

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

2020
Bogotá, D.C.,

Abogado
LUIS FELIPE CASTILLO GIBSON
info@castillograu.com

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-068644- -00007-0000

Fecha: 2012-09-26 12:46:53 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALI
Act. 519 TRASLADOINFORME Folios: 13

ASUNTO Radicación 10 068 644
 Trámite 011
 Evento 379
 Actuación 519
 Oficio
 Folios 13

17390

Patente de Invención	☒	Patente de Modelo de Utilidad	☐
Vía Nacional	☐		
Vía PCT (Fase Nacional)	☐	Capítulo I	☐
		Capítulo II	☒

No. Solicitud Internacional PCT/CN2007/003139
Fecha de Presentación Internacional 05/Noviembre/2007

Como resultado del Examen de Fondo realizado, con fundamento en el Artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se comunica:

1. Documentos estudiados

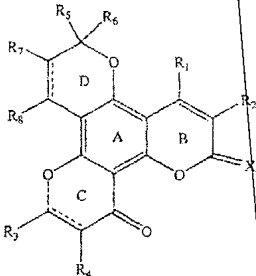
Descripción:	Folios 11 a 200	08/Junio/2010
Reivindicaciones:	Folios 201 a 208	08/Junio/2010

2. Objeto de la invención

Título de la solicitud: "Compuestos de Dipirano-Cumarina Tetracíclicos con Actividades Antivirus de la Inmunodeficiencia Humana y Anti-Mycobacterium Tuberculosis".

El problema planteado en esta solicitud consiste en suministrar compuestos con actividad mejorada, modificando la estructura del compuesto nativo (+)-calanolida A para el tratamiento del virus de la inmunodeficiencia humana del tipo 1 (VIH-1) e infección con *Mycobacterium tuberculosis*.

Para resolver este problema técnico la solicitud en estudio proporciona un compuesto de la fórmula (I).



El objeto de la presente Solicitud se relaciona con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP): C07D 493/16.

3. Reivindicaciones relativas a un uso o a un segundo uso (Art 14 y 21 D 486)

El uso de las reivindicaciones 10 y 11 no es patentable, de acuerdo con el Art 14.

4. De la Solicitud de Patente

Reivindicaciones (Art 30 D 486, Art 22 PCT)

Las reivindicaciones 1, 2 y 6 no son claras porque dicen que el $\equiv$ en el anillo C es un enlace sencillo carbono-carbono o un enlace doble carbono-carbono y en el anillo D es un enlace sencillo carbono-carbono o un enlace doble carbono-carbono y que --- puede ser un enlace sencillo carbono-carbono o ningún enlace. No es claro como el átomo de oxígeno del anillo C puede estar unido por el enlace doble o por un enlace sencillo, caso en el cual sería necesario tener un átomo adicional, en cuanto al anillo D, este no comprende ningún $\equiv$, por cual no es claro a que se refiere la definición dada, y en cuanto a ---, si este no está presente necesariamente el oxígeno necesitaría otro átomo al cual unirse. Se sugiere realizar las aclaraciones necesarias.

Se encuentran varios problemas de redacción que no permiten tener claridad en cuanto a la materia reclamada algunos son: en la definición de R^3 se dice al final "y grupos sustituidos seleccionados de ariilo o alquilo", donde no es claro a cuales grupos se refiere el solicitante o si es un error de redacción; "formar un anillo de carbono saturado de 3 miembros y/o 6 miembros adicional", donde no es claro si el solicitante se refiere a que este anillo es formado por R_3 y R_4 . Se sugiere ajustar el capítulo reivindicatorio para que tenga total claridad en idioma castellano.

No se encuentra soporte descriptivo de la obtención de solvatos de los compuestos reclamados en la solicitud, y puesto que no todos los compuestos forman solvatos se sugiere eliminarlos del alcance del pliego reivindicatorio.

No es claro a que corresponden los primeros 4 compuestos reclamados en la reivindicación 8, puesto que se encuentran 2 sustituyentes en la posición 10, al revisar el capítulo descriptivo se encuentra que los nombres coinciden, sin embargo las estructuras de los compuestos no corresponden con el nombre asignado. Se solicita realizar las aclaraciones necesarias.

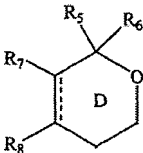
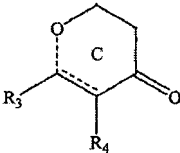
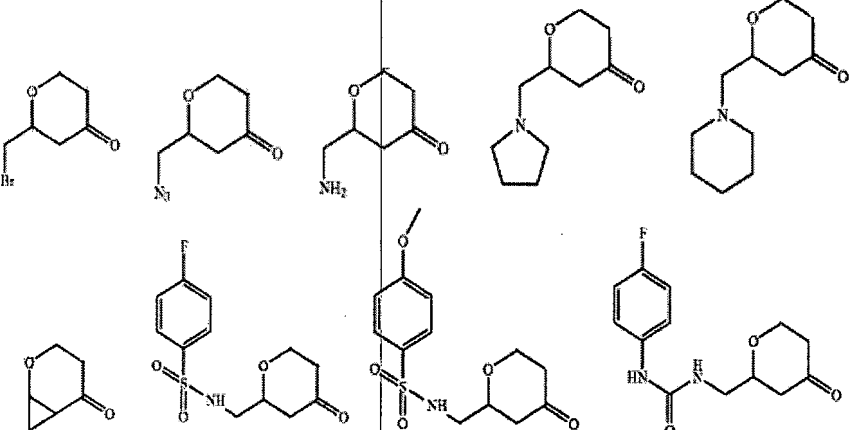
El cuarto compuesto de la reivindicación 8 no coincide con la fórmula (I) y adicionalmente, no se encuentra soporte descriptivo de su obtención o prueba. Por lo tanto se sugiere eliminar este compuesto del alcance del pliego reivindicatorio.

Las reivindicaciones 12 – 14 se refieren a procesos que no se encuentran caracterizados adecuadamente, puesto que no se definen las condiciones de cada una de las etapas de los procesos, los compuestos involucrados ni los medios en los que se llevan a cabo las mismas. Se sugiere caracterizar los procesos en cada una de las etapas por los ingredientes que participan y las condiciones de cada una de las etapas.

En las reivindicaciones 12 y 14 se reclaman procedimientos que si bien se nombran en el capítulo descriptivo no se encuentra soporte de algún proceso realizado como

el reclamado en esta reivindicación con un compuesto según la fórmula (I) cuando X corresponde a S y los radicales R₁ - R₈ correspondan a los mismos de la reivindicación 1, por otra parte, en la reivindicación 12 se nombra que los radicales R₁ - R₆ son como se definió en la reivindicación 1, pero no se definen R₇ y R₈. Por lo tanto se sugiere eliminar estas reivindicaciones del alcance del pliego reivindicatorio puesto que no se encuentran soporte en la descripción.

La reivindicación 1 no es concisa porque las definiciones de R₁, R₂, R₃ incluyen géneros funcionales como heterociclilo, arilo y alquilo sin definir el número de carbonos, ni los heterociclos específicos a los cuales se refiere el solicitante. Se sugiere restringir la solicitud a una razonable generalización del tipo de compuestos que ha sido sintetizado ó probado, es decir, que se encuentran debidamente soportados. En la descripción se encuentra el siguiente soporte para los compuestos que se ajustan a la fórmula (I):

Sustituciones	Soporte de los ejemplos presentados	
R ₁	AlquilC ₃	
R ₂	H	
X	O	
		
		

La reivindicación 9 no es concisa porque se refiere a una composición definiendo los ingredientes como un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, definiéndolos de forma general, lo cual no permite definir los ingredientes inequívocamente. Adicionalmente, no se encuentra soporte de la obtención o prueba de alguna composición de los compuestos de la solicitud. Se sugiere restringir el capítulo reivindicatorio a una razonable generalización de lo que se encuentra debidamente soportado en la descripción.

Descripción (Art 28 D 486)

En la descripción se nombra al compuesto 2 (Pág. 4, línea 15, Fl. 14), sin embargo éste no se encuentra identificado en el capítulo descriptivo, el solicitante puede referirse al compuesto que se encuentra en la Pág. 2 (Línea 30, Fl. 12). Se solicita realizar las aclaraciones o correcciones necesarias.

Durante la lectura del capítulo descriptivo se encuentran varias estructuras y esquemas, que se encuentran al final de la pagina y aparecen cortados (Pág. 5, Fl.

15; Pág. 33, Fl. 43; Pág. 12, Fl. 74; Pág. 92, Fl. 102; Pág. 108, Fl. 118; Pág. 126, Fl. 136; Pág. 136, Fl. 146; Pág. 138, Fl. 148; Pág. 140, Fl. 150; Pág. 143, Fl. 153; Pág. 169, Fl. 179). Se solicita realizar las correcciones necesarias.

Se presentan espacios en blanco en la descripción, y no es claro, si son espacios en blanco innecesarios, o si es posible que falte información en estos folios, como ejemplo se encuentran las páginas 34, 189 y 190 (Fls. 44, 199 y 200).

Se recuerda al solicitante que las objeciones realizadas al capítulo reivindicatorio respecto a los significados de $\equiv$, $---$, claridad en la definición de los radicales, la concordancia entre los nombres y las estructuras de los compuestos, y los errores de redacción también deben ser ajustados en el capítulo descriptivo.

5. Determinación del Estado de la Técnica

El estado de la técnica se determinó con base en la fecha de presentación internacional: 05/Noviembre/2007 y se encontraron los siguientes documentos que anticipan el objeto de esta solicitud:

Ítem	Documento	Título	Fecha de Publicación
D1	US 5,859,050	Methods For the Preparation of (+)-Calanolide A and Analogues Thereof	12/Enero/1999
D2	US 6,670,383	Pyranocoumarin Compounds as a Novel Pharmacophore with Anti-TB Activity	30/Diciembre/2003
D3	CN 1548439	Prepn of Racemized Optically Active Poon Essence A and its Analog	24/Noviembre/2004

D1 <http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=US&NR=5859050A&KC=A&FT=D&ND=&date=19990112&DB=&locale=en> EP divulga (Col. 2, líneas 35 – 38; Col. 50, tabla, líneas 4 – 32; Col. 52, reivindicación 1) un compuesto de la fórmula (I) análogo a la (+)-calanolida A que presenta actividad anti-HIV-1.

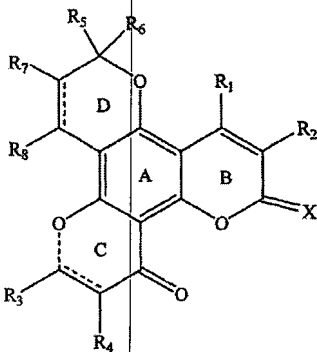
D2 <http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?FT=D&date=20031230&DB=&locale=en> EP&CC=US&NR=6670383B2&KC=B2&ND=1 divulga (Col. 2, línea 65 – Col. 3, línea 37) un compuesto de la fórmula (I) para el tratamiento de enfermedades asociadas con la infección con *Mycobacterium tuberculosis*.

D3 <http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/originalDocument?CC=CN&NR=1548439A&KC=A&FT=D&ND=&date=20041124&DB=&locale=en> EP divulga (Pág. 12, líneas 14 - 15) procedimiento en el que un derivado de cumarina reacciona con cloruro de 2-metil-2-butenol para formar un anillo como el anillo C de los compuestos de la solicitud.

6. Examen de Patentabilidad (Art 14 D486)

Nivel Inventivo (Art18 D486)

La reivindicación 1 consiste en un compuesto de fórmula general (I)



o un isómero óptico, sal o solvato farmacéuticamente aceptable del mismo.

Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D1	D2
Un compuesto de fórmula (I) 	Un compuesto de fórmula (I) 	Un compuesto de fórmula 44 o 22
X: O	O	O
R ₁ : H, alquilC ₁₋₆ , cicloalquilC ₃₋₆	R ₁ : H, alquilC ₁₋₆ , ciclohexil	Propilo
R ₂ : H, halógeno, alquilC ₁₋₆	R ₂ : H, halógeno, alquilC ₁₋₆	H
R ₃ : metileno sustituido con halógeno, amino, amino sustituido	R ₈ y R ₉ : alquil mono o polifluorinado, aminoalquilC ₁₋₈ , alquilC ₁₋₈ -amino-alquilC ₁₋₈ , di (alquilC ₁₋₈)-amino-alquilC ₁₋₈	No se menciona
R ₄ : H, metilo, etilo	R ₃ y R ₄ : H, alquilC ₁₋₆ , aril mono o polifluorinado	No se menciona
R ₅ : H, alquilC ₁₋₆ , fenilo sustituido con halógeno	R ₅ : H, alquilC ₁₋₆ , aril mono o polifluorinado	Metilo
R ₆ : H, alquilC ₁₋₆ , fenilo sustituido con halógeno	R ₆ : H, alquilC ₁₋₆ , aril mono o polifluorinado	Metilo
R ₇ : H, alquilC ₁₋₆	R ₇ : H, metilo, etilo	H
R ₈ : H	H	H

Los documentos D1 y D2 se consideran el estado de la técnica cercano a la invención definida en la reivindicación 1 porque divulgan compuestos anti-VIH y con actividad contra la infección de *Mycobacterium tuberculosis*.

El documento D1 enseña compuestos de fórmula (I) con actividad anti-HIV-1 que corresponden con la fórmula (I) de la solicitud cuando X es O; R₁ es H, alquilC₁₋₆ o cicloalquilC₃₋₆; R₂ es H, halógeno o alquilC₁₋₆; R₃ es metileno sustituido con halógeno, amino o amino sustituido; R₄ es H, metilo o etilo; R₅ es H, alquilC₁₋₆ o fenilo sustituido con halógeno; R₆ es H, alquilC₁₋₆, fenilo sustituido con halógeno; R₇ es H, alquilC₁₋₆, y R₈ es H (Col. 52 – 53, reivindicación 1)

El documento D1 también da a conocer composiciones de los compuestos de fórmula (I) (Pág. 27, líneas 19 – 49).

El documento D2 enseña compuestos para el tratamiento de enfermedades asociadas con la infección con *Mycobacterium tuberculosis* como los compuestos 22 y 44 que coinciden con la fórmula (I) cuando X es O, R₁ es alquilC₃, R₂ es H, R₅ es metilo, R₆ es metilo, R₇ es hidrogeno y R₈ es hidrogeno (Col. 52 – 54, tabla 3).

Adicionalmente, el documento D2 enseña composiciones de estos compuestos (Col. 8, líneas 24 – 53; Col. 60, reivindicaciones 18 y 19).

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1 y los compuestos del documento D1 consiste en que se encuentran compuestos específicos en los que R₃ corresponde a un metileno sustituido.

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1 y el los compuestos del Documento D2 consiste en que R₃ corresponde a un metileno sustituido.

El efecto que logra incluir los sustituyentes en el grupo metilo del R₃ es la selección de compuestos con actividad mejorada anti VIH y anti-*Mycobacterium tuberculosis*.

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: “cómo obtener una selección de los compuestos de fórmula (I) del documento D1 para obtener compuestos con actividad mejorada anti VIH y anti-*Mycobacterium tuberculosis*”.

Sin embargo, en el documento D1 ya se contemplaba la posibilidad de usar alquil mono o polifluorinado, aminoalquilC₁₋₈, alquilC₁₋₈-amino-alquilC₁₋₈, di (alquilC₁₋₈)-amino-alquilC₁₋₈ en la posición del radical R₃ (Col. 52 – 53, reivindicación 1) y en el documento D2 se enseña la actividad anti-*Mycobacterium tuberculosis* de esta clase de compuestos (Col. 52 – 54, tabla 3). Por otro lado no se encuentra reportada en el capítulo descriptivo la actividad de ninguno de los compuestos que coinciden con la fórmula (I) y aun si ésta se reportara para algunos de los compuestos, se encuentra en la literatura compuestos que coinciden con la fórmula (I) de la solicitud que no presentan actividad anti VIH⁽¹⁾, y por lo tanto la selección reclamada en esta solicitud no cuenta con nivel inventivo.

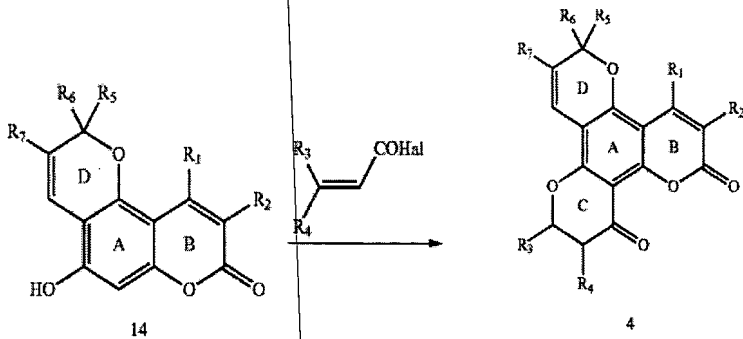
(1) XUE, H. ET AL., “Highly Suppressing Wild-Type HIV-1 and Y181C Mutant HIV-1 Strains by 10-Chloromethyl-11-demethyl-12-oxo-calanolide A with Druggable Profile”, Journal of Medicinal Chemistry, Vol. 53, 2010, Págs. 1397 – 1401.

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, realizaría una selección de los compuestos de los documentos D1 según las enseñanzas de los documentos D1 y D2 para llegar así a la selección de la reivindicación 1 de la solicitud sin generar ningún efecto técnico inesperado ni la solución a algún problema técnico. Por lo cual se considera obvia.

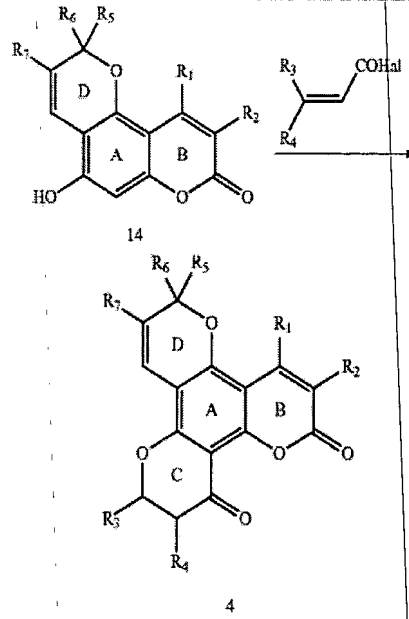
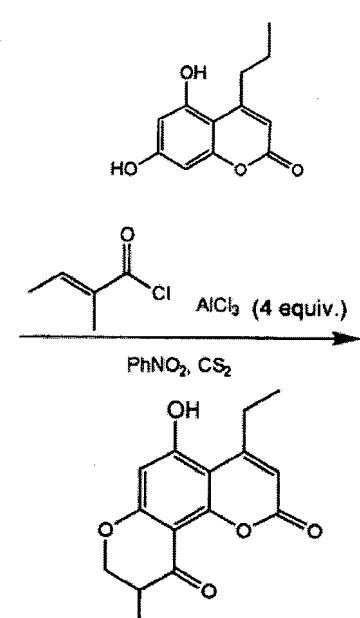
Puesto que las reivindicaciones dependientes 2 – 9 no mencionan características inventivas adicionales tampoco se pueden considerar inventivas.

Conclusión:
Las reivindicaciones 1 – 9 cumplen el requisito de novedad (Art. 16), pero no cumplen con el requisito de nivel inventivo (Art. 18).

La reivindicación 13 consiste en un proceso para preparar un compuesto tetraciclocumarina (4), que está caracterizado porque el compuesto de cumarina tricíclica 14 con los anillos A, B y D se hace reaccionar con un haluro de acilo del ácido α,β -no saturado para formar el anillo C:



Comparación de las características técnicas **esenciales**, con las del Estado de la Técnica:

Características esenciales	D3
Proceso que se caracteriza por:	Proceso que se caracteriza por:
	

El documento D3 se considera el estado de la técnica cercano a la invención definida en la reivindicación 1 porque da a conocer un procedimiento como se muestra en la tabla en el que un derivado de cumarina reacciona con cloruro de 2-metil-2-butenoil

para formar un anillo como el anillo C de los compuestos de la solicitud (Pág. 9, líneas 14 - 15).

La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1 y el procedimiento del documento D3 consiste en que el compuesto inicial tiene el anillo D.

No existe ningún efecto inesperado generado porque el compuesto inicial 14 tenga el anillo D.

Por lo tanto, el problema técnico objetivo que pretende resolver esta invención se puede formular así: "cómo utilizar el procedimiento conocido en D1 para obtener un compuesto de fórmula 4".

Sin embargo, la utilización de el mismo tipo de reacción para obtener un derivado de cumarina que tiene un anillo como el anillo C de los compuestos de la solicitud ya se encontraba divulgado en el documento D3 (Pág. 9, líneas 14 - 15) y no se observa ningún efecto técnico inesperado generado por el hecho de que el compuesto inicial 14 tenga el anillo D.

En consecuencia, la persona del oficio normalmente versada en la materia, aplicaría el procedimiento del documento D3 para obtener el compuesto 4 llegando así al objeto de la reivindicación 13 de la solicitud. Por lo cual se considera obvia.

Conclusión:

La reivindicación 13 cumple el requisito de novedad (Art. 16), pero no cumple con el requisito de nivel inventivo (Art. 18).

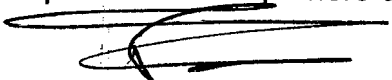
7. Conclusión

Los requisitos de Patentabilidad de la presente Solicitud están afectados así:

Ítem	Documento	Reivindicaciones afectadas	Requisito que afecta
D1	US 5,859,050	1 - 9	Nivel Inventivo
D2	US 6,670,383	1 - 9	Nivel Inventivo
D3	CN 1548439	13	Nivel Inventivo

En cumplimiento del artículo 45 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le indica que debe dar respuesta dentro del término de sesenta (60) días contados a partir de la fecha de notificación de la presente comunicación. En caso de no dar respuesta al presente requerimiento, o si a pesar de la respuesta subsistieran los impedimentos para la concesión, se denegará la patente.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No. 10 de 2001.


JOSÉ LUIS SALAZAR LÓPEZ
 Director de Nuevas Creaciones (C)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista, de fecha 02 OCT. 2012

Elaborado por: Jeny Paola Villate Becerra *P. Villate*
 Revisado por: Consuelo Leguizamón *CL*

Expediente 10 068 644 1er Art 45

Highly Suppressing Wild-Type HIV-1 and Y181C Mutant HIV-1 Strains by 10-Chloromethyl-11-demethyl-12-oxo-calanolide A with Druggable Profile

Hai Xue,^{†,§} Xiaofan Lu,^{†,§} Purong Zheng,[†] Li Liu,[†] Chunyan Han,[†] Jinping Hu,[†] Zijie Liu,[†] Tao Ma,[†] Yan Li,[†] Lin Wang,[†] Zhiwei Chen,^{*,†} and Gang Liu^{*,†}

[†]Department of Synthetic Medicinal Chemistry, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, No. 2 Nan Wei Road, Beijing 100050, China and [‡]AIDS Institute, Department of Microbiology, Li Ka Shing Faculty of Medicine, The University of Hong Kong, Room 45, 5/F Laboratory Block, 21 Sassoon Road, Pokfulam, Hong Kong. [§]These authors contributed to this study equally.

Received November 9, 2009

We herein report a new compound: 10-chloromethyl-11-demethyl-12-oxo-calanolide A (**20**, EC₅₀ = 7.4 nM, SI = 1417), which demonstrates a druggable profile with 32.7% oral bioavailability in rat, tolerated oral single dose toxicity in mice, and especially the feature of highly efficient suppression of the wild-type HIV-1 and Y181C mutant HIV-1 at an EC₅₀ = 7.4 nM and EC₅₀ = 0.46 nM, respectively.

Introduction

Over 20 antiretroviral medications have now been approved for the treatment of HIV-infected individuals.¹ Although highly active antiretroviral therapy (HAART^a) has been very effective in suppressing HIV load, these medications present several limitations such as the rapid emergence of drug-resistant mutant strains due to the narrow range of chemical structure of the cocktail components. Because of viral resistance and issues related to drug side effects, there remains a great need to discover novel antivirals, especially ones that function as nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs). Today, four NNRTIs have been approved by the FDA,² therefore, the scarcity of unique inhibitors warrants the development of novel NNRTI compounds.

(+)-Calanolide A (Figure 1) was previously described as the first natural product that inhibits HIV-1 reverse transcriptase.³ It inhibits reverse transcriptase by a mechanism involving at least two binding sites, which are distinguished as having competitive and uncompetitive components.⁴ Therefore, this type of drug could inhibit diverse HIV-1 strains resistant to other nucleoside and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors.^{5–7} In particular, (+)-calanolide A is unique in inhibiting HIV-1 isolates carrying the viral reverse transcriptase Y181C amino acid mutation, which is associated with high-level resistance to most current NNRTIs.^{6–8} In addition, because (+)-calanolide A displays additive to synergistic anti-HIV activity with a range of nucleoside analogues, protease inhibitors, and NNRTIs,^{4,5,7} this compound could

be used in clinical settings in combination with other antiviral drugs to suppress HIV-1 mutants. Nevertheless, its low inhibitory potency against HIV-1 probably may account for the limitation in clinical trials although it was shown to be well tolerated in phase Ia/Ib studies.^{9,10} Thus, targeted modification of (+)-calanolide A to find new analogues with high potency against HIV-1 has become crucial.

There are several papers documenting the chemical modifications of (+)-calanolide A and related natural species in an effort to find new analogues with higher anti-HIV-1 potency.^{11–16} Zembower and co-workers illustrated for the first time that the 12-ketone form of calanolide A exhibits anti-HIV-1 activity; however, this molecule possesses a lower therapy index than the parent natural product (+)-calanolide A.^{11,12} Through a systematic analysis of structure–activity relationships (SARs), we found that 10-bromomethyl-12-oxo-calanolide A (**3**, Figure 1) has significantly enhanced antiviral potency (EC₅₀ = 2.85 nM).¹⁶ To address the concern that compound **3** bearing a bromine atom at position C-10 of ring C may confer toxicity, in this article we describe the modifications of ring C involving a replacement of the bromine atom, with the aim of finding alternative antiviral drug candidate presenting similar or higher anti-HIV activity against both wild type and drug mutants with tolerated toxicity, and acceptable oral bioavailability.

Results and Discussion

Chemistry. To replace bromine atom, we carried out a nucleophilic substitution reaction of the three-rings brominated intermediate **4** with NaN₃ or NaSCH₃ in DMF to prepare the intermediates **5** and **10** followed by the construction of ring D with 1,1-diethoxy-3-methyl-2-butene to afford the analogues **6** and **11** (Scheme 1). Moreover, when compound **4** was treated with K₂CO₃ in anhydrous THF at room temperature, a three-membered cycle attached to ring C in compound **8** was formed through an intramolecular nucleophilic substitution. After ring closure utilizing 1,1-diethoxy-3-methyl-2-butene, a new analogue **9** was readily obtained, termed as 10,11-cyclopropyl-12-oxo-calanolide A. Oxidation

*To whom correspondence should be addressed. For Z.C.: phone, (852) 2819 9825; fax, (852) 2817 7805; E-mail: zchenai@hku.hk. For G.L.: phone, +86 10 63167165; fax, +86 10 63165246; E-mail: gliu@imm.ac.cn.

^aAbbreviations: HIV, human immunodeficiency virus; HAART, highly active antiretroviral therapy; NNRTI, nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor; EC₅₀, half maximal effective concentration; SI, selectivity index; FDA, Food and Drug Administration (USA); DMF, dimethylformamide; THF, tetrahydrofuran; DCM, dichloromethane; DCE, 1,2-dichloroethane; m-CPBA, m-chloroperbenzoic acid; TCID₅₀, 50% tissue culture infective dose; MRT, mean residence time.

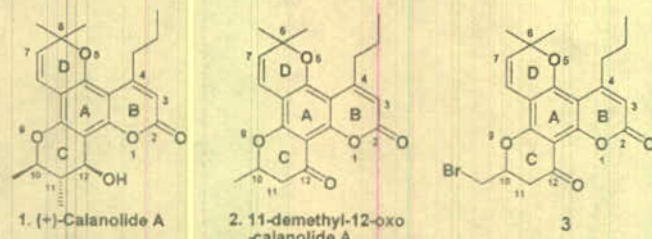
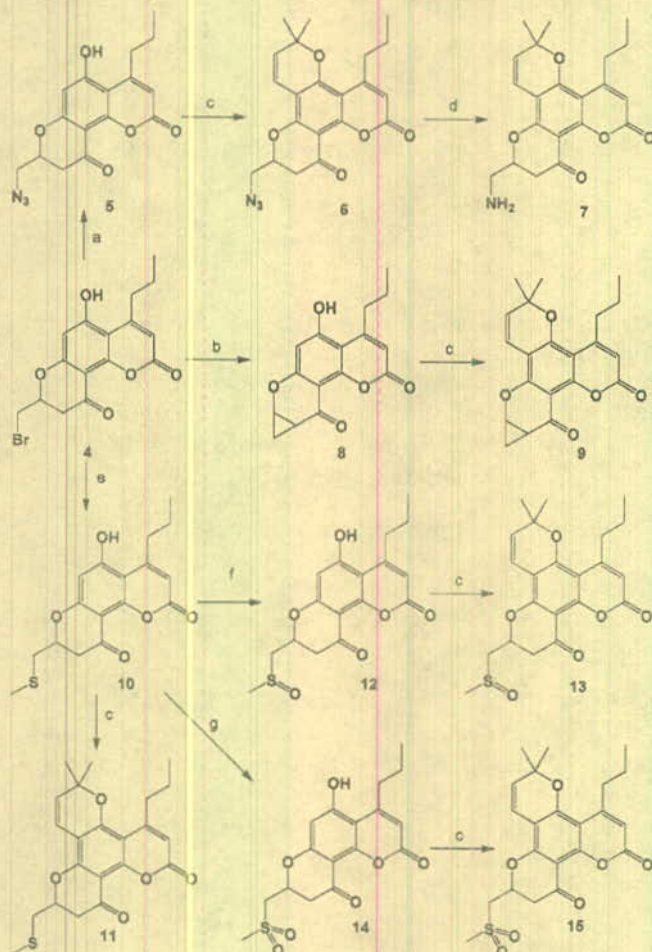


Figure 1. Chemical structure of the biologically active dipyrano-coumarins.

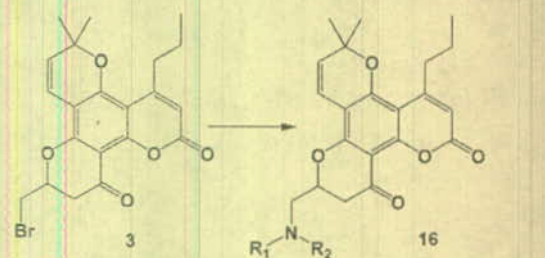
Scheme 1^a



^a Reagents and conditions: (a) NaN_3 , DMF, 75 °C, 1 h; (b) K_2CO_3 , ethanol, reflux, 3 h; (c) 1,1-diethoxy-3-methyl-2-butene, pyridine, toluene, 1.5 h; (d) $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, ethanol, reflux, 3 h; (e) NaSCH_3 , DMF, 75 °C, 0.5 h; (f) *m*-CPBA, THF, 0 °C, 1 h; (g) *m*-CPBA, THF, reflux, 3 h.

of **10** in THF with *m*-CPBA at different temperature could produce the intermediate **12** (0 °C) and **14** (reflux), which were further converted into the corresponding final sulfoxide analogue **13** and the sulfone analogue **15**, respectively. The amine analogue **7** was also synthesized through reduction of the azide analogue **6** with SnCl_2 in the presence of hydrochloric acid. When compound **3** was reacted with secondary amines in THF at room temperature, the classical nucleophilic substitution products (**16a**, **16b**, and **16c**) were obtained (Scheme 2) in which hydrophilic groups were introduced at the C-10 position of 12-oxo-calanolide A. The amine analogue **7** reacted with 4-fluorophenyl isocyanate in THF at 65 °C to afford compound **17a**. Similarly, treatment of compound **7** with 2-methoxyphenyl isothiocyanate in THF, and 4-fluorobenzenesulfonyl

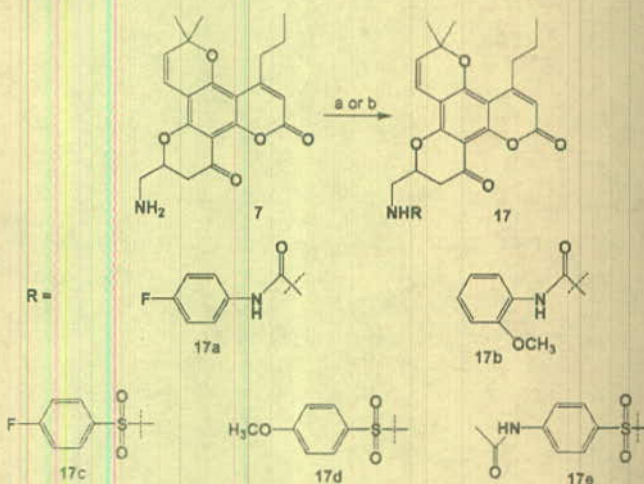
Scheme 2. Nucleophilic Substitution with the Secondary Amine^a



$\text{R}_1=\text{R}_2=\text{CH}_3$, **16a**; $\text{R}_1-\text{R}_2 = \text{N}^+\text{R}_1\text{R}_2$, **16b**; $\text{R}_1-\text{R}_2 = \text{N}^+\text{R}_1\text{R}_2$, **16c**

^a Reagents and conditions: pyrrolidine (or dimethylamine, piperidine), THF, 12–36 h.

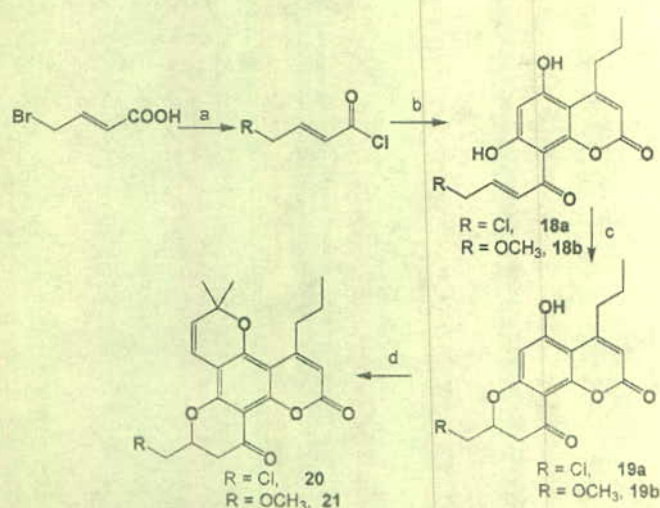
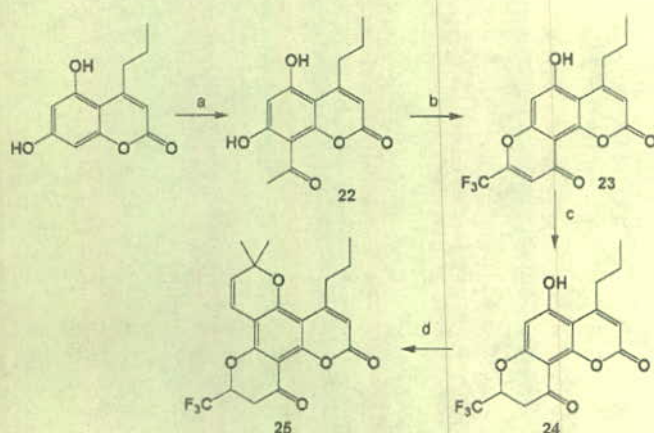
Scheme 3^a



^a Reagents and conditions: (a) 4-fluorophenyl isocyanate (or 2-methoxyphenyl isothiocyanate), THF, reflux, 3 h; (b) 4-fluorobenzenesulfonyl chloride (or 4-methoxybenzenesulfonyl chloride, *N*-acetylsulfanil chloride), DCM, reflux, 3 h.

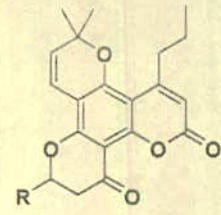
chloride, 4-methoxybenzenesulfonyl chloride, and *N*-acetylsulfanil chloride in dichloromethane, respectively, in the presence of pyridine provided the corresponding amino derivatives **17b**, **17c**, **17d**, and **17e** (Scheme 3).

To obtain the Cl-mimic analogue of compound **3**, 4-bromosubstituted crotonic acid was converted into the corresponding 4-hydroxy species,¹⁷ which was then treated with SOCl_2 . The resulting acyl chloride was reacted with 4-propyl-5,7-dihydroxy coumarin through Friedel–Crafts acylation, using anhydrous AlCl_3 as catalyst. The subsequent ring closure using sodium acetate afforded the three-ringed chloro-intermediate **19a**. The target compound **20** was obtained after the construction of ring D, according to the synthetic method described in Scheme 4. Similarly, the analogue **21** containing an CH_3O -substituent at position C-10 was produced using 4-methoxy-crotonic acid as the starting material.¹⁸ Attempts to prepare the CF_3 -mimic analogue of **3** with this strategy were unsuccessful. An alternative approach was developed which consists of first acylation of coumarin at C-8 position to afford **22**, the subsequent classic condensation with trifluoro anhydride in the presence of pyridine, to produce the unsaturated species **23** followed by reduction of 10,11-double bond with trimethylsilane catalyzed by $\text{Pd}[\text{P}(\text{Ph})_3]\text{Cl}$, and the ultimate ring closure of the above resulted intermediate **24** treated with 1,1-diethoxy-3-methyl-2-butene to obtain the title compound **25** (Scheme 5).

Scheme 4. Synthetic Route for the Cl-Mimic Analogue 20^aScheme 5^a

Antiviral Activity in Vitro. All synthesized compounds were assayed for inhibition of HIV-1 replication against 100 TCID₅₀ HIVADA infections in a pseudovirus-based assay, as previously described.¹⁹ Clearly, aminomethylation at position C-10 or further various acylation of aminomethylated-12-oxo calanolide A were useless for improving the activity against HIV-1. For instance, compounds **6**, **16a–16c** and **17a–17e** became inactive (Table 1). These compounds were also observed with their higher toxicity to the virus host cells (data not show); in particular, the azide analogue **6** exhibited extreme cellular toxicity. The results imply that positive charge groups are inappropriate at C-10 of position.

Methylthioylation at C-10 position (**11**) did also not give an improved inhibitory potency against HIV-1 as compared to (+)-calanolide A. This included its gradually oxidated products of sulfoxide (**13**) and sulfone (**15**). Replacement of bromo atom of compound **3** (EC₅₀ = 0.18 μM) with methoxyl group (**21**) resulted in a similar inhibitory activity to (+)-calanolide A, however, with lower selectivity index (Table 1).

Table 1. Inhibitory Activities of 12-Oxo-calanolide A Analogues against 100 TCID₅₀ HIVADA Infection


Compd.	R	EC ₅₀ (μM)	SI ^b
(+)-1	CH ₃	0.1	16-279
6		^a	^d
7		^a	^d
9		0.0141	709
11		0.456	^d
13		14.4	^d
15		33.9	^d
16a–16c	see scheme 2	^a	^d
17a–17e	see scheme 3	^a	^d
20		0.0074	1417
21		0.18	39.7
25	CF ₃	14.9	^d
Nevirapine		0.0082	3300

^aNo suppression. ^bSelectivity index(SI) was calculated by the formula: IC₅₀/EC₅₀ (cytotoxicity data IC₅₀ were supplemented in Supporting Information). ^cThe substituent at position C10,C11. ^dNot determined.

Significant improvement of activity compared to the natural product (+)-calanolide A was observed with compounds *cis*-10,11-cyclopropyl-12-oxo-calanolide A (**9**) and 10-chloromethyl-12-oxo-calanolide A (**20**). Compound **9** yielded an EC₅₀ value of 14.1 nM (SI = 709) and compound **20** yielded 7.4 nM (SI = 1417), respectively. C-10 halogen-methylation of 12-oxo-calanolide A gave the variable results with their atomic order. Trifluoromethylated compound **25** offered the antiviral activity to 14.9 μM of EC₅₀ value, however, chloromethylated **20** gave a remarkably higher potency of 7.4 nM. With the observation of previous result of bromomethylation of 12-oxo-calanolide A (**3**, EC₅₀ = 2.85 nM), it is likely that the penetration ability of cell membrane is the key factor because, in principle, the fluorine atom is able to improve the binding ability of small molecule through the mimic of hydrogen atom, however, the chlorine atom could help a small molecule passing through a cell membrane with its hydrophobic property. Furthermore, the

Table 2. Biological Activity of **20** in Drug Resistant HIV-1 Strains

EC ₅₀ (nM)	mutants					
	PNL4-3 ^a	K103N	Y181C	Y188L	G190A	T139I
20	7.4	316	0.46	6127	43.9	103.5
(+)-calanolide A	97.5	13416	42.6	10475	385	6151
nevirapine	11.4	464	10591	7166	159.4	2.2

^a Wild-type HIV-1.Table 3. Pharmacokinetic Parameters of **20** in Rats after a Single Oral and Intravenous Dosing (*n* = 3)

	AUC (μg/ mL·h)	MRT (h)	T _{1/2} (h)	T _{max} (h)	C _{max} (μg/ mL)
intravenous	1.5	1.7	1.9	0.03	0.93
oral	4.7	9.2	3.8	8.00	0.34

much stronger electron-withdrawing ability of CF₃ group than that of CH₂Br or CH₂Cl might be another reason that it significantly decreased the electronic interaction between **25** and HIV-1 reverse transcriptase.

Anti-HIV Drug Mutants Profile of Compound 20. Resistance to chemotherapy can develop in a significant number of patients during the long-term HAART that combines three or more different drugs. Efavirenz and nevirapine are the most widely used NNRTIs in combination regimens. Many studies demonstrated that each of these NNRTIs is usually associated with a single point mutation that triggers the development of clinical resistance. For efavirenz, it is the K103N mutation. For nevirapine, it is the Y181C mutation.²⁰ The Y181C mutation can even cause multidrug resistance to NNRTIs.²¹ More importantly, a dual mutation of Y181C and K103N has occurred, which can cause high-level resistance to each of the available NNRTIs. Studies indicated that compound **20** presents the similar potency as nevirapine against the K103N mutant, but at a much higher level than that of (+)-calanolide A (Table 2). The compound **20** was also proved with a moderate potency against G190A single mutation of HIV-1 (EC₅₀ = 43.9 nM) but not for (+)-calanolide A (EC₅₀ = 385 nM) and nevirapine (EC₅₀ = 159.4 nM). Compound **20** was demonstrated an in vitro potency against wild-type HIV-1 approximately 10-fold higher than the natural product (+)-calanolide A, however, exceeding much higher ability (~90-fold) to inhibit the Y181C mutation than (+)-calanolide A while the nevirapine was completely inactive. The compound **20** presents less potency against T139I, which was indicated as a mutant site point of (+)-calanolide A treatment.⁸ The suppression was not observed for the Y188L viral strain in the assays of compound **20**, (+)-calanolide A, and nevirapine (Table 3). Accordingly, it is of particular interest in the inclusion of **20** in a combination regimen to treat patients who have failed other NNRTIs and have developed the Y181C mutation or the Y181C/K103N dual mutations. Therefore, compound **20** deserved to be selected and developed as a new drug candidate against the resistant HIV-1 infection.

Pharmacokinetic Study and Safety Assessment of 20. As indicated in Table 3, when administered at 50 mg/kg orally as a suspension in 0.5% CMC, the compound **20** was rapidly absorbed with a *T*_{max} of 8 h, a favorable half-life of 3.8 h, and mean residence time (MRT) of 9.2 h. The *C*_{max} of **20** was 0.34 μg/mL (860 nM) that is more than 100-fold the EC₅₀ value of anti-HIV-1 activity in vitro (Table 1). The measured oral bioavailability

in this experiment was moderately high (= 32.7%). Single dose toxicity test of compound **20** was carried out in mice. After intragastric administration of **20** with a dose of 4640 mg/kg, no death of the mice was observed and there was no abnormality of the body weight increase for the animals in two weeks (seeing Supporting Information). A long-term toxicity study is underway that will be reported elsewhere when it is finished.

Conclusion

This study provided one new HIV-1 inhibitor of compound **20** with low EC₅₀ value (7.4 nM) and high SI (1417). Compound **20** has presented a druggable profile for its 32.7% oral bioavailability in rat, tolerated oral acute toxicity in mice, and extremely high potency against the clinical Y181C single mutation of HIV-1.

Experimental Section

Preparation of the Cl-Mimic Analogue 20. In a 50 mL round-bottom flask, 4-hydroxy-crotonic acid (250 mg) was treated in SOCl₂ (3 mL) at reflux for 2 h and then the resulting solution of acyl chloride was condensed to an yellow oil. The mixture of anhydrous AlCl₃ (500 mg) and 5,7-dihydroxy-coumarin (330 mg) in 3 mL of PhNO₂ and 15 mL of DCE were added to the flask and were simultaneously stirred at 75 °C for 36 h. After hydrolysis with 100 g of ice and 8 mL of hydrochloric acid, the mixture was extracted with EtOAc for 3 times and then the organic phase was dried and filtered. Chromatography on silica gel of the filtrate eluting first with petroleum and then with petroleum EtOAc (2:1) afforded 228 mg compound **18a** as a yellow powder with the yield of 47.2%; mp 174.5–176.1 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): 11.290 (s, 1H, OH), 11.196 (s, 1H, OH), 6.635–6.798 (m, 2H, alkene-H), 6.376 (s, 1H, Ar-H), 5.911 (s, 1H, 3-H), 4.442 (d, 2H, *J* = 8.4 Hz, Cl-CH₂), 2.861 (t, 2H, *J* = 7.2 Hz, 4-CH₂CH₂CH₃), 1.592 (sex, 2H, *J* = 7.2 Hz, 4-CH₂CH₂CH₃), 0.939 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz, 4-CH₂CH₂CH₃). ESI-MS (*m/z*): 323.14/325.16 [M + H]⁺ (MW = 322.74). HRESIMS obsd *m/z* 323.0689, calcd for C₁₆H₁₆ClO₅⁺ 323.0681.

Anhydrous sodium acetate (10 mg) was added into the solution of **18a** in 20 mL of ethanol and 1 mL of H₂O and then stirred for 5 h at reflux. After condensation to about 3 mL, the resulted mixture was extracted with EtOAc for 3 times. Purification of the dried organic phase through chromatography on silica gel eluting with petroleum–EtOAc (1:1) produced 20 mg **19a** as white powder with the yield of 75%, mp 216.5–218.2 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): 11.814 (s, 1H, OH), 6.315 (s, 1H, Ar-H), 6.046 (s, 1H, 3-H), 4.655–4.737 (m, 1H, 8-H), 3.602 (d, 2H, *J* = 7.2 Hz, ClCH₂), 2.871 (t, 2H, *J* = 7.5 Hz, 4-CH₂CH₂CH₃), 2.752 (m, 1H, 9-CH₂), 2.562 (d, 1H, *J* = 3.3 Hz, 9-CH₂), 1.550 (m, 2H, 4-CH₂CH₂CH₃), 0.930 (t, 3H, *J* = 7.5 Hz, 4-CH₂CH₂CH₃). ESI-MS (*m/z*): [M + H]⁺: 323.09/325.08 (MW = 322.74). HRESIMS obsd *m/z* 323.0685, calcd for C₁₆H₁₆ClO₅⁺ 323.0681.

6,6-Dimethyl-10-chloromethyl-4-propyl-2H,6H,12H-benzo-[1,2-*b*:3,4-*b'*:5,6-*b''*]tripyrans-2,12-dione (20). Compound **20** (white-off powder) was prepared from **19a** in the procedure described as the literature (ref 16) with the yield of 79%; mp 159.2–160.0 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆, ppm): 6.624 (d, 1H, *J* = 10.2 Hz, 8-H), 6.133 (s, 1H, 3-H), 5.852 (d, 1H, *J* = 9.9 Hz, 7-H), 4.857–4.918 (m, 1H, 10-H), 3.941–4.100 (m, 2H, ClCH₂), 2.842–2.939 (m, 3H, 11-CH₂, 4-CH₂CH₂CH₃), 2.683 (dd, 1H, *J* = 3.0 Hz, 16.2 Hz, 11-CH₂), 1.604 (m, 2H, 4-CH₂CH₂CH₃), 1.514, 1.472 (2s, 6H, 6-CH₃), 0.972 (t, 3H, *J* = 7.2 Hz, 4-CH₂CH₂CH₃). ESI-MS (*m/z*): 389.78 [M + H]⁺ (MW = 388.84). HRESIMS obsd *m/z* 389.1152, calcd for C₂₁H₂₂ClO₅⁺ 389.1150.

Cell-Based Anti-HIV-1 Assay. The inhibitory activities of the compounds against HIV are evaluated as described previously by anti-HIV assays using TZM-bl cells.¹⁹ TZM cells contain the HIV primary receptor CD4 and coreceptor CCR5 as well as

a reporter luciferase gene driven by the HIV promoter. These assays quantify the activity of a drug to inhibit HIV-induced reporter luciferase activity. Briefly, a serial diluted drug was tested against 100 TCID₅₀ HIV infection. The viral infection was determined on day 3 by measuring the reporter luciferase activity in TZM-bl cells postinfection using commercially available kits. Antiviral data are reported as the quantity of drug required to inhibit production by 50% (EC₅₀).

Acknowledgment. This research is supported financially by the National Natural Science Foundation of China (No. 90713045) and the National 863 Program of China. No.2006AA020501. We thank HKU-UDF and HKSARG FHB/RFCID09080772 for partial funding support of this study. We are also grateful to Mr. Jinfeng Wei for his assistance of single dose toxicity measurement.

Supporting Information Available: Experimental details of the synthesis of 6–17, 21–25; biological methods and detailed data of cytotoxicity and single dose acute toxicity test. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

References

- (1) Flexner, C. HIV drug development: the next 25 years. *Nat. Rev. Drug Discovery* 2007, 6, 959–966.
- (2) Drugs@FDA: <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda>.
- (3) Kashman, Y.; Gustafson, K. R.; Fuller, R. W.; Cardellina, J. H.; McMahon, J. B.; Currens, M. J.; Buckheit, R. W., Jr.; Hughes, S. H.; Cragg, G. M.; Boyd, M. R. HIV inhibitory natural products. Part 7. The calanolides, a novel HIV inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree *Calophyllum lanigerum*. *J. Med. Chem.* 1992, 35, 2735–2743.
- (4) Currens, M. J.; Mariner, J. M.; McMahon, J. B.; Boyd, M. R. Kinetic Analysis of Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type-1 Reverse Transcriptase by Calanolide A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996, 279, 652–661.
- (5) Currens, M. J.; Gulakowski, R. J.; Mariner, J. M.; Moran, R. A.; Buckheit, R. W., Jr.; Gustafson, K. R.; McMahon, J. B.; Boyd, M. R. Antiviral activity and mechanism of action of calanolide A against the human immunodeficiency virus type-1. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1996, 279, 645–651.
- (6) Quan, Y.; Motakis, D.; Buckheit, R., Jr.; Xu, Z. Q.; Flavin, M. T.; Parniak, M. A.; Wainberg, M. A. Sensitivity and resistance to (+)-calanolide A of wild-type and mutated forms of HIV-1 reverse transcriptase. *Antiviral Ther.* 1999, 4, 203–209.
- (7) Buckheit, R. W., Jr.; Russell, J. D.; Xu, Z. Q.; Flavin, M. Anti-HIV-1 activity of calanolides used in combination with other mechanistically diverse inhibitors of HIV-1 replication. *Antiviral Chem. Chemother.* 2000, 11 (5), 321–327.
- (8) Auwerx, J.; Rodriguez-Barrios, F.; Ceccherini-Silberstein, F.; San-Felix, A.; Velazquez, S.; De Clercq, E.; Camarasa, M. J.; Perno, C. F.; Gago, F.; Balzarini, J. The Role of Thr139 in the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Reverse Transcriptase Sensitivity to (+)-Calanolide A. *Mol. Pharmacol.* 2005, 68, 652–659.
- (9) (a) Creagh, T.; Ruckle, J. L.; Tolbert, D. T.; Giltner, J.; Eiznhamer, D. A.; Dutta, B.; Flavin, M. T.; Xu, Z. Q. Safety and Pharmacokinetics of Single Doses of (1)-Calanolide A, a Novel, Naturally Occurring Nonnucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor, in Healthy, Human Immunodeficiency Virus-Negative Human Subjects. *Antiviral Chem. Chemother.* 2001, 12 (5), 1379–1386. (b) Eiznhamer, D. A.; Creagh, T.; Ruckle, J. L.; Tolbert, D. T.; Giltner, J.; Dutta, B.; Flavin, M. T.; Jenta, T.; Xu, Z. Q. Safety and pharmacokinetic profile of multiple escalating doses of (+)-calanolide A, a naturally occurring nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor, in healthy HIV-negative volunteers. *HIV Clin. Trials* 2002, 3 (6), 435–450.
- (10) Sherer, R.; Dutta, B.; Anderson, R.; Laudette-Aboulhab, J.; Kamarulzaman, A.; D'Amico, R.; Paton, N.; Abdullah, M. S.; Pollard, R.; Cooley, T.; Flavin, M. T.; Xu, Z. Q. A phase 1B study of (+)-calanolide A in HIV-1-infected, antiretroviral therapy-naïve patients. 7th CROI, San Francisco, 2000, Abstract 508.
- (11) Zembower, D. E.; Liao, S.; Flavin, M. T.; Xu, Z.-Q.; Stup, T. L.; Buckheit, R. W., Jr.; Khilevich, A.; Mar, A. A.; Sheinkmann, A. K. Structural Analogues of the Calanolide Anti-HIV Agents. Modification of the trans-10,11-Dimethyldihdropyran-12-ol Ring (Ring C). *J. Med. Chem.* 1997, 40, 1005–1017.
- (12) Xu, Z. Q.; Buckheit, R. W.; Stup, T. L.; Flavin, M. T.; Khilevich, A.; Rizzo, J. D.; Lin, L.; Zembower, D. E. In vitro anti-HIV activity of the chromanone derivatives, 12-oxo calanolide A, a novel NNRTI. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998, 8, 2179–2184.
- (13) Galinis, D. L.; Fuller, R. W.; McKee, T. C.; Cardellina, J. H., II; Gulakowski, R. J.; McMahon, J. B.; Boyd, M. R. Structure–Activity Modifications of the HIV-1 Inhibitors (+)-Calanolide A and (–)-Calanolide B. *J. Med. Chem.* 1996, 39, 4507–4510.
- (14) Sharma, G. V. M.; Ilangovan, A.; Narayanan, V. L.; Gurjar, M. K. First synthesis of aza-calanolides—a new class of anti-HIV active compounds. *Tetrahedron* 2003, 59, 95–99.
- (15) Sekino, E.; Kumamoto, T.; Tanaka, T.; Ikeda, T.; Ishikawa, T. Concise Synthesis of Anti-HIV-1 Active (+)-Inophyllum B and (+)-Calanolide A by Application of (–)-Quinine-Catalyzed Intramolecular Oxo-Michael Addition. *J. Org. Chem.* 2004, 69 (8), 2760–2767.
- (16) Ma, T.; Liu, L.; Xue, H.; Li, L.; Han, C. Y.; Wang, L.; Chen, Z. W.; Liu, G. Chemical Library and Structure–Activity Relationships of 11-Demethyl-12-oxo-Calanolide A Analogues as Anti-HIV-1 Agents. *J. Med. Chem.* 2008, 51, 1432–1446.
- (17) Bourguignon, J. J.; Schoenfelder, A.; Schmitt, M.; Wernuth, C. G.; Hechler, V.; Charlier, B.; Maitre, M. Analogues of γ -Hydroxybutyric Acid: Synthesis and Binding Studies. *J. Med. Chem.* 1988, 31, 893–897.
- (18) Owen, L. N.; Sultanbawa, M. U. S. Olefinic acids. Part VI. α -Bromo- β -methoxycrotonic acid. *J. Chem. Soc.* 1949, 3105–3109.
- (19) Chen, Z. W.; Zhou, P.; Ho, D. D.; Landau, N. R.; Marx, P. A. Genetically divergent strains of SIV use CCR5 as a coreceptor for entry. *J. Virol.* 1997, 71, 2075–2074.
- (20) Zhang, Z.; Hamatake, R.; Hong, Z. Clinical utility of current NNRTIs and perspectives of new agents in this class under development. *Antiviral Chem. Chemother.* 2004, 15, 121–134.
- (21) Fontaine, E.; Vaerenbergh, K. V.; Vandamme, A. M.; Schmit, J. C. Multidrug Resistant Human Immunodeficiency Virus Type 1. *AIDS Rev.* 1999, 1, 231–237.