFC-D): TR 4.20 min, MH^+ 604, pureza quiral 100%.

Enantiómero 6B:

15

^1H RMN (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm 3.09 - 3.25 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H) 3.74 - 3.83 (m, 2 H) 4.06 - 4.21 (m, 3 H) 4.43 (td, $J=10.2$, 6.6 Hz, 1 H) 4.98 (t, $J=5.4$ Hz, 1 H) 5.83 (d, $J=8.5$ Hz, 1 H) 6.35 (s, 1 H) 6.66 (s, 1 H) 6.83 (s, 1 H) 6.88 (d, $J=8.8$ Hz, 1 H) 6.99 - 7.06 (m, 2 H) 7.15 (d, $J=1.6$ Hz, 1 H) 7.36 (dd, $J=12.6$, 8.2 Hz, 2 H) 8.04 (s, 1 H) 8.16 (s, 1 H) 9.14 (s, 1 H)

20

LC/MS (método LC-A): TR 3.31 min, MH^+ 604

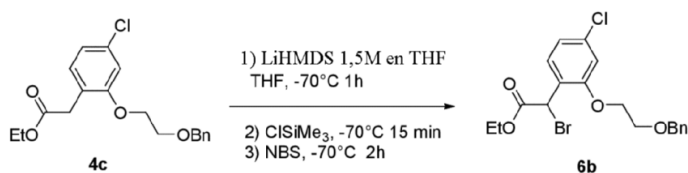
$[\alpha]_D^{20}$: -46.3° (c 0.3, DMF)

SFC quiral (método SFC-D): TR 5.30 min, MH^+ 604, pureza quiral 100%.

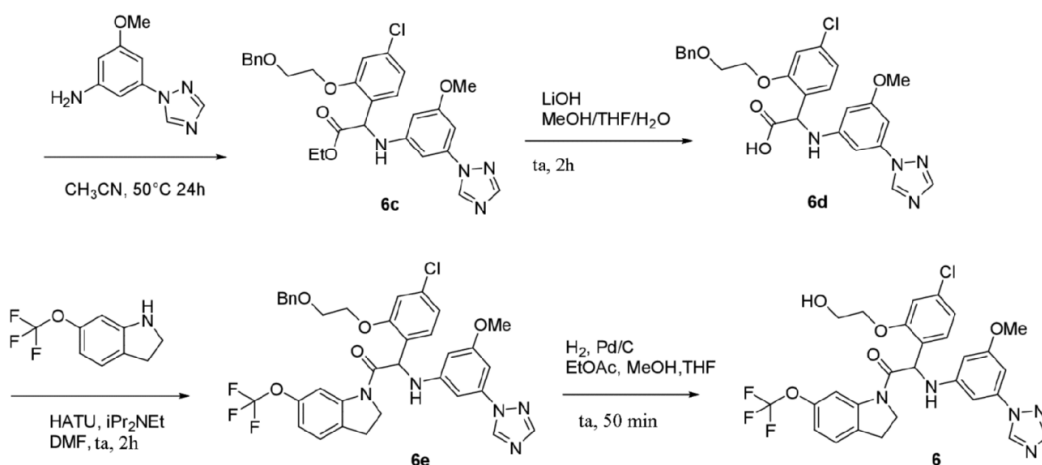
25

Ejemplo 6 (Método 2): síntesis de 2-(4-cloro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etanona (Compuesto 6).

30



35



Síntesis del intermedio 6b:

A una disolución 1.5 M de bis(trimetilsilil)amida de litio en THF (23 ml, 34.4 mmol), enfriada a -70 °C bajo flujo de N₂, se añadió una disolución de 2-(4-cloro-2-hidroxifenil)acetato de etilo **4c** (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 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 intermedio 6c:

Se agitó una mezcla de 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-bromoacetato **6b** (6.5 g, 15.2 mmol), 3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)anilina [CAS 1220630-56-7] (4.6 g, 24.1 mmol) y diisopropiletilamina (5.3 ml, 30.4 mmol) en CH₃CN (130 ml) a 50 °C durante 24 h. Se concentró el disolvente a presión reducida. Se diluyó el residuo con EtOAc. Se filtró la disolución para retirar las partículas sólidas (anilina residual). Se concentró la fase orgánica a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía instantánea sobre gel de sílice (15-40 µm, 120 g, gradiente de heptano/EtOAc de 80/20 a 70/30). Se combinaron las fracciones puras y se retiró el disolvente a presión reducida para proporcionar 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)acetato de etilo **6c** (4.8 g).

Síntesis del intermedio 6d:

A 10 °C, se añadió hidróxido de litio monohidratado (500 mg, 11.9 mmol) a una disolución de 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)acetato de etilo **6c** (3.2 g, 5.96 mmol) en MeOH/THF/agua (1/1/1) (50 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 N y se extrajo con EtOAc. Se combinaron las fases orgánicas, se secaron 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-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)acético **6d** (2.75 g). El compuesto se usó en la siguiente etapa de reacción sin purificación adicional.

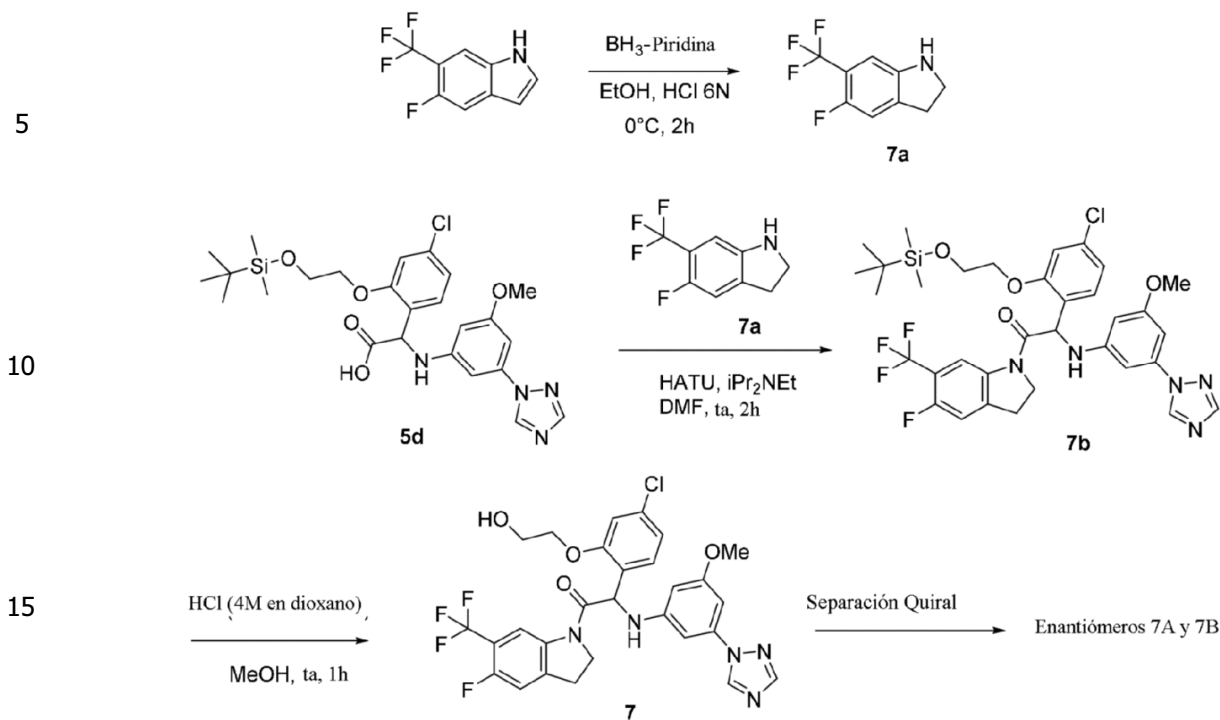
Síntesis del intermedio 6e:

Se agitó una mezcla de ácido 6-(trifluorometoxi)indolina [CAS 959235-95-1] (1.2 mg, 5.89 mmol), ácido 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)acético **6d** (2.5 g, 4.91 mmol), HATU (2.29 g, 6.01 mmol) y diisopropiletilamina (1.99 ml, 12.0 mmol) en DMF (18 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 concentró el disolvente a presión reducida. El compuesto se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (15-40 µm, 220 g, heptano/EtOAc 50/50). Se combinaron las fracciones puras y se concentró el disolvente a presión reducida para dar 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etanona **6e** (2.5 g).

Síntesis del Compuesto 6:

Una disolución de 2-(2-(2-(benciloxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etanona **6e** (2 g, 2.88 mmol) en EtOAc/MeOH/THF (1/1/1) (100 ml), se hidrogenó durante 50 h a presión atmosférica de H₂ con Pd/C (10%)(3.07 g, 2.88 mmol) como catalizador. Se diluyó la reacción con MeOH y se filtró a través de un lecho de Celite®. El filtrado se concentró a presión reducida. Se combinó el residuo (1.42 g) con otro lote (cantidad total: 1.65 g) y se purificó por medio de un SFC aquiral (fase estacionaria: NH₂ 5 µm 150 x 30 mm, fase móvil: 70% de CO₂, 30% de iPrOH (+0.3% de iPrNH₂)). Se combinaron las fracciones puras y se concentró el disolvente a presión reducida para proporcionar 2-(4-cloro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-1-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etanona **6** (1.36 g) en forma de racemato.

Ejemplo 7: síntesis de 2-(4-cloro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-1-(5-fluoro-6-(trifluorometil)indolin-1-il)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)etanona(Compuesto **7**) y separación quiral en los Enantiómeros **7A** y **7B**.



Síntesis del intermedio 7a:

A 0 °C, se añadió gota a gota BH_3 -Piridina (10.45 ml, 103.4 mmol) a una disolución de 5-fluoro-6-(trifluorometil)-1*H*-indol [CAS 1493800-10-4](7 g, 34.5 mmol) en EtOH (45 ml). Se añadió lentamente HCl 6 N (105 ml) mientras se mantenía la temperatura por debajo de 10 °C. La mezcla se agitó a 0 °C durante 2 h. Se añadió agua (210 ml) y la mezcla se basificó a pH 8-9 con una disolución acuosa concentrada de NaOH (la temperatura de reacción se mantuvo por debajo de 20 °C). Se añadió EtOAc. La fase orgánica se separó, se lavó con agua, se secó sobre MgSO_4 , se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. Se co-evaporó el residuo a presión reducida con tolueno. Se purificó la sustancia bruta por medio de cromatografía instantánea sobre gel de sílice (20-45 μm , 120 g, $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 98.5/1.5). Las fracciones puras se combinaron y el disolvente se concentró a presión reducida para dar 5-fluoro-6-(trifluorometil)indolina **7a** (3.5 g).

Síntesis del intermedio 7b:

Se agitó una mezcla de ácido 5-fluoro-6-(trifluorometil)indolina **7a** (385 mg, 1.88 mmol), ácido 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)acético **5d** (1 mg, 1.88 mmol), HATU (1.07 g, 2.814 mmol) y diisopropiletilamina (930 μl , 5.63 mmol) en DMF (10 ml) a temperatura ambiente durante 2 h. Se diluyó la mezcla con agua. Se introdujo el material gomoso resultante en EtOAc. Se lavó la fase orgánica con una disolución al 10% de K_2CO_3 en agua, agua, se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró el disolvente a presión reducida para

proporcionar 2-(2-(2-((*terc*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-clorofenil)-1-((5-fluoro-6-(trifluorometil)indolin-1-il)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)etanona **7b** (1.4 g).

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

Bajo un flujo de N₂, a 5°C, se añadió gota a gota HCl 4M en dioxano (4.9 ml, 19.4 mmol) a una disolución de 2-(2-(2-((*terc*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-clorofenil)-1-((5-fluoro-6-(trifluorometil)indolin-1-il)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino) etanona **7b** (1.4 g, 1.94 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: 98/2). Se combinaron las fracciones puras y se concentró el disolvente a presión reducida para proporcionar 2-(4-cloro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-1-(5-fluoro-6-(trifluorometil)indolin-1-il)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)etanona **7** (737 mg) en forma de racemato.

Los enantiómeros del Compuesto **7** se separaron mediante SFC quiral preparativa (Fase estacionaria: Chiralpak® AD-H 5 µm 250 x 30 mm, Fase móvil: 60% de CO₂, 40% de EtOH (+0.3% de *i*PrNH₂)). El primer enantiómero eluido (325 mg) se cristalizó a partir de éter diisopropílico/éter de petróleo para dar el Enantiómero **7A** (244 mg). El segundo enantiómero eluido (310 mg) se cristalizó en éter diisopropílico/éter de petróleo para dar el Enantiómero **7B** (220 mg).

Compuesto 7:

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.19 – 3.30 (m, 2 H) 3.63 - 3.87 (m, 5 H) 4.05 - 4.24 (m, 3 H) 4.40 – 4.49 (m, 1 H) 4.97 (s a, 1 H) 5.83 (d a, *J*=6.9 Hz, 1 H) 6.35 (s a, 1 H) 6.67 (s a, 1 H) 6.80 – 6.89 (m, 2 H) 7.03 (d a, *J*=7.3 Hz, 1 H) 7.15 (s a, 1 H) 7.37 (d a, *J*=7.6 Hz, 1 H) 7.47 (d a, *J*=9.5 Hz, 1 H) 8.16 (s a, 1 H) 8.39 (d a, *J*=4.4 Hz, 1 H) 9.14 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-B): TR 3.14 min, MH⁺ 606

Punto de fusión: 140°C

Enantiómero 7A:

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.20 - 3.30 (m, 2 H) 3.69 - 3.86 (m, 5 H) 4.06 - 4.23 (m, 3 H) 4.40 - 4.50 (m, 1 H) 4.98 (t a, *J*=5.2 Hz, 1 H) 5.83 (d a, *J*=8.8 Hz, 1 H) 6.35 (s a, 1 H) 6.67 (s, 1 H) 6.82 - 6.89 (m, 2 H) 7.03 (d a, *J*=8.2 Hz, 1 H) 7.16 (s, 1 H) 7.37 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 7.47 (d a, *J*=10.1 Hz, 1 H) 8.17 (s, 1 H) 8.39 (d a, *J*=6.3 Hz, 1 H) 9.14 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 3.27 min, MH⁺ 606

[α]_D²⁰: -44.3° (c 0.282, DMF)

SFC quiral (método SFC-B): TR 2.89 min, MH⁺ 606, pureza quiral 100%.

Punto de fusión: 166°C

Enantiómero 7B:

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.18 - 3.30 (m, 2 H) 3.69 - 3.86 (m, 5 H) 4.07 - 4.22 (m, 3 H) 4.40 - 4.50 (m, 1 H) 4.97 (t a, *J*=5.2 Hz, 1 H) 5.83 (d a, *J*=8.8 Hz, 1 H) 6.35 (s a, 1 H) 6.67 (s, 1 H) 6.81 - 6.89 (m, 2 H) 7.03 (d a, *J*=8.2 Hz, 1 H) 7.16 (s, 1 H) 7.37 (d a, *J*=8.2 Hz, 1 H) 7.47 (d a, *J*=10.1 Hz, 1 H) 8.17 (s, 1 H) 8.39 (d a, *J*=6.3 Hz, 1 H) 9.14 (s, 1 H)

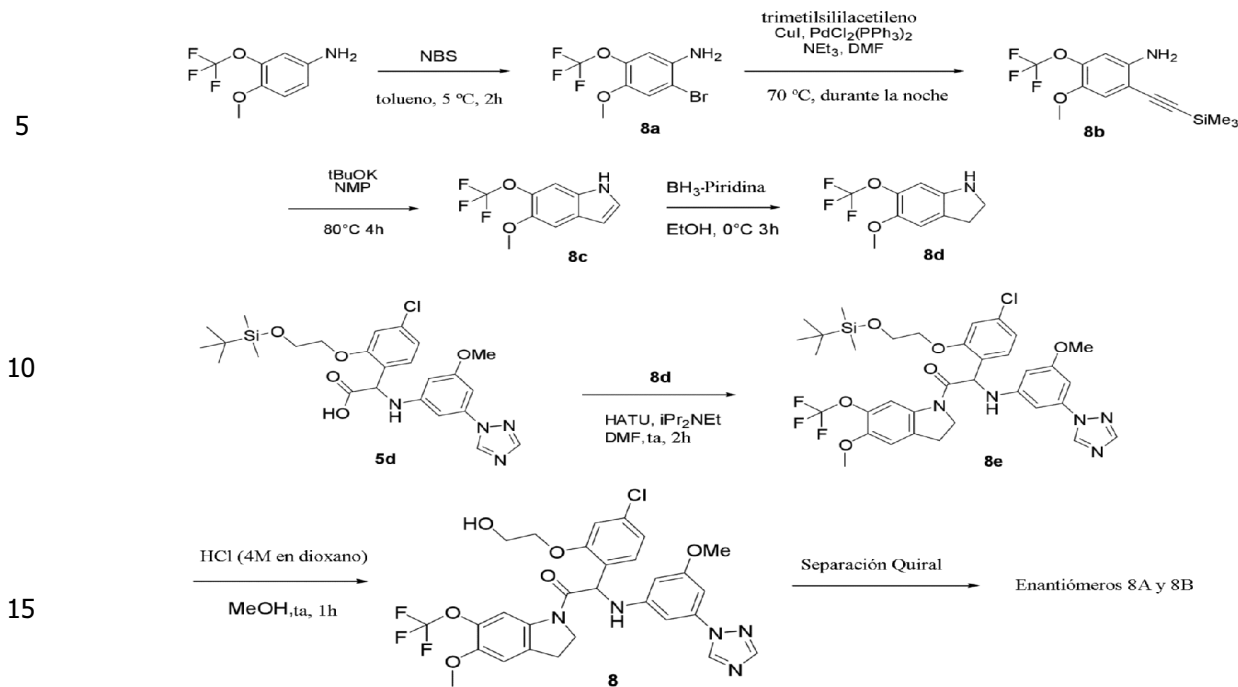
LC/MS (método LC-A): TR 3.27 min, MH⁺ 606

[α]_D²⁰: +35.6° (c 0.281, DMF)

SFC quiral (método SFC-B): TR 4.92 min, MH⁺ 606, pureza quiral 100%.

Punto de fusión: 100°C

Ejemplo 8: síntesis de 2-(4-cloro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-1-(5-metoxi-6-(trifluorometil)indolin-1-il)etanona (Compuesto **8**) y separación quiral en Enantiómeros **8A** y **8B**.



Síntesis del intermedio 8a:

Una solución de 4-metoxi-3-(trifluorometoxi)anilina [CAS 647855-21-8] (3.1 g, 15.0 mmol) en tolueno (50 ml) se trató con *N*-bromosuccinimida (2.8 g, 15.7 mmol) a 5 °C y la mezcla resultante se agitó a 5-10 °C durante 2 h. La mezcla se diluyó con agua y se extrajo con EtOAc. Los extractos orgánicos combinados se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se evaporaron a presión reducida. La purificación se realizó mediante cromatografía instantánea sobre gel de sílice (15-40 μm, 24 g, gradiente de 95/5 a 90/10 de heptano/EtOAc). Las fracciones puras se combinaron y se evaporaron a sequedad para dar 2-bromo-4-metoxi-5-(trifluorometoxi)anilina **8a** (2.5 g).

Síntesis del intermedio 8b:

Una solución de 2-bromo-4-metoxi-5-(trifluorometoxi)anilina **8a** (2.72 g, 9.51 mmol) en DMF (30 ml) se desgasificó con N₂ durante 15 min. Se añadieron diclorobis(trifenilfosfina)paladio (II) (667 mg, 0.95 mmol), yoduro de cobre (I) (362 mg, 1.90 mmol), trietilamina (3.96 ml, 28.53 mmol) y trimetilsililacetileno (3.95 ml, 28.5 mmol). Se calentó la mezcla de reacción a 70 °C durante 12 h bajo un flujo de N₂. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó con H₂O y 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 ultrarrápida en gel de sílice (15-40 μm, 80 g, heptano/EtOAc 85/15). Las fracciones puras se combinaron y se evaporaron a sequedad para dar 4-metoxi-5-(trifluorometoxi)-2-((trimetilsilil)etinil)anilina **8b** (1.4 g).

Síntesis del intermediario 8c:

A una solución de 4-metoxi-5-(trifluorometoxi)-2-((trimetilsilil)etnil)anilina **8b** (1.2 g, 3.96 mmol) en NMP (11 ml) en un flujo de N₂ se añadió *t*BuOK (1.33 g, 11.9 mmol) en una porción. Se calentó la mezcla de reacción a 80 °C durante 4 h, se vertió sobre hielo/agua y se acidificó con HCl 3 N hasta pH 4-5. Se extrajo la mezcla de reacción con EtOAc. Las fases orgánicas se combinaron, se lavaron con H₂O, se secaron sobre MgSO₄, se filtraron y se concentraron a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (15-40 µm, 40 g, heptano/EtOAc 85/15). Las fracciones puras se combinaron y se evaporaron a sequedad para dar 5-metoxi-6-(trifluorometoxi)-1*H*-indol **8c** (490 mg).

Síntesis del intermediario 8d:

A 0 °C, se añadió gota a gota BH₃-Piridina (10.5 ml, 103.8 mmol) a una disolución de 5-metoxi-6-(trifluorometoxi)-1*H*-indol **8c** (8 g, 34.6 mmol) en EtOH (45 ml). Se añadió gota a gota HCl 6 N (6 ml) mientras se mantenía la temperatura por debajo de 10 °C. La mezcla se agitó a 0 °C durante 3 h. Se añadió agua (210 ml) y la mezcla se basificó hasta pH 8-9 con una solución concentrada de NaOH en agua (la temperatura de reacción se mantuvo por debajo de 20 °C). La mezcla se extrajo con EtOAc. La fase orgánica se lavó con agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. Se añadió tolueno y la solución se concentró a presión reducida para dar 7.5 g de 5-metoxi-6-(trifluorometoxi)indolina **8d** (7.5 g).

Síntesis del intermediario 8e:

Se agitó una mezcla de 5-metoxi-6-(trifluorometoxi)indolina **8d** (437 mg, 1.88 mmol), ácido 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)acético **5d** (1 mg, 1.88 mmol), HATU (1.07 g, 2.81 mmol) y diisopropiletilamina (930 µl, 5.63 mmol) en DMF (10 ml) a temperatura ambiente durante 2 h. Se diluyó la mezcla con agua. Se introdujo el material gomoso resultante en EtOAc. Se lavó la fase orgánica con una disolución al 10% de K₂CO₃ en agua, 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-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-1-(5-metoxi-6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etanona **8e** (1.5 g). El compuesto se utilizó como tal en el siguiente paso de reacción.

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

Bajo un flujo de N₂, a 5°C, se añadió gota a gota HCl 4M en dioxano (4.9 ml, 19.4 mmol) a una disolución de 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-1-(5-metoxi-6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etanona **8e** (1.4 g, 1.94 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/MeOH/NH₄OH 98.4/1.5/0.1). Se combinaron las fracciones puras y se concentró el disolvente a presión reducida para proporcionar, tras la cristalización de CH₂Cl₂, 2-(4-cloro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-1-(5-metoxi-6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etanona **8** (850 mg) en forma de racemato.

Los enantiómeros del Compuesto **8** se separaron mediante SFC quiral preparativa (Fase estacionaria: Chiralpak® IC 5 µm 250 x 30 mm, Fase móvil: 60% de CO₂, 40% de iPrOH). El primer enantiómero eluido (410 mg) se solidificó por medio de trituración con éter diisopropílico para proporcionar el Enantiómero **8A** (314 mg). Se solidificó el segundo enantiómero eluido (388 mg) por medio de trituración con éter diisopropílico para proporcionar el Enantiómero **8B** (300 mg).

Compuesto **8**:

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.07 - 3.27 (m, 2 H) 3.70 - 3.85 (m, 8 H) 4.07 - 4.19 (m, 3 H) 4.35 - 4.45 (m, 1 H) 4.97 (t, *J*=5.6 Hz, 1 H) 5.80 (d, *J*=8.6 Hz, 1 H) 6.34 (s, 1 H) 6.63 - 6.67 (m, 1 H) 6.80 - 6.87 (m, 2 H) 7.02 (dd, *J*=8.1, 2.0 Hz, 1 H) 7.14 (d, *J*=2.0 Hz, 1 H) 7.20 (s, 1 H) 7.37 (d, *J*=8.6 Hz, 1 H) 8.06 (s, 1 H) 8.15 (s, 1 H) 9.12 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 3.20 min, MH⁺ 634

Punto de fusión: 181°C

Enantiómero **8A**:

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 3.09 - 3.26 (m, 2 H) 3.70 - 3.85 (m, 8 H) 4.08 - 4.20 (m, 3 H) 4.40 (td, *J*=10.3, 6.5 Hz, 1 H) 4.99 (t a, *J*=5.4 Hz, 1 H) 5.81 (d, *J*=8.5 Hz, 1 H) 6.35 (s, 1 H) 6.66 (s, 1 H) 6.83 (s, 1 H) 6.86 (d, *J*=8.8 Hz, 1 H) 7.03 (dd, *J*=8.2, 1.3

Hz, 1 H) 7.15 (d, $J=1.6$ Hz, 1 H) 7.21 (s, 1 H) 7.38 (d, $J=8.2$ Hz, 1 H) 8.07 (s, 1 H) 8.16 (s, 1 H) 9.13 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-B): TR 3.09 min, MH^+ 634

$[\alpha]_D^{20}$: +39.3° (c 0.3, DMF)

SFC quiral (método SFC-E): TR 3.39 min, MH^+ 634, pureza quiral 100%.

Enantiómero 8B:

^1H RMN (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm 3.09 - 3.27 (m, 2 H) 3.70 - 3.85 (m, 8 H) 4.06 - 4.19 (m, 3 H) 4.40 (td, $J=10.2, 6.6$ Hz, 1 H) 4.99 (t a, $J=5.2$ Hz, 1 H) 5.81 (d, $J=8.5$ Hz, 1 H) 6.35 (s, 1 H) 6.66 (s, 1 H) 6.83 (s, 1 H) 6.86 (d, $J=8.8$ Hz, 1 H) 7.03 (dd, $J=8.2, 1.6$ Hz, 1 H) 7.15 (d, $J=1.6$ Hz, 1 H) 7.21 (s, 1 H) 7.38 (d, $J=8.2$ Hz, 1 H) 8.07 (s, 1 H) 8.16 (s, 1 H) 9.13 (s, 1 H)

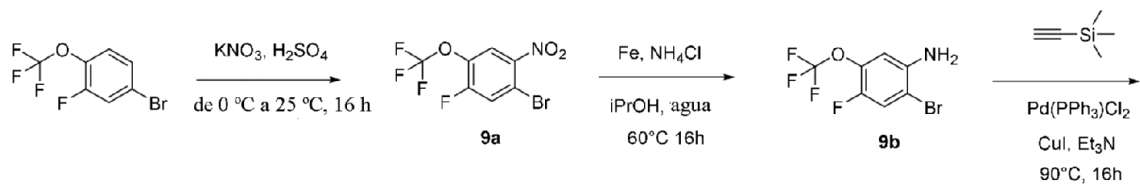
LC/MS (método LC-A): TR 3.07 min, MH^+ 634

$[\alpha]_D^{20}$: -44.4° (c 0.295, DMF)

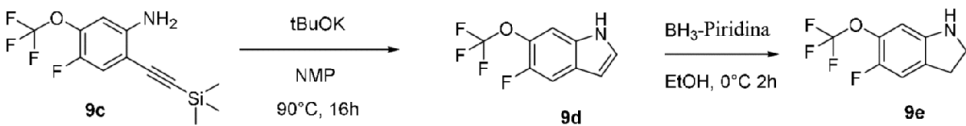
SFC quiral (método SFC-E): TR 5.69 min, MH^+ 634, pureza quiral 100%.

Ejemplo 9: síntesis de 2-(4-cloro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-1-(5-fluoro-6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)etanona(Compuesto **9**) y separación quiral en los Enantiómeros **9A** y **9B**.

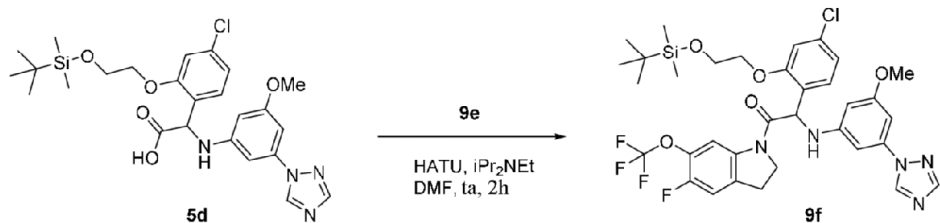
5



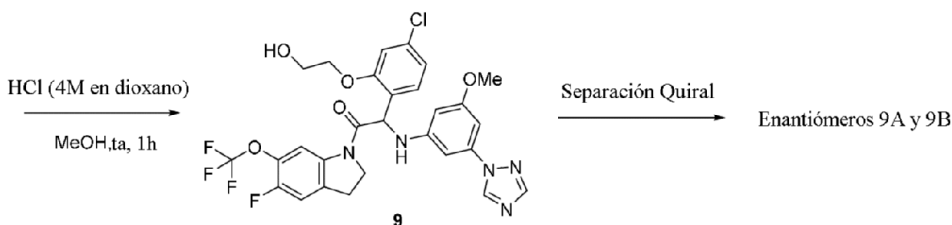
10



15



20



Síntesis del intermedio 9a:

25

30

35

Se enfrió una disolución de 4-bromo-2-fluoro-1-(trifluorometoxi)benceno [CAS 105529-58-6] (98.7 g, 381.1 mmol) en H_2SO_4 concentrado(98%, 200 ml), a 0 °C con un baño de hielo. Se añadió KNO_3 (43.0 g, 425.3 mmol) por partes. Tras la adición, se retiró el baño de hielo y se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 16 h. Se vertió la mezcla de reacción en agua-hielo (2 l) al tiempo que se agitaba. La mezcla se extrajo con CH_2Cl_2 (3 x 500 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con una disolución acuosa saturada de NaHCO_3 (2x 500 ml), salmuera (500 ml), se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró a presión reducida para permitir la obtención de 1-bromo-5-fluoro-2-nitro-4-(trifluorometoxi)benceno **9a** (117.2 g), que se usó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Síntesis del intermedio 9b:

A una suspensión agitada de 1-bromo-5-fluoro-2-nitro-4-(trifluorometoxi)benceno **9a** (70.0 g, 230 mmol) y NH_4Cl (123.2 g, 2.30 mol) en $i\text{PrOH}$ (1 l) y agua (330 ml) se añadió un polvo de hierro reductor (64.3 g, 1.15 mol) bajo atmósfera de N_2 . La mezcla de reacción se agitó a 60 °C durante 16 h. La mezcla de reacción se diluyó con EtOAc (1 l) y se filtró sobre Celite®. El filtrado se concentró a presión reducida. Se separó el residuo entre EtOAc (1 l) y agua (800 ml). Se separaron las fases y se lavó la fase

orgánica con salmuera (1 l), se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró a presión reducida. Se purificó el residuo por medio de destilación a presión reducida (bomba de aceite, punto de ebullición 60~64 °C). Se obtuvo 2-bromo-4-fluoro-5-(trifluorometoxi)anilina **9b** (47.3 g) en forma de aceite amarillo.

Síntesis del intermediario 9c:

A una mezcla de 2-bromo-4-fluoro-5-(trifluorometoxi)anilina **9b** (18.4 g, 67.2 mmol), se etinil(trimetil)silano (19.9 g, 202.4 mmol, 28.00 ml) en Et_3N (300 ml), se añadió CuI (1.28 g, 6.72 mmol) y $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ (2.40 g, 3.42 mmol). Se calentó la mezcla de reacción bajo atmósfera de N_2 a 90 °C durante 16 h. Tras enfriar a temperatura ambiente, se diluyó la mezcla con MTBE (300 ml) y se filtró a través de Celite®. El filtrado se concentró a presión reducida. Se purificó el residuo por medio de cromatografía instantánea sobre gel de sílice (ISCO®, 220 g Columna SepaFlash® Silica Flash, eluyente: gradiente de 0 a 5% de EtOAc en éter de petróleo a 100ml/min). Se obtuvo 4-fluoro-5-(trifluorometoxi)-2-((trimetilsilil)etinil)anilina **9c** (16.1 g, 90% de pureza) en forma de aceite marrón.

Síntesis del intermediario 9d:

Se calentó una mezcla de 4-fluoro-5-(trifluorometoxi)-2-((trimetilsilil)etinil)anilina **9c** (16.1 g, 55.3 mmol) y tBuOK (18.6 g, 165.8 mmol) en NMP (220.00 ml) a 90 °C durante 16 horas bajo atmósfera de N_2 . Tras enfriar a temperatura ambiente, se vertió la mezcla de reacción en hielo-agua (1 l) y se sometió a extracción con MTBE (3 x 300 ml). Se lavaron las fases orgánicas combinadas con agua (2x 200 ml), salmuera (300 ml), se secaron sobre MgSO_4 , se filtraron y se concentraron a presión reducida. Se purificó el residuo por medio de cromatografía instantánea sobre gel de sílice (ISCO®, 120 g Columna SepaFlash® Silica Flash, eluyente: gradiente de 0 a 5% de EtOAc en éter de petróleo a 85 ml/min) para permitir la obtención de 5-fluoro-6-(trifluorometoxi)-1*H*-indol **9d** (11 g) en forma de producto de aceite de color verde oscuro. Se combinó el residuo con otra fracción (cantidad total = 17.2 g) y se purificó de forma adicional por medio de destilación a presión reducida (bomba de aceite, punto de ebullición 60~64 °C) para proporcionar 5-fluoro-6-(trifluorometoxi)-1*H*-indol **9d** (14.7 g, 95% de pureza) en forma de aceite incoloro.

Síntesis del intermediario 9e:

A 0 °C, se añadió gota a gota BH_3 -Piridina (13.8 ml, 136.9 mmol) a una disolución de 5-fluoro-6-(trifluorometoxi)-1*H*-indol **9d** (6 g, 27.4 mmol) en EtOH (40 ml). Se añadió gota a gota HCl 6 N (90 ml) mientras se mantenía la temperatura por debajo de 10 °C.

La mezcla se agitó a 0 °C durante 2 h. Se añadió agua (100 ml) y la mezcla se basificó hasta pH 8-9 con una disolución concentrada de NaOH en agua (la temperatura de reacción se mantuvo por debajo de 20 °C). La mezcla se extrajo con CH₂Cl₂. La fase orgánica se lavó con agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. Se añadió tolueno y la disolución se concentró a presión reducida para dar 5.52 g de 5-fluoro-6-(trifluorometoxi)indolina **9e**. El compuesto se usó en la siguiente etapa de reacción sin purificación adicional.

Síntesis del intermedio **9f**:

Se agitó una mezcla de 5-fluoro-6-(trifluorometoxi)indolina **9e** (169 mg, 0.76 mmol), ácido 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)acético **5d** (407 mg, 0.76 mmol), HATU (435 g, 1.15 mmol) y diisopropiletilamina (379 µl, 2.29 mmol) en DMF (3.9 ml) a temperatura ambiente durante 2 h. Se diluyó la mezcla con agua. Se introdujo el material gomoso resultante en EtOAc. Se lavó la disolución orgánica con una disolución de K₂CO₃ al 10% en agua, agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (15-40 µm, 24 g, heptano/EtOAc 70/30). Se combinaron las fracciones puras y se concentró el disolvente a presión reducida para dar 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-clorofenil)-1-(5-fluoro-6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)etanona **9f** (257 mg).

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

Bajo un flujo de N₂, a 5°C, se añadió gota a gota HCl 4 M en dioxano (873 µl, 3.49 mmol) a una disolución de 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-clorofenil)-1-(5-fluoro-6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)etanona **9f** (257 g, 0.35 mmol) en MeOH (4 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. La fase orgánica se separó, se lavó con agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en gel de sílice (15-40 µm, 12 g, CH₂Cl₂/heptano: 98.5/1.5). Se combinaron las fracciones puras y se concentró el disolvente a presión reducida para proporcionar 2-(4-cloro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-1-(5-fluoro-6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)etanona **9** (210 mg) en forma de racemato. Se purificó de forma adicional una pequeña fracción (17 mg) por medio de cromatografía de fase inversa (Fase estacionaria: YMC-actus Triart-C18 10 µm 30 x 150mm, Fase móvil: Gradiente

de 50% de NH_4HCO_3 al 0.2%, 50% de CH_3CN a 0% de NH_4HCO_3 al 0.2%, 100% de CH_3CN) para permitir 7 mg. Se solidificó el residuo por medio de liofilización a partir de una mezcla de CH_3CN (1 ml) y agua (4 ml).

Se separaron los enantiómeros del Compuesto **9** (190 mg) por medio de SFC Quiral de Preparación (Fase estacionaria: Chiralpak® AD-H 5 μm 250 x 30 mm, Fase móvil: 65% de CO_2 , 35% de EtOH (+0.3% de $i\text{PrNH}_2$)). Se disolvió el primer enantiómero eluido (58 mg) en CH_3CN (2 ml), se añadió agua (8 ml) y se liofilizó la mezcla para proporcionar el Enantiómero **9A** (58 mg) en forma de polvo. Se disolvió el segundo enantiómero eluido (59 mg) en CH_3CN (2 ml), se añadió agua (8 ml) y se liofilizó la mezcla para proporcionar el Enantiómero **9B** (59 mg) en forma de polvo.

Compuesto 9:

^1H RMN (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 3.13 - 3.30 (m, 2 H) 3.72 (s, 3H) 3.70 - 3.80 (m, 2 H) 4.06 - 4.22 (m, 3 H) 4.42 (td, $J=10.4$, 6.3 Hz, 1 H) 4.97 (s a, 1 H) 5.82 (d, $J=8.5$ Hz, 1 H) 6.34 (s, 1 H) 6.66 (t, $J=1.9$ Hz, 1 H) 6.82 (s, 1 H) 6.87 (d, $J=8.2$ Hz, 1 H) 7.03 (dd, $J=8.2$, 1.9 Hz, 1 H) 7.15 (d, $J=2.2$ Hz, 1 H) 7.36 (d, $J=8.2$ Hz, 1 H) 7.45 (d, $J=9.8$ Hz, 1 H) 8.14 - 8.18 (m, 2 H)

LC/MS (método LC-A): TR 3.32 min, MH^+ 622

Enantiómero 9A:

^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 3.12 - 3.28 (m, 2 H) 3.72 (s, 3H) 3.69 - 3.82 (m, 2 H) 3.99 - 4.22 (m, 3 H) 4.42 (td, $J=10.0$, 6.8 Hz, 1 H) 4.96 (t, $J=5.3$ Hz, 1 H) 5.81 (d, $J=9.1$ Hz, 1 H) 6.34 (s, 1 H) 6.66 (t, $J=1.8$ Hz, 1 H) 6.80 - 6.88 (m, 2 H) 7.02 (dd, $J=8.1$, 2.0 Hz, 1 H) 7.15 (d, $J=2.0$ Hz, 1 H) 7.36 (d, $J=8.6$ Hz, 1 H) 7.45 (d, $J=10.1$ Hz, 1 H) 8.13 - 8.18 (m, 2 H) 9.13 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-B): TR 3.17 min, MH^+ 622

$[\alpha]_D^{20}$: -35.1° (c 0.276, DMF)

SFC quiral (método SFC-B): TR 2.75 min, MH^+ 622, pureza quiral 100%.

Enantiómero 9B:

^1H RMN (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ ppm 3.12 - 3.28 (m, 2 H) 3.72 (s, 3H) 3.69 - 3.82 (m, 2 H) 3.99 - 4.22 (m, 3 H) 4.42 (td, $J=10.0$, 6.8 Hz, 1 H) 4.96 (t, $J=5.3$ Hz, 1 H) 5.81 (d, $J=9.1$ Hz, 1 H) 6.34 (s, 1 H) 6.66 (t, $J=1.8$ Hz, 1 H) 6.80 - 6.88 (m, 2 H) 7.02 (dd, $J=8.1$,

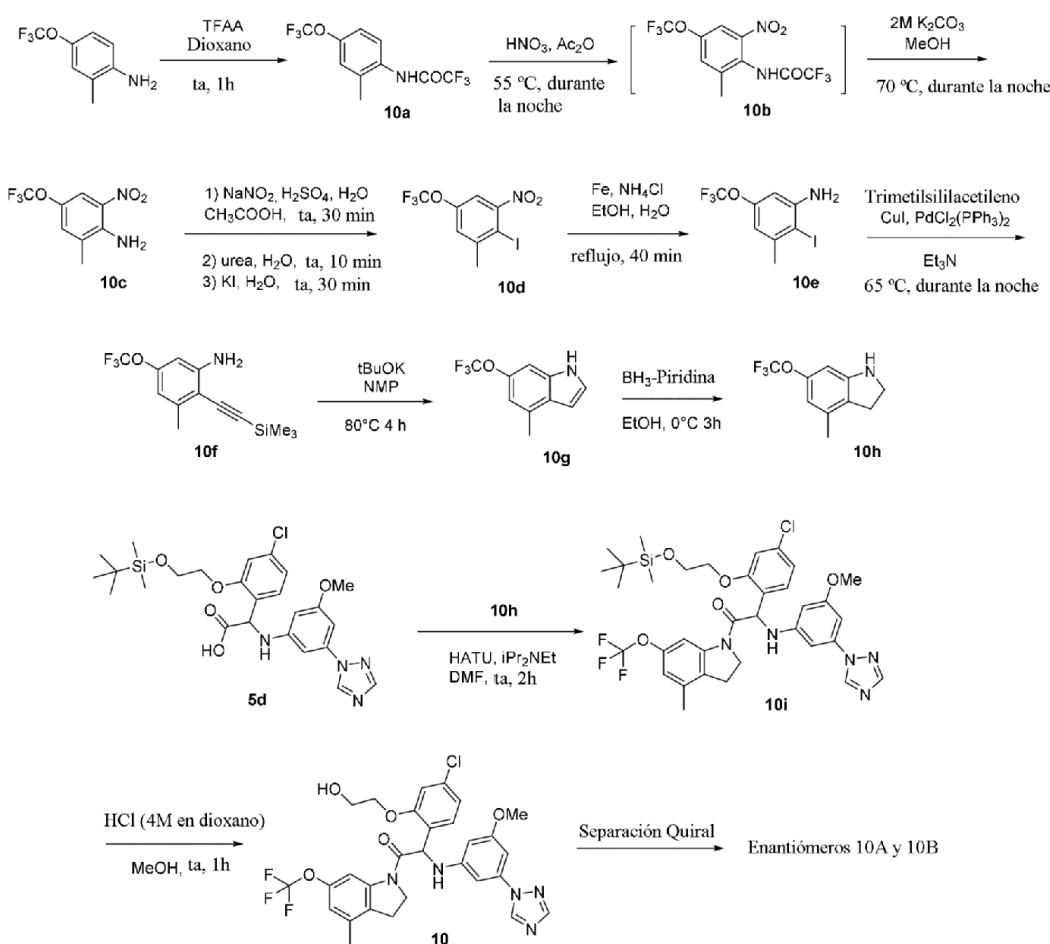
2.0 Hz, 1 H) 7.15 (d, *J*=2.0 Hz, 1 H) 7.36 (d, *J*=8.6 Hz, 1 H) 7.45 (d, *J*=10.1 Hz, 1 H)
8.13 - 8.18 (m, 2 H) 9.13 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-B): TR 3.17 min, MH⁺ 622

[α]_D²⁰: +32.3° (c 0.254, DMF)

SFC quiral (método SFC-B): TR 3.75 min, MH⁺ 622, pureza quiral 100%.

Ejemplo 10: síntesis de 2-(4-cloro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-1-(4-metil-6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etanona (Compuesto **10**) y separación quiral en Enantiómeros **10A** y **10B**.



Síntesis del intermedio 10a:

A una disolución de 2-metil-4-(trifluorometoxi)anilina [CAS 86256-59-9] (10.0 g, 52.3 mmol) en dioxano (20 ml) se añadió anhídrido trifluoroacético (8 ml, 57.2 mmol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 1 h. Se concentró la solución a presión reducida. El residuo se repartió entre EtOAc y HCl 1 N. Se separaron las fases. Se lavó la fase orgánica con disolución saturada de NaHCO₃ en agua, H₂O y salmuera, se secó sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida para permitir la obtención de 14.7 g de 2,2,2-trifluoro-*N*-(2-metil-4-

(trifluorometoxi)fenil)acetamida **10a** en forma de polvo blanco. Se usó el compuesto en la siguiente etapa sin purificación adicional.

5

Síntesis del intermediario 10c:

A anhídrido acético (11.4 ml, 61.1 mmol), enfriado a 0 °C, se añadió gota a gota ácido nítrico al 70% (3.9 ml). Se añadió gota a gota 2,2,2-trifluoro-*N*-(2-metil-4-(trifluorometoxi)fenil)-acetamida **10a** (5 g, 17.4 mmol) y se calentó la mezcla de reacción a 55 °C durante 12 h. Tras el enfriamiento a temperatura ambiente, se diluyó la mezcla con EtOAc y se lavó con H₂O. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó con Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. El residuo se disolvió en metanol (46 ml). Se añadió K₂CO₃ 2 M (23 ml, 46 mmol) y se calentó la mezcla de reacción a 70 °C durante 4 h. Se añadió más K₂CO₃ 2 M (10 ml, 20 mmol) y se calentó la mezcla de reacción a 70 °C durante 12 h. Se concentró parcialmente la mezcla de reacción a presión reducida para retirar el metanol. Se extrajo el residuo con EtOAc. La fase orgánica se lavó con 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 20% a 50%) en heptano para obtener 3.6 g de 2-metil-6-nitro-4-(trifluorometoxi)anilina **10c** en forma de sólido amarillo.

25

Síntesis del intermediario 10d:

A una disolución de 2-metil-6-nitro-4-(trifluorometoxi)anilina **10c** (1.8 g, 7.69 mmol) en ácido acético (10.9 ml), se añadió gota a gota una disolución de nitrito de sodio (0.806 g, 11.7 mmol) en H₂SO₄/H₂O (2 ml, 1/1). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadieron H₂O (22 ml) y urea (0.802 g, 13.4 mmol). Transcurridos 10 minutos a temperatura ambiente, se añadió gota a gota una disolución de yoduro de potasio (1.7 g, 10.2 mmol) en H₂O (11 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se filtró el sólido amarillo, se lavó con H₂O y se secó para proporcionar 2.4 g of 2-yodo-1-metil-3-nitro-5-(trifluorometoxi)benceno **10d**.

35

Síntesis del intermediario 10e:

A una disolución de 2-yodo-1-metil-3-nitro-5-(trifluorometoxi)benceno **10d** (3.5 g, 10.0 mmol) en EtOH (30 ml), se añadió una disolución de NH₄Cl (2.7 g, 49.9 mmol) en H₂O (30 ml). Se calentó la mezcla de reacción a 50 °C. Se añadió hierro (2.6 g, 46.9 mmol) y se calentó la mezcla de reacción a reflujo durante 40 minutos. Tras enfriar a temperatura ambiente, se filtró la mezcla de reacción a través de celite®. Se lavaron

los sólidos con EtOH. Se concentró el filtrado parcialmente a presión reducida para retirar EtOH. Se separó el residuo entre EtOAc y una disolución saturada de NaHCO₃ en agua. Se separaron las fases. La fase orgánica se lavó con 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 0% a 25%) en heptano para obtener 2.9 g de 2-yodo-3-metil-5-(trifluorometoxi)anilina **10e** en forma de aceite amarillo.

Síntesis del intermediario 10f:

Una disolución de 2-yodo-3-metil-5-(trifluorometoxi)anilina **10e** (2.9 g, 9.1 mmol) en trietilamina (23 ml), se desgasificó con argón durante 15 minutos. Se añadieron diclorobis(trifenilfosfina)paladio(II) (0.327 g, 0.47 mmol), yoduro de cobre(I) (0.164 g, 0.86 mmol) y trimetilsililacetileno (1.8 ml, 13.1 mmol). Se calentó la mezcla de reacción a 65 °C durante 12 horas. Tras enfriar a temperatura ambiente, se diluyó la mezcla de reacción con H₂O y se extrajo con EtOAc (3x). Se combinaron las fases orgánicas, se lavaron con H₂O y salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. Se purificó el residuo por medio de cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de EtOAc (de 0% a 20%) en heptano para permitir 2.6 g de 3-metil-5-(trifluorometoxi)-2-((trimetilsilil)etnil)anilina **10f** en forma de aceite naranja.

Síntesis del intermediario 10g:

A una disolución de 3-metil-5-(trifluorometoxi)-2-((trimetilsilil)etnil)anilina **10f** (2.7 g, 9.3 mmol) en NMP (27 ml), se añadió *t*BuOK (3.1 g, 27.8 mmol). Se calentó la mezcla de reacción a 80 °C durante 4 horas. Tras enfriar a temperatura ambiente, se diluyó la mezcla de reacción con H₂O y se extrajo con EtOAc (2x). Se combinaron las fases orgánicas, se lavaron con H₂O y salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄, se filtró y se concentró a presión reducida. Se purificó el residuo por medio de cromatografía sobre gel de sílice usando un gradiente de EtOAc (de 0% a 20%) en heptano para permitir la obtención de 1.7 g de 4-metil-6-(trifluorometoxi)-1*H*-indol **10g** en forma de aceite naranja.

Síntesis del intermediario 10h:

A 0 °C, se añadió gota a gota BH₃-Piridina (1.2 ml, 11.6 mmol) a una disolución de 4-metil-6-(trifluorometoxi)-1*H*-indol **10g** (0.5 g, 2.32 mmol) en EtOH (3 ml). Se añadió lentamente HCl 6 N (6 ml) mientras se mantenía la temperatura por debajo de 10 °C. La mezcla se agitó a 0 °C durante 3 h. Se añadió agua (12 ml) y la mezcla se basificó hasta pH 8-9 con una disolución concentrada de NaOH en agua (la temperatura de

reacción se mantuvo por debajo de 20 °C). La mezcla se extrajo con EtOAc. La fase orgánica se lavó con agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. Se añadió tolueno y la disolución se concentró a presión reducida para dar 450 g de 4-metil-6-(trifluorometoxi)indolina **10h**.

Síntesis del intermedio 10i:

Se agitó una mezcla de 4-metil-6-(trifluorometoxi)indolina **10h** (163 mg, 0.75 mmol), ácido 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)acético 5d (400 mg, 0.75 mmol), HATU (428 mg, 1.13 mmol) and diisopropiletilamina (372 µl, 2.25 mmol) en DMF (3.8 ml) a temperatura ambiente durante 2 horas. Se diluyó la mezcla con agua. Se introdujo el material gomoso resultante en EtOAc. Se lavó la fase orgánica con una disolución de K₂CO₃ al 10% en agua, agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró el disolvente a presión reducida. Este compuesto se purificó por cromatografía ultrarrápida sobre gel de sílice (15-40 µm, 24 g, gradiente de 80/20 a 70/30 de heptano/EtOAc). Se combinaron las fracciones puras y se concentró el disolvente a presión reducida para proporcionar 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-1-(4-metil-6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etanona **10i** (226 mg).

Síntesis del Compuesto 10 y separación quiral en los Enantiómeros 10A y 10B:

Bajo un flujo de N₂, a 5°C, se añadió gota a gota HCl 4M en dioxano (7 72 µl, 3.1 mmol) a una disolución de 2-(2-(2-((*tert*-butildimetilsilil)oxi)etoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-1-(4-metil-6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etanona **10i** (226 g, 0.31 mmol) en MeOH (4 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. La fase orgánica se separó, se lavó con agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró y el disolvente se evaporó a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en gel de sílice (15-40 µm, 12 g, CH₂Cl₂/heptano: 98.5/1.5). Se llevó a cabo una segunda purificación por medio de cromatografía de fase inversa (Fase estacionaria: YMC-actus Triart-C18 10 µm 30 x 150mm, Fase móvil: Gradiente de 55% de NH₄HCO₃ al 0.2%, 45% de CH₃CN a 0% de NH₄HCO₃ al 0.2%, 100% de CH₃CN). Se combinaron las fracciones puras y se concentró el disolvente a presión reducida para proporcionar 2-(4-cloro-2-(2-hidroxietoxi)fenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-1-(4-metil-6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etanona **10** (78 g) en forma de racemato. Se solidificó una pequeña fracción por medio de trituración con CH₃CN/éter diisopropílico para proporcionar el Compuesto **10** (9 mg). Se usó la cantidad restante para separar los

enantiómeros del Compuesto 10 por medio de SFC Quiral de Preparación (Fase estacionaria: Chiralpak® AD-H 5 µm 250 x 30 mm, Fase móvil: 60% de CO₂, 40% de iPrOH). Se disolvió el primer enantiómero eluido (27 mg) en CH₃CN (2 ml), se añadió agua (8 ml) y se liofilizó la mezcla para proporcionar el Enantiómero **10A** (25 mg) en forma de polvo. Se disolvió el segundo enantiómero eluido (28 mg) en CH₃CN (2 ml), se añadió agua (8 ml) y se liofilizó la mezcla para proporcionar el Enantiómero **10B** (22 mg) en forma de polvo.

Compuesto 10:

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.21 (s, 3 H) 3.01 - 3.13 (m, 2 H) 3.72 (s, 3H) 3.70 - 3.82 (m, 2 H) 4.08 - 4.22 (m, 3 H) 4.40 - 4.48 (m, 1 H) 4.98 (t, *J*=5.4 Hz, 1 H) 5.82 (d, *J*=8.5 Hz, 1 H) 6.35 (s, 1 H) 6.66 (s, 1 H) 6.82 - 6.90 (m, 3 H) 7.02 (dd, *J*=8.4, 1.7 Hz, 1 H) 7.15 (d, *J*=1.6 Hz, 1 H) 7.36 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 7.89 (s, 1 H) 8.16 (s, 1 H) 9.13 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-B): TR 3.26 min, MH⁺ 618

Enantiómero 10A:

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.21 (s, 3 H) 3.01 - 3.14 (m, 2 H) 3.72 (s, 3H) 3.71 - 3.83 (m, 2 H) 4.07 - 4.22 (m, 3 H) 4.44 (td, *J*=10.2, 6.5 Hz, 1 H) 4.98 (t, *J*=5.5 Hz, 1 H) 5.82 (d, *J*=8.5 Hz, 1 H) 6.35 (s, 1 H) 6.66 (t, *J*=1.9 Hz, 1 H) 6.81 - 6.90 (m, 3 H) 7.02 (dd, *J*=8.4, 2.1 Hz, 1 H) 7.15 (d, *J*=1.9 Hz, 1 H) 7.36 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 7.89 (s, 1 H) 8.16 (s, 1 H) 9.13 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-B): TR 3.26 min, MH⁺ 618

[α]_D²⁰: -38.4° (c 0.279, DMF)

SFC quiral (método SFC-F): TR 1.41 min, MH⁺ 618, pureza quiral 100%.

Enantiómero 10B:

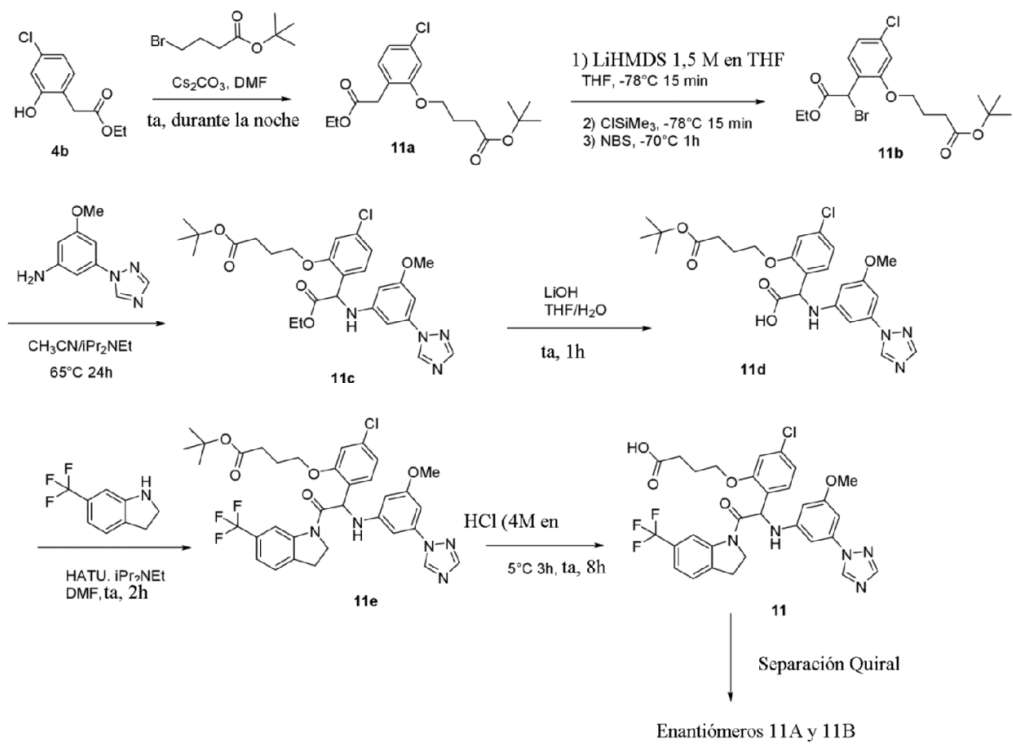
¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 2.21 (s, 3 H) 3.00 - 3.14 (m, 2 H) 3.72 (s, 3H) 3.71 - 3.82 (m, 2 H) 4.06 - 4.23 (m, 3 H) 4.44 (td, *J*=10.1, 6.9 Hz, 1 H) 4.95 - 5.02 (m, 1 H) 5.82 (d, *J*=8.5 Hz, 1 H) 6.35 (s, 1 H) 6.66 (t, *J*=1.7 Hz, 1 H) 6.82 - 6.90 (m, 3 H) 7.02 (dd, *J*=8.5, 1.9 Hz, 1 H) 7.15 (d, *J*=1.9 Hz, 1 H) 7.36 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 7.89 (s, 1 H) 8.16 (s, 1 H) 9.13 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-B): TR 3.26 min, MH⁺ 618

$[\alpha]_D^{20}$: +37.5° (c 0.299, DMF)

SFC quiral (método SFC-F): TR 1.82 min, MH⁺ 618, pureza quiral 100%.

Ejemplo 11: síntesis de ácido 4-(5-cloro-2-(1-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-2-oxo-2-(6-(trifluorometil)indolin-1-il)etil)fenoxi)butanoico (Compuesto **11**) y separación quiral en los Enantiómeros **11A** y **11B**.



Síntesis del intermedio 11a:

A una suspensión de 2-(4-cloro-2-hidroxifenil)acetato de etilo **4b** (8.5 g, 39.6 mmol) y Cs₂CO₃ (25.8 g, 79.2 mmol) en DMF (130 ml) a 10°C, se añadió 4-bromobutanoato de *tert*-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. Se decantaron las fases. Se lavó la fase orgánica con agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida 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 *tert*-butilo **11a** (12.7 g).

Síntesis del intermedio 11b:

Se introdujo LiHMDS 1.5 M en THF (23.5 ml, 35.3 mmol) en un matraz, bajo flujo de N₂ y se enfrió la disolución a -78°C. Se añadió gota a gota una disolución de 4-(5-cloro-2-(2-etoxi-2-oxoetil)fenoxi)butanoato de *tert*-butilo **11a** (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 separaron la fase orgánica, se lavó con agua, se secó sobre MgSO₄, 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 **11b** (7.6 g). Se usó el compuesto directamente en la siguiente etapa de reacción sin purificación adicional.

Síntesis del intermedio **11c**:

A una disolución de 4-(2-(1-bromo-2-etoxi-2-oxoetil)-5-clorofenoxi)butanoato de *terc*-butilo **11b** (7.6 g, 17.4 mmol) en CH₃CN (140 ml) a temperatura ambiente, se añadió diisopropiletilamina (4.8 ml, 27.9 mmol) y 3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)anilina [CAS 1220630-56-7] (4 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 MgSO₄, se filtró y se concentró el disolvente a presión reducida. Se purificó por cromatografía instantánea sobre 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-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-2-oxoetil)fenoxi)butanoato de *terc*-butilo **11c** (6.6 g).

Síntesis del intermedio **11d**:

Se agitó una mezcla de 4-(5-cloro-2-(2-etoxi-1-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-2-oxoetil)fenoxi)butanoato de *terc*-butilo **11c** (6.6 g, 12.1 mmol) e hidróxido de litio monohidratado (1.52 g, 36.3 mmol) en THF/agua (1/1) (160 ml), a temperatura ambiente durante 1 hora. Se diluyó la mezcla con agua. Se acidificó lentamente la disolución 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-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)acético **11d** (6.2 g). Se utilizó el producto bruto sin purificación adicional en el siguiente paso.

Síntesis del intermedio **11e**:

Se agitó una mezcla de 6-(trifluorometil)indolina [CAS 181513-29-1] (290 mg, 1.55 mmol), 2-(2-(4-(*terc*-butoxi)-4-oxobutoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)acético **11d** (800 mg, 1.55 mmol), HATU (880 mg, 2.32 mmol) y diisopropiletilamina (770 µl, 4.64 mmol) en DMF (30 ml) a temperatura ambiente

durante 2 horas. Se diluyó la mezcla con agua. Se filtró el precipitado, se lavó con agua y se introdujo en EtOAc. Se lavó la fase orgánica con agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró el disolvente a presión reducida. Se cristalizó el residuo a partir de éter diisopropílico para proporcionar 4-(5-cloro-2-(1-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-2-oxo-2-(6-(trifluorometil)indolin-1-il)etil)fenoxi)butanoato de *terc*-butilo **11e** (500 mg).

Síntesis del Compuesto **11** y separación quiral en los Enantiómeros **11A** y **11B**:

Se agitó una disolución de 4-(5-cloro-2-(1-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-2-oxo-2-(6-(trifluorometil)indolin-1-il)etil)fenoxi)butanoato de *terc*-butilo **11e** (500 mg, 0.729 mmol) en HCl 4 M en dioxano (5 ml) a 5 °C durante 3 horas y a temperatura ambiente durante 8 horas. Se filtró el precipitado, se lavó con dioxano/éter diisopropílico y se secó para proporcionar ácido 4-(5-cloro-2-(1-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-2-oxo-2-(6-(trifluorometil)indolin-1-il)etil)fenoxi)butanoico **11** (430 mg, 0.4 H₂O (determinado por medio de valoración) en forma de racemato.

Se separaron los enantiómeros del Compuesto **11** por medio de SFC Quiral de Preparación (Fase estacionaria: Chiralpak® AD-H 5 µm 250 x 30 mm, Fase móvil: 65% CO₂, 35% EtOH). El primer enantiómero eluido (80 mg) se solidificó por medio de valoración con éter de petróleo/éter diisopropílico para proporcionar el Enantiómero **11A** (65 mg). El primer enantiómero eluido (126 mg) se solidificó por medio de valoración con éter de petróleo/éter diisopropílico para proporcionar el Enantiómero **11B** (110 mg).

Compuesto **11**:

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.94 - 2.02 (m, 2 H) 2.31 - 2.42 (m, 2 H) 3.15 - 3.35 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H) 4.01 - 4.24 (m, 3 H) 4.22 - 4.49 (m, 1 H) 5.73 (s, 1 H) 6.34 (s, 1 H) 6.67 (s, 1 H) 6.82 (s, 1 H) 7.02 (dd, *J*=8.1, 2.0 Hz, 1 H) 7.13 (d, *J*=2.0 Hz, 1 H) 7.33 (d, *J*=8.0 Hz, 1 H) 7.38 (d, *J*=7.6 Hz, 1 H) 7.45 (d, *J*=7.6 Hz, 1 H) 8.16 (s, 1 H) 8.38 (s, 1 H) 9.15 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 2.70 min, MH⁺ 630

Enantiómero **11A**:

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.98 (s a, 2 H) 2.28 - 2.45 (m, 2 H) 3.13 - 3.29 (m, 2 H) 3.74 (s, 3 H) 4.02 - 4.17 (m, 3 H) 4.36 - 4.44 (m, 1 H) 5.74 (d a, *J*=8.5 Hz, 1 H) 6.35 (s a, 1 H) 6.68 (s, 1 H) 6.80 - 6.88 (m, 2 H) 7.03 (d a, *J*=7.9 Hz, 1 H) 7.14 (s, 1 H)

7.33 (d, $J=7.8$ Hz, 1 H) 7.37 - 7.40 (m, 1 H) 7.46 (d a, $J=7.6$ Hz, 1 H) 8.16 (s, 1 H) 8.39 (s, 1 H) 9.16 (s, 1 H) 12.13 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 2.79 min, MH^+ 630

$[\alpha]_D^{20}$: -28.9° (c 0.26, DMF)

SFC quiral (método SFC-G): TR 3.31 min, MH^+ 630, pureza quiral 100%.

Enantiómero 11B:

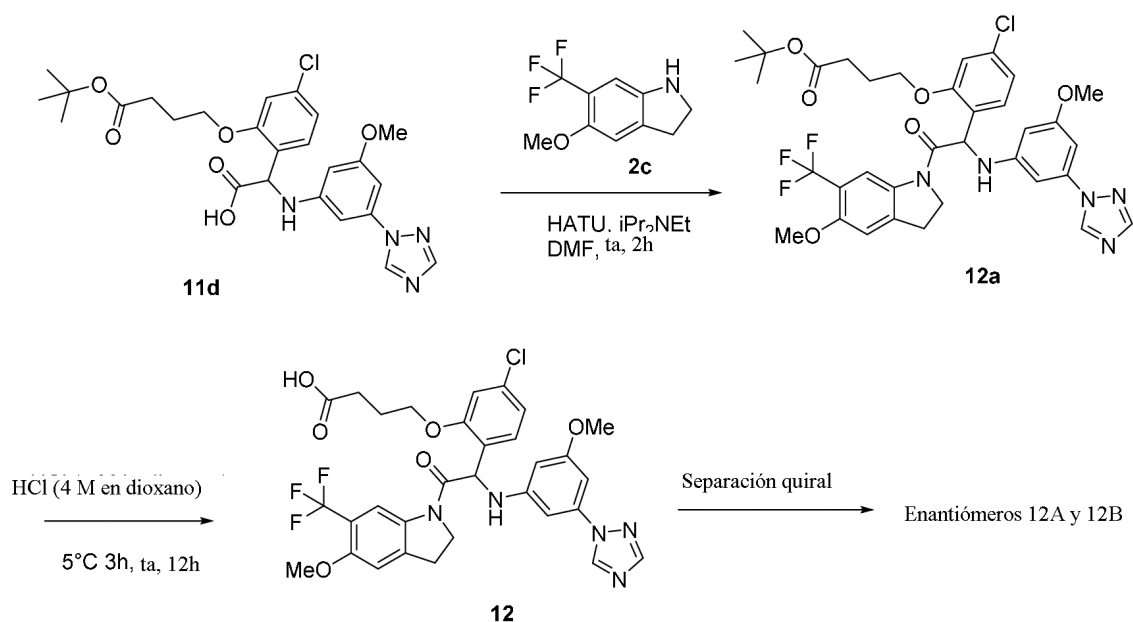
^1H RMN (500 MHz, $DMSO-d_6$) δ ppm 1.91 - 2.04 (m, 2 H) 2.28 - 2.46 (m, 2 H) 3.16 - 3.30 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H) 4.02 - 4.18 (m, 3 H) 4.35 - 4.44 (m, 1 H) 5.73 (d a, $J=8.5$ Hz, 1 H) 6.34 (s a, 1 H) 6.68 (s, 1 H) 6.80 - 6.87 (m, 2 H) 7.02 (d a, $J=7.9$ Hz, 1 H) 7.13 (s, 1 H) 7.31 - 7.41 (m, 2 H) 7.45 (d a, $J=7.9$ Hz, 1 H) 8.16 (s, 1 H) 8.38 (s, 1 H) 9.16 (s, 1 H) 12.13 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 2.79 min, MH^+ 630

$[\alpha]_D^{20}$: $+23.8^\circ$ (c 0.29, DMF)

SFC quiral (método SFC-G): TR 4.32 min, MH^+ 630, pureza quiral 100%.

Ejemplo 12: síntesis de ácido 4-(5-cloro-2-(1-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-2-(5-metoxi-6-(trifluorometil)indolin-1-il)-2-oxoetil)fenoxi)butanoico (Compuesto **12**) y separación quiral en los Enantiómeros **12A** y **12B**.



Síntesis del intermedio 12a:

Se agitó una mezcla de 5-metoxi-6-(trifluorometil)indolina 2c (630 mg, 2.9 mmol), ácido 2-(2-(4-(*tert*-butoxi)-4-oxobutoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)acético **11d** (1.5 g, 2.9 mmol), HATU (1.65 g, 4.35 mmol) y diisopropiletilamina (1.45 ml, 8.7 mmol) en DMF (30 ml) a temperatura ambiente durante 2 horas. Se diluyó la mezcla con agua. Se filtró el precipitado, se lavó con agua y se introdujo en EtOAc. Se lavó la disolución orgánica con agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (15-40 µm, 120 g, heptano/EtOAc 60/40). Se combinaron las fracciones puras y se concentró a sequedad para proporcionar, tras cristalización a partir de éter/éter diisopropílico, 4-(5-cloro-2-(1-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-2-(5-metoxi-6-(trifluorometil)indolin-1-il)-2-oxoetil)fenoxi)butanoato de *tert*-butilo **12a** (1.45 g).

Síntesis del Compuesto 12 y separación quiral en los Enantiómeros 12A y 12B:

Se agitó una disolución de 4-(5-cloro-2-(1-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-2-(5-metoxi-6-(trifluorometil)indolin-1-il)-2-oxoetil)fenoxi)butanoato de *tert*-butilo **12a** (1.45 g, 2.03 mmol) en HCl 4 M en dioxano (12 ml) a 5 °C durante 3 horas y a temperatura ambiente durante 12 horas. Se filtró el precipitado, se lavó con dioxano/éter diisopropílico y se secó para proporcionar el Compuesto 12 (1.02 g). Se purificó de forma adicional una pequeña parte (90 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 proporcionar, tras solidificación por medio de trituración con CH₃CN/éter diisopropílico, ácido 4-(5-cloro-2-(1-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-2-(5-metoxi-6-(trifluorometil)indolin-1-il)-2-oxoetil)fenoxi)butanoico **12** (70 mg,) como racemato. Se usó la cantidad restante para separar los enantiómeros.

Los enantiómeros del Compuesto **12** se separaron mediante SFC quiral preparativa (Fase estacionaria: Chiralpak® AS-H 5 µm 250 x 20 mm, Fase móvil: 63% de CO₂, 37% de iPrOH). Se agitó el primer enantiómero eluido (458 mg) 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. Se solidificó el residuo por medio de trituración con éter diisopropílico/éter de petróleo para proporcionar el Enantiómero **12A** (270 mg). Se agitó el segundo enantiómero eluido (405 mg) 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. Se solidificó el residuo por medio de trituración con éter diisopropílico/éter de petróleo para proporcionar el Enantiómero **12B** (272 mg).

Compuesto 12:

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.95 - 2.04 (m, 2 H) 2.31 - 2.45 (m, 2 H) 3.15 - 3.28 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H) 3.84 (s, 3 H) 3.98 - 4.17 (m, 3 H) 4.33 - 4.41 (m, 1 H) 5.70 (d a, *J*=8.6 Hz, 1 H) 6.33 (s, 1 H) 6.66 (s, 1 H) 6.77 - 6.83 (m, 2 H) 7.01 (d a, *J*=8.6 Hz, 1 H) 7.12 (s, 1 H) 7.23 (s, 1 H) 7.33 (d, *J*=8.6 Hz, 1 H) 8.15 (s, 1 H) 8.34 (s, 1 H) 9.13 (s, 1 H) 12.07 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 2.72 min, MH⁺ 660

Enantiómero 12A:

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.94 - 2.05 (m, 2 H) 2.31 - 2.46 (m, 2 H) 3.16 - 3.31 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H) 3.85 (s, 3 H) 3.99 - 4.18 (m, 3 H) 4.38 (td, *J*=10.2, 6.5 Hz, 1 H) 5.71 (d, *J*=8.5 Hz, 1 H) 6.34 (s, 1 H) 6.67 (s, 1 H) 6.82 (s, 1 H) 6.83 (d, *J*=9.5 Hz, 1 H) 7.02 (dd, *J*=8.2, 1.6 Hz, 1 H) 7.13 (s, 1 H) 7.23 (s, 1 H) 7.33 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 8.16 (s, 1 H) 8.34 (s, 1 H) 9.15 (s, 1 H) 12.11 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 2.70 min, MH⁺ 660

[α]_D²⁰: +30.4° (c 0.257, DMF)

SFC quiral (método SFC-H): TR 3.71 min, MH⁺ 660, pureza quiral 100%.

Enantiómero 12B:

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.91 - 2.08 (m, 2 H) 2.32 - 2.44 (m, 2 H) 3.16 - 3.31 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H) 3.85 (s, 3 H) 3.99 - 4.17 (m, 3 H) 4.38 (td, *J*=10.3, 6.6 Hz, 1 H) 5.71 (d, *J*=8.5 Hz, 1 H) 6.34 (s, 1 H) 6.67 (s, 1 H) 6.79 - 6.85 (m, 2 H) 7.02 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 7.13 (s, 1 H) 7.23 (s, 1 H) 7.33 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 8.16 (s, 1 H) 8.34 (s, 1 H) 9.15 (s, 1 H) 12.12 (s a, 1 H)

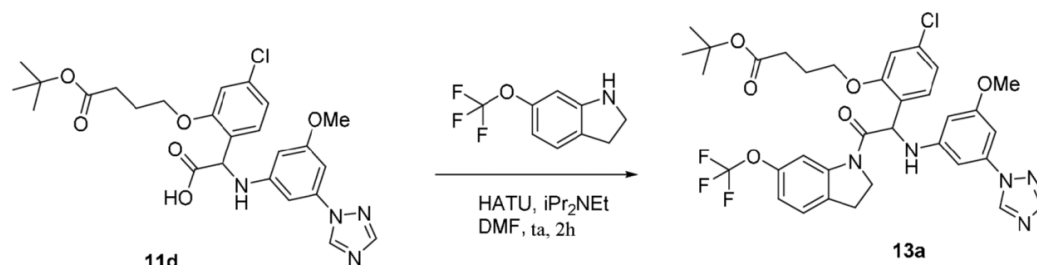
LC/MS (método LC-A): TR 2.70 min, MH⁺ 630

[α]_D²⁰: -36.9° (c 0.287, DMF)

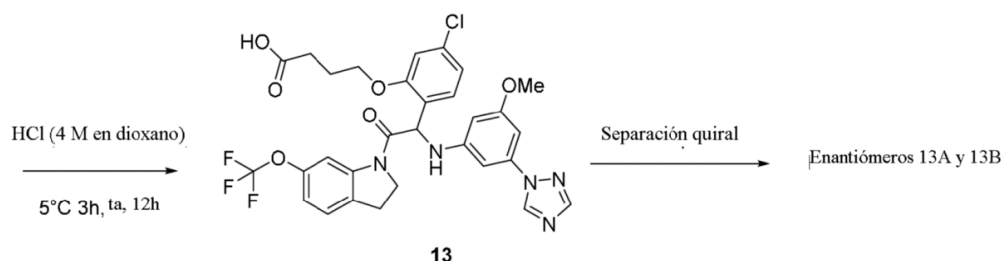
SFC quiral (método SFC-H): TR 5.91 min, MH⁺ 660, pureza quiral 100%.

Ejemplo 13: síntesis de ácido 4-(5-cloro-2-(1-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-2-oxo-2-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etil)fenoxi)butanoico (Compuesto **13**) y separación quiral en los Enantiómeros **13A** y **13B**.

5



10



15

Síntesis del intermedio 13a:

20

Se agitó una mezcla de 6-(trifluorometoxi)indolina [CAS 959235-95-1] (590 mg, 2.9 mmol), ácido 2-(2-(4-(*terc*-butoxi)-4-oxobutoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)acético **11d** (1.5 mg, 2.9 mmol), HATU (1.65 mg, 4.35 mmol) y diisopropiletilamina (1.45 ml, 8.7 mmol) en DMF (60 ml) a temperatura ambiente durante 12 horas. Se diluyó la mezcla con agua. Se filtró el precipitado, se lavó con agua y se introdujo en EtOAc. Se lavó la fase orgánica con agua, se secó sobre MgSO_4 , se filtró y se concentró el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó mediante cromatografía ultrarrápida en gel de sílice (15-40 μm , 120 g, heptano/EtOAc 60/40). Se combinaron las fracciones puras y se concentró a sequedad para proporcionar, tras cristalización a partir de éter/éter diisopropílico, 4-(5-cloro-2-(1-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-2-oxo-2-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etil)fenoxi)butanoato de *terc*-butilo **13a** (1.05 g).

30

Síntesis del Compuesto 13 y separación quiral en los Enantiómeros 13A y 13B:

35

Se agitó una disolución de 4-(5-cloro-2-(1-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-2-oxo-2-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etil)fenoxi)butanoato de *terc*-butilo **13a** (1.05 mg, 1.50 mmol) en HCl 4 M en dioxano (9.5 ml) a 5 °C durante 3 horas y a temperatura ambiente durante 12 horas. Se filtró el precipitado, se lavó con dioxano/éter diisopropílico y se secó para proporcionar ácido 4-(5-cloro-2-(1-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-2-oxo-2-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etil)fenoxi)butanoico **13** (965 mg, 0.23 H_2O (determinado por medio de valoración) en forma de racemato.

Los enantiómeros del Compuesto **13** se separaron mediante SFC quiral preparativa (Fase estacionaria: Chiralpak® AS-H 5 µm 250 x 20 mm, Fase móvil: 80% CO₂, 20% EtOH). El primer enantiómero eluido (390 mg) se solidificó por medio de valoración con éter de petróleo/éter diisopropílico para proporcionar el Enantiómero **13A** (260 mg). El segundo enantiómero eluido (350 mg) se solidificó por medio de valoración con éter de petróleo/éter diisopropílico para proporcionar el Enantiómero **13B** (188 mg).

Compuesto **13**:

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.94 - 2.03 (m, 2 H) 2.33 - 2.41 (m, 2 H) 3.10 - 3.24 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H) 4.04 - 4.26 (m, 3 H) 4.39 (td, *J*=10.2, 6.5 Hz, 1 H) 5.71 (s, 1 H) 6.34 (s, 1 H) 6.67 (s, 1 H) 6.81 (s, 1 H) 6.99 - 7.07 (m, 2 H) 7.13 (d, *J*=1.6 Hz, 1 H) 7.27-7.39 (m, 2 H) 8.04 (s, 1 H) 8.16 (s, 1 H) 9.15 (s, 1 H) 12.08 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-B): TR 2.73 min, MH⁺ 646

Enantiómero **13A**:

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.93 - 2.03 (m, 2 H) 2.34 - 2.47 (m, 2 H) 3.13 - 3.21 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H) 4.03 - 4.17 (m, 3 H) 4.39 (td, *J*=10.1, 6.6 Hz, 1 H) 5.72 (d, *J*=8.5 Hz, 1 H) 6.35 (s, 1 H) 6.68 (s, 1 H) 6.82 (s, 1 H) 6.87 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 7.02 (t, *J*=8.4 Hz, 1 H) 7.13 (s, 1 H) 7.27 - 7.39 (m, 2 H) 8.04 (s, 1 H) 8.16 (s, 1 H) 9.15 (s, 1 H) 12.10 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 2.83 min, MH⁺ 646

[α]_D²⁰: +38.4° (c 0.276, DMF)

SFC quiral (método SFC-I): TR 4.96 min, MH⁺ 646, pureza quiral 100%.

Enantiómero **13B**:

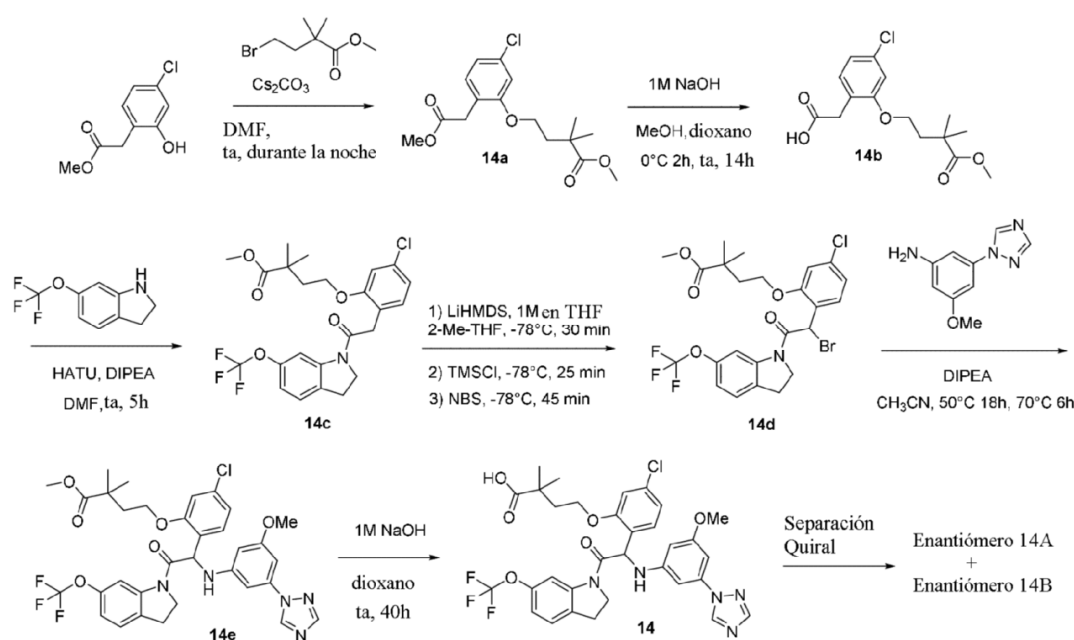
¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.91 - 2.02 (m, 2 H) 2.33 - 2.41 (m, 2 H) 3.10 - 3.24 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H) 4.04 - 4.17 (m, 3 H) 4.39 (td, *J*=10.1, 6.6 Hz, 1 H) 5.72 (d, *J*=8.5 Hz, 1 H) 6.35 (s, 1 H) 6.68 (s, 1 H) 6.81 - 6.89 (m, 2 H) 6.99 - 7.05 (m, 2 H) 7.12 - 7.15 (m, 1 H) 7.27-7.40 (m, 2 H) 8.04 (s, 1 H) 8.16 (s, 1 H) 9.16 (s, 1 H) 12.11 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 2.83 min, MH⁺ 646

[α]_D²⁰: -43.2° (c 0.273, DMF)

SFC quiral (método SFC-I): TR 6.56 min, MH⁺ 646, pureza quiral 100%.

Ejemplo 14: síntesis de ácido 4-(5-cloro-2-(1-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-2-oxo-2-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etil)fenoxi)-2,2-dimetilbutanoico (Compuesto **14**) y separación quiral en los Enantiómeros **14A** y **14B**.



Síntesis del intermedio 14a:

A una mezcla de 2-(4-cloro-2-hidroxifenil)acetato de metilo [CAS 518979-09-4] (1 g, 4.99 mmol) y carbonato de cesio (3.25 g, 9.97 mmol) en DMF (30 ml), se añadió 4-bromo-2,2-dimetilbutanoato de metilo [CAS 4833-99-2] (1.09 g, 5.23 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 20 h. La mezcla de reacción se vertió sobre agua en agitación (150 ml) y 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. Se dejó el producto en reposo a temperatura ambiente. Se agitó el residuo sólido en 5 ml de éter diisopropílico. Se filtró el precipitado, se lavó (3x) con éter diisopropílico, y se secó a vacío a 45 °C para proporcionar 4-(5-cloro-2-(2-metoxi-2-oxoetil)fenoxi)-2,2-dimetilbutanoato de metilo **14a** (0.897 g).

Síntesis del intermedio 14b:

Se enfrió una disolución de 4-(5-cloro-2-(2-metoxi-2-oxoetil)fenoxi)-2,2-dimetilbutanoato de metilo **14a** (0.897 g, 2.73 mmol) en una mezcla de disolventes de MeOH (10 ml) y dioxano (5 ml) en un baño de hielo. A 0 °C, se añadió NaOH 1 M (2.73 ml, 2.73 mmol) con precaución. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 2 h y a temperatura ambiente durante 14 h. La mezcla de reacción se vertió sobre agua (50 ml), se agitó durante 15 minutos y se dejó en reposo durante 30 minutos. Se filtró la fracción sólida (intermedio que no había reaccionado 14a) y se lavó (3x) con agua. Se

acidificaron los filtrados combinados por medio de adición gota a gota de HCl 1 N (2,8 ml) al tiempo que se agitaba. Trascurridos 10 minutos, se filtró el precipitado, se lavó (3x) con agua, y se secó a vacío a 45 °C para proporcionar ácido 2-(4-cloro-2-(4-metoxi-3,3-dimetil-4-oxobutoxi)fenil)acético **14b** (0.576 g).

Síntesis del intermedio 14c:

A una disolución en agitación de ácido 2-(4-cloro-2-(4-metoxi-3,3-dimetil-4-oxobutoxi)fenil)acético **14b** (576 mg, 1.83 mmol), 6-(trifluorometoxi)indolina [CAS 959235-95-1] (409 mg, 2.01 mmol) y diisopropiletilamina (907 µl, 5.49 mmol) en DMF (7.5 ml) bajo atmósfera de N₂, se añadió HATU (1.07 g, 2.75 mmol), y se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 5 horas. Se añadió agua (30 ml) y 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 se purificó mediante cromatografía instantánea en gel de sílice (40 g) utilizando un gradiente de heptano/EtOAc de 100/0 a 0/100. Las fracciones deseadas se combinaron, se evaporaron a presión reducida y se co-evaporaron con tolueno. Se secó el residuo a vacío a 45 °C para proporcionar 4-(5-cloro-2-(2-oxo-2-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etil)fenoxi)-2,2-dimetilbutanoato de metilo **14c** (790 mg) en forma de polvo.

Síntesis del intermedio 14d:

Se agitó una disolución de 4-(5-cloro-2-(2-oxo-2-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etil)fenoxi)-2,2-dimetilbutanoato de metilo **14c** (790 mg, 1.58 mmol) en 2-Me-THF (30 ml), bajo flujo de N₂ y se enfrió a -78°C. Se añadió una disolución de bis(trimetilsilil)amida de litio 1 M en THF (3.16 ml, 3.16 mmol) gota a gota y se agitó la mezcla resultante a -78 °C durante 30 minutos. Se añadió clorotrimetilsilano (323 µl, 2.53 mmol) y se agitó la mezcla a -78 °C durante 25 minutos. Se añadió gota a gota una disolución de *N*-bromosuccinimida (352 mg, 1.98 mmol) en 2-Me-THF (7.5 ml) y THF (2.5 ml) y se agitó la mezcla de reacción a -78 °C durante 45 minutos. Se añadió lentamente una disolución acuosa saturada de NH₄Cl (50 ml), y se agitó la mezcla resultante sin enfriamiento hasta que la temperatura alcanzó 0 °C. Se añadió agua (10 ml) y, tras agitar durante 30 minutos, 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 4-(2-(1-bromo-2-oxo-2-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etil)-5-clorofenoxi)-2,2-dimetilbutanoato de metilo **14d** (915 g). Se usó el producto sin purificación adicional en la siguiente etapa.

Síntesis del intermedio 14e:

A una disolución agitada de 4-(2-(1-bromo-2-oxo-2-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etil)-5-clorofenoxi)-2,2-dimetilbutanoato de metilo **14d** (915 mg, 1.58 mmol) en CH₃CN (40 ml), bajo atmósfera de N₂, se añadieron 3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)anilina [CAS 1220630-56-7] (301 mg, 1.58 mmol), y diisopropiletilamina (545 µl, 3.16 mmol) y se agitó la mezcla de reacción a 50 °C durante 18 horas y 70 °C durante 6 horas. Se enfrió la mezcla a temperatura ambiente y se vertió en un H₂O en agitación (200 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 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 y se co-evaporó con dioxano para proporcionar 4-(5-cloro-2-(1-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-2-oxo-2-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etil)fenoxi)-2,2-dimetilbutanoato de metilo **14e** (1.09 g). Se usó el producto en la siguiente etapa sin purificación.

Síntesis del Compuesto 14 y separación quiral en los Enantiómeros 14A y 14B:

Se añadió 1M NaOH (3.95 ml, 3.95 mmol) a una disolución en agitación de 4-(5-cloro-2-(1-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-2-oxo-2-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etil)fenoxi)-2,2-dimetilbutanoato de metilo **14e** (1.09 g, 1.58 mmol) en dioxano (6.5 ml). Se agitó la mezcla de reacción a temperatura ambiente durante 40 h. Se añadieron agua (21 ml) y HCl 1 N (4.1 ml) y tras agitar durante 10 minutos, se filtró el precipitado y se lavó (3x) con agua. Se agitó el residuo sólido (0.9 g) en CH₂Cl₂ (7.5 ml) durante 45 minutos, se filtró, se lavó (3x) con CH₂Cl₂, y se secó a vacío a 45 °C para proporcionar ácido 4-(5-cloro-2-(1-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-2-oxo-2-(6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)etil)fenoxi)-2,2-dimetilbutanoico (Compuesto 14, 590 mg).

Se separaron los enantiómeros del Compuesto **14** (557 mg) por medio de SFC Quiral de Preparación (Fase estacionaria: Chiralpak® Diacel AD 20 x 250 mm, Fase móvil: CO₂, EtOH + 0.4% de iPrNH₂). Las fracciones que contenían el primer producto eluido se combinaron, se evaporaron a presión reducida y se co-evaporaron con CH₃CN. El residuo se cristalizó a partir de Et₂O/heptano 3/1, se filtró, se lavó (3x) con Et₂O y se secó a vacío a 50 °C para proporcionar el Enantiómero **14A** (96 mg). Las fracciones que contenían el segundo producto eluido se combinaron, se evaporaron a presión reducida y se co-evaporaron con CH₃CN. El residuo se cristalizó a partir de Et₂O, se

filtró, se lavó (3x) con Et₂O y se secó a vacío a 50 °C para proporcionar el Enantiómero **14B** (35 mg + 106 mg (segundo cultivo)).

5

Compuesto 14:

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.11 (d, *J*=5.1 Hz, 6 H) 1.86 - 2.03 (m, 2 H) 3.09 - 3.28 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H) 4.01 - 4.18 (m, 3 H) 4.38 (td, *J*=10.2, 6.6 Hz, 1 H) 5.69 (d, *J*=8.6 Hz, 1 H) 6.33 (t, *J*=2.0 Hz, 1 H) 6.67 (t, *J*=1.9 Hz, 1 H) 6.79 - 6.86 (m, 2 H) 6.97 - 7.05 (m, 2 H) 7.18 (d, *J*=1.8 Hz, 1 H) 7.31 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 7.34 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 8.03 (s a, 1 H) 8.15 (s, 1 H) 9.14 (s, 1 H) 12.25 (s a, 1 H)

10

LC/MS (método LC-C): TR 1.12 min, MH⁺ 674

15

Enantiómero 14A:

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.11 (d, *J*=5.1 Hz, 6 H) 1.87 - 2.02 (m, 2 H) 3.09 - 3.26 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H) 4.02 - 4.18 (m, 3 H) 4.37 (td, *J*=10.2, 6.6 Hz, 1 H) 5.69 (d, *J*=8.8 Hz, 1 H) 6.33 (t, *J*=2.2 Hz, 1 H) 6.67 (t, *J*=1.8 Hz, 1 H) 6.79 - 6.86 (m, 2 H) 6.99 - 7.04 (m, 2 H) 7.18 (d, *J*=2.0 Hz, 1 H) 7.31 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 7.34 (d, *J*=8.4 Hz, 1 H) 8.03 (s a, 1 H) 8.15 (s, 1 H) 9.14 (s, 1 H) 12.25 (s a, 1 H)

20

LC/MS (método LC-D): TR 2.09 min, MH⁺ 674

25

[α]_D²⁰: -32.8° (c 0.528, DMF)

SFC quiral (método SFC-K): TR 3.63 min, MH⁺ 674, pureza quiral 100%.

Punto de fusión: 111°C

30

Enantiómero 14B:

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.11 (d, *J*=5.1 Hz, 6 H) 1.87 - 2.02 (m, 2 H) 3.10 - 3.27 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H) 4.03 - 4.18 (m, 3 H) 4.38 (td, *J*=10.2, 6.5 Hz, 1 H) 5.69 (d, *J*=8.6 Hz, 1 H) 6.33 (t, *J*=1.9 Hz, 1 H) 6.67 (t, *J*=1.9 Hz, 1 H) 6.79 - 6.86 (m, 2 H) 6.98 - 7.05 (m, 2 H) 7.18 (d, *J*=1.8 Hz, 1 H) 7.31 (d, *J*=8.4 Hz, 1 H) 7.34 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 8.03 (s a, 1 H) 8.15 (s, 1 H) 9.14 (s, 1 H) 12.25 (s a, 1 H)

35

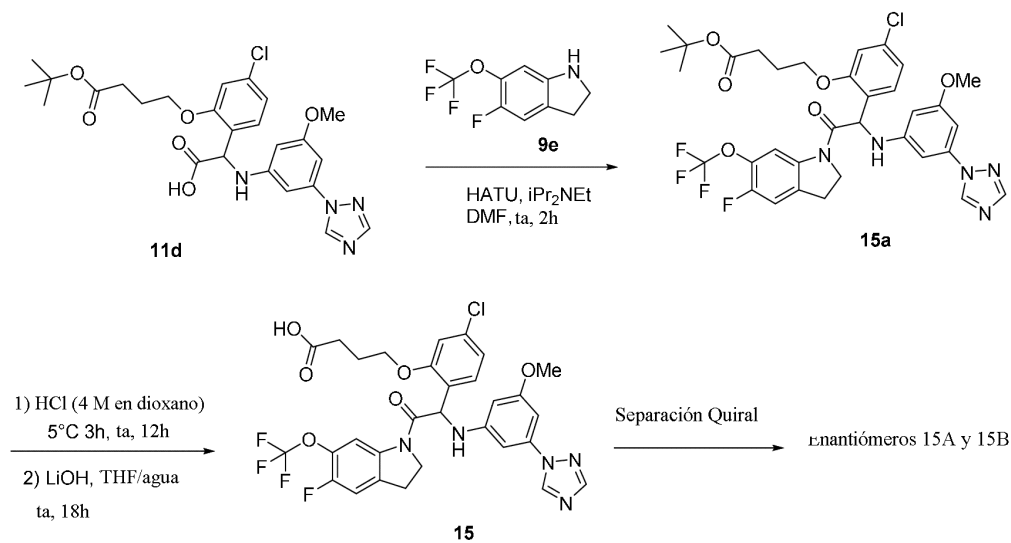
LC/MS (método LC-D): TR 2.08 min, MH⁺ 674

[α]_D²⁰: +32.8° (c 0.515, DMF)

SFC quiral (método SFC-K): TR 4.22 min, MH⁺ 674, pureza quiral 100%.

Punto de fusión: 177°C

Ejemplo 15: síntesis de ácido 4-(5-cloro-2-(2-(5-fluoro-6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)-1-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-2-oxoetil)fenoxi)butanoico (Compuesto **15**) y separación quiral para dar los Enantiómeros **15A** y **15B**.



Síntesis del intermedio 15a:

Se agitó una mezcla de 5-fluoro-6-(trifluorometoxi)indolina **9e** (321 mg, 1.45 mmol), ácido 2-(2-(4-(*tert*-butoxi)-4-oxobutoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)acético **11d** (750 mg, 1.45 mmol), HATU (827 mg, 2.18 mmol) y diisopropiletilamina (719 µl, 4.35 mmol) en DMF (30 ml) a temperatura ambiente durante 12 horas. Se diluyó la mezcla con agua. Se filtró el precipitado, se lavó con agua y se introdujo en EtOAc. Se lavó la disolución orgánica con una disolución de K₂CO₃ al 10% en agua, agua, 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: 98/2). Se combinaron las fracciones puras y se concentró a sequedad para proporcionar 4-(5-cloro-2-(2-(5-fluoro-6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)-1-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-2-oxoetil)fenoxi)butanoato de *tert*-butilo **15a** (1.05 g).

Síntesis del Compuesto 15 y separación quiral en los Enantiómeros 15A y 15B:

Se agitó una disolución de 4-(5-cloro-2-(2-(5-fluoro-6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)-1-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-2-oxoetil)fenoxi)butanoato de *tert*-butilo **15a** (1.05 g, 1.46 mmol) en HCl 4 M en dioxano (8 ml) a 5 °C durante 3 horas y a temperatura ambiente durante 12 horas. Se filtró el precipitado, se lavó con dioxano/éter diisopropílico y se secó. Se disolvió el residuo (580 mg) en THF (2.5 ml) y se añadió gota a gota una disolución de hidróxido de litio monohidratado (180 mg, 4.277 mmol) en agua (2.5 ml). Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 18

h. Se enfrió la reacción a 0 °C y se añadieron agua y hielo. Se ajustó el pH a 6 por medio de adición de HCl 3 N. El producto se extrajo con EtOAc. Se separó la fase orgánica, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró el disolvente a presión reducida. Se cristalizó una pequeña fracción del residuo a partir de CH₂Cl₂ para proporcionar ácido 4-(5-cloro-2-(2-(5-fluoro-6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)-1-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-2-oxoetil)fenoxi)butanoico **15** (24 mg) en forma de racemato. La cantidad restante se purificó de forma adicional mediante cromatografía instantánea en gel de sílice (20-45 µm, 24 g, gradiente de CH₂Cl₂/MeOH: de 99.5/0.5 a 90/10). Se combinaron las fracciones puras y se concentraron a sequedad para proporcionar una segunda fracción del Compuesto **15** (382 mg).

Se separaron los enantiómeros del Compuesto **15** (382 mg) por medio de SFC Quiral de Preparación (Fase estacionaria: Chiralcel® OD-H 5 µm 250 x 30 mm, Fase móvil: 75% de CO₂, 25% de MeOH (+0.3% de iPrNH₂)). El primer enantiómero eluido (178 mg) se solidificó por medio de valoración con heptano/éter diisopropílico para proporcionar el Enantiómero **15A** (140 mg). El segundo enantiómero eluido (187 mg) se solidificó por medio de valoración con heptano/éter diisopropílico para proporcionar el Enantiómero **15B** (136 mg).

Compuesto 15:

¹H RMN (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.90 - 2.04 (m, 2 H) 2.28 - 2.46 (m, 2 H) 3.11 - 3.28 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H) 4.03 - 4.18 (m, 3 H) 4.33 - 4.42 (m, 1 H) 5.71 (d, *J*=8.8 Hz, 1 H) 6.34 (s, 1 H) 6.67 (s, 1 H) 6.81 (s, 1 H) 6.87 (d a, *J*=8.8 Hz, 1 H) 7.02 (dd, *J*=8.2, 1.9 Hz, 1 H) 7.12 (s, 1 H) 7.31 (d, *J*=8.2 Hz, 1 H) 7.43 (d, *J*=9.8 Hz, 1 H) 8.12 - 8.20 (m, 2 H) 9.16 (s, 1 H) 12.12 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-B): TR 2.72 min, MH⁺ 664

Punto de fusión: 188°C

Enantiómero 15A:

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.88 - 2.12 (m, 2 H) 2.19 - 2.42 (m, 2 H) 2.96 - 3.24 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H) 3.89 - 4.16 (m, 3 H) 4.25 - 4.43 (m, 1 H) 5.72 (d, *J*=8.6 Hz, 1 H) 6.34 (s, 1 H) 6.66 (s, 1 H) 6.79 - 6.86 (m, 2 H) 7.01 (dd, *J*=8.3, 1.8 Hz, 1 H) 7.09 - 7.14 (m, 1 H) 7.32 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 7.41 (d, *J*=9.6 Hz, 1 H) 8.12 - 8.17 (m, 2 H) 9.16 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-B): TR 2.75 min, MH⁺ 664

[α]_D²⁰: -31.5° (c 0.267, DMF)

SFC quiral (método SFC-J): TR 2.66 min, MH⁺ 664, pureza quiral 99.69%.

Enantiómero 15B:

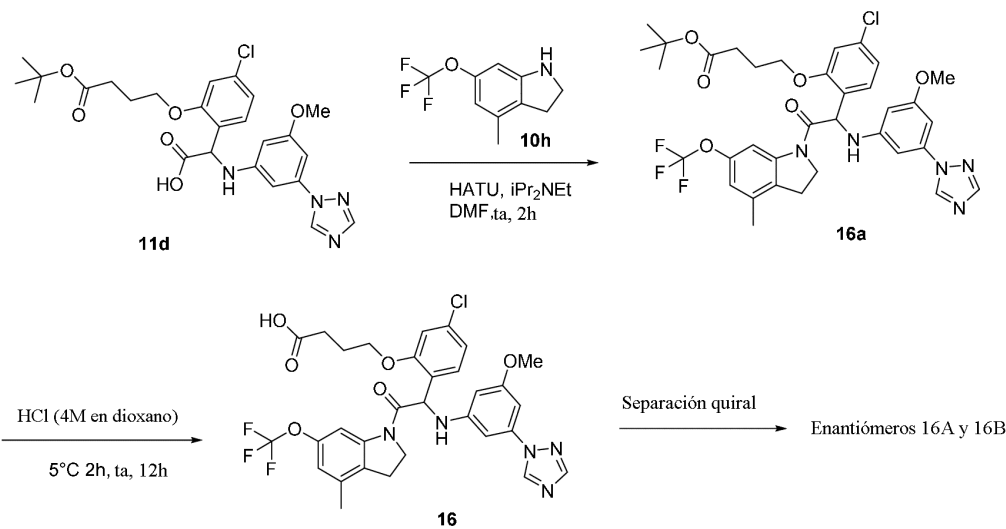
¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.88 - 2.04 (m, 2 H) 2.22 - 2.43 (m, 2 H) 3.12 - 3.40 (m, 2 H) 3.72 (s, 3H) 4.03 - 4.17 (m, 3 H) 4.33 - 4.43 (m, 1 H) 5.72 (d, *J*=8.6 Hz, 1 H) 6.34 (s, 1 H) 6.67 (s, 1 H) 6.78 - 6.87 (m, 2 H) 7.01 (dd, *J*=8.3, 1.8 Hz, 1 H) 7.09 - 7.13 (m, 1 H) 7.32 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 7.41 (d, *J*=9.6 Hz, 1 H) 8.12 - 8.18 (m, 2 H) 9.16 (s, 1 H)

LC/MS (método LC-B): TR 2.73 min, MH⁺ 664

[α]_D²⁰: +28.2° (c 0.262, DMF)

SFC quiral (método SFC-J): TR 3.53 min, MH⁺ 664, pureza quiral 98.93%.

Ejemplo 16: síntesis de ácido 4-(5-cloro-2-(1-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-2-(4-metil-6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)-2-oxoetil)fenoxi)butanoico (Compuesto **16**) y separación quiral para dar los Enantiómeros **16A** y **16B**.



Síntesis del intermedio 16a:

Se agitó una mezcla de 4-metil-6-(trifluorometoxi)indolina **10h** (336 mg, 1.55 mmol), ácido 2-(2-(4-(*terc*-butoxi)-4-oxobutoxi)-4-clorofenil)-2-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)acético **11d** (800 mg, 1.55 mmol), HATU (883 mg, 2.32 mmol) y diisopropiletilamina (767 μl, 4.64 mmol) en DMF (30 ml) a temperatura ambiente durante 12 horas. Se diluyó la mezcla con agua. Se filtró el precipitado, se lavó con agua y se introdujo en EtOAc. Se lavó la disolución orgánica con una disolución de

K₂CO₃ al 10% en agua, agua, se secó sobre MgSO₄, se filtró y se concentró el disolvente a presión reducida. El residuo se purificó por cromatografía instantánea sobre gel de sílice (15-40 µm, 40 g, gradiente de heptano/EtOAc de 90/10 a 70/30). Se combinaron las fracciones puras y se concentró a sequedad para proporcionar, 4-(5-cloro-2-(1-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-2-(4-metil-6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)-2-oxoetil)fenoxi)butanoato de *terc*-butilo **16a** (816 g).

Síntesis del Compuesto 16 y separación quiral en los Enantiómeros 16A y 16B:

Se agitó una disolución de 4-(5-cloro-2-(1-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-2-(4-metil-6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)-2-oxoetil)fenoxi)butanoato de *terc*-butilo **16a** (816 g, 1.14 mmol) en HCl 4 M en dioxano (7 ml) a 5 °C durante 2 horas y a temperatura ambiente durante 12 horas. Se filtró el precipitado, se lavó con dioxano/éter diisopropílico y se secó. El residuo se purificó mediante cromatografía instantánea en gel de sílice (20-45 µm, 40 g, gradiente de CH₂Cl₂/heptano: de 100/0 a 95/5). Se combinaron las fracciones puras y se evaporó el disolvente a presión reducida para proporcionar, tras cristalización a partir de CH₃CN/éter diisopropílico, ácido 4-(5-cloro-2-(1-((3-metoxi-5-(1*H*-1,2,4-triazol-1-il)fenil)amino)-2-(4-metil-6-(trifluorometoxi)indolin-1-il)-2-oxoetil)fenoxi)butanoico **16** (495 g).

Los enantiómeros del Compuesto **16** se separaron mediante SFC quiral preparativa (Fase estacionaria: Chiralpak® AD-H 5 µm 250 x 30 mm, Fase móvil: 65% de CO₂, 35% de iPrOH (+0.3% de iPrNH₂)). El primer enantiómero eluido (145 mg) se purificó adicionalmente por cromatografía instantánea sobre gel de sílice (10-40 µm, 24 g, CH₂Cl₂/MeOH 98/2). Se combinaron las fracciones puras y se concentró el disolvente a presión reducida para proporcionar, tras solidificación a partir de trituración con éter diisopropílico/pentano, el Enantiómero **16A** (99 mg). El segundo enantiómero eluido (149 mg) se purificó adicionalmente por cromatografía instantánea sobre gel de sílice (10-40 µm, 24 g, CH₂Cl₂/MeOH 98/2). Se combinaron las fracciones puras y se concentró el disolvente a presión reducida para proporcionar, tras solidificación a partir de trituración con éter diisopropílico/pentano, el Enantiómero **16B** (95 mg).

Compuesto 16:

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.91 - 2.05 (m, 2 H) 2.20 (s, 3 H) 2.29 - 2.43 (m, 2 H) 3.01 - 3.27 (m, 2 H) 3.72 (s, 3 H) 4.02 - 4.18 (m, 3 H) 4.35 - 4.44 (m, 1 H) 5.71 (d a, *J*=8.6 Hz, 1 H) 6.34 (s a, 1 H) 6.67 (s, 1 H) 6.78 - 6.90 (m, 3 H) 7.01 (d a, *J*=7.1 Hz, 1 H) 7.12 (s, 1 H) 7.31 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 7.88 (s a, 1 H) 8.15 (s, 1 H) 9.14 (s, 1 H) 12.07 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 2.93 min, MH⁺ 660

Punto de fusión: 214°C

Enantiómero 16A:

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.92 - 2.04 (m, 2 H) 2.20 (s, 3 H) 2.30 - 2.44 (m, 2 H) 2.99 - 3.16 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H) 4.04 - 4.17 (m, 3 H) 4.35 - 4.44 (m, 1 H) 5.71 (d a, *J*=8.6 Hz, 1 H) 6.34 (s a, 1 H) 6.67 (s, 1 H) 6.79 - 6.89 (m, 3 H) 7.02 (d a, *J*=8.6 Hz, 1 H) 7.12 (s, 1 H) 7.32 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H) 7.89 (s, 1 H) 8.15 (s, 1 H) 9.14 (s, 1 H) 12.09 (s a, 1 H)

LC/MS (método LC-A): TR 2.94 min, MH⁺ 660

[α]_D²⁰: -35.4° (c 0.263, DMF)

SFC quiral (método SFC-F): TR 1.61 min, MH⁺ 660, pureza quiral 100%.

Enantiómero 16B:

¹H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 1.91 - 2.04 (m, 2 H) 2.20 (s, 3 H) 2.30 - 2.44 (m, 2 H) 3.00 - 3.15 (m, 2 H) 3.73 (s, 3 H) 4.03 - 4.17 (m, 3 H) 4.35 - 4.44 (m, 1 H) 5.71 (d, *J*=8.6 Hz, 1 H) 6.34 (s, 1 H) 6.67 (s, 1 H) 6.79 - 6.89 (m, 3 H) 7.02 (dd, *J*=8.1, 1.5 Hz, 1 H) 7.10 - 7.14 (m, 1 H) 7.32 (d, *J*=8.59 Hz, 1 H) 7.89 (s, 1 H) 8.15 (s, 1 H) 9.14 (s, 1 H) 12.10 (s a, 1 H)

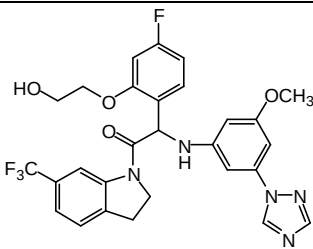
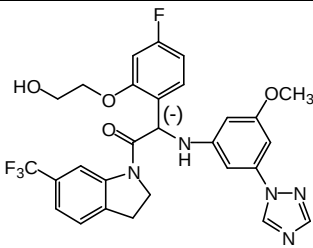
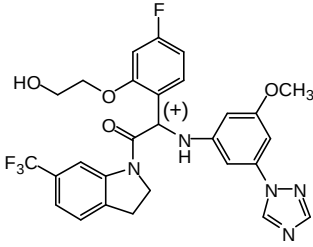
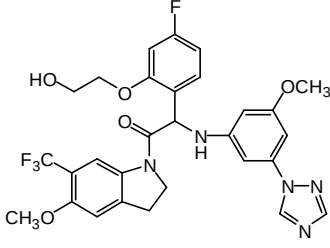
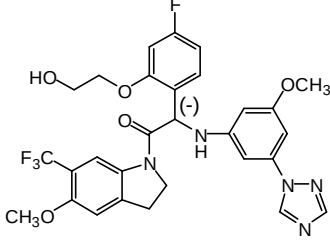
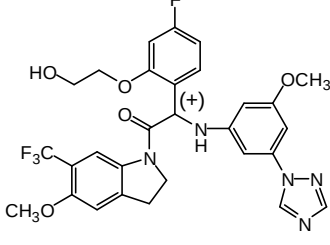
LC/MS (método LC-A): TR 2.94 min, MH⁺ 660

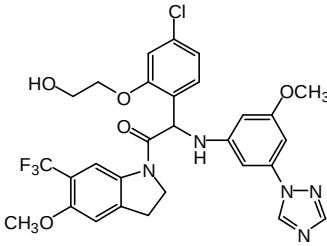
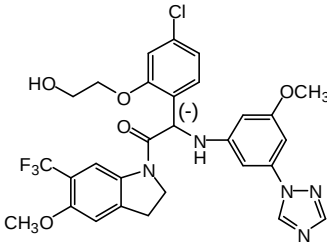
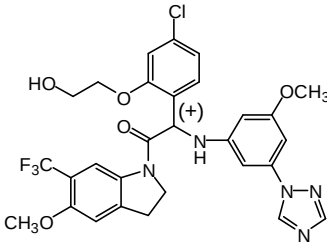
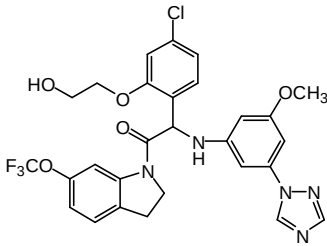
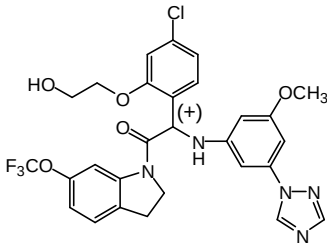
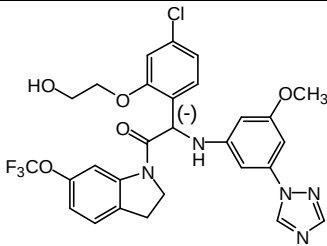
[α]_D²⁰: +34.3° (c 0.274, DMF)

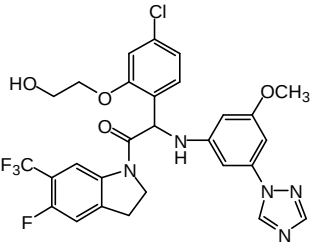
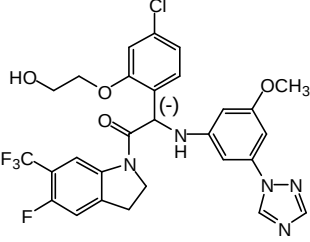
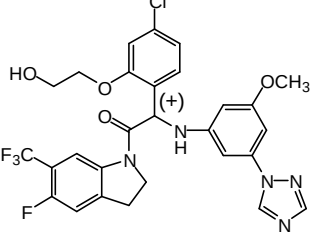
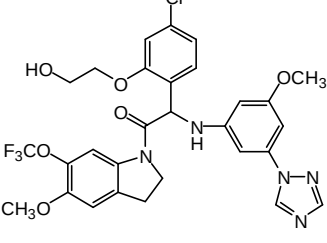
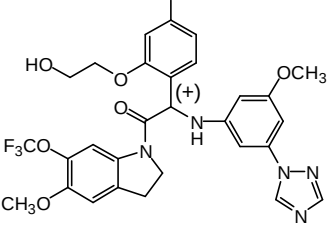
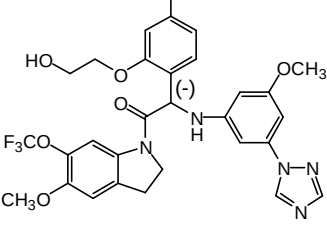
SFC quiral (método SFC-F): TR 2.22 min, MH⁺ 660, pureza quiral 99.47%.

Tabla: compuestos preparados como se ha descrito anteriormente

5

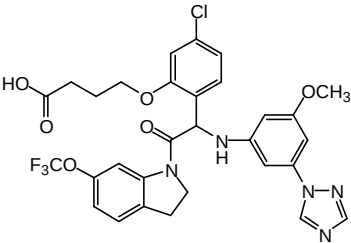
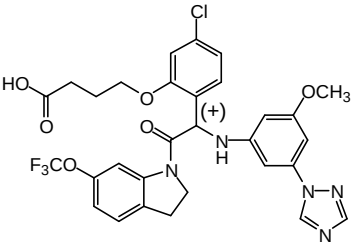
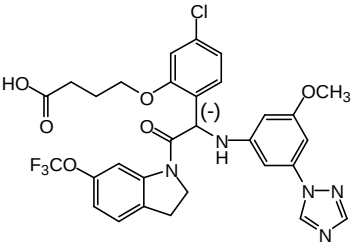
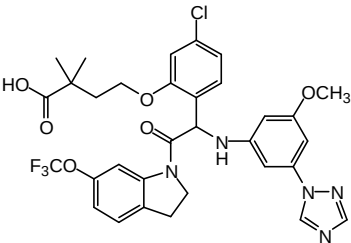
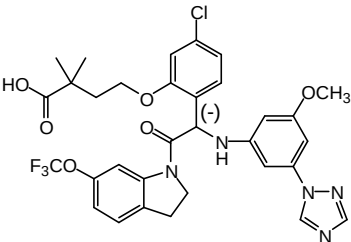
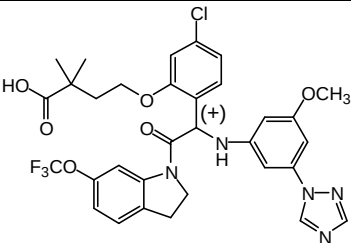
Compuesto	Estructura	Rotación óptica
1		racémico
1A		$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -44.8^{\circ}$
1B		$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +36.2^{\circ}$
2		racémico
2A		$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -45.0^{\circ}$
2B		$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +43.4^{\circ}$

Compuesto	Estructura	Rotación óptica
5		racémico
5A		$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -40.3^{\circ}$
5B		$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +40.0^{\circ}$
6		racémico
6A		$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +45.9^{\circ}$
6B		$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -46.3^{\circ}$

Compuesto	Estructura	Rotación óptica
7		racémico
7A		$[\alpha]_D^{20} = -44.3^\circ$
7B		$[\alpha]_D^{20} = +35.6^\circ$
8		racémico
8A		$[\alpha]_D^{20} = +39.3^\circ$
8B		$[\alpha]_D^{20} = -44.4^\circ$

Compuesto	Estructura	Rotación óptica
5 9		racémico
10 9A		$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -35.1^{\circ}$
15 9B		$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +32.3^{\circ}$
20 10		racémico
25 10A		$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -38.4^{\circ}$
30 10B		$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +37.5^{\circ}$

Compuesto	Estructura	Rotación óptica
11		racémico
11A		$[\alpha]_{D^{20}} = -28.9^{\circ}$
11B		$[\alpha]_{D^{20}} = +23.8^{\circ}$
12		racémico
12A		$[\alpha]_{D^{20}} = +30.4^{\circ}$
12B		$[\alpha]_{D^{20}} = -36.9^{\circ}$

Compuesto	Estructura	Rotación óptica
13		racémico
13A		$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +38.4^{\circ}$
13B		$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -43.2^{\circ}$
14		racémico
14A		$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -32.8^{\circ}$
14B		$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +32.8^{\circ}$

Compuesto	Estructura	Rotación óptica
5 15		racémico
10 15A		$[\alpha]_{D^{20}} = -31.5^{\circ}$
15 15B		$[\alpha]_{D^{20}} = +28.2^{\circ}$
20 16		racémico
25 16A		$[\alpha]_{D^{20}} = -35.4^{\circ}$
30 16B		$[\alpha]_{D^{20}} = +34.3^{\circ}$

ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE LOS COMPUESTOS DE LA INVENCION

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 (eGFP). 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 n.º	CE ₅₀ (µM)	N	CC ₅₀ (µM)	N	IS	N
1	0.0031	4	12	4	3350	4
1A	1.00	3	7.7	3	7.8	3
1B	0.0028	4	9.8	2	3530	2
2	0.0028	4	13	4	4000	4
2A	0.27	3	12	3	43	3
2B	0.0018	3	10	3	4180	3
3	0.0019	4	8.5	4	5210	4
3A	0.52	3	11	3	22	3
3B	0.00099	3	8.7	3	11400	3

	compuesto n.º	CE ₅₀ (µM)	N	CC ₅₀ (µM)	N	IS	N
5	4A	1.2	4	7.8	4	6.4	4
	4B	0.0010	3	11	3	16100	3
	5	0.00082	3	11	3	11200	3
10	5A	0.042	3	11	3	275	3
15	5B	0.00062	3	9.2	3	14400	3
	6	0.00097	3	3.3	3	3370	3
	6A	0.00059	9	8.5	9	14900	9
	6B	0.092	7	7.3	7	79	7
	7	0.0030	3	10	3	3410	3
20	7A	0.43	3	11	3	26	3
25	7B	0.0018	3	7.6	3	4180	3
	8	0.0021	3	9.5	3	4410	3
	8A	0.0015	3	12	3	7360	3
	8B	0.25	3	12	3	47	3
	9	0.0016	4	3.9	3	2850	3
30	9A	0.25	3	4.2	4	17	3
35	9B	0.00060	3	10	3	13800	3
	10	0.00035	3	10	3	26600	3
	10A	0.063	3	10	3	165	3
	10B	0.00025	3	11	3	51400	3
	11	0.00031	3	15	3	53500	3
	11A	0.045	3	11	3	246	3

	compuesto n.º	CE ₅₀ (µM)	N	CC ₅₀ (µM)	N	IS	N
5	11B	0.00020	3	12	3	45200	3
	12	0.0022	3	13	3	5660	3
	12A	0.0012	3	13	3	11000	3
10	12B	0.32	3	12	3	37	3
	13	0.00023	3	11	3	59500	3
	13A	0.00012	4	12	4	103601	4
15	13B	0.012	3	12	3	972	3
	14	0.00041	3	10	3	24900	3
	14A	0.42	3	9.1	3	22	3
20	14B	0.00027	4	9.4	4	35500	4
	15	0.00022	3	11	3	58700	3
	15A	0.0053	3	10	3	1970	3
25	15B	0.00013	3	11	4	94800	3
	16	0.00011	3	11	3	95800	3
30	16A	0.014	3	11	3	800	3
	16B	0.000069	5	6.2	5	>174673	5

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

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

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 gen 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 µl/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 µM – 0.000064 µM o 2.5 µM – 0.0000064 µM 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 µl 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 µl 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 µl). 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 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos. Después de la adición de 5 µl de los lisados celulares, se realizó una etapa de desnaturalización de cinco minutos a 75 °C (tabla 3B). Posteriormente, se añadieron 7.43 µl 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 µl/pocillo en placas LightCycler qPCR de 96 pocillos en las que se añadieron 3 µl 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).

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

Mezcla A					
A	Placas	8			
	Muestras	828			
				Vol. de reacción (µl)	20
	Elemento de mezcla	Concentración			Volumen para (µl)
		Unidad	Patrón	Final	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

35 Etapa de
B desnaturalización:

Etapa	Temp.	Tiempo
Desnaturalización	75°C	5'
Mantenimiento	4°C	Mantenimiento

C Mezcla B

5	Muestras	864				
10	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
15	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
20	Volumen total de la mezcla (µl)				7.43	

25 Protocolo de síntesis de

D ADNc

30	Etapa	Temp.	Tiempo
	Trans. inv.	42°C	30'
	Desnaturalización	99°C	5'
35	Mantenimiento	4°C	Mantenimiento

Tabla 4: Protocolo y mezcla de qPCR.

5	A Mezcla C					
10	Muestras	833			Vol. de reacción (µl)	25
15	Elemento de mezcla	Concentración			Volumen para (µl)	
		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
25	F3utr258	µM	20	0.3	0.38	316.54
	R3utr425	µM	20	0.3	0.38	316.54
	P3utr343	µM	20	0.1	0.13	108.29
30	Factin743	µM	20	0.3	0.38	316.54
	Ractin876	µM	20	0.3	0.38	316.54
	Pactin773	µM	20	0.1	0.13	108.29
35	Volumen de mezcla / tubo (µl)				22.02	
	ADNc				3.00	

Protocolo

B qPCR3

5

10

15

20

Etapas	Temp.	Tiempo	Velocidad de la rampa	
preincub./desnat.	95°C	10 min	4.4	
Desnaturalización	95°C	10 s	4.4	40 ciclos
Hibridación	58°C	1 min	2.2	
Elongación	72°C	1 s	4.4	
Refrigeración	40°C	10 s	1.5	

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

25

30

35

Protocolo A						
RT-qPCR para TC974#666 del serotipo 1						
compuesto n.º	EC ₅₀ (µM)	N	CC ₅₀ (µM)	N	IS	N
1B	0.0015	4	>2.5	4	>2290	4
2B	0.0060	5	>2.5	5	>744	5
3B	0.0024	3	>2.5	2	>1550	2
4B	0.00057	4	>2.5	4	>8060	4
5B	0.0020	4	>2.5	4	>981	4
6A	0.00064	4	>2.5	4	>10900	4
7B	0.00088	3	>2.5	3	>6750	3

5

10

15

20

25

30

35

Protocolo A						
RT-qPCR para TC974#666 del serotipo 1						
compuesto n.º	EC ₅₀ (µM)	N	CC ₅₀ (µM)	N	IS	N
8A	0.0020	3	>2.5	3	>1570	3
9B	0.00099	3	>2.5	3	>2860	3
10B	0.00036	3	>2.5	3	>8670	3
11B	0.000095	3	>2.5	3	>4180	3
					0	
12A	0.0021	3	11	3	3850	3
13A	0.00012	3	>2.5	3	>3250	3
					0	
14B	0.00022	3	2.3	3	8720	3
15B	0.00013	3	4.9	3	46500	3
16B	0.000092	3	>1.0	3	>2310	3
					0	

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

5		Protocolo A					
		RT-qPCR para 16681 del serotipo 2					
10	compuesto n.º	EC ₅₀ (µM)	N	CC ₅₀ (µM)	N	IS	N
	1B	0.0024	3	>2.5	1	>1480	1
	2B	0.0021	3	4.3	3	2070	3
15	3B	0.0014	3	13	3	5680	3
	4B	0.00045	3	2.4	3	6270	3
20	5B	0.00052	3	2.8	3	6730	3
	6A	0.00049	5	11	5	18700	5
	7B	0.0019	3	>2.5	2	>9150	2
25	8A	0.00038	3	>0.99	3	3620	3
	9B	0.00047	3	>2.5	2	>4250	2
	10B	0.00015	3	>1.0	3	>10700	3
30	11B	0.000059	3	5.0	3	64900	3
	12A	0.00042	3	14	3	19800	3
	13A	0.000057	3	>2.5	3	>53100	3
35	14B	0.00016	4	2.6	3	>9320	3
	15B	0.000100	3	6.3	4	>22600	3
	16B	0.000055	3	>1.0	3	>44200	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

5

10

15

20

25

30

35

Protocolo A						
RT-qPCR para H87 del serotipo 3						
compuesto n.º	EC ₅₀ (µM)	N	CC ₅₀ (µM)	N	IS	N
1B	0.025	3	>2.5	3	>123	3
2B	0.038	4	>2.5	4	>118	4
3B	0.023	3	>2.5	3	>136	3
4B	0.011	3	2.3	3	228	3
5B	0.015	4	>2.2	4	>116	4
6A	0.0081	4	>2.5	4	>227	4
7B	0.013	3	>2.5	3	>259	3
8A	0.015	3	>2.5	3	>203	3
9B	0.0064	4	>1.0	1	>103	1
10B	0.0059	3	>2.5	3	>414	3
11B	0.0065	3	>2.5	3	>991	3
12A	0.036	3	12	3	384	3
13A	0.0018	3	>2.5	3	>1580	3
14B	0.0055	3	>2.5	3	>644	3
15B	0.0028	3	5.8	3	3130	3
16B	0.00087	3	>1.0	3	>1780	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

5

10

15

20

25

30

35

Protocolo A						
RT-qPCR para H241 del serotipo 4						
compuesto n.º	EC ₅₀ (µM)	N	CC ₅₀ (µM)	N	IS	N
1B	0.18	3	2.2	2	10	2
2B	0.15	3	>2.5	3	>11	3
3B	0.098	3	>2.5	2	>25	2
4B	0.076	3	1.8	3	23	3
5B	0.090	3	>2.5	2	>33	2
6A	0.060	6	>2.5	4	>53	4
7B	0.12	3	1.1	3	10	3
8A	0.056	3	1.1	2	21	2
9B	0.087	3	2.5	3	27	3
10B	0.032	3	1.1	2	27	2
11B	0.020	3	3.3	3	184	3
12A	0.10	3	5.5	3	96	3
13A	0.010	3	2.6	3	251	3
14B	0.023	3	1.4	3	61	3
15B	0.015	3	2.3	3	174	3
16B	0.0053	3	1.2	2	181	2

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