

no 98

422

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. \_\_\_\_\_ S. \_\_\_\_\_ D. \_\_\_\_\_

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 04-122695-A-00005-0000

Fecha 2009-08-21 16:29:05 Dep 2020 NUECREACION  
Tra 11 PATENTEIYII Eve 379 FASENACIONALII  
Act 444 RESPUESTAREQUE Folios: 3

Re: Expediente No. 04-122.695 A

Solicitud de patente de invención titulada: "PROFÁRMACOS DE AMINOÁCIDOS  
EXCITADORES"

Solicitante: ELI LILLY AND COMPANY

Nuestra Ref.: P2004/000142A

**RESPUESTA AL OFICIO No. 5942 NOTIFICADO POR FIJACIÓN EN LISTA No. 153**

**DE FECHA 22 DE MAYO DE 2009**

**(SEGUNDO EXAMEN DE FONDO)**

CARLOS R. OLARTE, mayor de edad y vecino de Bogotá, identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la sociedad solicitante, me permito manifestar lo siguiente ante el auto emanado por ese Despacho, dentro del plazo legal de previsto en el artículo 45 de la Decisión 486, en los siguientes términos:

1. a- El Examinador establece que las patentes US5.688.826 (D1) y US5998412 (D2) afectan el nivel inventivo de la presente solicitud.

El Examinador argumenta que la única diferencia entre los compuestos de la presente invención y aquellos divulgados en el arte previo citado, es la presencia de aminoácidos adicionales en la

posición A del núcleo bicíclico de los compuestos reivindicados. El Examinador señala que dicha diferencia estructural se deriva evientemente de D2, el cual enseña que la modificación estructural de un ingrediente activo mediante la adición de un grupo aminoácido es un método común para mejorar su solubilidad en agua.

b- i) En relación con el arte previo citado por el Examinador, debo señalar que la presente solicitud reconoce la existencia de D1, e indica que el objeto de la invención constituye justamente el desarrollo de profármacos para los compuestos divulgados en D1. D1 revela únicamente compuestos en los que la posición 4 del núcleo biciclo [3.1.0]hexano **no está sustituido**. Así, D1 no proporciona motivación alguna para incluir un derivado de aminoácido en dicha posición.

ii) En cuanto a D2, debo subrayar que tras un análisis exhaustivo de dicha referencia, no se encontró ninguna indicación acerca de la inclusión de grupos aminoácidos en la estructura de moléculas activas con el objeto de incrementar su solubilidad. Así pues, las afirmaciones del Examinador respecto a D2 carecen completamente de sustento.

Llamo respetuosamente la atención del Examinador al hecho que D2 solamente se refiere a sulfonamidas de Fórmula I como inhibidores de MMPs, las cuales pueden formar ésteres o carbamatos a través de grupos hidroxilos (formación de profármacos). Sin embargo, D2 no menciona o siquiera sugiere el empleo de grupos aminoácidos en moléculas activas, con el objetivo de mejorar sus propiedades fisicoquímicas.

iii) En conclusión, D1 y D2, independientemente o en combinación, no enseñan o siquiera sugieren el empleo de aminoácidos en para constituir profármacos de compuestos derivados del núcleo biciclo[3.1.0]hexano.

De mantener su posición, **solicito respetuosamente al Examinador** indicar los apartes de D1 y D2 que conducen específicamente a la inclusión de un grupo aminoácido en la posición 4 del núcleo biciclo[3.1.0]hexano, esperando obtener compuestos con una potencia in vivo y una biodisponibilidad oral incrementada.

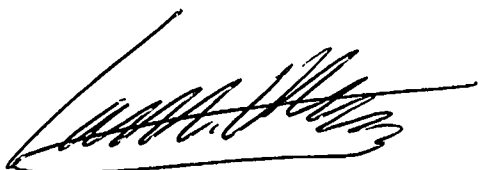
2. Finalmente deseo poner bajo su conocimiento que para la materia objeto e la presente invención ha sido concedida el privilegio de patentes en Nueva Zelanda .

424  
3

Si bien es cierto que las concesiones de patentes en oficinas de otros países no son vinculantes en el sentido que obliguen a la SIC a tomar una decisión en el mismo sentido, considero que dichas concesiones sugieren el cumplimiento de los requisitos de patentabilidad de la materia reivindicada, ya que los criterios de evaluación y estudio aplicados para concluir la aceptación de dichas patentes resultan equivalentes a los que la SIC debe emplear.

3. Por todo lo anterior, considero que las objeciones presentadas por el Examinador en su examen de fondo han sido resueltas y por consiguiente solicito respetuosamente que el Despacho tengan por cumplidos los requisitos de patentabilidad, en tanto no se logró desvirtuar ninguno de ellos, y se proceda con la concesión de la patente.

Atentamente,



CARLOS R. OLARTE

C.C. No. 79.782.747 de Bogotá

T.P. 74.295



No. 04-122695-A-00006-0000

Fecha: 2009-08-21 16:29:48 Dep: 2020 NUECREACION  
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII  
Act: 444 RESPUESTAREQUE Folios: 11

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

E. \_\_\_\_\_ S. \_\_\_\_\_ D. \_\_\_\_\_

Re: Expediente No. 04-122.695 A

Solicitud de patente de invención titulada: "PROFÁRMACOS DE  
AMINOÁCIDOS EXCITADORES"

Solicitante: ELI LILLY AND COMPANY

Nuestra Ref.: P2004/000142A

**RESPUESTA AL OFICIO No. 5943 NOTIFICADO POR FIJACIÓN EN LISTA No. 153**

**DE FECHA 22 DE MAYO DE 2009**

**(REQUERIMIENTO ARTÍCULO 46)**

CARLOS R. OLARTE, mayor de edad y vecino de Bogotá, identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la sociedad solicitante, me permito manifestar lo siguiente ante el auto emanado por ese Despacho, dentro del plazo legal previsto en el artículo 46 de la Decisión 486:

1. Presento copia completa del siguiente documento exigido por el Examinador en el examen de búsqueda de anterioridades, según lo previsto en el Artículo 46 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina:

SANCHEZ J P ET AL: "QUINOLONE  
ANTIBACTERIAL AGENTS. SYNTHESIS AND  
STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS OF A  
SERIES OF AMINO ACID PRODRUGS OF RACEMIC  
AND CHIRAL  
7-(3-AMINO-1-PYRROLIDINYL)QUINOLONES,  
HIGHLY SOLUBLE QUINOLONE PRODRUGS WITH IN  
VIVO PSEUDOMONAS ACTIVITY"  
JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN  
CHEMICAL SOCIETY. WASHINGTON, US,  
vol. 35, no. 10, 15 May 1992 (1992-05-15),  
pages 1764-1773, XP001026653  
ISSN: 0022-2623

Atentamente,

CARLOS R. OLARTE  
C.C. No. 79.782.747 de Bogotá  
T.P. 74.295

Anexo: Artículo mencionado.

evaporated to give 7 as an oil (1.61 g) which was essentially pure by TLC (silica plate, eluant 10% MeOH in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $R_f$  0.8) and which was used without further purification. It was dissolved in a mixture of MeOH (70 mL) and acetic acid (30 mL) and hydrogenated in the presence of 10% Pd-C (0.4 g) at about 20 bar and 60 °C for 48 h. The mixture was cooled and filtered, and the solvent evaporated to give S-27 as an oil. This was converted to S-27-HCl which was crystallized from a mixture of MeOH and EtOAc, mp 171-173 °C, yield 1.34 g (95%),  $[\alpha]_D^{25}$  -10.7° (c 1.0, MeOH).

(S)-[4-[2-[[2-Hydroxy-3-(4-hydroxyphenoxy)propyl]amino]ethoxy]phenoxy]-N-(2-methoxyethyl)acetamide (S-70). A mixture of 6 (5.58 g, 15.6 mmol) and (S)-1-[4-(benzyloxy)phenoxy]-2,3-epoxypropane (4.0 g, 15.6 mmol;  $[\alpha]_D^{25}$  +8.1° (c 1.03 in MeOH) [lit.<sup>4</sup>  $[\alpha]_D^{20}$  +8.6° (c 1.02 in MeOH)]) in propan-2-ol (50 mL) was heated under reflux for 16 h and then the solvent was evaporated to give an oil A (8.8 g) which was essentially pure by TLC (silica plate, eluant 10% MeOH in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $R_f$  0.85) and which was used without further purification. The oil A (4.7 g, 7.7 mmol), 10% Pd-C (800 mg) and ammonium formate (0.98 g, 15.5 mmol) in EtOH (200 mL) was heated at 50 °C for 2.5 h. A TLC check showed the presence of some starting material. A further amount of ammonium formate (0.5 g, 7.9 mmol) was added and heating continued for 2 h. The mixture was filtered and the solvent evaporated. The residual oil was converted to S-70-HCl, which was crystallized from a mixture of MeOH and EtOAc, mp 166-167 °C, yield 1.75 g from oil A (49%),  $[\alpha]_D^{25}$  -10.5° (c 1.02 in MeOH).

**Registry No.** 1 ( $R^1 = \text{OMe}$ ), 139733-51-0; 1 ( $R^1 = \text{OH}$ ), 139733-52-1; 2, 139733-53-2; 3, 108856-98-0; 4, 10263-66-8; 5, 71031-03-3; 6, 133025-88-4; 7, 139733-54-3; 9, 139733-55-4; 9-HCl, 139733-56-5; 10, 139733-57-6; (S)-10, 115656-35-4; (S)-10 ester, 107332-64-9; 11, 139733-58-7; 12, 139733-59-8; 12-HCl, 139733-60-1; 13, 139733-61-2; 13-HCl, 139733-62-3; 14, 139733-63-4; 15, 139733-64-5; 15-HCl, 139733-65-6; 16, 139733-66-7; 16-HCl, 139733-67-8; 17, 139733-68-9; 18, 139733-69-0; 19, 139733-70-3; 20, 139733-71-4; 20-HCl, 139733-72-5; 21, 139733-73-6; 22, 139733-74-7; 23, 139733-75-8; 23-HCl, 139733-76-9; (S)-23, 115656-45-6; 24, 139733-77-0; 25, 139733-78-1; 26, 139733-79-2; 26-HCl, 139733-80-5; 27, 139892-81-2; 27-HCl, 139892-82-3; (S)-27, 129689-30-1; (S)-27-HCl, 129689-28-7; (R)-27, 139733-81-6; (R)-27-HCl, 139733-82-7; (R)-27 ester, 139733-51-0; 28, 139733-83-8; 29, 139733-84-9; 29-HCl, 139733-85-0; 30, 139733-86-1; 30-2HCl, 139733-87-2; 31, 139733-88-3; 31-HCl, 139733-89-4; 32, 139733-90-7;

32-HCl, 139733-91-8; 33, 139733-92-9; 34, 139733-93-0; 35, 139733-94-1; 36, 139733-95-2; 36-HCl, 139733-96-3; 37, 139733-97-4; 38, 139733-98-5; 39, 139733-99-6; 39-HCl, 139734-00-2; 40, 139734-01-3; 40-HCl, 139734-02-4; 41, 139734-03-5; 41-HCl, 139734-04-6; 42, 139734-05-7; (S,S)-43, 139734-06-8; (S,S)-43-HCl, 139734-04-6; 44, 139734-08-0; 45, 139734-09-1; 46, 139734-10-4; 47, 139734-11-5; 47-HCl, 139734-12-6; 48, 139734-13-7; 48-HCl, 139734-14-8; 49, 139734-15-9; 50, 139734-16-0; 51, 139734-17-1; 52, 139734-18-2; 53, 139734-19-3; 53-HCl, 139734-20-6; 54, 139734-21-7; 54-HCl, 139734-22-8; 55, 139734-23-9; 55-HCl, 139734-24-0; 56, 139734-25-1; 56-HCl, 139734-26-2; 56-oxalate, 139734-27-3; 57, 139734-28-4; 58, 139734-29-5; 59, 139734-30-8; 59-HCl, 139734-31-9; 60, 139734-32-0; 60-HCl, 139734-33-1; 61, 139734-34-2; 61-HCl, 139734-35-3; 61 ester, 139734-36-4; 62, 139734-37-5; 62-HCl, 139734-38-6; 63, 139734-39-7; 63 ester, 139734-40-0; 64, 139734-41-1; 65, 139734-42-2; 65 ester, 139734-43-3; 66, 139734-44-4; 66-HCl, 139734-45-5; 67, 139734-46-6; 67-HCl, 139734-47-7; 68, 139734-48-8; 68-HCl, 139734-49-9; 68 ester, 139734-50-2; 69, 139734-51-3; 69 ester, 139734-52-4; 70, 139734-53-5; 70-HCl, 139734-54-6; (S)-70, 139892-83-4; (S)-70-HCl, 139892-84-5;  $\text{ClCH}_2\text{CON}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{Ph}$ , 73685-56-0;  $\text{ClCH}_2\text{CON}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_3$ , 139734-55-7;  $\text{ClCH}_2\text{CONHC}_6\text{H}_5$ , 2,6-( $\text{CH}_3$ )<sub>2</sub>, 1131-01-7;  $\text{ClCH}_2\text{CONHC}_6\text{H}_5$ , 2,4- $\text{Cl}_2$ , 56978-45-1;  $\text{ClCH}_2\text{CONH}i\text{Bu}$ , 15678-99-6;  $\text{ClCH}_2\text{CONHPh}$ , 587-65-5;  $\text{ClCH}_2\text{CON}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$ , 2315-36-8;  $\text{NH}_2\text{CH}_3$ , 74-89-5;  $\text{NH}_2\text{Et}$ , 75-04-7;  $\text{NH}_2\text{Pr}-n$ , 107-10-8;  $\text{NH}_2\text{Pr}-i$ , 75-31-0;  $\text{NH}_2\text{Bu}-n$ , 109-73-9;  $\text{NH}_2\text{Bu}-i$ , 78-81-9;  $\text{NH}_2\text{Bu}-s$ , 13952-84-6;  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{Bu}-t$ , 5813-64-9;  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$ , 111-26-2;  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ , 107-11-9;  $\text{NH}_2\text{Pr}-c$ , 765-30-0;  $\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ , 1003-03-8;  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{OH}$ , 141-43-5;  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_3\text{OH}$ , 156-87-6;  $\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OH}$ , 78-91-1;  $\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2\text{OH}$ , 124-68-5;  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{OCH}_3$ , 109-85-3;  $\text{NH}_2(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{OCH}_3$ , 5332-73-0;  $\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OCH}_3$ , 37143-54-7;  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ , 107-15-3;  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$ , 598-41-4;  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{Ph}$ , 100-46-9;  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4$ -*p*- $\text{CH}_3$ , 104-84-7;  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4$ -*p*- $\text{OCH}_3$ , 2393-23-9;  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4$ -*o*- $\text{Cl}$ , 89-97-4;  $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4$ -*p*- $\text{Cl}$ , 104-86-9;  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{Ph}$ , 64-04-0; (S)- $\text{NH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{Ph}$ , 2627-86-3;  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{OPh}$ , 1758-46-9;  $\text{NH}_2\text{OCH}_2\text{Ph-HCl}$ , 2687-43-6;  $\text{NH}(\text{CH}_3)_2$ , 124-40-3;  $\text{NH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_2\text{OH}$ , 109-83-1; (S)-1-[4-(benzyloxy)phenoxy]-2,3-epoxypropane, 122797-04-0; 2-(amino-methyl)thiophene, 27757-85-3; N-chloroacetyl-2,3,4,5-tetrahydroisoxazole, 139734-56-8; N-chloroacetyl-1,3-dihydroisindole, 41910-53-6; 2-(aminomethyl)furan, 617-89-0; pyrrolidine, 123-75-1; piperidine, 110-89-4; 4-hydroxypiperidine, 5382-16-1; morpholine, 110-91-8; 1-methylpiperazine, 109-01-3; 1,2,3,4-tetrahydroisoxanoline, 91-21-4; chloroacetyl chloride, 79-04-9.

## Quinolone Antibacterial Agents. Synthesis and Structure-Activity Relationships of a Series of Amino Acid Prodrugs of Racemic and Chiral 7-(3-Amino-1-pyrrolidinyl)quinolones. Highly Soluble Quinolone Prodrugs with in Vivo Pseudomonas Activity

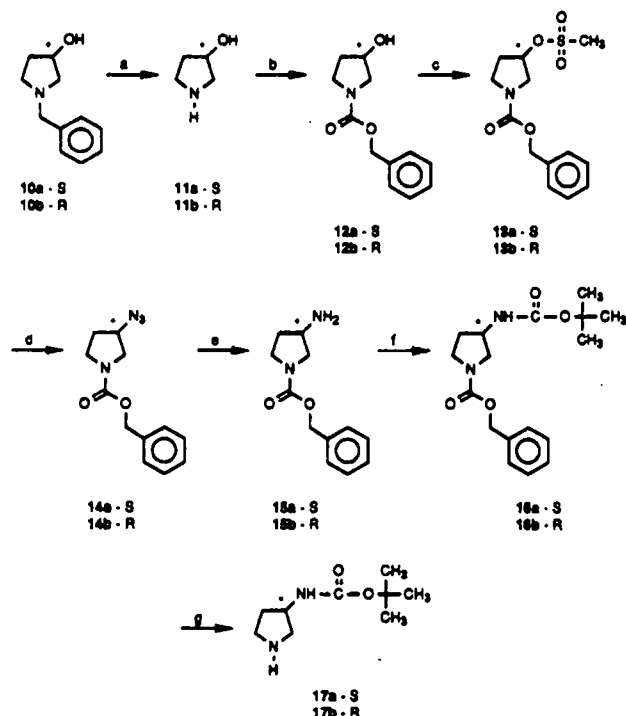
Joseph P. Sanchez,\* John M. Domagala, Carl L. Heifetz, Stephen R. Priebe, Josephine A. Seanie, and Ashok K. Trehan

Parke-Davis Pharmaceutical Research Division, Warner-Lambert Company, Ann Arbor, Michigan 48105.  
Received November 12, 1991

A series of amino acid prodrugs of racemic and chiral 7-(3-amino-1-pyrrolidinyl)-6-fluoro-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acids, 1-cyclopropyl-6,8-difluoro-3-quinolinecarboxylic acids, 1-cyclopropyl-6-fluoro-3-quinolinecarboxylic acids, and 5-amino-1-cyclopropyl-6,8-difluoro-3-quinolinecarboxylic acids have been prepared and evaluated for comparative antibacterial activity. Compounds were prepared by acylation of the 3-amino group of the pyrrolidine with common amino acids using standard peptide chemistry. This series has been compared with the parent compounds for antibacterial activity in vitro and in vivo as well as for comparative solubility. The amino acid analogues were less active in vitro, but had equal or increased efficacy in vivo. Indeed, it was proven that these compounds, which were stable to acid and base under the reaction conditions for their preparation, were rapidly cleaved in serum to give the parent quinolones. The amino acid derivatives showed a 3-70 times improved solubility when compared to the parent compounds. The most active compound of the series was [S-(R\*,R\*)]-7-[3-[(2-amino-1-oxopropyl)-amino]-1-pyrrolidinyl]-1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid (PD 131112).

The search for the ideal quinolone antibacterial agent continues in many laboratories.<sup>1</sup> Such an agent will have

potent activity against a broad spectrum of Gram-positive and Gram-negative aerobic and anaerobic organisms as

Scheme 1<sup>a</sup>

<sup>a</sup> (a) H<sub>2</sub>, 20% Pd-C, MeOH; (b) CbzCl, H<sub>2</sub>O, pH 7.0, 5 °C; (c) MeCl, pyridine, 5 °C. (d) NaN<sub>3</sub>, DMF, 100 °C; (e) H<sub>2</sub>, Ra-Ni, MeOH; (f) di-*tert*-butyl dicarbonate, 1.0 N NaOH, *t*-BuOH, room temperature; (g) H<sub>2</sub>, 20% Pd-C, MeOH.

well as mycobacteria; it will have minimal adverse reactions, and have excellent aqueous solubility and oral bioavailability. The list of quinolones currently approved or being tested in man continues to increase (Table I).<sup>2-10</sup>

Table I. Clinically Significant or Marketed Quinolone Type Antibacterial Agents

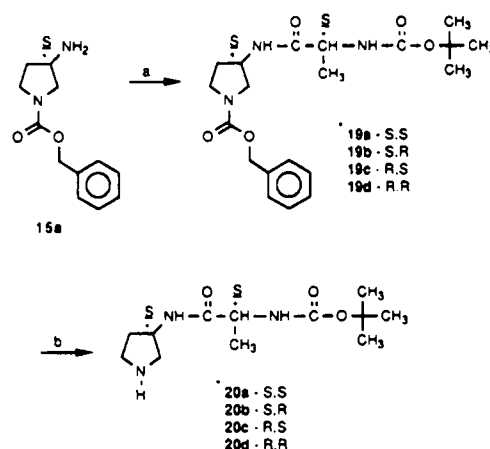
| name          | X   | R <sub>1</sub>                                    | R <sub>5</sub>  | R <sub>7</sub> | ref |
|---------------|-----|---------------------------------------------------|-----------------|----------------|-----|
| norfloxacin   | CH  | Et                                                | H               |                | 2   |
| ofloxacin     |     |                                                   | H               |                | 3   |
| enoxacin      | N   | Et                                                | H               |                | 4   |
| ciprofloxacin | CH  | <i>c</i> -Pr                                      | H               |                | 5   |
| lomefloxacin  | CF  | Et                                                | H               |                | 6   |
| tosufloxacin  | N   | 2,4-F <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> | H               |                | 7   |
| sparfloxacin  | CF  | <i>c</i> -Pr                                      | NH <sub>2</sub> |                | 8   |
| WIN-57273     | CH  | <i>c</i> -Pr                                      | H               |                | 9   |
| clinafloxacin | CCl | <i>c</i> -Pr                                      | H               |                | 10  |

- (1) For a comprehensive review through 1976 see: (a) Albrecht, R. Development of antibacterial agents of the nalidixic type. *Prog. Drug Res.* 1977, 21, 9-104. More recent reviews include: (b) Brighty, K. E.; McGuirk, P. R. Antibacterial Agents. *Annu. Rep. Med. Chem.* 1991, 26, 123-131. (c) Siporin, C.; Heifetz, C. L.; Domagala, J. M. *The New Generation of Quinolones*; Marcel Dekker, Inc.: New York, 1990. (d) Bouzard, D. Recent Advances in the Chemistry of Quinolones. *Recent Progress in the Chemical Synthesis of Antibiotics*; Springer-Verlag: Heidelberg, 1990.
- (2) Koga, H.; Itoh, A.; Murayama, S.; Suzue, S.; Irikura, T. Structure-Activity Relationships of Antibacterial 6,7- And 7,8-Disubstituted 1-Alkyl-1,4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic Acids. *J. Med. Chem.* 1980, 23, 1358-1363.
- (3) Hayakawa, I. *Eur. Pat.* 47005; *Chem. Abstr.* 1982, 97, 55821b.
- (4) Matsumoto, J.; Miyamoto, T.; Minamida, A.; Nishimura, Y.; Egawa, H.; Nishimura, H. Pyridonecarboxylic Acids as Antibacterial Agents. 2. Synthesis and Structure-Activity Relationships of 1,6,7-Trisubstituted-1,4-Dihydro-4-oxo-1,8-naphthyridine-3-carboxylic Acids, Including Enoxacin, a New Antibacterial Agent. *J. Med. Chem.* 1984, 27, 292-301.
- (5) Wise, R.; Andrews, J. M.; Edwards, L. J. In Vitro Activity of Bay 09867, a New Quinolone Derivative, Compared with those of Other Antimicrobial Agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1983, 23, 559-564.
- (6) Chin, N. X.; Novelli, A.; Neu, H. C. In Vitro Activity of Lomefloxacin (SC-4711; NY-198), a Difluoroquinolone-3-carboxylic acid, Compared with Those of Other Quinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1988, 32, 656-662. Wise, R.; Andrews, J. M.; Ashby, J. P.; Matthews, R. S. In Vitro Activity of Lomefloxacin, a New Quinolone Antimicrobial Agent, in Comparison with Those of Other Agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1988, 32, 617-622.

A great body of knowledge has been accumulated in this area which covers mechanism of action,<sup>11</sup> structure-activity relationships,<sup>12</sup> and adverse side effects.<sup>13</sup> This has led

- (7) Chu, D. T. W.; Prabhavathi, B. F.; Akiyo, K. C.; Pihuleac, E.; Nordeen, C. W.; Maleczka, R. E.; Pernet, A. G. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Novel Arylfluoroquinolone Antibacterial Agents. *J. Med. Chem.* 1985, 28, 1558-1564.
- (8) Miyamoto, T.; Matsumoto, J.; Chiba, K.; Egawa, H.; Shibamori, K.; Minamida, A.; Nishimura, Y.; Okada, H.; Kataoka, M.; Fujita, M.; Hirose, T.; Nakano, J. Synthesis and Structure-Activity Relationships of 5-Substituted 6,8-Difluoroquinolones, Including Sparfloxacin, a New Quinolone Antibacterial Agent with Improved Potency. *J. Med. Chem.* 1990, 33, 1645-1656.
- (9) Sedlock, D. M.; Dobson, R. A.; Deuel, D. M.; Leasher, G. Y.; Rake, J. B. In Vitro and In Vivo Activities of a New Quinolone, WIN 57273, Possessing Potent Activity Against Gram-Positive Bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1990, 34, 568-575.
- (10) (a) Norrby, S. R.; Jonsson, M. Comparative In Vitro Activity of PD 127,391, a New Fluorinated 4-Quinolone Derivative. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1988, 32, 1278-1281. (b) Wise, R.; Ashby, J. P.; Andrews, J. M. In Vitro Activity of PD 127,391, an Enhanced-Spectrum Quinolone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1988, 32, 1251-1256.
- (11) (a) Shen, L. L.; Mitscher, L. A.; Sharma, P. N.; O'Donnell, T. J.; Chu, D. T. W.; Cooper, C. S.; Rosen, T.; Pernet, A. G. Mechanism of Inhibition of DNA Gyrase by Quinolone Antibacterials: A Cooperative Drug-DNA Binding Model. *Biochemistry* 1989, 28, 3888-3894. (b) Hooper, D. C.; Wolfson, J. S. Mode of Action of the Quinolone Antimicrobial Agents: Review of Recent Information. *Rev. Infect. Dis.* 1989, 11 (Suppl. 1), S141-S. (c) Drlica, K.; Coughlin, S. Inhibitors of DNA Gyrase. *Pharmacol. Ther.* 1989, 44, 107-121.

to the identification of three significant basic groups substituted at the 7-position of the quinolone ring. The great majority of the quinolones currently under development possess the 1-piperazinyl moiety at this position. However, the replacement of the piperazine ring with a 3-amino-1-pyrrolidine or 3-(aminomethyl)-1-pyrrolidine substituent, which are successful piperazine mimics, has greatly increased the Gram-positive activity of some quinolones under investigation.<sup>14</sup> Other important improvements brought about by this body of knowledge include the substitution of a cyclopropyl or 2,4-difluorophenyl group at the 1-position and the placement of a fluoro substituent at the 6-position. The zwitterionic character displayed by quinolones having a basic substituent in the 7-position causes them to display low water solubility (<0.2 mg/mL). Since water solubility at physiological pH is important for preclinical testing, in vivo efficacy, and parenteral formulation, we decided to investigate methods of improving solubility. The acid addition salts of ciprofloxacin (5) (hydrochloride) and tosu-floxacin (7) (*p*-toluenesulfonate) still exhibit poor water solubility (2–50 mg/mL). Therefore, it was felt that chemical modification might be the more prudent way to improve water solubility. Major modifications to the parent molecule, such as hydroxylation or adding extra amines to the amino substituent of the side chain, were usually deleterious.<sup>15</sup> Even putting simple acyl groups on the side chain nitrogen to remove the zwitterionic character did not improve solubility or antibacterial activity, presumably because of the lost basicity of the side chain and the in vivo stability of the acyl group.<sup>15</sup> In a pilot study, we added a basic group to the acyl function (in the form of an alanine moiety) and similarly saw a great decrease in in vitro activity. However, upon either oral or subcutaneous dosing, good in vivo efficacy was observed. These compounds also possessed a high degree of water solubility (3–70 times when compared to the parent compounds). These initial results implied that the amino acid acyl

Scheme II<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> (a) Boc-S-Ala, *i*-isobutyl chloroformate, *N*-methylmorpholine, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -20 °C; (b) H<sub>2</sub>, 20% Pd-C, MeOH. <sup>b</sup> Rather than using the more complex nomenclature for two stereocenters, e.g. [S-(R\*,R\*)], we will designate the pyrrolidine center first (S), and the amino acid center second (S) to give (S,S) for 20a, etc.

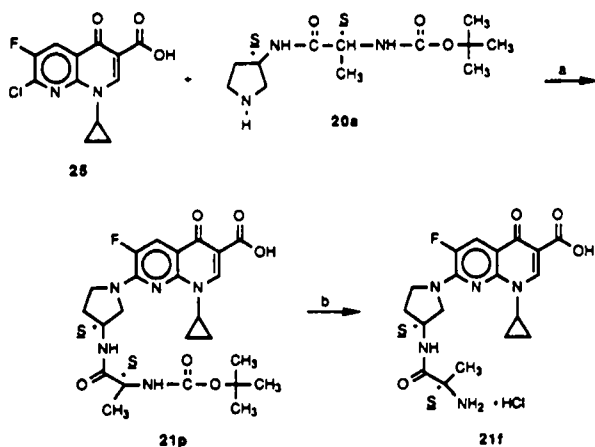
analogues may act as soluble prodrugs for the quinolone antibacterials. In this current work, we report a series of common amino acids covalently bonded to the nitrogen of the 3-aminopyrrolidine side chain. Not only did they greatly increase the water solubility of the quinolones to which they were attached, but they were rapidly cleaved in vivo to give the parent compound with its antibacterial activity intact.

## Chemistry

The Boc-protected chiral (*S*)- and (*R*)-3-aminopyrrolidines 17a and 17b (Scheme I) were prepared from the chiral 1-benzyl-3-pyrrolidinols 10a and 10b, which were in turn synthesized using the procedure of Brown.<sup>16</sup> The benzyl protecting group was removed by catalytic hydrogenation to give the chiral 3-aminopyrrolidines 11a and 11b, and the pyrrolidine nitrogen was reprotected with a carbobenzyloxy group to give 12a and 12b to prevent aziridine formation during the subsequent steps.<sup>17</sup> The alcohols were converted to the mesylates 13a and 13b using methanesulfonyl chloride in pyridine at 5 °C. Sodium azide in dimethylformamide at 100 °C converted the mesylates into their enantiomeric azides 14a and 14b. Catalytic reduction of the azides with Raney nickel in methanol provided the corresponding 3-aminopyrrolidines 15a and 15b in excellent yield and enantiomeric purity. The 3-amino group was protected using di-*tert*-butyl dicarbonate and 1.0 N sodium hydroxide in *tert*-butyl alcohol to give the Boc derivatives 16a and 16b. Catalytic hydrogenation using Pearlman's catalyst<sup>18</sup> in methanol pro-

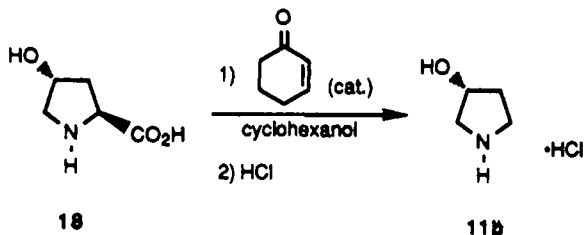
- (12) (a) Domagala, J. M.; Hanna, L. D.; Heifetz, C. L.; Hutt, M. P.; Mich, T. F.; Sanchez, J. P.; Solomon, M. New Structure-Activity Relationships of the Quinolone Antibacterials Using the Target Enzyme. The Development and Applications of a DNA Gyrase Assay. *J. Med. Chem.* 1986, 29, 394-404. (b) Fernandes, P. B.; Chu, D. T. W. Structure-Activity Relationships of the Fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1989, 33, 131-135. (c) Stein, G. E. The 4-Quinolone Antibiotics: Past, Present, and Future. *Pharmacotherapy (Carlisle, Mass.)* 1988, 8, 301-314. (d) Koga, H. Structure-Activity Relationships and Drug Design of the Pyridonecarboxylic Acid Type (Nalidixic Acid Type) Synthetic Antibacterial Agents. *Kagaku no Ryoiki, Zokan* 1982, 136, 177-202.
- (13) (a) Ball, P. Long-Term Use of Quinolones and Their Safety. *Rev. Infect. Dis.* 1989, 11 (Suppl. 5), S1365-S1370. (b) Christ, W.; Lehnert, T.; Ulbrich, B. Specific Toxicologic Aspects of the Quinolones. *Rev. Infect. Dis.* 1988, 10 (Suppl. 1), S141-S146. (c) Furet, Y. X. and Pechere, J.-C. Usual and Unusual Antibacterial Effects of Quinolones. *J. Antimicrob. Chemother.* 1990, 26 (Suppl. B), 7-15.
- (14) (a) Reference 7. (b) Reference 10. (c) Domagala, J. M.; Heifetz, C. L.; Priebe, S.; Sanchez, J. P.; Seanie, J. S.; Trehan, A. K. PD 131112. A Highly Soluble Quinolone Prodrug With Outstanding In Vivo Pseudomonas Activity. 30 Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Atlanta, GA, 1990; Abstr. 375.
- (15) (a) Reference 12a. (b) Culbertson, T. P.; Domagala, J. M.; Hagen, S. E.; Hutt, M. P.; Nichols, J. B.; Mich, T. F.; Sanchez, J. P.; Schroeder, M. C.; Solomon, M.; Worth, D. F. Structure-Activity Relationships of the Quinolone Antibacterials. The Nature of the C<sub>7</sub>-Side Chain. In *International Telesymposium on Quinolones*; Fernandes, P. B., Ed.; Prous Science: Barcelona, Spain, 1989; p 47-71.

- (16) Brown, H. C.; Vara Prasad, J. V. N.; Gupta, A. K. Hydroboration. 78. Reinvestigation of the Hydroboration of *N*-Benzyl-3-pyrrolidines. Preparation of *N*-Benzyl-3-pyrrolidinol and (*N*-Benzyl-3-pyrrolidinyl)boronate of Very High Purity. *J. Org. Chem.* 1986, 51, 4296-4298.
- (17) (a) Hammer, C. F.; Heller, S. R.; Craig, J. H. Reactions of  $\beta$ -Substituted Amines-II. Nucleophilic Displacement Reactions on  $\beta$ -Chloro-1-ethylpiperidine. *Tetrahedron* 1972, 28, 239-253. (b) Fuson, R. C.; Zirkle, C. L. Ring Enlargement by Rearrangement of the 1,2-Aminochloroalkyl Group; Rearrangement of 1-Ethyl-2-chloromethylpyrrolidine to 1-Ethyl-3-chloropiperidine. *J. Am. Chem. Soc.* 1948, 70, 2760-2762. (c) Thottathil, J. K.; Moniot, J. L. Lithium Diphenylcuprate Reactions with 4-Tosyloxy-L-proline; An Interesting Stereochemical Outcome. A Synthesis of Trans-4-phenyl-L-proline. *Tetrahedron Lett.* 1986, 27, 151-154.

Scheme III<sup>a</sup>

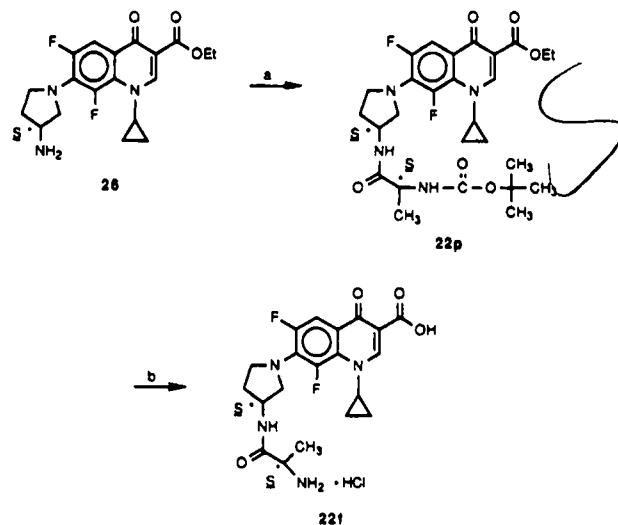
<sup>a</sup> (a) Et<sub>3</sub>N, CH<sub>3</sub>CN, reflux; (b) 1.0 M HCl, EtOH, reflux.

vided the chiral pyrrolidine side chains 17a and 17b. The (*S*)-3-aminopyrrolidine side chain could also be prepared from (*R*)-3-hydroxypyrrolidine (11b) produced by the decarboxylation of L-hydroxyproline (18)<sup>19</sup> and cycled through the sequence of reactions in Scheme I.

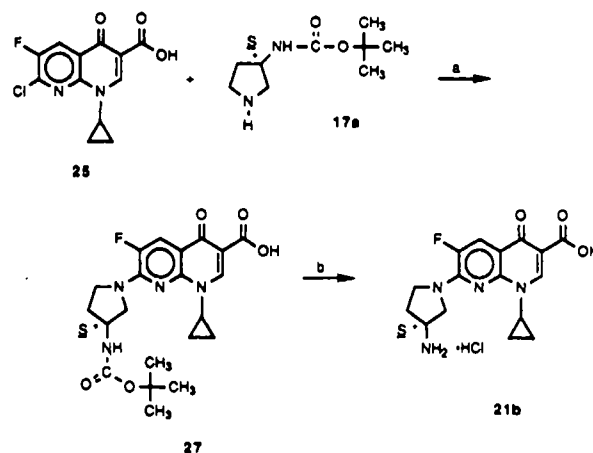


The coupling of the Boc-protected amino acids to the Cbz-protected, chiral 3-aminopyrrolidines was accomplished using the mixed anhydride in standard peptide forming reactions (Scheme II).<sup>20</sup> Deprotection of the pyrrolidine nitrogen was accomplished by catalytic hydrogenation as in the previous example. The chiral purity of the pyrrolidines was established by HPLC at the Cbz-protected 3-aminopyrrolidine 15, the Boc-protected 3-aminopyrrolidine 17, and the Boc-protected amino acid acylaminopyrrolidine 20 stages. Enantiomeric purity could be established in all of these cases, but diastereomeric purity in the amino acid acylamino compounds could not be established. However, because of the manner of their coupling to the 3-aminopyrrolidines, racemization of the amino acids was assumed to be minimal.<sup>20</sup>

Coupling reactions of the amino acid side chains to the quinolone substrates, exemplified by the preparation of 21f were done in refluxing acetonitrile using 1 equiv of the quinolone or naphthyridine substrate, 1.0–1.5 equiv of side chain and 3 equiv of triethylamine (Scheme III). The penultimate intermediates (p) were deprotected using 1.0

Scheme IV<sup>a</sup>

<sup>a</sup> (a) Boc-S-Ala, *i*-butyl chloroformate, *N*-methylmorpholine, CH<sub>3</sub>CN, 5 °C; (b) 1.0 M HCl, EtOH, reflux.

Scheme V<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Et<sub>3</sub>N, CH<sub>3</sub>OH, reflux. (b) 1.0 M HCl, EtOH, reflux.

M hydrochloric acid in ethanol at reflux to produce part of the final series (21e–21i, 22d, 22e, 22h, 22j, 23c–23e, 24d–24f).

A second amino acid coupling procedure, exemplified by the preparation of 22f, involved reacting the mixed anhydride of the Boc-protected amino acid with the ester of the quinolone or naphthyridine in which the 7-position was already substituted with the 3-aminopyrrolidine side chain (Scheme IV). Deprotection of both the amine and ester protecting groups of the penultimate intermediate (p) using 1.0 M hydrochloric acid in ethanol produced the remainder of the amino acyl series (21d, 22f, 22g, 22i, 23b, 23f).

The preparation of the quinolones with the chiral 3-aminopyrrolidine in the 7-position was done by standard coupling reactions as exemplified by the preparation of 21b (Scheme V). The quinolone molecule was reacted with the protected 3-aminopyrrolidine to produce the penultimate intermediate (p) which was deprotected using 1.0 M hydrochloric acid to produce the final products as the hydrochloride salts (21a–21c, 22a–22c, 23a, 24a–24c).

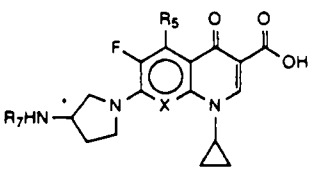
#### Biological Assays

The series of 7-(3-aminopyrrolidinyl)- and 7-[(3-amino acid acylaminopyrrolidinyl)]quinolones were tested against 11 representative Gram-positive and Gram-negative organisms by using standard microtitration techniques,<sup>21</sup> and

- (18) (a) Pearlman, W. M. U.S. Patent 3,239,563; *Chem. Abstr.* 1966, 64, 15796a. (b) Pearlman, W. M. Noble Metal Hydroxides on Carbon Nonpyrophoric Dry Catalysts. *Tetrahedron Lett.* 1967, 17, 1663–1664. (c) Bernotas, R. C.; Cube, R. V. The Use of Pearlman's Catalyst for Selective *N*-Debenzylation in the Presence of Benzyl Ethers. *Synth. Commun.* 1990, 20, 1209–1212.
- (19) Hashimoto, M.; Yutaka, E.; Yasutomo, O.; Tohiaki, I.; Seiichi, A. A Novel Decarboxylation of  $\alpha$ -Amino Acids. A Facile Method of Decarboxylation by the Use of 2-Cyclohexen-1-one as a Catalyst. *Chem. Lett.* 1986, 893–896.
- (20) Meienhofer, J. Protected Amino Acids in Peptide Synthesis. In *Chemistry and Biochemistry of the Amino Acids*; Barrett, G. C., Ed.; Chapman and Hall Ltd.: London, 1985; p 297–337.

430

Table II. Synthetic and Physical Data of the Quinolone and Naphthyridine Antibacterials Prepared for This Study



| compd | R <sub>5</sub>  | X  | R <sub>7</sub> | method of prep <sup>a</sup> | mp, °C | formula (anal.) <sup>b</sup> | purification <sup>c</sup>                                                                                              | yield, <sup>d</sup> %                       |
|-------|-----------------|----|----------------|-----------------------------|--------|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| 21a   | H               | N  | R,S            | H                           | C      | 284–286                      | C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub>                                                         | ref 22c                                     |
| 21b   | H               | N  | S              | H                           | C      | 310–312                      | C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> ·HCl·H <sub>2</sub> O (C,H,N,F)                         | trit 2-PrOH/Et <sub>2</sub> O 87            |
| 21c   | H               | H  | R              | H                           | C      | 285–287                      | C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> (C,H,N,F)                                               | trit 2-PrOH 92                              |
| 21d   | H               | N  | R,S            | S-Ala                       | B      | 198–200                      | C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ·1.5HCl·1.65H <sub>2</sub> O (C,H,N,Cl)                 | lyophilization 62                           |
| 21e   | H               | N  | R,S            | R-Ala                       | A      | 268–270                      | C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ·1.2HCl·2.5H <sub>2</sub> O (C,H,N,Cl)                  | trit EtOH/Et <sub>2</sub> O 86              |
| 21f   | H               | N  | S              | S-Ala                       | A      | 200–202                      | C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ·1.0HCl·1.0H <sub>2</sub> O (C,H,N,F)                   | trit 2-PrOH/Et <sub>2</sub> O 92            |
| 21g   | H               | N  | R              | S-Ala                       | A      | 198–200                      | C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ·1.0HCl·1.5H <sub>2</sub> O (C,H,N,Cl,F)                | trit 2-PrOH/Et <sub>2</sub> O 97            |
| 21h   | H               | N  | R,S            | S-Phe                       | A      | 108–110                      | C <sub>28</sub> H <sub>26</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ·1.6HCl·3.25H <sub>2</sub> O (C,H,N,Cl)                 | trit 2-PrOH 42                              |
| 21i   | H               | N  | R,S            | Gly                         | A      | 157–160                      | C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ·1.4HCl·1.0H <sub>2</sub> O (C,H,N,Cl)                  | trit EtOH/Et <sub>2</sub> O 74              |
| 21j   | H               | N  | R,S            | S-Lys                       | A      | 128–130                      | C <sub>22</sub> H <sub>26</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ·2.0HCl·1.0H <sub>2</sub> O (C,H,N,Cl)                  | trit EtOH/Et <sub>2</sub> O 70              |
| 21k   | H               | N  | R,S            | S-Val                       | A      | 135                          | C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ·1.0HCl·2.5H <sub>2</sub> O (C,H,N)                     | trit 2-PrOH/Et <sub>2</sub> O 79            |
| 21l   | H               | N  | R,S            | S-c-Gln                     | A      | 289–291                      | C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O (C,H,N)                              | lyophilization 77                           |
| 22a   | H               | CF | R,S            | H                           | C      | 313–315                      | C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> F <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> ·1.0HCl·1.25H <sub>2</sub> O              | ref 22c                                     |
| 22b   | H               | CF | S              | H                           | C      | >300                         | C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> F <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> ·1.0HCl·1.0H <sub>2</sub> O (C,H,N)       | trit EtOH/Et <sub>2</sub> O 94              |
| 22c   | H               | CF | R              | H                           | C      | 313–316                      | C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> F <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> ·1.0HCl·1.0H <sub>2</sub> O (C,H,N)       | trit EtOH/Et <sub>2</sub> O 92              |
| 22d   | H               | CF | R,S            | S-Ala                       | A      | 200–202                      | C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> F <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ·1.1HCl·1.5H <sub>2</sub> O (C,H,N,Cl,F)  | trit EtOH/Et <sub>2</sub> O 90              |
| 22e   | H               | CF | R,S            | R-Ala                       | A      | 190–193                      | C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> F <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ·1.0HCl·2.0H <sub>2</sub> O (C,H,N,Cl,F)  | trit EtOH/Et <sub>2</sub> O 69              |
| 22f   | H               | CF | S              | S-Ala                       | B      | 127–130                      | C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> F <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ·1.5HCl·2.0H <sub>2</sub> O (C,H,N,Cl,F)  | trit EtOH/Et <sub>2</sub> O 49              |
| 22g   | H               | CF | R              | S-Ala                       | B      | 210–214                      | C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> F <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ·1.0HCl·2.25H <sub>2</sub> O (C,H,N,Cl)   | trit EtOH/Et <sub>2</sub> O 76              |
| 22h   | H               | CF | R,S            | S-Phe                       | A      | 215–219                      | C <sub>26</sub> H <sub>26</sub> F <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ·1.0HCl·1.75H <sub>2</sub> O (C,H,N)      | trit CHCl <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O 66 |
| 22i   | H               | CF | R,S            | Gly                         | B      | 273–274                      | C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> F <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ·1.0HCl·1.6H <sub>2</sub> O (C,H,N,Cl)    | lyophilization 78                           |
| 22j   | H               | CF | R,S            | S-Lys                       | A      | 190–192                      | C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> F <sub>2</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> ·2.0HCl·1.7H <sub>2</sub> O (C,H,N,Cl)    | trit EtOH/Et <sub>2</sub> O 54              |
| 23a   | H               | CH | R,S            | H                           | C      | >300                         | C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> FN <sub>3</sub> O <sub>3</sub> ·2.0HCl·0.25H <sub>2</sub> O                            | ref 22c                                     |
| 23b   | H               | CH | R,S            | S-Ala                       | B      | 217–219                      | C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> FN <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ·1.75HCl·1.75H <sub>2</sub> O (C,H,N,Cl)                | trit EtOH 86                                |
| 23c   | H               | CH | R,S            | R-Ala                       | A      | 210–213                      | C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> FN <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ·1.6HCl·1.5H <sub>2</sub> O (C,H,N,Cl)                  | trit EtOH/Et <sub>2</sub> O 88              |
| 23d   | H               | CH | R,S            | S-Phe                       | A      | 197–200                      | C <sub>26</sub> H <sub>27</sub> FN <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ·1.3HCl·1.25H <sub>2</sub> O (C,H,N,Cl)                 | trit EtOH/Et <sub>2</sub> O 80              |
| 23e   | H               | CH | R,S            | Gly                         | A      | 208–210                      | C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> FN <sub>4</sub> O <sub>4</sub> ·1.6HCl·1.5H <sub>2</sub> O (C,H,N,Cl)                  | trit EtOH/Et <sub>2</sub> O 90              |
| 23f   | H               | CH | R,S            | S-Lys                       | B      | 123–125                      | C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> FN <sub>5</sub> O <sub>4</sub> ·2.2HCl·1.0H <sub>2</sub> O (C,H,N,Cl)                  | trit EtOH/Et <sub>2</sub> O 83              |
| 24a   | NH <sub>2</sub> | CF | R,S            | H                           | C      | 257–259                      | C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> F <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> ·1.3H <sub>2</sub> O                      | ref 25                                      |
| 24b   | NH <sub>2</sub> | CF | S              | H                           | C      | 315–317                      | C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> F <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> ·1.0HCl·1.5H <sub>2</sub> O (C,H,N,Cl,F)  | trit EtOH/Et <sub>2</sub> O 95              |
| 24c   | NH <sub>2</sub> | CF | R              | H                           | C      | 313–315                      | C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> F <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> ·1.0HCl·1.75H <sub>2</sub> O (C,H,N,Cl,F) | trit EtOH 94                                |
| 24d   | NH <sub>2</sub> | CF | S              | S-Ala                       | A      | 230–233                      | C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> F <sub>2</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> ·0.9HCl·1.5H <sub>2</sub> O (C,H,N,Cl,F)  | isoelectric pptn 83                         |
| 24e   | NH <sub>2</sub> | CF | R              | S-Ala                       | A      | 267–272                      | C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> F <sub>2</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> ·1.0HCl·0.5H <sub>2</sub> O (C,H,N,Cl,F)  | trit 2-PrOH 86                              |
| 24f   | NH <sub>2</sub> | CF | R,S            | Gly                         | A      | 264–266                      | C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> F <sub>2</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub> ·1.0HCl·0.75H <sub>2</sub> O (C,H,N,Cl,F) | trit EtOH/Et <sub>2</sub> O 89              |

<sup>a</sup> Refers to the general method used and is described in the Experimental Section. <sup>b</sup> Symbols refer to those elements analyzed. Analyses were  $\pm 0.4\%$  of theoretical values. <sup>c</sup> Trituration (trit) refers to grinding of the solids under solvent to produce a fine powder. Isoelectric precipitation refers to dissolving the solid in aqueous base, adjusting the pH to 7.2, and filtering the solid that precipitates. Lyophilization refers to dissolving the solid in aqueous hydrochloric acid, freezing the resulting solution, and removing the water from the frozen solid in vacuo. <sup>d</sup> Yields are those obtained from the coupling step to final product isolation, including hydrolysis, reductions, and deprotection where applicable.

their minimum inhibitory concentrations (MIC's in microgram/milliliter) were compared to standard drugs (5, 7, and 8) in multiple experiments (Table III). The compounds were also tested for their inhibition of DNA gyrase by using a previously described test.<sup>12a,22b</sup> The assay

measured the concentration of drug (micrograms/milliliter) necessary to cleave DNA (Table III).

The in vivo potency expressed as the median protective dose (PD<sub>50</sub>, mg/kg) was determined in acute systemic infections after a single dose of drug (given at time of challenge) using previously described methods.<sup>22</sup> The results of in vivo tests are summarized in Table IV. More extensive in vivo testing was not generally performed on compounds which did not show good activity against *Escherichia coli* and *Streptococcus pneumoniae*.

## Results and Discussion

**In Vitro and in Vivo Activity.** By evaluating the MIC's of the Gram-negative and Gram-positive organisms (Table III), it is apparent that the amino acid derivatives, like acyl groups in general, are significantly less active than the parent drug in vitro (21a–c, vs 21d–l, 22a–c vs 22d–j, 23a vs 23b–f and 24a–c vs 24d–f). This decrease in in vitro potency is directly attributable to a 10–50-fold reduced gyrase inhibition (Table III). However, the R-amino acids provided good in vitro activity against Gram-positive organisms, which may indicate an uptake by these bacteria.

- (21) (a) Reference 12a. (b) Cohen, M. A.; Griffin, T. J.; Bien, P. A.; Heifetz, C. L.; Domagala, J. M. In Vitro Activity of CI-934, a Quinolone Carboxylic Acid Active Against Gram-Positive and -Negative Bacteria. *J. Med. Chem.* 1985, 28, 766–772.
- (22) (a) Miller, L. C.; Tainter, M. L. Estimation of the ED<sub>50</sub> and Its Error by Means of Logarithmic-Probit Graph Paper. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1944, 57, 261–264. (b) Domagala, J. M.; Heifetz, C. L.; Mich, T. F.; Nichols, J. B. 1-Ethyl-7-[3-[(ethylamino)methyl]-1-pyrrolidinyl]-6,8-difluoro-1,4-dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxylic Acid. A New Quinolone Antibacterial with Potent Gram-Positive Activity. *J. Med. Chem.* 1986, 29, 445–448. (c) Sanchez, J. P.; Domagala, J. M.; Hagen, S. E.; Heifetz, C. L.; Hutt, M. P.; Nichols, J. B.; Trehan, A. K. Quinolone Antibacterial Agents. Synthesis and Structure-Activity Relationships of 8-Substituted Quinolone-3-carboxylic Acids and 1,8-Naphthyridine-3-carboxylic Acids. *J. Med. Chem.* 1988, 31, 983–991.

Table III. Test Results for the Compounds in This Study

| minimum inhibitor concentrations MIC's (μg/mL) <sup>a,b</sup> |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|---------------------------------------------------------------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|
|---------------------------------------------------------------|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|--|

<sup>a</sup>Standard microdilution techniques; see ref 21a,b. <sup>b</sup>All values for 21a-f are accurate to ±50% and have been obtained from duplicate or triplicate experiments; see ref 21a,b. <sup>c</sup>Refers to the minimum concn. at which cleaved DNA (linear) is observed at an intensity relative to oxolinic acid at 10 μg/mL. <sup>d</sup>Reference 21a.

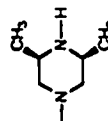
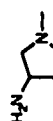
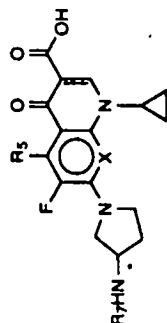


Table IV

| compd         | mouse chemotherapy PD50 (mg/kg) <sup>a,b,c</sup> |     |                  |    |                  |     |                 |     | solubility of product HCl salt (mg/mL) |                |                   |                       |
|---------------|--------------------------------------------------|-----|------------------|----|------------------|-----|-----------------|-----|----------------------------------------|----------------|-------------------|-----------------------|
|               | <i>E. coli</i>                                   |     | <i>P. aerug.</i> |    | <i>S. pneum.</i> |     | <i>S. pyog.</i> |     | H <sub>2</sub> O<br>(distilled)        | HCl<br>(0.1 N) | pH 4<br>(acetate) | pH 7.4<br>(phosphate) |
|               | po                                               | sc  | po               | sc | po               | sc  | po              | sc  |                                        |                |                   |                       |
| 21a           | 2                                                | 0.6 | 7                | 3  | 58               | 33  | 32              | 14  | 84                                     | 12             | 88                | 0.03                  |
| 21b           | 0.8                                              | 0.4 | 4                | 2  | 19               | 14  | 19              | 9   | 100                                    | 14             | 101               | 0.05                  |
| 21c           | 0.5                                              | 0.4 | -                | -  | 45               | 34  | -               | -   | 97                                     | 15             | 79                | 0.05                  |
| 21d           | 1                                                | 0.6 | 7                | 5  | 28               | 10  | 15              | 7   | >300                                   | >350           | >350              | 0.08                  |
| 21e           | 22.5                                             | 5.1 | -                | -  | >100             | 3   | -               | -   | >250                                   | 189            | 262               | 0.06                  |
| 21f           | 1.3                                              | 0.4 | 3                | 2  | 25               | 12  | 22              | 10  | >350                                   | >350           | >350              | 0.02                  |
| 21g           | 2                                                | 0.5 | -                | -  | 40               | 28  | 49              | 32  | >200                                   | >200           | >200              | 0.07                  |
| 21h           | 2                                                | 0.4 | -                | -  | 65               | 37  | -               | -   | >200                                   | 80             | >100              | 0.06                  |
| 21i           | -                                                | -   | -                | -  | 37               | 10  | -               | -   | >200                                   | 67             | >200              | -                     |
| 21j           | -                                                | -   | -                | -  | 71               | 70  | -               | -   | >300                                   | >200           | >600              | 0.07                  |
| 21k           | 3                                                | 0.6 | -                | -  | -                | -   | 76              | 27  | >200                                   | >200           | >200              | 0.08                  |
| 21l           | 4.8                                              | 0.4 | -                | -  | -                | -   | -               | -   | 6.1                                    | 1.4            | 3.1               | 0.05                  |
| 22a           | 1                                                | 0.2 | 7                | 3  | 15               | 6   | 7               | 2   | 15                                     | 3.0            | 2.4               | 0.08                  |
| 22b           | 1                                                | 0.2 | -                | -  | 15               | 7   | -               | -   | 17                                     | -              | -                 | -                     |
| 22c           | 0.9                                              | 0.2 | -                | -  | 14               | 9   | -               | -   | 11                                     | -              | -                 | -                     |
| 22d           | 2                                                | 0.3 | 13               | 2  | 13               | 9   | 12              | 4   | 31                                     | 7.2            | 25                | 0.09                  |
| 22e           | 31                                               | 2   | -                | -  | >100             | 1   | -               | -   | 42                                     | 3.6            | 19.4              | -                     |
| 22f           | 1                                                | 0.4 | -                | -  | 25               | 9   | -               | -   | 33                                     | 5.4            | 19                | 0.07                  |
| 22g           | 1                                                | 0.6 | -                | -  | 25               | 19  | -               | -   | 29                                     | 6.0            | 30                | 0.07                  |
| 22h           | 5                                                | 1   | -                | -  | -                | -   | -               | -   | 31                                     | 7.2            | 21                | -                     |
| 22i           | 1                                                | 0.4 | -                | -  | 29               | 16  | -               | -   | 33                                     | 4.6            | 20                | -                     |
| 22j           | -                                                | -   | -                | -  | -                | -   | -               | -   | -                                      | -              | -                 | -                     |
| 23a           | 3                                                | 0.5 | 49               | 5  | 43               | 4   | 97              | 11  | 22                                     | 1.4            | 12                | 0.41                  |
| 23b           | 5                                                | 0.5 | -                | -  | >100             | 13  | >100            | 5   | >100                                   | >100           | >100              | 0.27                  |
| 23c           | >100                                             | 4.1 | -                | -  | >100             | 3.1 | -               | -   | >100                                   | >100           | >100              | 0.24                  |
| 23d           | 5                                                | 1   | -                | -  | >50              | 5   | -               | -   | 44                                     | 9.2            | 66                | 0.30                  |
| 23e           | 6.3                                              | 1.1 | -                | -  | >100             | 18  | -               | -   | >100                                   | >100           | >100              | 0.22                  |
| 23f           | 10                                               | 1   | -                | -  | >100             | 12  | -               | -   | 93                                     | 69             | >100              | 0.11                  |
| 24a           | 2                                                | 0.4 | 16               | 4  | 20               | 9   | 24              | 6   | 2.4                                    | 0.1            | 3.2               | 0.08                  |
| 24b           | 1.2                                              | 0.4 | -                | -  | 10               | 6.0 | 18              | 5.5 | 2.5                                    | 0.25           | 2.3               | 0.05                  |
| 24c           | 1.7                                              | 0.3 | -                | -  | 15               | 3.5 | 12              | 7.5 | 2.8                                    | 0.2            | 2.6               | 0.04                  |
| 24d           | 5.0                                              | 2.5 | 9.6              | 4  | 17               | 13  | 6.3             | 23  | 18.0                                   | 2.8            | 58                | 0.04                  |
| 24e           | 2.2                                              | 0.5 | -                | -  | 18               | 7.7 | 20              | 6.3 | 21.0                                   | 3.2            | 71                | 0.08                  |
| 24f           | 1                                                | 0.4 | -                | -  | 29               | 16  | 36              | 8.1 | 17                                     | 3.5            | 69                | 0.07                  |
| ciprofloxacin | 1                                                | 0.3 | 15               | 4  | 260              | 29  | 180             | 19  | 42                                     | 23             | 90                | 0.10                  |
| tosufloxacin  | 1                                                | 0.2 | 6                | 4  | 14               | 3   | 5               | 3   | 0.65                                   | 0.40           | 0.55              | 0.01                  |
| sparfloxacin  | 1                                                | 0.4 | 14               | 7  | 14               | 13  | 17              | 17  | 0.09                                   | 0.02           | 0.03              | 0.09                  |

<sup>a</sup> Single dose given at challenge. <sup>b</sup> po indicates oral administration by gavage, and sc indicates subcutaneous injection. <sup>c</sup> Reference 22.  
<sup>d</sup> Confidence limits for the in vivo data are  $\pm 50\%$  of the reported values. <sup>e</sup> Bacterial strains cited in Table IV are the same as those used in Table III.

Almost all of the amino acid derivatives deliver greater in vivo efficacy than the MIC's would predict and therefore appear to be acting as prodrugs.

A significant difference in activity was also exhibited by the stereoisomers of the pyrrolidine, both in vitro and in vivo. The *S*-isomer of the 3-aminopyrrolidine side chain (17a), when affixed to the 7-position of the 1,8-naphthyridine 21b, PD 131628,<sup>23</sup> was more active than either the racemate 21a or the *R*-isomer 21c. When the 6,8-difluoroquinolone was the substrate, there was a similar potency difference between the *S*-isomer 22b, the *R*-isomer 22c, and the racemate 22a. This was also true for the 5-amino-6,8-difluoroquinolones 24a, 24b, and 24c.

A similar difference in activities was also seen when the *R*- and *S*-amino acids were affixed to the 3-amino functionality of the pyrrolidine. A comparison of the naphthyridines, 21d (*S*-amino acid, *R,S*-pyrrolidine) and 21e (*R*-amino acid, *R,S*-pyrrolidine), shows an identical in vitro spectrum against Gram-negative organisms with 21e showing a superiority against Gram-positive as previously mentioned. However, 21d has superior in vivo efficacy when compared to 21e (*E. coli* 1/0.6 vs 22.5/5.1; *S. pneum.* 28/10 vs 100/3). This enhanced in vivo activity is also exhibited when (*S*)-alanine is put on the (*R*)-pyrrolidine, 21g (*E. coli* 2/0.5, *S. pneum.* 40/28) or the *S*-pyrrolidine,

21f, PD 131112 (*E. coli* 1.3/0.4 *S. pneum.* 25/12).<sup>24</sup> This dominance of (*S*)- over (*R*)-alanine on the racemic 3-aminopyrrolidine can also be seen in the 6,8-difluoroquinolones, 22d vs 22e (*E. coli* 2/0.3 vs 31/2) and the 6-fluoro-8H-quinolones, 23b vs 23c (*E. coli* 5/0.5 vs >100/4.1).<sup>25</sup> This comparison demonstrates the importance of having (*S*)-alanine as opposed to (*R*)-alanine as the acylating portion of the side chain for in vivo efficacy.

A comparison of the effect of the various amino acids on the activity of the side chains, both in vitro and in vivo, shows that alanine is the superior amino acid in this series. It has already been shown that the *S*-isomer of the amino acid is most desirable.

It is also interesting to note that the least active amino acid of the series is (*S*)-lysine. The importance of having a basic group in the 7-position of the quinolone antibacterials for activity has been thoroughly demonstrated. The poor activity of the lysine analogues (21j, 22j, 23f) once again demonstrates the importance of the distance rela-

(24) Sanchez, J. P. U.S. Patent 4,851,418, 1989; *Chem. Abstr.* 1989, 111, 153777u.

(25) Domagala, J. M.; Hagen, S. E.; Heifetz, C. L.; Hutt, M. P.; Mich, T. F.; Sanchez, J. P.; Trehan, A. K. 7-Substituted 5-Amino-1-cyclopropyl-6,8-difluoro-1,4-dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxylic Acids: Synthesis and Biological Activity of a New Class of Quinolone Antibacterials. *J. Med. Chem.* 1988, 31, 503-506.

(23) Sanchez, J. P. U.S. Patent 4,916,141, 1990; *Chem. Abstr.* 1990, 113, 40658d.

**Table V.** Stability and Breakdown of PD 131112 (21f) to PD 131628 (21b)

| conditions                        | time (h) | % cleaved to 21b |
|-----------------------------------|----------|------------------|
| 0.1 N HCl                         | 24       | 0                |
| 2.0 N AcOH                        | 24       | 0                |
| 0.1 N NaOH                        | 24       | 1.3              |
| MeOH, EtOH                        | 24       | 0                |
| pH 7.4                            | 24       | 0                |
| serum (dog, human, mouse)         | 1        | >50              |
| po or iv dosing (dog, rat, mouse) | 0.25     | 100              |

tionship of the basic portion of the side chain to the rest of the molecule.

An attempt to put (*S*)-glutamine on the racemic 3-aminopyrrolidine produced the desired Boc-protected quinolone. However, during removal of the protecting group the glutamine cyclized to give 21i. It is included in the study as an example of an acylated aminopyrrolidine which shows a decreased activity in vitro as well as in vivo.

The combination of in vitro activity, enhanced in vivo efficacy, *Pseudomonas* activity, solubility, gyrase activity, and bioavailability led to the choice of the naphthyridine substrate with the *S*-amino acid on the (*S*)-3-aminopyrrolidine 21f as the most significant compound.

**Solubility.** In every case, the amino acid derivatives (as their hydrochloride salts) had 3–70 times improved solubility compared to their parent compounds. The most significant increase in solubility was seen in the case of the 1,8-naphthyridines which have the greatest inherent solubility. This increase in solubility was even apparent in 0.1 M hydrochloric acid where solubility is usually suppressed due to the common ion effect. The increase in solubility of the other members of the amino acid series mirrored the solubilities of their parents, that is, the smallest increase in solubility was seen in the series that had the least soluble parents. The solubilities of the amino acid derivatives were similar to those of the parent compounds at pH 7.4 due to the zwitterionic character of both sets of compounds. As expected, the stereoisomers did not show any differences in solubility.

**Mechanism.** Data from Tables III and IV suggest that the amino acid analogues, although stable in acid and base, are rapidly cleaved in vivo in serum to release the parent drug. Compounds such as *N*-acetyl, *N*-propionyl, or the cyclic amide 21i which are acid and base stable and are not cleaved in vivo (serum) cannot confer either the activity or the solubility of the amino acid analogues.

## Conclusions

The *S*-amino acid derivatives of potent quinolones such as 21b greatly enhance solubility (in the form of 21f). The amino acids are rapidly cleaved in vivo (serum) to release the parent drugs (Table V). The cleavage appears to be enzyme mediated and somewhat specific in that the *R*-amino acids are much less active in vivo. The naphthyridine 21f was identified as the best overall compound, being cleaved to release 21b. The prodrug combination 21f/21b provides equal or superior activity to all the standard quinolones and is up to 400 times more soluble. Compound 21f is even soluble in saline at >250 mg/mL and was the most active quinolone ever tested in our *Pseudomonas* Chemotherapy model.

## Experimental Section

**Instrumental Data.** All melting points were determined on a Hoover capillary melting point apparatus and are uncorrected. Infrared (IR) spectra were determined in KBr on a Nicolet FTIR SX-20 instrument. Proton magnetic resonance (NMR) were recorded on either a Varian XL-200 or an IBM 100 WP100SY spectrometer. Shifts are reported in  $\delta$  units relative to internal

tetramethylsilane. Elemental analyses were performed on a Perkin-Elmer 240 elemental analyzer. All compounds had analytical results  $\pm 0.4\%$  of theoretical values. All organic solutions were dried over magnesium sulfate, and all concentrations were performed in vacuo at 10–30 mmHg. Chiral HPLC was performed on the side chains and intermediates after derivization of the amino functionality with 3,5-dinitrobenzoyl chloride using a D-naphthylalanine Pirkle column (Regis) eluting with hexane/2-propanol (95:5). The final quinolones and naphthyridines were chromatographed using an Ultrasphere C18 column eluting with MeOH/0.025  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  (40:60). Optical and diastereomeric purities were accurate to 0.5%. Solubilities were determined either by HPLC areas at equilibrium or by a conventional weight volume method. All solutions were maintained for 24 h (Table IV). Stability of the amino acid quinolone derivatives was determined by HPLC. Cleavage in serum could be halted at pH 4.0 at 0–10 °C.

**(*R*)-3-Hydroxy-1-pyrrolidinecarboxylic Acid, Phenylmethyl Ester (12b).** A solution of 35.4 g (0.29 mol) of (*R*)-3-hydroxypyrrolidine hydrochloride (11b)<sup>19</sup> in 100 mL of water was cooled to 5 °C and neutralized to pH 7.0 by the addition of 10% sodium hydroxide using a pH meter. The resulting solution was treated dropwise with 49.0 g (0.29 mol) of carbobenzyloxy chloride maintaining the pH at  $11.0 \pm 0.5$  by the addition of 10% sodium hydroxide. When the addition was complete, the reaction was stirred at 5 °C for 2 h and allowed to come to room temperature overnight. The reaction mixture was extracted with ethyl acetate (2  $\times$  400 mL), and the combined extracts were washed with water, dried ( $\text{MgSO}_4$ ), filtered, and evaporated in vacuo to give 60.1 g (95%) of 12b as a clear colorless oil:  $[\alpha]_D^{25} +26.2^\circ$  (c 1.1, MeOH); NMR ( $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  1.92 (m, 2 H), 2.83 (s, 1 H), 3.47 (m, 4 H), 4.41 (m, 1 H), 5.14 (s, 2 H), 7.34 (m, 5 H); MS (*m/e* relative intensity) 222 (33, *M* + 1), 91 (100). Anal. ( $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{NO}_3$ ) C, H, N.

**(*R*)-3-[(Methylsulfonyl)oxy]-1-pyrrolidinecarboxylic Acid, Phenylmethyl Ester (13b).** A solution of 70.1 g (0.29 mol) of 12b in 300 mL of pyridine was cooled to 5 °C and treated dropwise with 34.4 g (0.3 mol) of methanesulfonyl chloride. The reaction was stirred at 5 °C for 2 h and allowed to come to room temperature overnight. The reaction was diluted with 600 mL of ethyl acetate, the resulting precipitate was removed by filtration and washed with ethyl acetate, and the filtrate was evaporated in vacuo. The residue was partitioned between ethyl acetate and water (500 mL each) and the aqueous layer was reextracted with ethyl acetate (250 mL). The combined organic layers were washed with water (3  $\times$  200 mL), dried ( $\text{MgSO}_4$ ), filtered, and evaporated in vacuo to give 77.9 g (91%) of 13b as a light yellow oil:  $[\alpha]_D^{25} -27.3^\circ$  (c 1.09, MeOH); NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.23 (m, 2 H), 3.03 (s, 3 H), 3.65 (m, 4 H), 5.15 (s, 2 H), 5.28 (m, 1 H), 7.34 (m, 5 H); MS (*m/e* relative intensity) 300 (100, *M* + 1), 256 (45). Anal. ( $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}_5$ ) C, H, N.

**(*S*)-3-Azido-1-pyrrolidinecarboxylic Acid, Phenylmethyl Ester (14a).** A solution of 77.9 g (0.26 mol) of 13b in 250 mL of *N,N*-dimethylformamide was treated with 19.5 g (0.3 mol) of finely powdered sodium azide, and the reaction mixture was heated at 100 °C for 2 h. The solvent was removed in high vacuo at 50 °C, and the residue was partitioned between ethyl acetate and water (350 mL each). The aqueous layer was reextracted with ethyl acetate (2  $\times$  250 mL), and the combined organic layers were washed with water, dried ( $\text{MgSO}_4$ ), filtered, and evaporated in vacuo to give 62.5 g (98%) of 14a as a clear colorless oil:  $[\alpha]_D^{25} +36.7^\circ$  (c 1.09, MeOH); NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  2.08 (m, 2 H), 3.56 (m, 4 H), 4.19 (m, 1 H), 5.17 (s, 2 H), 7.37 (m, 5 H); MS (*m/e* relative intensity): 247 (13, *M* + 1), 91 (100). Anal. ( $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$ ) C, H, N.

**(*S*)-3-Amino-1-pyrrolidinecarboxylic Acid, Phenylmethyl Ester (15a).** A solution of 61.4 g (0.25 mol) of 14a in 900 mL of methanol was treated with 5.0 g of Raney nickel and shaken in a hydrogen atmosphere at temperatures of 21.5–25.0 °C and a pressure of 50 psi for 21.5 h. The reaction was vented and treated with an additional 5.0 g of catalyst after 19 h. The catalyst was removed by filtration through Celite, and the solvent was removed in vacuo to give 52.1 g (95%) of 15a as a clear, colorless oil:  $[\alpha]_D^{25} +2.8^\circ$  (c 1.54, MeOH); NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.62 (s, 2 H), 1.89 (m, 1 H), 2.06 (m, 1 H), 3.16 (m, 1 H), 3.53 (m, 4 H), 5.17 (s, 2 H), 7.35 (m, 5 H); chiral HPLC 96/4 *S/R*; MS (*m/e* relative

433

intensity) 221 (93, M + 1), 206 (34), 177 (24), 91 (100). Anal. ( $C_{12}H_{16}N_2O_2$ ) C, H, N.

(S)-3-[[[(1,1-Dimethylethoxy)carbonyl]amino]-1-pyrrolidinecarboxylic Acid, Phenylmethyl Ester (16a). A solution of 5.5 g (25 mmol) of 15a in 25 mL (25 mmol) of 1.0 N sodium hydroxide and 40 mL of *tert*-butyl alcohol was treated dropwise with a solution of 5.5 g (25 mmol) of di-*tert*-butyl dicarbonate in 15 mL of *tert*-butyl alcohol. The reaction mixture was stirred at room temperature overnight, and the solvent was removed in vacuo. The residue was partitioned between ethyl acetate and water, and the layers were separated. The organic layer was reextracted with ethyl acetate, and the combined organic layers were washed with water, dried ( $MgSO_4$ ), filtered, and evaporated in vacuo to give 6.7 g (84%) of 16a as a white solid, mp 124–125 °C;  $[\alpha]^{25}_D$  -8.73° (c 0.55, MeOH); NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.38 (s, 9 H), 1.74 (m, 1 H), 2.50 (m, 1 H), 3.14 (m, 1 H), 3.33 (m, 2 H), 3.96 (bs, 1 H), 5.05 (s, 2 H), 7.35 (m, 5 H); MS (*m/e* relative intensity) 321 (32, M + 1), 265 (79), 221 (76). Anal. ( $C_{17}H_{24}N_2O_4$ ) C, H, N.

(S)-3-Pyrrolidinylcarbamic Acid, 1,1-Dimethylethyl Ester (17a). A solution of 6.1 g (18.7 mmol) of 16a in 100 mL of methanol was treated with 1.0 g of 20% palladium on carbon and was shaken in a hydrogen atmosphere at temperatures of 21–25 °C and pressures of 31.7–50.6 psi for 30 min. The catalyst was removed by filtering through Celite, and the solvent was removed in vacuo to give 3.3 g (95%) of 17a as a colorless oil which solidified upon standing:  $[\alpha]^{25}_D$  -22.7° (c 1.04, MeOH); NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  1.44 (s, 9 H), 1.69 (m, 1 H), 2.20 (m, 1 H), 3.19 (m, 4 H), 3.39 (m, 1 H), 4.27 (bd, 1 H), 5.86 (bs, 1 H); chiral HPLC 98:2 S/R; MS (*m/e* relative intensity): 187 (95, M + 1), 131 (86), 69 (97). Anal. ( $C_9H_{18}N_2O_2$ ) C, H, N.

[S-(R\*,R\*)]-3-[[[(1,1-Dimethylethoxy)carbonyl]amino]-1-oxopropyl]amino]-1-pyrrolidinecarboxylic Acid, Phenylmethyl Ester (19a). A solution of 9.4 g (50 mmol) of (*tert*-butoxycarbonyl)-L-alanine in 150 mL of dichloromethane was treated with 5.1 g (50 mmol) of *N*-methylmorpholine at room temperature. The reaction mixture was then cooled to -20 °C and treated with 6.8 g (50 mmol) of isobutyl chloroformate. The reaction mixture was warmed to -10 °C for 5 min, recooled to -20 °C, and treated with a solution of 7.7 g (35 mmol) of 15a in 30 mL of dichloromethane. The solution was stirred at -10 °C for 30 min and allowed to come to room temperature overnight. The reaction was washed with a 5% solution of sodium bicarbonate (2 × 100 mL) and water, dried ( $MgSO_4$ ), filtered, and evaporated in vacuo to give 13.2 g (96%) of 19a as a white solid:  $[\alpha]^{25}_D$  -13.5° (c 1.5, MeOH); NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  1.32 (d, 3 H), 1.42 (s, 9 H), 1.90 (m, 2 H), 3.55 (m, 4 H), 4.12 (m, 1 H), 4.44 (m, 1 H), 5.00 (bs, 1 H), 5.10 (s, 2 H), 6.62 (bs, 1 H), 7.34 (s, 5 H); MS (*m/e* relative intensity) 392 (10, M + 1), 336 (100), 292 (63), 258 (47), 202 (71). Anal. ( $C_{20}H_{28}N_3O_5$ ) C, H, N.

[S-(R\*,R\*)]-[1-Methyl-2-oxo-2-(3-pyrrolidinylamino)-ethyl]carbamic Acid, 1,1-Dimethylethyl Ester (20a). A solution of 15.7 g (40.1 mmol) of 19a in 400 mL of methanol was treated with 1.0 g of 20% palladium on carbon and was shaken in a hydrogen atmosphere at temperatures of 24.5–25.5 °C and pressures of 48.7–51.6 psi for 3 h. The catalyst was removed by filtering through Celite, and the filtrate was evaporated in vacuo to give 10.0 g (97%) of 20a as a colorless oil:  $[\alpha]^{25}_D$  -34.3° (c 5.1, MeOH); NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$  1.31 (d, 3 H), 1.44 (s, 9 H), 1.76 (m, 1 H), 2.16 (m, 1 H), 2.97 (m, 2 H), 3.14 (m, 2 H), 3.84 (s, 1 H), 4.13 (m, 1 H), 4.44 (m, 1 H), 5.40 (bs, 1 H), 7.40 (bs, 1 H). The signals at 3.84, 5.40, and 7.40 could be exchanged with  $D_2O$ . Chiral HPLC 99.7% S; MS (*m/e* relative intensity) 258 (84, M + 1), 202 (100). Anal. ( $C_{12}H_{23}N_3O_3$ ) C, H, N.

**Preparation of Final Quinolones. General Method A: Compounds 21e–21l, 22d, 22e, 22h, 22j, 23c–23e, 24d–24f.** [S-(R\*,R\*)]-1-Cyclopropyl-7-[3-[[[(1,1-dimethylethoxy)carbonyl]amino]-1-oxopropyl]amino]-1-pyrrolidinyl]-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-1,8-naphthyridine-3-carboxylic Acid (21p). A suspension of 2.8 g (10 mmol) of 25, 2.8 g (15 mmol) of 20a, 3.0 g (30 mmol) of triethylamine, and 150 mL of acetonitrile was heated at reflux for 4 h. The reaction mixture was cooled

to room temperature, and the solid was removed by filtration, washed with acetonitrile, and dried in vacuo to give 4.3 g (85%) of 21p: mp 195–197 °C; NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.12 (m, 4 H), 1.19 (d, 3 H), 1.37 (s, 9 H), 1.97 (m, 1 H), 2.18 (m, 1 H), 3.65 (m, 2 H), 3.93 (m, 4 H), 4.39 (m, 1 H), 6.88 (d, 1 H), 7.94 (d, 1 H), 8.29 (d, 1 H), 8.56 (m, 1 H), 15.70 (bs, 1 H). The signals at 6.88, 8.29, and 15.70 could be exchanged with  $D_2O$ . MS (*m/e* relative intensity) 504 (100, M + 1), 430 (23). Anal. ( $C_{24}H_{30}FN_5O_6$ ) C, H, N.

[S-(R\*,R\*)]-7-[3-[(2-Amino-1-oxopropyl)amino]-1-pyrrolidinyl]-1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-1,8-naphthyridine-3-carboxylic Acid, Hydrochloride (21f). A suspension of 1.5 g (3.0 mmol) of 21p in a mixture of 25 mL of 1.0 M hydrochloric acid and 25 mL of ethanol was stirred at room temperature for 1 h and heated at reflux for 2 h. The solvent was removed in vacuo, the residue was triturated with 50 mL of 2-propanol/ether (1:1), and the solid was removed by filtration, washed with the above mixture and ether, and dried in vacuo to give 1.2 g (92%) of 21f: mp 200–202 °C; NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.23 (m, 4 H), 1.73 (d, 3 H), 2.07 (m, 1 H), 2.43 (m, 1 H), 3.67 (m, 6 H), 4.87 (m, 1 H), 8.01 (d, 1 H), 8.33 (s, 2 H), 9.07 (s, 1 H), 9.20 (d, 1 H), 15.81 (bs, 1 H). The signals at 8.33, 9.07, and 15.81 could be exchanged with  $D_2O$ . MS (*m/e* relative intensity) 404 (100, M + 1), 359 (15), 315 (45), 271 (88). Anal. ( $C_{19}H_{22}FN_5O_4 \cdot HCl \cdot H_2O$ ) C, H, N.

**General Method B: Compounds 21d, 22f, 22g, 22i, 23b, 23f.** [S-(R\*,R\*)]-7-[3-[(2-Amino-1-oxopropyl)amino]-1-pyrrolidinyl]-1-cyclopropyl-6,8-difluoro-1,4-dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxylic Acid, Sesquihydrochloride (22f). A solution of 1.5 g (7.7 mmol) of *tert*-butoxycarbonyl-L-alanine in 15 mL of acetonitrile was cooled to 5 °C and treated with 0.8 g (7.7 mmol) of *N*-methylmorpholine. The reaction mixture was stirred at 5 °C for 5 min and cooled to -20 °C where 1.1 g (7.7 mmol) of isobutyl chloroformate was added dropwise while the temperature was maintained at -20 ± 5 °C. After the addition was complete the reaction mixture was stirred at 0 °C for 2 h and treated with a solution of 2.9 g (7.7 mmol) of ethyl (S)-7-(3-amino-1-pyrrolidinyl)-1-cyclopropyl-6,8-difluoro-1,4-dihydro-4-oxo-3-quinolinecarboxylate (26p) in 15 mL of dichloromethane. The reaction mixture was stirred at -5 °C for 2 h and allowed to come to room temperature overnight. The solvent was removed in vacuo, and the residue was dissolved in dichloromethane, washed with water, dried ( $MgSO_4$ ), filtered, and evaporated in vacuo. The residue was dissolved in a mixture of 1.0 M hydrochloric acid (30 mL) and ethanol (20 mL) and heated to reflux for 4 h. The ethanol was allowed to evaporate, and the aqueous acid solution was heated at reflux an additional 30 min. The solution was filtered through a fiber glass pad to clarify, and the filtrate was lyophilized. The residue was triturated with ethanol and ether (50 mL, 1:1), and the solid was removed by filtration, washed with the aforementioned mixture (25 mL) and ether, and dried in vacuo to give 1.9 g (49%) of 22f: mp 128–131 °C;  $[\alpha]^{25}_D$  -32.8° (c 1.08, MeOH); NMR (TFA- $d$ )  $\delta$  1.51 (m, 4 H), 1.83 (s, 3 H), 2.47 (m, 2 H), 4.31 (m, 6 H), 4.83 (m, 1 H), 8.12 (bs, 1 H), 9.31 (bs, 1 H); MS (*m/e* relative intensity) 421 (100, M + 1), 403 (23), 350 (50). Anal. ( $C_{20}H_{22}F_2N_4O_4 \cdot 1.5HCl \cdot 2.0H_2O$ ) C, H, N, Cl, F.

**General Method C: Compounds 21a–21c, 22a–22c, 23a, 24a–24c.** (S)-7-(3-Amino-1-pyrrolidinyl)-1-cyclopropyl-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-1,8-naphthyridine-3-carboxylic Acid, Monohydrochloride (21b). A near solution of 4.3 g (15 mmol) of 25, 3.5 g (19 mmol) of 17a, 4.0 g (40 mmol) of triethylamine, and 75 mL of acetonitrile was heated at reflux for 3 h. The reaction mixture was cooled to 5 °C, and the solid was removed by filtration, washed with acetonitrile and ether, and dried in vacuo to give 6.2 g (95%) of the Boc-protected product. This solid was suspended in a solution of 1.0 M hydrochloric acid (30 mL) and ethanol (30 mL) and was heated at reflux for 3 h. The solvent was removed in vacuo, and the residue was triturated with 2-propanol/ether (20 mL each). The solid was removed by filtration, washed with the previous solvent mixture (2 × 5 mL) and ether, and dried in vacuo to give 4.8 g (87% over two steps) of 21b: mp 310–312 °C; NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.09 (m, 2 H), 1.20 (m, 2 H), 2.19 (m, 1 H), 2.33 (m, 1 H), 3.67 (m, 1 H), 3.98 (m, 5 H), 8.05 (d, 1 H), 8.44 (bs, 3 H), 8.58 (s, 1 H); chiral HPLC 98.3/1.7 S/R; MS (*m/e* relative intensity) 332 (25, M + 1), 288 (100). Anal. ( $C_{18}H_{17}FN_4O_3 \cdot HCl \cdot 1.0H_2O$ ) C, H, N.

Registry No. 11b, 104706-47-0; 12b, 100858-33-1; 13b, 122536-68-9; 14a, 122536-70-3; 15a, 122536-72-5; 16a, 122536-74-7; (±)-17, 140629-77-2; 17a, 122536-76-9; 17b, 122536-77-0; 18, 51-35-4; 19a, 140412-80-2; 20a, 122536-66-7; 20b, 140412-68-6; 20c, 122537-11-5; 20d, 140412-67-5; 21a (free base), 140629-71-6; 21b (free base), 127967-03-7; 21b·HCl, 138668-47-0; 21c (free base), 140412-10-8; (S,R)-21e (free base), 122536-21-4; (S,R)-21e·xHCl, 140412-41-5; (R,R)-21e (free base), 140412-12-0; (R,R)-21e·xHCl, 140412-42-6; 21f (free base), 122536-20-3; 21f·HCl, 122536-48-5; 21g (free base), 140412-11-9; 21g·HCl, 122536-42-9; (S,S)-21h (free base), 122536-95-2; (S,S)-21h·xHCl, 140412-43-7; (R,S)-21h (free base), 122536-38-3; (R,S)-21h·xHCl, 140412-44-8; 21i (free base), 140412-13-1; 21i·xHCl, 140412-45-9; (S,S)-21j (free base), 140438-08-0; (S,S)-21j·2HCl, 140412-46-0; (R,S)-21j (free base), 140412-14-2; (R,S)-21j·2HCl, 140412-47-1; (S,S)-21k (free base), 140412-15-3; (S,S)-21k·HCl, 140412-48-2; (R,S)-21k (free base), 140412-16-4; (R,S)-21k·HCl, 140412-49-3; (S,S)-21l (free base), 140412-17-5; (R,S)-21l (free base), 140412-18-6; 21p, 122536-91-8; 22a (free base), 140629-72-7; 22a·HCl, 140629-75-0; 22b (free base), 133298-78-9; 22b·HCl, 140412-50-6; 22c (free base), 140412-19-7; 22c·HCl, 133298-73-4; (S,R)-22e (free base), 140412-21-1; (S,R)-22e·HCl, 122536-44-1; (R,R)-22e (free base), 140412-22-2; (R,R)-22e·HCl, 122536-43-0; 22f (free base), 122548-08-7; 22f·3/2HCl, 140412-51-7; 22g (free base), 140412-20-0; 22g·HCl, 122536-36-1; (S,S)-22h (free base), 140412-23-3; (S,S)-22h·HCl, 122537-08-0; (R,S)-22h (free base), 140412-24-4; (R,S)-22h·HCl, 122536-60-1; 22i (free base), 140412-25-5; 22i·HCl, 140412-52-8; (S,S)-22j (free base), 140412-26-6; (S,S)-22j·2HCl, 140412-53-9;

(R,S)-22j (free base), 140412-27-7; (R,S)-22j·2HCl, 140412-54-0; 23a (free base), 140629-73-8; 23g·2HCl, 140629-76-1; (S,S)-23b (free base), 140412-28-8; (S,S)-23b·xHCl, 140412-55-1; (R,S)-23b (free base), 140412-29-9; (R,S)-23b·xHCl, 140412-56-2; (S,R)-23c (free base), 140412-30-2; (S,R)-23c·xHCl, 140412-57-3; (R,R)-23c (free base), 140412-31-3; (R,R)-23c·xHCl, 140412-58-4; (S,S)-23d (free base), 140412-32-4; (S,S)-23d·xHCl, 140412-59-5; (R,S)-23d (free base), 140412-33-5; (R,S)-23d·xHCl, 140412-60-8; 23e (free base), 140412-34-6; 23e·xHCl, 140412-61-9; (S,S)-23f (free base), 140412-35-7; (S,S)-23f·xHCl, 140412-62-0; (R,S)-23f (free base), 140412-36-8; (R,S)-23f·xHCl, 140412-63-1; 24a (free base), 140629-74-9; 24b (free base), 133298-74-5; 24b·HCl, 140412-64-2; 24c (free base), 140412-37-9; 24c·HCl, 140412-65-3; 24d (free base), 140412-38-0; 24d·HCl, 122536-56-5; 24e (free base), 140412-39-1; 24e·HCl, 122536-55-4; 24f (free base), 140412-40-4; 24f·HCl, 140412-66-4; 25, 100361-18-0; 8-deaza-25, 86393-33-1; 26, 122536-80-5; (R)-26, 122536-81-6; (±)-26, 140630-88-2; (±)-8-aza-2b, 140412-77-7; (±)-26 (6-monofluoro derivative), 140438-09-1; 7-chloro-26 (free acid), 140412-78-8; 5-amino-7-chloro-26 (free acid), 140412-79-9; 27, 127934-52-5; Boc-Ala, 15761-38-3; Boc-Gly, 4530-20-5; Boc-Lys, 13734-28-6; Boc-Phe-(R)-NH(3-pyrrolidinyl), 122536-86-1; Boc-Phe-(S)-NH(3-pyrrolidinyl), 140412-69-7; Boc-Gly-(±)-NH(3-pyrrolidinyl), 140412-70-0; Boc-Lys-(R)-NH(3-pyrrolidinyl), 140412-71-1; Boc-Lys-(S)-NH(3-pyrrolidinyl), 140412-72-2; Boc-Val-(R)-NH(3-pyrrolidinyl), 140412-73-3; Boc-Val-(S)-NH(3-pyrrolidinyl), 140412-74-4; Boc-Gln-(R)-NH(3-pyrrolidinyl), 140412-75-5; Boc-Gln-(S)-NH(3-pyrrolidinyl), 140412-76-6.

## Structure-Activity Relationships of (+)-CC-1065 Analogues in the Inhibition of Helicase-Catalyzed Unwinding of Duplex DNA<sup>†</sup>

Daekyu Sun\* and Laurence H. Hurley\*

Drug Dynamics Institute, College of Pharmacy, The University of Texas at Austin, Austin, Texas 78712-1074.

Received November 7, 1991

(+)-CC-1065 is a potent antitumor antibiotic produced by *Streptomyces zelensis*. Previous studies have shown that the potent cytotoxic and antitumor activities of (+)-CC-1065 are due to the ability of this compound to covalently modify DNA. (+)-CC-1065 reacts with duplex DNA to form a (N3-adenine)-DNA adduct which lies in the minor groove of DNA overlapping with a five base-pair region. As a consequence of covalent modification with (+)-CC-1065, the helix bends into the minor groove and also undergoes winding and stiffening. In the studies described here, we have constructed templates for helicase-catalyzed unwinding of DNA that contain site-directed (+)-CC-1065 and analogue DNA adducts. Using these templates we have shown that (+)-CC-1065 and select synthetic analogues, which have different levels of cytotoxicity, all produce a significant inhibition of unwinding of a 3'-tailed oligomer duplex by helicase II when the displaced strand is covalently modified. However, the extent of helicase II inhibition is much more significant for (+)-CC-1065 and an analogue which also produced DNA winding when the winding effects are transmitted in the opposite direction to the helicase unwinding activity. This observed pattern of inhibition of helicase-catalyzed unwinding of drug-modified templates was the same for a 3'-T-tail, for different duplex region sequences, and with the *Escherichia coli* rep protein. Unexpectedly, the gel mobility of the displaced drug-modified single strand was dependent on the species of drug attached to the DNA. Last, strand displacement by helicase II coupled to primer extension by *E. coli* DNA polymerase I showed the same pattern of inhibition when the lagging strand was covalently modified. In addition, the presence of helicase II on single-stranded regions of templates caused the premature termination of primer extension by DNA polymerase. These results are discussed from the perspective that (+)-CC-1065 and its analogues have different effects on DNA structure, and these resulting structural changes in DNA molecules are related to the different in vivo biological consequences caused by these drug molecules.

### Introduction

In order for DNA to serve as an efficient substrate for polymerases, the duplex DNA must be unwound. The task of unwinding DNA rapidly is carried out by a special class of enzymes called helicases.<sup>1,2</sup> These enzymes progress in a unidirectional or bidirectional manner through the helix utilizing energy derived from hydrolysis of nucleotide

triphosphates to fuel this process. The precise mechanisms of helicase-catalyzed unwinding of DNA are not known, but in general they require a single-stranded region to which the protein initially binds. Helicase-catalyzed unwinding of DNA is important in replication, transcription, recombination, and repair.<sup>3-5</sup> While most in vitro studies

<sup>†</sup> Abbreviations: DDW, double-distilled water; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; N, any nucleotide; pu, purine nucleotide; py, pyrimidine nucleotide; ss, single-stranded; TEMED, N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine; Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane.

(1) Geider, K.; Hoffmann-Berling, H. Proteins Controlling the Helical Structure of DNA. *Annu. Rev. Biochem.* 1981, 50, 233-260.

(2) Gelfer, M. DNA Unwinding Enzymes. In *The Enzymes*; Boyer, P. D., Ed.; Academic Press: New York, 1981; Vol. 14, pp 367-372.

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  
DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES**

**Radicación No. 04122695-A**

**Clasificación Internacional (IPC): A61K38/05**

**Concepto Técnico No. 3583**

Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad



Vía Nacional



Vía PCT (fase nacional)



Cap. I



Cap. II



No. Sol. Internacional

PCT/US03/15405

Fecha de Presentación Internal.

6/06/2003

Como resultado del examen definitivo, realizado con fundamento en el artículo 48 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica:

**1. Documentos estudiados**

Descripción: Folios 178 a 375 solicitud de divisional no aceptada inicialmente

Reivindicaciones: Folios 376 a 384 solicitud de divisional no aceptada inicialmente por lo cual se encuentra en la divisional original  
Folios 385 a 390 reivindicaciones de la solicitud de divisional modificadas como respuesta del solicitante al artículo 45 de la divisional original.  
Folios 401 a 405 reivindicaciones modificadas de la solicitud de divisional como respuesta del solicitante al primer examen de fondo de la divisional.

Prioridad:

Fecha: 11/06/2002 y 3/10/2002

País: EP y US

Número: 02380120.2

02380121.0

60/415.936

60/415.937

Respuesta del solicitante: Folios: 397 a 405

**2. Objeto de la invención**

- Título de la solicitud: Profármacos de aminoácidos excitadores. Número de folio: 2.

**El problema planteado en esta solicitud** es la necesidad de compuestos útiles para trastornos neurológicos y psiquiátricos que mejoren la potencia in vivo del compuesto precursor respectivo y produzcan mayor exposición oral del precursor con mayor biodisponibilidad oral.

**Para solucionar este problema técnico** la solicitud en estudio proporciona profármacos de aminoácidos sintéticos para el tratamiento de trastornos neurológicos y trastornos psiquiátricos.

Clasificación Internacional de Patentes (IPC.): A61K38/05

**3. Determinación del Estado de la Técnica**

La fecha que se ha tenido en cuenta para determinar el Estado de la Técnica es:

Fecha de presentación de la solicitud prioritaria 11/06/2002

Teniendo en cuenta la fecha indicada se realizó la búsqueda en el estado de la técnica de documentos relacionados con la solicitud encontrándose los siguientes documentos más relevantes:

| Nº             | Documento | Título                            | Fecha de publicación* |
|----------------|-----------|-----------------------------------|-----------------------|
| D <sub>1</sub> | US5688826 | EXCITATORY AMINO ACID DERIVATIVES | 18/11/1997            |

**4. Respuesta a los argumentos del solicitante:**

- Dice el solicitante que la presente solicitud reconoce la existencia de D1, e indica que el objeto de la invención constituye justamente el desarrollo de profármacos para los compuestos divulgados en dicho documento. Dice el solicitante que allí se revela únicamente compuestos en los que la posición 4 del núcleo biciclo [3.1.0] hexano no está sustituido así que no hay motivación para incluir un derivado de aminoácido en dicha posición.

Se aclara al solicitante que un experto medio en la materia sabe a priori de las ventajas que se le confieren a un compuesto por el simple hecho de convertirlo en su respectivo profármaco, por lo tanto la motivación es de por si ya un precedente para que un experto en la materia desee mediante la inclusión de un aminoácido llegar a convertir un compuesto en su profármaco. Mas aun cuando en el estado de la técnica ya era conocido que se incrementa la solubilidad en agua y la biodisponibilidad pegando aminoácidos a los principios activos pues se convierten en sus profármacos.

- Dice el solicitante que tras analizar D2 no encontró indicación acerca de la inclusión de grupos aminoácidos en la estructura de moléculas activas con el objeto de incrementar su solubilidad.

Se confirma el argumento del solicitante y se encuentra procedente eliminar D2 del presente concepto.

- El solicitante no esgrime argumentos acerca del documento solicitado como prueba para corroborar que en el estado de la técnica ya era conocido que se incrementa la solubilidad en agua y la biodisponibilidad pegando aminoácidos a los principios activos, más sin embargo procede a adjuntarlo "QUINOLONE ANTIBACTERIAL AGENTS. SYNTHESIS AND STRUCTURE- ACTIVITY

RELATIONSHIPS OF A SERIES OF AMINO ACID PRODRUGS OF RACEMIC AND CHIRAL 7-(3-AMINO – 1- PYRROLIDINYLQUINOLONES, HIGHLY SOLUBLE QUINOLONE PRODRUGS WITH IN VIVO PSEUDOMONAS ACTIVITY”. Al respecto de este documento se había dicho que corroboraba que el profármaco alanil de la quinolona resultaba ser más activo que el compuesto original, solamente por pegar aminoácidos lo cual resultaba ser normal en la práctica para incrementar la solubilidad en agua y la biodisponibilidad del medicamento de origen ya que muestra un incremento de 400 veces la solubilidad del compuesto activo el cual es rápidamente distribuido in vivo haciéndolo además más activo. Todo esto corrobora que incluir un grupo aminoácido en el núcleo farmacofórico como sucede en la presente solicitud para los compuestos divulgados, ya había sido enseñado en el estado de la técnica, lo cual conduce a una persona medianamente versada en la materia a lo reivindicado.

5. Análisis de patentabilidad (artículo 14 D486)

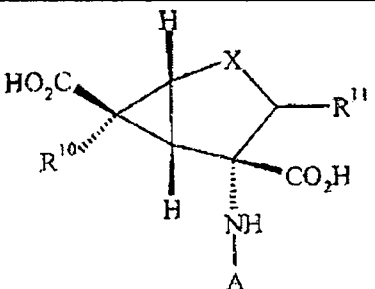
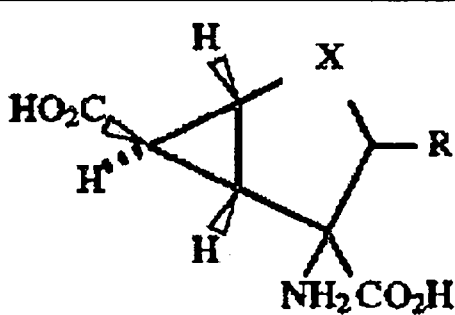
Nivel inventivo (artículo 18 D486)

La presente Solicitud de Patente reivindica (de 1 – 12) un compuesto de fórmula general (I) o su sal y (13) una formulación que comprende dicho compuesto más un vehículo, diluyente o excipiente:

Dicho compuesto está afectado por el siguiente documento del Estado de la Técnica:

D<sub>1</sub> que enseña según tabla 1-A (ver folio 391, abstract) compuestos útiles como moduladores del receptor de glutamato metabotrópico.

TABLA 1-A

| SOLICITUD       |                                                                                                                                               | ANTERIORIDAD (D <sub>1</sub> ) |                                                                                      | comparación                                           |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| (I)             |                                                            | (I)                            |  |                                                       |
| R <sub>10</sub> | H                                                                                                                                             |                                | H                                                                                    | IGUAL                                                 |
| X               | SO <sub>2</sub>                                                                                                                               | X                              | SO <sub>2</sub>                                                                      | IGUAL                                                 |
| A               | H-(Q) <sub>1-10</sub> <sup>-</sup><br>Q se selecciona independientemente del grupo amino acilo derivado de un aminoácido natural o no natural |                                | H                                                                                    | DIFERENTE<br>grupo amino acilo o aminoácido adicional |
| R <sub>11</sub> | H                                                                                                                                             | R                              | H                                                                                    | IGUAL                                                 |

La única diferencia con D<sub>1</sub> es que esta solicitud agrega un aminoácido como sustituyente adicional en “A” pero esta diferencia no parece conceder ningún efecto inesperado.

El **efecto técnico logrado por esta diferencia** es mayor solubilidad y biodisponibilidad de los compuestos aminoácidos excitadores por ser convertido en profármaco de mismo.

El **Problema Técnico Objetivo fundamental** de la Invención Reivindicada se define en: "Cómo aumentar la solubilidad y biodisponibilidad de los compuestos aminoácidos excitadores".

Por consiguiente resultaría obvio el diseño de este tipo de compuestos y formulaciones para un experto en la materia que conozca el estado de la técnica ya que es bien conocido en el área que el hecho de convertir un compuesto a su profármaco le aumentará la biodisponibilidad al mismo ya que actuará directamente in vivo sin necesidad de sufrir transformaciones, además también era conocido que pegar aminoácidos era una práctica normal para incrementar la solubilidad (folio 421 segundo artículo 45).

En conclusión no se considera que la presente solicitud merezca reconocimiento de nivel inventivo.

**6. Conclusión:**

En consecuencia y por todo lo expuesto anteriormente, se recomienda **Negar** las reivindicaciones: 1 a 13 (folios: 401 a 405)

Bogotá, D.C.,

|                                            |                                                |
|--------------------------------------------|------------------------------------------------|
| <b>CONCEPTO TECNICO No.</b><br><b>3583</b> | <b>EXAMINADOR TECNICO</b><br>Código No. 202087 |
|--------------------------------------------|------------------------------------------------|

8

| EXAMEN TÉCNICO DE FONDO    |                |                               |            |
|----------------------------|----------------|-------------------------------|------------|
| Nº Radicación              | 04122695       | Fecha de presentación         | 07/12/2004 |
| Nº Solicitud Internacional | PCT/US03/15405 | Fecha Solicitud Internacional | 6/06/2003  |
| Nº Prioridad               | 02380120.2     | Fecha de Prioridad            | 11/06/2002 |
|                            | 02380121.0     |                               | 11/06/2002 |
|                            | 60/415.936     |                               | 3/10/2002  |
|                            | 60/415.937     |                               | 3/10/2002  |

|                                                                                                 |              |  |  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--|--|
| Palabras clave                                                                                  |              |  |  |
|                                                                                                 |              |  |  |
| CLASIFICACIONES INTERNACIONALES DE BUSQUEDA                                                     |              |  |  |
| A61K38/05; C07K5/06; C07K5/062; C07K5/065; C07K5/068; A61K38/00; A61K38/05; C07K5/00; A61K38/00 |              |  |  |
| DOCUMENTOS CORRESPONDIENTES EN OTROS PAÍSES                                                     |              |  |  |
| WO03104217                                                                                      |              |  |  |
| MXPA04012518                                                                                    |              |  |  |
| CA2488167                                                                                       |              |  |  |
| BRPI0311558                                                                                     |              |  |  |
| AU2003232146                                                                                    |              |  |  |
| Patente Original                                                                                | WO 03/104217 |  |  |

| BASES DE DATOS CONSULTADAS |  |
|----------------------------|--|
| EPOLINE                    |  |
| ESPACENET                  |  |

| INFORMES DE EXÁMENES EN OTRAS OFICINAS |                |                 |
|----------------------------------------|----------------|-----------------|
| Oficina                                | Fecha          | Reiv. afectadas |
|                                        |                |                 |
| ANTERIORIDADES ENCONTRADAS             |                |                 |
| Documento                              | Relevancia     | Reiv. afectadas |
| US5688826                              | Particular (Y) | 1-18, 27        |
| LITERATURA NO PATENTES                 |                |                 |
| Documento                              | Relevancia     | Reiv. afectadas |
|                                        |                |                 |

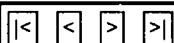
|               |  |
|---------------|--|
| Observaciones |  |
|               |  |

|                  |            |
|------------------|------------|
| Fecha del examen | 20/02/2008 |
|------------------|------------|

441

# **SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO** **SISTEMA DE TRAMITES-CONSULTA DE TRÁMITES\***

Viernes 5 de Febrero de 2010

**Datos del Trámite (PENDIENTE)**

Radicación: Año: 2004 \* Número: 122695 \* Ctrl: \* Cons Rad: 0 \* Secu Even: 0  
 Tipo Trámite: 11 PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II  
 Tipo Evento: 379. FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO II  
 Tipo Actuación: 411. PRESENTACION  
 Dependencia Origen:  
 Dependencia Destino: 2020. DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES  
 Solicitante/Destinatario: CARLOS R. OLARTE  
 Contenedora  
 Identificación NN NO IDENTIFICADO Número: 8123457717.0  
 Dirección:  
 Tipo de Radicación: EN ENTRADA Folios: 409  
 Fecha de Radicación: Día: 7 Mes: Diciembre Año: 2004 Entrega: PRESENTACION PERSONAL  
 10:28:28  
 Guía fecha:  
 Observaciones:

**Otros Datos**

[ Documentos ][ Recibos ][ Actos ][ Trámite N ][ Ver Documento ]

Nueva Consulta

Regresar

[Cerrar Sesión]

Registro : 1 / 22

**Información adicional en la Oficina de Sistemas**

| Año | Número | Ctrl | Cons Rad | Sec Eve | Trámite                                   | Evento                             | Actuación                               | Tipo | Fecha               | Solicitante      | Asignación/<br>Estado-<br>Correspondencia |
|-----|--------|------|----------|---------|-------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|------|---------------------|------------------|-------------------------------------------|
| 4   | 122695 |      | 0        | 0       | PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II | FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO II | PRESENTACION                            | EN   | 2004-12-07 10:28:28 | CARLOS OLARTE R. |                                           |
| 4   | 122695 |      | 1        | 0       | PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II | FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO II | SOLICITUD PRORROGA                      | EN   | 2005-02-16 17:36:59 | CARLOS OLARTE R. |                                           |
| 4   | 122695 |      | 2        | 0       | PCT-PATENTE DE INVENCION CAPITULOS I Y II | FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO II | REPUESTA A REQUERIMIENTO DE INFORMACION | EN   | 2005-04-14 09:39:32 | CARLOS OLARTE R. |                                           |

A92

|   |        |  |    |   |                                           |                                    |                                         |    |                     |                                                                  |   |  |  |
|---|--------|--|----|---|-------------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------------|----|---------------------|------------------------------------------------------------------|---|--|--|
| 4 | 122695 |  | 3  | 0 | PCT-PATENTE DE INVENCIÓN CAPITULOS I Y II | FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO II | PETICION DE EXAMEN                      | EN | 2006-05-25 17:15:39 | CARLOS REYNALDO OLARTE GARCIA                                    | E |  |  |
| 4 | 122695 |  | 4  | 0 | PCT-PATENTE DE INVENCIÓN CAPITULOS I Y II | FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO II | REQUERIMIENTO DE INFORMACION            | SA | 2004-12-23 14:59:24 | PARA MIGRACION TRAMITES SOLICITANTE DESTINATARIO NO IDENTIFICADO | E |  |  |
| 4 | 122695 |  | 5  | 0 | PCT-PATENTE DE INVENCIÓN CAPITULOS I Y II | FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO II | COMPLEMENTO DE INFORMACION              | EN | 2007-11-23 10:30:27 | CARLOS REYNALDO OLARTE GARCIA                                    | E |  |  |
| 4 | 122695 |  | 6  | 0 | PCT-PATENTE DE INVENCIÓN CAPITULOS I Y II | FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO II | COMPLEMENTO DE INFORMACION              | EN | 2008-02-11 16:34:50 | CARLOS REYNALDO OLARTE GARCIA                                    | E |  |  |
| 4 | 122695 |  | 7  | 0 | PCT-PATENTE DE INVENCIÓN CAPITULOS I Y II | FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO II | COMPLEMENTO DE INFORMACION              | EN | 2008-02-15 15:52:56 | CARLOS REYNALDO OLARTE GARCIA                                    | E |  |  |
| 4 | 122695 |  | 8  | 0 | PCT-PATENTE DE INVENCIÓN CAPITULOS I Y II | FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO II | TRASLADO INFORME BUSQUEDA               | SA | 2008-03-13 13:52:50 | CARLOS REYNALDO OLARTE GARCIA                                    | E |  |  |
| 4 | 122695 |  | 9  | 0 | PCT-PATENTE DE INVENCIÓN CAPITULOS I Y II | FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO II | REPUESTA A REQUERIMIENTO DE INFORMACION | EN | 2008-06-16 15:33:12 | CARLOS REYNALDO OLARTE GARCIA                                    | E |  |  |
| 4 | 122695 |  | 10 | 0 | PCT-PATENTE DE INVENCIÓN CAPITULOS I Y II | FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO II | TRASLADO INFORME BUSQUEDA               | SA | 2008-12-04 14:02:23 | CARLOS REYNALDO OLARTE GARCIA                                    | E |  |  |
| 4 | 122695 |  | 11 | 0 | PCT-PATENTE DE INVENCIÓN CAPITULOS I Y II | FASE NACIONAL INCLUIDO CAPITULO II | REPUESTA A REQUERIMIENTO DE INFORMACION | EN | 2009-03-04 16:27:34 | CARLOS REYNALDO OLARTE GARCIA                                    | E |  |  |
|   |        |  |    |   | PCT-PATENTE                               | FASE NACIONAL                      | TRASLADO                                |    | 2009-               | NURY ASTRID                                                      |   |  |  |

A43

|   |        |   |    |   |                                                           |                                                |                                                  |    |                            |                                     |      |   |
|---|--------|---|----|---|-----------------------------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------------|----|----------------------------|-------------------------------------|------|---|
| 4 | 122695 |   | 12 | 0 | DE INVENCIÓN<br>CAPÍTULOS<br>I Y II                       | INCLUIDO<br>CAPÍTULO<br>II                     | SECRETARIA<br>GENERAL                            | TR | 12-01<br>10:38:46          | BLOISE<br>CARRASCAL                 | e    |   |
| 4 | 122695 |   | 13 | 0 | PCT-<br>PATENTE<br>DE<br>INVENCIÓN<br>CAPÍTULOS<br>I Y II | FASE<br>NACIONAL<br>INCLUIDO<br>CAPÍTULO<br>II | COMUNICACION<br>ACTO<br>ADMINISTRATIVO           | SA | 2009-<br>12-01<br>10:38:48 | CARLOS<br>REINALDO<br>OLARTE GARCIA | e    | ≡ |
| 4 | 122695 |   | 14 | 0 | PCT-<br>PATENTE<br>DE<br>INVENCIÓN<br>CAPÍTULOS<br>I Y II | FASE<br>NACIONAL<br>INCLUIDO<br>CAPÍTULO<br>II | PRESENTACION<br>RECURSO<br>REPOSICION            | EN | 2009-<br>12-31<br>12:28:59 | CARLOS<br>REINALDO<br>OLARTE GARCIA | e    |   |
| 4 | 122695 | A | 0  | 0 | PCT-<br>PATENTE<br>DE<br>INVENCIÓN<br>CAPÍTULOS<br>I Y II | FASE<br>NACIONAL<br>INCLUIDO<br>CAPÍTULO<br>II | PRESENTACION                                     | EN | 2004-<br>12-07<br>10:28:28 | CARLOS<br>OLARTE                    | R. e |   |
| 4 | 122695 | A | 1  | 0 | PCT-<br>PATENTE<br>DE<br>INVENCIÓN<br>CAPÍTULOS<br>I Y II | FASE<br>NACIONAL<br>INCLUIDO<br>CAPÍTULO<br>II | TRASLADO<br>INFORME<br>BUSQUEDA                  | SA | 2008-<br>12-04<br>14:39:38 | CARLOS<br>REINALDO<br>OLARTE GARCIA | e    | ≡ |
| 4 | 122695 | A | 2  | 0 | PCT-<br>PATENTE<br>DE<br>INVENCIÓN<br>CAPÍTULOS<br>I Y II | FASE<br>NACIONAL<br>INCLUIDO<br>CAPÍTULO<br>II | REPUESTA A<br>REQUERIMIENTO<br>DE<br>INFORMACION | EN | 2009-<br>03-04<br>16:28:50 | CARLOS<br>REINALDO<br>OLARTE GARCIA | e    |   |
| 4 | 122695 | A | 3  | 0 | PCT-<br>PATENTE<br>DE<br>INVENCIÓN<br>CAPÍTULOS<br>I Y II | FASE<br>NACIONAL<br>INCLUIDO<br>CAPÍTULO<br>II | TRASLADO<br>INFORME<br>BUSQUEDA                  | SA | 2009-<br>05-21<br>14:44:28 | CARLOS<br>REINALDO<br>OLARTE GARCIA | e    | ≡ |
| 4 | 122695 | A | 4  | 0 | PCT-<br>PATENTE<br>DE<br>INVENCIÓN<br>CAPÍTULOS<br>I Y II | FASE<br>NACIONAL<br>INCLUIDO<br>CAPÍTULO<br>II | TRASLADO<br>INFORME<br>BUSQUEDA                  | SA | 2009-<br>05-21<br>14:45:21 | CARLOS<br>REINALDO<br>OLARTE GARCIA | e    | ≡ |
| 4 | 122695 | A | 5  | 0 | PCT-<br>PATENTE<br>DE<br>INVENCIÓN<br>CAPÍTULOS<br>I Y II | FASE<br>NACIONAL<br>INCLUIDO<br>CAPÍTULO<br>II | REPUESTA A<br>REQUERIMIENTO<br>DE<br>INFORMACION | EN | 2009-<br>08-21<br>16:29:05 | CARLOS<br>REINALDO<br>OLARTE GARCIA | e    |   |
| 4 | 122695 | A | 6  | 0 | PCT-<br>PATENTE<br>DE<br>INVENCIÓN<br>CAPÍTULOS           | FASE<br>NACIONAL<br>INCLUIDO<br>CAPÍTULO<br>II | REPUESTA A<br>REQUERIMIENTO<br>DE<br>INFORMACION | EN | 2009-<br>08-21<br>16:29:48 | CARLOS<br>REINALDO<br>OLARTE GARCIA | e    |   |



445

**Industria y Comercio**  
SUPERINTENDENCIA

**REPÚBLICA DE COLOMBIA**  
**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

**RESOLUCIÓN N° 14578**

Por la cual se niega una patente de invención

Rad. N° PCT/04-122695 A

**EL SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

en ejercicio de sus facultades legales, en especial de las que se confirieron en el artículo 3, numeral 32 del decreto 3523 de 2009, y

**CONSIDERANDO**

**PRIMERO:** Que mediante escrito radicado en esta Superintendencia el 7 de diciembre de 2004, bajo el número 04 – 122965, se presentó la solicitud de patente de invención titulada: "PROFARMACOS DE AMINOACIDOS EXCITADORES".

**SEGUNDO:** Que efectuado el examen de forma en cuanto a los requisitos que debe llenar la solicitud, y cumplidas las exigencias legales, se ordenó publicar el extracto sin que se hubieran presentado oposiciones por parte de terceros.

**TERCERO:** Que mediante escrito radicado el 15 de febrero de 2008, el solicitante allegó la presente solicitud divisional, la cual se deriva de la inicial 04 – 122695 y, por ende, se beneficia de la fecha de presentación citada en el considerando primero de esta resolución. Esta divisional se identifica con el No. 04 – 122695 A y se titula: "PROFARMACOS DE AMINOACIDOS EXCITADORES".

**CUARTO:** Que realizado el examen de patentabilidad de la presente divisional se encontró que la invención no cumple con los requisitos establecidos. En consecuencia, con fundamento en lo dispuesto en el artículo 45 de la Decisión 486, se requirió al peticionario en dos oportunidades para que se pronunciara sobre las objeciones efectuadas a la solicitud. Así mismo, se requirió al solicitante información con base en el artículo 46 de la Decisión señalada.

**QUINTO:** Que el solicitante mediante escritos radicados el 4 de marzo de 2009 y el 21 de agosto del mismo año, atendió oportunamente a los requerimientos formulados y presentó aclaraciones. Con la respuesta del 4 de marzo allegó nuevo capítulo reivindicatorio, el cual se ajusta a las prescripciones establecidas en el artículo 34 de la mencionada Decisión 486. Mediante escrito radicado el 21 de agosto de 2009, dio respuesta oportuna al requerimiento de información realizado con base en el artículo 46 de la Decisión 486.

**SEXTO:** Que según lo dispuesto en el artículo 14 de la Decisión 486 expedida por la Comisión de la Comunidad Andina se otorgarán patentes "para las invenciones, sean de producto o de procedimiento, en todos los campos de la tecnología, siempre que sean nuevas, tengan nivel inventivo y sean susceptibles de aplicación industrial".

14578

REPÚBLICA DE COLOMBIA  
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCIÓN N° 14578

Por la cual se niega una patente de invención

Rad. N° PCT/04-122695 A

**SEPTIMO:** Que las reivindicaciones 1 a 13, contenidas en los folios 401 a 405, no cumplen con el requisito de nivel inventivo de acuerdo con las siguientes consideraciones:

1. Objeto de la invención

El objeto de la solicitud se refiere a profármacos de aminoácidos sintéticos para el tratamiento de trastornos neurológicos y trastornos psiquiátricos

El problema planteado en esta solicitud es la necesidad de compuestos útiles para trastornos neurológicos y psiquiátricos que mejoren la potencia in vivo del compuesto precursor respectivo y produzcan mayor exposición oral del precursor con mayor biodisponibilidad oral.

2. Determinación del estado de la técnica

2.1. Fecha determinante para el análisis comparativo

La fecha para determinar el estado de la técnica es el 11 de junio de 2002, que corresponde a la fecha de las prioridades invocadas respecto de las solicitudes EP Nos. 02380120.2 y 02380121.0. Adicionalmente, se reivindicó prioridad de las solicitudes US Nos. 60/415,936 y 60/415,937 del 3 de octubre de 2002.

Las prioridades fueron tenidas en cuenta para el examen de patentabilidad, según obra en los folios 436 y 437 del expediente en estudio.

2.2. Documentos del estado de la técnica

Consultadas las bases de datos y los archivos con que se cuenta, se encontró el siguiente documento anterior a las fechas de las prioridades reivindicadas y relacionados con la materia reclamada:

| No. | Documento | Título                            | Fecha de publicación |
|-----|-----------|-----------------------------------|----------------------|
| D1  | US5688826 | EXCITATORY AMINO ACID DERIVATIVES | 1997-11-18           |

3. Nivel inventivo

Según lo dispuesto en el artículo 18 de la Decisión 486, "Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni

447

**REPÚBLICA DE COLOMBIA**  
**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

**RESOLUCIÓN N°**

Por la cual se niega una patente de invención

Rad. N° PCT/04-122695 A

se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica".

El estado de la técnica, al tenor de lo dispuesto en el artículo 16 de la misma Decisión, comprende "todo lo que haya sido accesible al público, por una descripción escrita u oral, utilización, comercialización o cualquier otro medio antes de la fecha de presentación de la solicitud de patente o, en su caso, de la prioridad reconocida".

Al respecto, el Tribunal de Justicia de la Comunidad Andina ha dicho:

"Como requisito adicional al de la novedad, se exige que la invención tenga nivel inventivo, esto es, que implique un salto cualitativo en relación con la técnica existente. Este requerimiento es desarrollado por el artículo 4 de la Decisión 344 (hoy artículo 18 D. 486) que presupone el requisito de nivel inventivo al establecer que la invención goza de dicho nivel al no derivar de manera evidente del estado de la técnica, ni resultar obvia para una persona entendida o versada en la materia.

Este requisito ofrece al examinador la posibilidad de determinar si con los conocimientos técnicos que existían al momento de la invención, se hubiese podido llegar de manera evidente a la misma, o si el resultado hubiese sido obvio para un experto medio en la materia de que se trate, es decir, para una persona del oficio y normalmente versada en la materia técnica correspondiente.

(...)

En este orden de ideas, se puede concluir que una invención goza de nivel inventivo cuando a los ojos de un experto medio en el asunto de que se trate, se necesita algo más que la simple aplicación de los conocimientos técnicos en la materia para llegar a ella, es decir, que de conformidad con el estado de la técnica el invento no es consecuencia clara y directa de dicho estado.

Este Tribunal, al respecto, manifiesta que: "el inventor debe reunir los méritos que le permitan atribuirse una patente, sólo si la invención fruto de su investigación y desarrollo creativo constituye "un salto cualitativo en la elaboración de la regla técnica", actividad intelectual mínima que permitirá que su invención no sea evidente (no obvia) del estado de la técnica. Es decir, que con el requisito del nivel inventivo, lo que se pretende es dotar al examinador técnico de un elemento que le permita afirmar o no si a la invención objeto de estudio no se habría podido llegar a partir de los conocimientos técnicos que existían en ese momento dentro del estado de la técnica (...)" (Proceso 13-IP-2004)"<sup>1</sup>.

En el presente caso el objeto carece de nivel inventivo, porque a los ojos de un conocedor de nivel medio en la materia, se hubiese derivado de manera obvia a partir de su conocimiento y del estado de la técnica.

---

<sup>1</sup> Proceso 105-IP-2008

448

REPÚBLICA DE COLOMBIA  
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

RESOLUCIÓN N° 14578

Por la cual se niega una patente de invención

Rad. N° PCT/04-122695 A

En efecto, la solicitud reivindica un compuesto de fórmula general (I) o su sal y una formulación que comprende dicho compuesto más un vehículo, diluyente o excipiente.

Por su parte, D1 enseña (según tabla 1-A, folio 391, abstract) compuestos útiles como moduladores del receptor de glutamato metabotrópico.

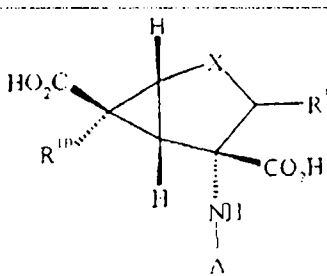
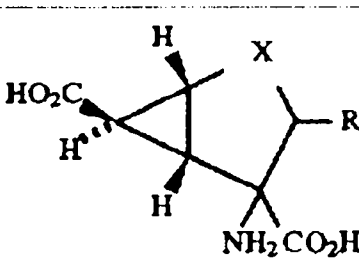
| SOLICITUD       |                                                                                                                                    | ANTERIORIDAD (D <sub>1</sub> ) |                                                                                     | Comparación                                        |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| (I)             |                                                  | (I)                            |  |                                                    |
| R <sub>10</sub> | H                                                                                                                                  |                                | H                                                                                   | IGUAL                                              |
| X               | SO <sub>2</sub>                                                                                                                    | X                              | SO <sub>2</sub>                                                                     | IGUAL                                              |
| A               | H-(Q) <sub>1-10</sub> -<br>Q se selecciona independientemente del grupo amino acilo derivado de un aminoácido natural o no natural |                                | H                                                                                   | DIFERENTE grupo amino acilo o aminoácido adicional |
| R <sub>11</sub> | H                                                                                                                                  | R                              | H                                                                                   | IGUAL                                              |

TABLA 1-A

La única diferencia de la solicitud con la anterioridad D1, es que esta solicitud **agrega un aminoácido** como sustituyente adicional en "A", sin embargo esta diferencia no concede ningún efecto inesperado.

El efecto técnico logrado por esta diferencia es una mayor solubilidad y biodisponibilidad de los compuestos aminoácidos excitadores por ser convertido en profármaco de mismo.

El problema técnico objetivo fundamental de la invención reivindicada, consiste en: "cómo aumentar la solubilidad y biodisponibilidad de los compuestos aminoácidos excitadores".

449

**REPÚBLICA DE COLOMBIA**  
**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

**RESOLUCIÓN N° 14578**

Por la cual se niega una patente de invención

Rad. N° PCT/04-122695 A

Por consiguiente, resultaría obvio el diseño de este tipo de compuestos y formulaciones para una persona normalmente versada en la materia que conozca el estado de la técnica, ya que es bien conocido en el área que el hecho de convertir un compuesto a su profármaco le aumentará la biodisponibilidad al mismo, ya que actuará directamente in vivo sin necesidad de sufrir transformaciones, además era conocido que pegar aminoácidos era una práctica normal para incrementar la solubilidad (folio 421 segundo artículo 45).

Así las cosas, el objeto de la solicitud no presenta nivel inventivo, razón por la cual no cumple con lo dispuesto en el artículo 18 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

**4. Sobre la respuesta del solicitante**

Argumenta el solicitante, que el objeto de la invención constituye justamente el desarrollo de profármacos para los compuestos divulgados en la anterioridad D1. Agrega, que en dicho documento se revelan únicamente compuestos en los que la posición 4 del núcleo biciclo [3.1.0] hexano no está sustituido, así que no hay motivación para incluir un derivado de aminoácido en dicha posición.

Al respecto, cabe aclarar al solicitante que un técnico en la materia de nivel medio sabe a priori de las ventajas que se le confieren a un compuesto por el simple hecho de convertirlo en su respectivo profármaco, por lo tanto, tal motivación sería suficiente para que una persona normalmente versada en la materia desee, mediante la inclusión de un aminoácido, llegar a convertir un compuesto en su profármaco. Más aun cuando en el estado de la técnica ya era conocido que se incrementa la solubilidad en agua y la biodisponibilidad pegando aminoácidos a los principios activos pues se convierten en sus profármacos.

El solicitante no esgrime argumentos acerca del documento solicitado como prueba para corroborar que en el estado de la técnica ya era conocido que se incrementa la solubilidad en agua y la biodisponibilidad pegando aminoácidos a los principios activos, más sin embargo procede a adjuntarlo "QUINOLONE ANTIBACTERIAL AGENTS. SYNTHESIS AND STRUCTURE- ACTIVITY RELATIONSHIPS OF A SERIES OF AMINO ACID PRODRUGS OF RACEMIC AND CHIRAL 7-(3-AMINO - 1- PYRROLIDINYLQUINOLONES, HIGHLY SOLUBLE QUINOLONE PRODRUGS WITH IN VIVO PSEUDOMONAS ACTIVITY".

Al respecto, de este documento se había dicho que corroboraba que el profármaco alanil de la quinolona resultaba ser más activo que el compuesto original,

450

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

**REPÚBLICA DE COLOMBIA  
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO****RESOLUCIÓN N° 14578**

Por la cual se niega una patente de invención

Rad. N° PCT/04-122695 A

solamente por pegar aminoácidos, lo cual resultaba ser normal en la práctica para incrementar la solubilidad en agua y la biodisponibilidad del medicamento de origen, ya que muestra un incremento de 400 veces la solubilidad del compuesto activo el cual es rápidamente distribuido in vivo haciéndolo además más activo. Todo esto corrobora que incluir un grupo aminoácido en el núcleo farmacofórico como sucede en la presente solicitud para los compuestos divulgados, ya había sido enseñado en el estado de la técnica, lo cual conduce a una persona medianamente versada en la materia a lo reivindicado.

Finalmente, el solicitante señala que a la materia objeto de la presente invención le ha sido concedido el privilegio de patente en Nueva Zelanda. Agrega, que "Si bien es cierto que las concesiones de patentes en otras oficinas de otros países no son vinculantes en el sentido que obliguen a la SIC a tomar una decisión en el mismo sentido, considero que dichas concesiones sugieren el cumplimiento de los requisitos de patentabilidad de la materia reivindicada, ya que los criterios de evaluación y estudio aplicados para concluir la aceptación de dichas patentes resultan equivalentes a los que la SIC debe emplear".

Al respecto es necesario traer a colación el principio de territorialidad, así como el principio de autonomía que rige en materia de patentes, mediante los cuales los derechos de propiedad industrial se circunscriben al ámbito geográfico y normativo en el que se concedieron, siendo autónomo cada país de conceder un privilegio de patente de invención y su protección.

Así mismo, es pertinente recordar el principio de independencia en relación con el estudio de patentabilidad que realizan otras oficinas de patentes.

El principio de independencia significa que: "cada país miembro juzgara la validez de las patentes que otorgue conforme a sus reglas generalmente aplicables a tales patentes, sin alterar sus efectos en función de las reglas o estado jurídico que correspondan a la misma invención patentada en otros países de la Unión o fuera de esta"<sup>2</sup>.

Al respecto, señala el Tribunal de Justicia Andina:

"El sistema de otorgamiento de patentes que se adoptó en la Comunidad Andina se encuentra soportado en la actividad autónoma e independiente de las Oficinas Competentes en cada País Miembro. Dicha actividad, que aunque de manera general se encuentra regulada por la normativa comunitaria, deja a salvo la mencionada independencia y es así... como regula el procedimiento para la obtención de una patente e instaura en cabeza de las Oficinas Nacionales Competentes el trámite del procedimiento y del respectivo examen

<sup>2</sup> Proceso 51 IP 2008, refiriéndose a convenio de paris, el Dr. Guillermo Cabanellas.

**REPÚBLICA DE COLOMBIA**  
**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

**RESOLUCIÓN N° 14578**

Por la cual se niega una patente de invención

Rad. N° PCT/04-122695 A

de patentabilidad.

Que se haya obtenido una patente de invención en un País Miembro no significa que indefectiblemente se deba conceder dicha patente de invención en Otro País Miembro, así como si se ha negado la solicitud de patente de invención en un País Miembro se deba negar igualmente en otro.

Lo mismo ocurre en relación con patentes obtenidas en países no miembros de la Comunidad Andina".

Continúa señalando el Tribunal:

"No se está afirmando que la oficina de patentes no tenga límites a su actuación y que no puede utilizar como precedentes sus propias actuaciones. Lo que está diciendo es que la oficina de patentes tiene la obligación en cada caso de hacer un análisis de patentabilidad de conformidad con la normativa vigente y teniendo en cuenta los aspectos y pruebas que obran en cada trámite. Además, los límites a la actuación administrativa de dichas oficinas se encuentran dados por la propia norma comunitaria y las acciones judiciales para defender la legalidad de los actos administrativos proferidos"<sup>3</sup>.

Así las cosas, cada oficina de patentes es autónoma de realizar los análisis correspondientes, y según los resultados, tomar una decisión, siempre y cuando se cumplan con las disposiciones normativas que regulan la materia, razón por la cual la concesión de un derecho de patente de invención en un país no determina el otorgamiento automático en otro país, ni sugiere el cumplimiento de los requisitos de patentabilidad de la materia reivindicada.

Por lo expuesto, se concluye que no obstante los comentarios formulados por el solicitante, la solicitud no cumple lo dispuesto en el artículo 18 de la Decisión 486.

**RESUELVE**

**ARTICULO PRIMERO:** Negar el privilegio de patente de invención a la creación denominada: "PROFARMACOS DE AMINOACIDOS EXCITADORES".

**ARTICULO SEGUNDO:** Notificar personalmente al doctor Carlos R. Olarte, en su calidad de apoderado de la sociedad ELI-LILLY AND COMPANY, o a quien haga sus veces, el contenido de la presente resolución, entregándole copia de la misma, advirtiéndole que contra ella procede el recurso de reposición ante el

<sup>3</sup> Proceso 51 IP 2008

**REPÚBLICA DE COLOMBIA**  
**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

**RESOLUCIÓN N° 14210**

Por la cual se niega una patente de invención

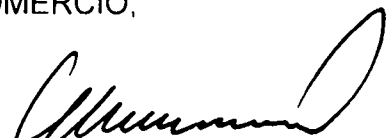
Rad. N° PCT/04-122695 A

Superintendente de Industria y Comercio al momento de notificarse o dentro de los 5 días hábiles siguientes.

**NOTIFIQUESE Y CUMPLASE**

Dada en Bogotá D.C., a los 16 MAR. 2010

EL SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO,

  
**GUSTAVO VALBUENA QUIÑONES**

Doctor  
**CARLOS R. OLARTE**  
Diagonal 34 No. 5 - 28  
Bogotá D.C.

202067  
