

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-506298

(P2005-506298A)

(43) 公表日 平成17年3月3日(2005.3.3)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>**A61K 45/00****A61K 31/505****A61K 31/513****A61K 45/06****A61P 35/00**

F 1

A 61 K 45/00

A 61 K 31/505

A 61 K 31/513

A 61 K 45/06

A 61 P 35/00

テーマコード(参考)

4 C 084

4 C 086

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 75 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-576907(P2002-576907)	(71) 出願人	391015708 ブリストルマイヤーズ スクイブ カンパニー
(86) (22) 出願日	平成14年3月28日(2002.3.28)	B R I S T O L - M Y E R S S Q U I B B COMPANY	アメリカ合衆国 ニューヨーク州 101 54 ニューヨーク パーク アベニュー 345
(85) 翻訳文提出日	平成15年9月29日(2003.9.29)	(74) 代理人	100068526 弁理士 田村 恒生
(86) 國際出願番号	PCT/US2002/009817	(74) 代理人	100126778 弁理士 品川 永敏
(87) 國際公開番号	W02002/078639		
(87) 國際公開日	平成14年10月10日(2002.10.10)		
(31) 優先権主張番号	60/279,956		
(32) 優先日	平成13年3月29日(2001.3.29)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	60/280,366		
(32) 優先日	平成13年3月30日(2001.3.30)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】Eg5阻害剤を用いる増殖性疾患の治療方法

## (57) 【要約】

本願発明は Eg5タンパク質活性を調節することによる症状の治療方法であって、そのような治療を必要とする哺乳類に対して、少なくともひとつの低分子化合物の Eg5タンパク質阻害剤の有効量を投与することよりなる方法を提供する。本願発明は、また、Eg5タンパク質活性を調節することによる症状の治療方法であって、そのような治療を必要とする哺乳類に対して、少なくともひとつの低分子化合物の Eg5タンパク質阻害剤の有効量を、少なくともひとつの他の抗がん剤と併用して投与することよりなる方法を提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

哺乳類に対し、少なくともひとつの低分子化合物の E g 5 タンパク質阻害剤の有効量を投与することによりなる、E g 5 タンパク質活性を調節することによる病気の治療方法。

## 【請求項 2】

該低分子化合物が有糸分裂停止およびアポトーシスを誘起する、請求項 1 の方法。

## 【請求項 3】

該低分子化合物が細胞増殖試験において約 $10\mu M$ 以下の I C<sub>50</sub> 値を有する、請求項 1 の方法。

## 【請求項 4】

該低分子化合物と併用して、少なくともひとつの他の抗ガン剤を当該哺乳類に投与することによりなる、請求項 1 の方法。

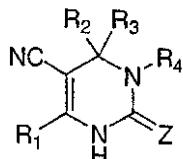
## 【請求項 5】

その病気がガンである、請求項 1 の方法。

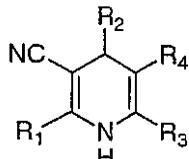
## 【請求項 6】

該低分子化合物が式 I 又は II A

## 【化 1】



I



II A

(式中、R<sup>1</sup> は水素、アルキルおよびシクロアルキルよりなる群から選択され；R<sup>2</sup> と R<sup>3</sup> はそれぞれ独立して H、アルキル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクロアルキルアルキルおよびヘテロアリールアルキルよりなる群から選択され；又は R<sup>2</sup> と R<sup>3</sup> は一緒になって炭素環若しくはヘテロ環を形成してもよく；

R<sup>4</sup> はアルキル、アリールアルキル、ヘテロシクロアルキル、アミノアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロアリールアルキル、ヘテロシクロアルキルアルキル、C N、C O R<sup>5</sup>、C O<sub>2</sub> R<sup>5</sup> およびC O N R<sup>5</sup> R<sup>6</sup> よりなる群から選択され；

R<sup>5</sup> と R<sup>6</sup> はそれぞれ独立して H、アルキル、アリールアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロアリールアルキルおよびヘテロシクロアルキルアルキルよりなる群から選択され；Z は O、S およびN R<sup>8</sup> よりなる群から選択され；

R<sup>8</sup> は H、C N、スルホンアミド、O R<sup>7</sup>、アルキル、シクロアルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテロシクリル、ヘテロアリールおよびヘテロアリールアルキルよりなる群から選択され；R<sup>7</sup> は H、アルキル、アリールアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクロアルキルアルキルおよびヘテロアリールアルキルよりなる群から選択される。)

の化合物又はそのエナンチオマー、ジアステレオマー、薬学的に許容される塩、プロドラッグ若しくは溶媒和物である請求項 1 の方法。

## 【請求項 7】

R<sup>4</sup> がアルキル、アリールアルキル、C O<sub>2</sub> R<sup>5</sup> およびC O N R<sup>5</sup> R<sup>6</sup> よりなる群から選択される、請求項 6 の方法。

## 【請求項 8】

R<sup>4</sup> がC O<sub>2</sub> R<sup>5</sup> であって Z が O である、請求項 6 の方法。

## 【請求項 9】

R<sup>4</sup> がC O N R<sup>5</sup> R<sup>6</sup> であって Z が O である、請求項 6 の方法。

10

20

30

40

50

**【請求項 10】**

$R^4$  がアルキルおよびアリールアルキルよりなる群から選択され、 $Z$  が  $O$  である、請求項 6 の方法。

**【請求項 11】**

$R^1$  がメチル、 $R^2$  がアリール、 $R^4$  が  $C O_2 R^5$  、 $R^5$  がアルキルで  $Z$  が  $O$  である、請求項 6 の方法。

**【請求項 12】**

$R^1$  がメチル、 $R^2$  がアリール、 $R^4$  が  $C O N R^5 R^6$  、 $R^5$  がアルキルで  $Z$  が  $O$  である、請求項 6 の方法。

**【発明の詳細な説明】**

10

**【技術分野】****【0001】****関連出願**

本願は、米国仮出願 No.60/279,956(2001年3月29日出願) および No.60/280,366(2001年3月30日出願)に対する米国特許法119条(e)に基づく利益を主張する。

**発明の分野**

本願発明はキネシン様 Eg5 モータータンパク質阻害剤を用いる、ガンのような増殖性疾患の治療方法、および抗悪性腫瘍薬と併用して Eg5 阻害剤を用いるガンの治療方法に関する。

**【背景技術】**

20

**【0002】**

生体における細胞集団の維持は、細胞分割およびプログラム化された細胞死の細胞プロセスにより支配されている。正常細胞においては、それぞれのプロセスの開始と完了に関する細胞現象は高度に制御を受けている。ガンのような増殖性疾患においては、それらのいずれか若しくは両方のプロセスが攪乱されている可能性がある。例えばガン細胞は、恐らくは突然変異により、正の制御因子による過剰発現若しくは負の制御因子による発現低下を通じて細胞分割サイクルが制御(チェックポイント制御)を失っているのかもしれない。

或いは、ガン細胞は負の制御因子の過剰発現によりプログラム化された細胞死を進行させる能力を失っているのかも知れない。ここに、ガン性細胞に対してプログラム化された細胞死およびチェックポイント制御を回復させるような新規な化学療法剤開発の必要性が存在する。

ヒトにおけるガン治療法のひとつのアプローチは細胞周期進行の必須タンパク質を標的とすることである。細胞周期がひとつの相から次の相へ進行するためにはある種の必須現象が完了しなければならない。細胞周期にはそれぞれの相と現象を正しい順に実行させるためのチェックポイントが複数存在する。そのようなチェックポイントのひとつが有糸分裂の分裂中期に生じる紡錘体である。有糸分裂における必須機能を有するタンパク質を標的とする低分子化合物が紡錘体チェックポイントを惹起させて有糸分裂の細胞を停止させる可能性がある。有糸分裂の細胞を停止させる低分子化合物の中で、臨床で抗腫瘍活性を示すものがアポトーシス、即ち、プログラム化された細胞死に関連する形態学的变化、をも誘導し得る。ガン治療における有効な化学療法とはプログラム化された細胞死とチェックポイント制御を誘導するものであるかも知れない。残念ながら、細胞内でこれらのプロセスを制御できる化合物はほとんど存在しない。有糸分裂の停止とアポトーシスを誘導できる化合物の多くはチューブリン結合剤である。これらは、微小管の動的不安定性を変化させ、間接的に紡錘体の機能 / 構造を変化させて有糸分裂の停止を引き起こす。これら化合物の多くはすべての微小管を構成するチューブリンタンパク質を特異的に標的とするから、微小管が関与する多数の正常細胞プロセスの多くに影響を与える可能性がある。従って、増殖細胞関連タンパク質をより特異的に標的化する低分子化合物の必要性が存在する。

**【0003】**

Eg5 は、紡錘体に局在する数種のキネシン様モータータンパク質のひとつであり、双極

40

30

50

性紡錘体の形成および／又は機能に必要であることが知られている。最近、紡錘体の双極性を妨害する低分子化合物の報告がなされた（非特許文献1参照）。より詳細には、その低分子化合物は異常な紡錘体の形成を誘起したが、そこでは中央にある一対の中心小体より発する微小管の单一星状配列が、微小管末端に染色体が付着した状態で存在する。その低分子化合物は、单一星状配列に因んで「モナストロール」と呼ばれた。この单一星状配列の表現型は以前Eg5モータータンパク質が免疫的に枯渇した有糸分裂細胞で観察されたことがあった。この独特な单一星状配列の表現型のために、モナストロールのEg5阻害剤としての可能性が確認された。実際、モナストロールは更にin vitro試験で、Eg5による微小管の運動性を阻害することが示された。Eg5阻害剤モナストロールは、関連するキネシンモーター又は細胞内ゴルジ装置の運動を担うモーターに対しては明らかな効果を示さない。单一星状配列の表現型を示す細胞は、Eg5の免疫的枯渇又はEg5のモナストロールによる阻害を通じて細胞周期のM期で停止させる。しかしながら、Eg5の阻害又は免疫的枯渇によりもたらされる有糸分裂の停止は一過性である（非特許文献2参照）。单一星状配列の表現型も、モナストロールによりもたらされる有糸分裂における細胞周期の停止も可逆的である。細胞は回復して、正常な両極性紡錘体を形成し、有糸分裂を完了し細胞周期と正常な細胞増殖を進行させる。これらのデータから、一過性に有糸分裂を停止させるEg5低分子化合物阻害剤はガン細胞増殖に対して有効でないことが示唆される。にもかかわらず、モナストロールによる有糸分裂停止の発見は興味があり、更に研究を進めてヒトのガン治療に有効な方法でEg5モータータンパク質を調節するのに用い得る化合物を同定する必要がある。また、これら化合物を他の抗腫瘍剤と組み合わせて使用する用途を探索する必要もある。

#### 【0004】

最近の別の報告によれば、レチノイン酸が細胞周期に影響を与えEg5遺伝子発現を調節することによりG2/M期の進行を遅らせることが提唱されている（非特許文献3参照）。Eg5タンパク質の免疫的枯渇又はモナストロールによる有糸分裂停止と同じく、レチノイン酸による有糸分裂停止も一過性である。

従って、Eg5阻害剤を用いて、ガンのような増殖性疾患を治療する方法を提供することが本発明の目的である。加えて、Eg5阻害剤と他の抗腫瘍剤とを併用してガンを治療する方法を提供することが本発明の目的である。本発明のこれらの目的その他の目的は以下の記述から明らかとなるであろう。

#### 要約

本発明は、哺乳類に対して、少なくともひとつの低分子化合物のEg5タンパク質阻害剤の有効量を投与することによる、Eg5タンパク質活性を調節することによる病気の治疗方法を提供する。本発明はまた、哺乳類に対して、少なくともひとつの低分子化合物Eg5阻害剤および少なくともひとつの他の抗ガン剤を併用してその有効量を投与することによる治疗方法を提供する。

#### 【非特許文献1】

Mayer, T. U. et. al. 1999. Science 286 (5441) 971-4

#### 【非特許文献2】

Kapoor, T. M., 2000. J Cell Biol 150 (5) 975-80

#### 【非特許文献3】

Kaiser, A., et. al., 1999. J Biol Chem 274 (27), 18925-31

#### 【発明の開示】

#### 【0005】

以下に掲げるのは本発明の方法に用いられる化合物を記述するため使用される種々の述語の定義である。これらの定義は本願明細書において独立して又はより大きなグループの一部として用いられるいずれの場合にも適用される（特別な例において他に限定されない限り）。

「アルキル」の語は、特に他の定義がない限り、単独で又は別のグループの一部として、炭素数1から12の一価のアルカン（炭化水素）由来のラジカルをいう。アルキル基は直

鎖、分枝鎖又は環状の飽和炭化水素グループで置換されていてもよい。置換される場合、アルキル基は最大4つの置換基を有することができ、Rとして定義されるが、いずれの位置で置換されていてもよい。アルキル基で置換されたアルキル基という場合は「分枝状アルキル基」と同義的に用いられる。典型的な非置換アルキル基としては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、n-ブチル、tert-ブチル、イソブチル、ペンチル、ヘキシル、イソヘキシル、ヘプチル、4,4-ジメチルペンチル、オクチル、2,2,4-トリメチルペンチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル等が例示できる。典型的な置換基としては以下の例が挙げられるがこれらに限定されるものではない；ハロ(F、Cl、Br、I等)、ハロアルキル(CCl<sub>3</sub>、CF<sub>3</sub>)、アルコキシ、アルキルチオ、ヒドロキシ、カルボキシ(-COOH)、アルキルオキシカルボニル(-C(O)R)、アルキルカルボニルオキシ(-OCOR)、アミノ(-NH<sub>2</sub>)、カルバモイル(-NHC(=O)R)又は-OCONHR)、ウレア(-NHCONHR)、チオール(-SH)。定義されるアルキル基はひとつ若しくはそれ以上の炭素炭素二重結合又はひとつ若しくはそれ以上の炭素炭素三重結合を含んでいてもよい。

10

## 【0006】

「アルケニル」の語は、単独で又は別のグループの一部として、直鎖、分枝鎖又は環状の炭素数2から12の炭化水素ラジカルであって、少なくともひとつの炭素炭素二重結合を含むものをいう。

20

「アルキニル」の語は、単独で又は別のグループの一部として、直鎖、分枝鎖又は環状の炭素数2から12の炭化水素ラジカルであって、少なくともひとつの炭素炭素三重結合を含むものをいう。

原稿中、Cの後ろの数字は特別の基が包含できる炭素数を定義する。例えば「C<sub>1</sub>-6アルキル」は炭素数1から6の直鎖又は分枝鎖状の飽和炭素を示す；例えば、メチル、エチル、n-プロピル、イソプロピル、n-ブチル、sec-ブチル、イソブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、sec-ペンチル、イソペンチル、n-ヘキシルを含む。文脈により「C<sub>1</sub>-6アルキル」は二つの原子団を架橋するC<sub>1</sub>-6アルキレンをも示すことができる；例えば、プロパン-1,3-ジイル、ブタン-1,4-ジイル、2-メチルブタン-1,4-ジイル等が含まれる。

30

「C<sub>2</sub>-6アルケニル」は、少なくともひとつの炭素炭素二重結合を含み、炭素数2から6の直鎖又は分枝鎖状の炭素鎖を示す；例えば、エテニル、プロペニル、イソプロペニル、ブテニル、イソブテニル、ペンテニル、ヘキセニルを含む。文脈により、「C<sub>2</sub>-6アルケニル」は二つの原子団を橋渡しするC<sub>2</sub>-6アルケンジイルをも示すことができる；例えば、エチレン-1,2-ジイル(ビニレン)、2-メチル-2-ブテン-1,4-ジイル、2-ヘキセン-1,6-ジイル等が含まれる。「C<sub>2</sub>-6アルキニル」は少なくともひとつの炭素炭素三重結合を含み、炭素数2から6の直鎖又は分枝鎖状の炭素鎖を示す；例えば、エチニル、プロピニル、ブチニル、ヘキシニル等が含まれる。

40

「シクロアルキル」の語は、単独で又は別のグループの一部として炭素間の共鳴又は交互性二重結合を有しない、炭素数3から15のアルキルの種である。1ないし4の環上構造を有していてもよい。非置換体の例としてはシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、アダマンチル等が含まれる。置換基の例としては、以下のグループのひとつ又はそれ以上のものが含まれる；ハロゲン、アルキル、アルコキシ、アルキルヒドロキシ、アミノ、ニトロ、シアノ、チオールおよび/又はアルキルチオ。

「アルコキシ」又は「アルキルチオ」の語は、単独で又は別のグループの一部として、既述のアルキル基がそれぞれ酸素原子(-O-)又は硫黄原子(-S-)を介して結合したものを表示する。

## 【0007】

「アルキルオキシカルボニル」の語は、単独で又は別のグループの一部として、カルボニル基を介して結合したアルコキシ基を表示する。アルキルオキシカルボニル・ラジカルは式：-C(O)ORで表され、Rは直鎖又は分枝鎖状のC<sub>1</sub>-6アルキル基を意味する。

50

「アルキルカルボニル」の語は、単独で又は別のグループの一部として、カルボニル基を

介して結合したアルキル基をいう。

「アルキルカルボニルオキシ」の語は、単独で又は別のグループの一部として、酸素原子を介して結合したアルキルカルボニル基をいう。

「アリールアルキル」の語は、単独で又は別のグループの一部として、既述のアルキル基に結合した芳香族環をいう。

「アリール」の語は、単独で又は別のグループの一部として、単環性または二環性芳香環を示し、例えばフェニル、置換フェニル等および縮合したナフチル環、フェナントレニル環等を示す。従って、アリール基とは、少なくともひとつの6原子よりなる環を有し、最大22原子よりなる五環性の基を含み、隣接する炭素原子又は適切なヘテロ原子との間に共鳴二重結合が存在する。アリール基はひとつ又はそれ以上の置換基を有していてもよく、限定はされないが、例えばハロゲン、アルキル、アルコキシ、ヒドロキシ、カルボキシ、カルバモイル、アルキルオキシカルボニル、ニトロ、トリフルオロメチル、アミノ、シクロアルキル、シアノ、アルキルS(0)m(m=0、1、2)又はチオールで置換されていてもよい。  
10

#### 【0008】

「炭素環」の語は、単独で又は別のグループの一部として、安定な飽和又は一部不飽和の、炭素数3から7の單一環状炭化水素をいい、例えばシクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシリ、シクロヘプチル等がある。炭素環は置換されていてもよく、即ち、置換可能な位置のひとつ又はそれ以上が下記のものから独立して選択されるひとつ又はそれ以上の置換基で置換されていてもよい；アルキル(好ましくは低級アルキル)、アルコキシ(好ましくは低級アルコキシ)、ニトロ、モノアルキルアミノ(好ましくは低級アルキルアミノ)、ジアルキルアミノ(好ましくはジ[低級]アルキルアミノ)、シアノ、ハロ、ハロアルキル(好ましくはトリフルオロメチル)、アルカノイル、アミノカルボニル、モノアルキルアミノカルボニル、ジアルキルアミノカルボニル、アルキルアミド(好ましくは低級アルキルアミド)、アルコキシアルキル(好ましくは低級アルコキシ[低級]アルキル)、アルコキシカルボニル(好ましくは低級アルコキシカルボニル)、アルキルカルボニルオキシ(好ましくは低級アルキルカルボニルオキシ)およびアリール(好ましくはフェニル)で、当該アリールは、ハロ、低級アルキル又は低級アルコキシで置換されていてもよい。  
20

「シクロアルキル」の語は、単独で又は別のグループの一部として、炭素数3から9、好ましくは3から7の飽和若しくは一部不飽和の炭化水素を示す。更に、シクロアルキルは置換されていてもよい。置換シクロアルキルとは、1、2又は3個、好ましくは1個の置換基を有する環であり、ハロ、アルキル、置換アルキル、アルケニル、アルキニル、ニトロ、シアノ、オキソ(=O)、ヒドロキシ、アルコキシ、チオアルキル、-CO<sub>2</sub>H、-OC(=O)H、CO<sub>2</sub>-アルキル、-C(=O)アルキル、ケト、=N-OH、=N-O-アルキル、アリール、ヘテロアリール、ヘテロシクロ、五員環又は六員環ケタール(例えば、1,3-ジオキソラン又は1,3-ジオキサン)、-NR-R、-C(=O)NR-R、-CO<sub>2</sub>NR-R、-NR-CO<sub>2</sub>R、-NR-C(=O)R-SO<sub>2</sub>NR-R、-NR-SO<sub>2</sub>Rよりなる群から選択される置換基を有していてもよい。ここで、RおよびR'は独立して水素、アルキル、置換アルキル、シクロアルキルより選択され、一緒になってヘテロシクロ環又はヘテロアリール環を形成してもよい。  
30  
40

#### 【0009】

「ヘテロアリール」の語は、単独で又は別のグループの一部として、置換又は非置換の芳香族单環五員環若しくは六員環、原子の数9又は10の二環性基又は原子の数11から14の三環性基を示し、ここでは少なくともひとつの環に少なくともひとつのヘテロ原子が存在する。それぞれの環のヘテロ原子総数が4以下で少なくともひとつの炭素原子を含むとすれば、ヘテロ原子を含む各ヘテロアリール環は1個又は2個の酸素原子若しくは硫黄原子および/又は1から4の窒素原子を含み得る。二環性基又は三環性基を形成する縮合環は炭素原子のみを有していてもよく、飽和、一部飽和又は不飽和であってもよい。窒素原子又は硫黄原子は、酸化されていてもよく、窒素原子は四級化されていてもよい。二環

性又は三環性のヘテロアリール基は少なくともひとつの完全な芳香環を含まなければならぬが、他の縮合環は芳香族であっても非芳香族であってもよい。ヘテロアリール環はいずれの環においても置換可能な窒素原子又は炭素原子上で置換することができる。ヘテロアリール環は、ハロ、アルキル、置換アルキル、アルケニル、アルキニル、ニトロ、シアノ、ヒドロキシ、アルコキシ、チオアルキル、 $-CO_2H$ 、 $-C(=O)H$ 、 $CO_2-$ アルキル、 $-OC(=O)Alk$ 、フェニル、ベンジル、フェニルエチル、フェニルオキシ、フェニルチオ、シクロアルキル、置換シクロアルキル、ヘテロシクロ、ヘテロアリール、 $-NR-R'$ 、 $-C(=O)NR-R'$ 、 $-CO_2NR-R'$ 、 $-NR-CO_2R$ 、 $-NR-C(=O)R$ 、 $-SO_2NR-R'$ 、 $-NR-SO_2R$ よりなる群から選択されるゼロ、1、2又は3個の置換基を有してもよく、ここでR'およびRは独立して水素、アルキル、置換アルキル、シクロアルキルより選択され、共になってヘテロシクロ環又はヘテロアリール環を形成してもよい。

10

20

30

40

## 【0010】

典型的な単環性ヘテロアリール基としては、ピロリル、ピラゾリル、ピラゾリニル、イミダゾリル、オキサゾリル、イソキサゾリル、チアゾリル、チアジアゾリル、イソチアゾリル、フラニル、チエニル、オキサジアゾリル、ピリジル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、トリアジニル等を例示できる。

典型的な二環性ヘテロアリール基としては、インドリル、ベンゾチアゾリル、ベンゾジオキソリル、ベンゾキサゾリル、ベンゾチエニル、キノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、イソキノリニル、ベンズイミダゾリル、ベンゾピラニル、インドリジニル、ベンゾフラニル、クロモニル、クマリニル、ベンゾピラニル、シンノリニル、キノキサリニル、インダゾリル、ピロロピリジル、フロピリジニル、ジヒドロイソインドリル、テトラヒドロキノリニル、等を例示できる。

典型的な三環性ヘテロアリール基としては、カルバゾリル、ベンズインドリル、フェナントロニリル、アクリジニル、フェナントリジニル、キサンテニル等を例示できる。

「ヘテロシクロアルキル」の語は、単独で又は別のグループの一部として、環上の炭素原子のひとつがO、S又はNより選択されるヘテロ原子で置換され、残りの炭素原子中最大3個までが当該ヘテロ原子で置換されていてもよいシクロアルキル基（非芳香族）をいう。

30

## 【0011】

「ヘテロ環」の語は、単独で又は別のグループの一部として、安定で、飽和又は一部不飽和の単環系であって、環を構成する炭素原子および窒素、硫黄および/又は酸素より選択される他の原子の数が5から7であるものをいう。好ましくは、ヘテロシクリルは单環の5又は6員環であって窒素、硫黄および/又は酸素より選択されるヘテロ原子を1、2又は3個含むものがよい。ヘテロ環は置換されていてもよく、即ち、置換可能な位置のひとつ又はそれ以上が下記のものより独立して選択されるひとつ又はそれ以上の置換基で置換されていてもよい；アルキル（好ましくは低級アルキル）、アルコキシ（好ましくは低級アルコキシ）、ニトロ、モノアルキルアミノ（好ましくは低級アルキルアミノ）、ジアルキルアミノ（好ましくはジ[低級]アルキルアミノ）、シアノ、ハロ、ハロアルキル（好ましくはトリフルオロメチル）、アルカノイル、アミノカルボニル、モノアルキルアミノカルボニル、ジアルキルアミノカルボニル、アルキルアミド（好ましくは低級アルキルアミド）、アルコキシアルキル（好ましくは低級アルコキシ[低級]アルキル）、アルコキシカルボニル（好ましくは低級アルコキシカルボニル）、アルキルカルボニルオキシ（好ましくは低級アルキルカルボニルオキシ）およびアリール（好ましくはフェニル）で、当該アリールは、ハロ、低級アルキル又は低級アルコキシで置換されていてもよい。そのようなヘテロ環の例としては、イソキサゾリル、イミダゾリニル、チアゾリニル、イミダゾリジニル、ピロリル、ピロリニル、ピラニル、ピラジニル、ピベリジル、モルホリニル、トリアゾリル等が挙げられる。ヘテロ環は炭素原子を介して又は安定構造を与えるならいざれのヘテロ原子を介しても、親構造に置換することができる。

50

## 【0012】

「ヘテロシクリル」の語は、単独で又は別のグループの一部として、安定であって、飽和若しくは一部不飽和の、単環、架橋单環、二環性又はスピロ環系で、炭素原子および窒素、硫黄および/又は酸素より選択される他の原子よりなるものをいう。好ましくは、ヘテロシクリルとは単環5員環若しくは6員環又は二環性8-11員環であって、炭素原子および窒素、硫黄および/又は酸素より選択される1、2又は3個のヘテロ原子よりなるものをいう。ヘテロシクリルにおいて「置換基を有することがある」とは、置換可能な位置のひとつ又はそれ以上が、以下より独立して選択されるひとつ又はそれ以上の置換基で置換され得ることを示す；アルキル（好ましくは低級アルキル）、アルコキシ（好ましくは低級アルコキシ）、ニトロ、モノアルキルアミノ（好ましくは低級アルキルアミノ）、ジアルキルアミノ（好ましくはジ[低級]アルキルアミノ）、シアノ、ハロ、ハロアルキル（好ましくはトリフルオロメチル）、アルカノイル、アミノカルボニル、モノアルキルアミノカルボニル、ジアルキルアミノカルボニル、アルキルアミド（好ましくは低級アルキルアミド）、アルコキシアルキル（好ましくは低級アルコキシ[低級]アルキル）、アルコキシカルボニル（好ましくは低級アルキルカルボニルオキシ）およびアリール（好ましくはフェニル）で、当該アリールは、ハロ、低級アルキル又は低級アルコキシで置換されていてもよい。そのようなヘテロシクリルとしては、イソキサゾリル、イミダゾリニル、チアゾリニル、イミダゾリジニル、ピロリル、ピロリニル、ピラニル、ピラジニル、ピペリジル、モルホリニル、トリアゾリル等を例示できる。ヘテロシクリルは炭素原子を介して又は安定構造を与えるならいざれのヘテロ原子を介しても、親構造に置換することができる。

10

20

30

40

## 【0013】

「ヘテロ原子」の語は、独立して選択されたO、S又はNをいう。いずれのヘテロ原子も、その原子価が満たされない場合はそれが満たされるように水素原子が置換していると解すべきである。

「ハロゲン」又は「ハロ」の語は、独立して選択される塩素、臭素、フッ素又はヨウ素をいう。

「アミノ」の語は、単独で又は別のグループの一部として、-NH<sub>2</sub>をいう。「アミノ」は1又は2個の置換基を有することがあり、これらは同一又は異なっていてもよく、例えば、アルキル、アリール、アリールアルキル、アルケニル、アルキニル、ヘテロアリール、ヘテロアリールアルキル、シクロヘテロアルキル、シクロヘテロアルキルアルキル、シクロアルキル、シクロアルキルアルキル、ハロアルキル、ヒドロキシアルキル、アルコキシアルキル、チオアルキル、カルボニル、カルボキシ等が挙げられる。これら置換基は更にカルボン酸、ここで定義されたアルキル又はアリールのいざれによっても置換され得る。ある具体的態様では、アミノ基はカルボキシル又はカルボニルで置換されN-アシル体又はN-カルバモイル体を形成する。

官能基が「保護される」という場合は、保護された部位における好ましくない副反応を除くためその基が修飾されていることを意味する。本発明化合物における適切な保護基は、当業者の知識を考慮し標準的な教科書〔例えば、as Greene, T. W. et al., Protective Groups in Organic Synthesis, Wiley, N. Y. (1991)〕を参照して本出願から認識できるであろう。

ここで用いられているように、「放射線療法」の語句はX線又はガンマ線であって、外部光源から例えばビーム照射したり、小さな放射線活性源を埋め込む場合も含まれるがこれらに限定されるものではない。

ここで用いられているように、「抗悪性腫瘍剤」の語句はガン細胞の増殖を防ぐ化合物をいう。本発明における抗悪性腫瘍剤とは、一般的には、(1)細胞のDNA複製能力に干渉するか、(2)ガン性細胞にアポトーシスを誘導することにより、ガン細胞の増殖を防ぐ。

ここで用いられているように、「患者」の語はすべての哺乳類を包含する。

## 【0014】

本発明の方法で用いられる化合物の適切な無機塩又は有機塩としては、塩酸塩、臭化水素

50

酸塩、メタンスルホン酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、リン酸塩等を例示できる。薬学的用途に適さない塩であっても、例えば遊離化合物Iの精製や単離に利用できるもの、およびその薬学的に許容される塩もまた包含される。

本発明化合物のすべての立体異性体も、混合物として、又は純粋な若しくは実質的に純粋なものとして考慮される。特にラセミ体および特異的活性を呈する、単離された光学異性体が包含される。ラセミ体は物理的方法、例えば、分別結晶、ジアステレオマー誘導体の結晶化若しくは分離又はキラルなカラム・クロマトグラフィーによって分割することが可能である。個々の光学活性体は慣用的手法、例えば、光学活性な酸との塩形成と続く結晶化によりラセミ体から得ることができる。

本発明は式Iの化合物のプロドラッグを包含すると理解しなければならない。種々のプロドラッグが当業者に知られている。プロドラッグ誘導体の例としては、以下を参照できる：

(a) Design of Prodrugs, edited by H. Bundgaard (Elsevier, 1985); and Methods in Enzymology, Vol. 42, pp. 309-396, edited by K. Widder et al., (Academic Press, 1985);

(b) A Textbook of Drug Design and Development, edited by Krosgaard-Larsen and H. Bundgaard, Chapter 5, "Design and Application of Prodrugs," by H. Bundgaard, pp. 13-191 (1991) ;

(c) H. Bundgaard, Advanced Drug Deliver Reviews, 8, pp. 1-38 (1992);

(d) H. Bundgaard et al., Journal of Pharmaceutical Sciences, 77, 285 (1988); and

(e) N. Kayeka et al., Chem. Phar. Bull., 32, 692 (1984).

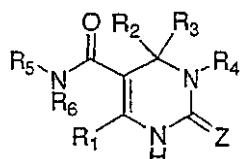
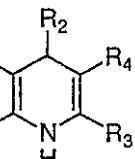
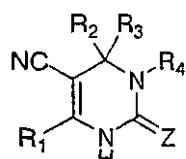
### 【0015】

本発明は、Eg5タンパク質活性を調節することによる症状の治療方法であって、そのような治療を必要とする哺乳類に対して、少なくともひとつの低分子化合物のEg5タンパク質阻害剤の有効量を投与することよりなる方法を提供する。本発明はまた、Eg5タンパク質活性を調節することによる症状の治療方法であって、そのような治療を必要とする哺乳類に対して少なくともひとつの低分子化合物Eg5阻害剤および少なくともひとつの他の抗ガン剤を併用して（同時に又は経時的に）その有効量を投与することよりなる方法を提供する。好ましい具体的態様は、治療対象がガンのような増殖性疾患である。抗悪性腫瘍剤として作用する化合物およびEg5タンパク質を調節して有糸分裂を停止させ、アポトーシスを誘起し得る化合物はいずれも本発明で使用できる。モナストロールはアポトーシスを誘起しないので本発明の範囲には含まれない。加えて、本発明は、HsEg5遺伝子配列からデザインされたアンチセンスのオリゴヌクレオチドを含まない。

低分子化合物Eg5モーターダンパク質阻害剤はどのような化合物でもよく、例えば2002年3月22日出願、代理人事件整理番号LD0300の米国特許出願で、発明の名称「シアノ置換ジヒドロピリジン化合物およびその疾病治療用途」（シリアル番号未定）に記載された化合物（参考のためその開示をここに組み込んだ）又はその薬学的に許容される塩が使用できる。これらは有糸分裂停止およびアポトーシス誘導によりガン治療に対する有効性又は可能性が示された。本発明の方法で使用される化合物で好ましいものとしては、下式I、IIIA又はIIIAの化合物、

### 【0016】

#### 【化1】



I

IIA

IIIA

10

20

30

40

50

そのエナンチオマー、ジアステレオマー、薬学的に許容される塩、プロドラッグ、溶媒和物が含まれる。ここで、R<sup>1</sup>は、水素、アルキル又はシクロアルキルであり；R<sup>2</sup>およびR<sup>3</sup>はそれぞれ独立してH、アルキル、アリール、ヘテロアリール、アリールアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクロアルキルアルキル又はヘテロアリールアルキルであり、又はR<sup>2</sup>とR<sup>3</sup>は共に炭素環若しくはヘテロ環を形成し；R<sup>4</sup>はアルキル、アリールアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロアリールアルキル、ヘテロシクロアルキルアルキル、CN、COR<sup>5</sup>、CO<sub>2</sub>R<sup>5</sup>又はCONR<sup>5</sup>R<sup>6</sup>であり；R<sup>5</sup>とR<sup>6</sup>はそれぞれ独立してH、アルキル、アリールアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロアリールアルキル又はヘテロシクロアルキルアルキルであり；ZはO、S又はNR<sup>8</sup>であり；R<sup>8</sup>はH、CN、スルホンアミド、OR<sup>7</sup>、アルキル、シクロアルキル、アリール、アリールアルキル、ヘテロシクリル、ヘテロアリール又はヘテロアリールアルキルであり；R<sup>7</sup>はH、アルキル、アリールアルキル、シクロアルキルアルキル、ヘテロシクロアルキルアルキル又はヘテロアリールアルキルである。より好ましい態様は、本発明の方法に使用される低分子化合物は式I又はIIA

10

20

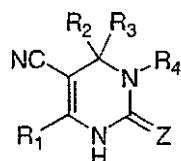
30

40

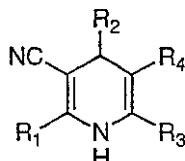
50

【0017】

【化2】



I



IIA

の化合物である。

本発明の好ましい態様のひとつは、式I又はIIAの化合物において、R<sup>1</sup>がアルキル、R<sup>2</sup>がアリールおよびヘテロアリールよりなる群から選択され、R<sup>3</sup>がH、R<sup>4</sup>がアルキル、アリールアルキル、CO<sub>2</sub>R<sup>5</sup>およびCONR<sup>5</sup>R<sup>6</sup>よりなる群から選択され、R<sup>5</sup>とR<sup>6</sup>はそれぞれ独立してH、アルキルおよびアリールアルキルよりなる群から選択され、ZはO、S又はNR<sup>8</sup>よりなる群から選択され、R<sup>8</sup>はHおよびCNよりなる群から選択される。

別の好ましい態様は、上記式I又はIIAの化合物よりなる発明であって、R<sup>4</sup>がアルキル、アリールアルキル、CO<sub>2</sub>R<sup>5</sup>およびCONR<sup>5</sup>R<sup>6</sup>よりなる群から選択されるものである。

更に別の好ましい態様は、上記式I又はIIAの化合物よりなる発明であって、R<sup>4</sup>がCO<sub>2</sub>R<sup>5</sup>又はCONR<sup>5</sup>R<sup>6</sup>であり、ZがOであるものである。

更に別の好ましい態様は、上記式I又はIIAの化合物よりなる発明であって、R<sup>4</sup>がアルキルおよびアリールアルキルよりなる群から選択され、ZがOであるものである。

更に別の好ましい態様は、上記式I又はIIAの化合物よりなる発明であって、R<sup>1</sup>がメチル、R<sup>2</sup>がアリール、R<sup>4</sup>がCO<sub>2</sub>R<sup>5</sup>であり、R<sup>5</sup>がアルキル、ZがOであるものである。

更に別の好ましい態様は、上記式I又はIIAの化合物よりなる発明であって、R<sup>1</sup>がメチル、R<sup>2</sup>がアリール、R<sup>4</sup>がCONR<sup>5</sup>R<sup>6</sup>であり、R<sup>5</sup>がアルキル、ZがOであるものである。

【0018】

併用療法（同時又は経時的）においては、Eg5タンパク質の低分子化合物阻害剤は既知の抗ガン治療、例えば放射線療法と共に使用できる。又、細胞分裂停止性若しくは細胞毒性の薬剤、例えば限定はされないが、シスプラチンやドキソルビシンのようなDNA作用薬、エトポシドのようなトポイソメラーゼII阻害薬、CPT-11やトポテシンのようなトポイソメラーゼI阻害薬、パクリタキセル、ドセタキセル、エポチロンのようなチューブリン作用薬、タモキシフェンやカソデックスのようなホルモン性薬剤、5-フルオロウ

ラシルのようなチミジル酸合成阻害薬、BMS-214662のようなファルネシルトランスフェラーゼ阻害薬、フラボピリドールのようなサイクリン依存性キナーゼ阻害剤、メトレキサートのような代謝拮抗剤等と併用できる。

更に、併用療法には、他の抗ガン剤と一定用量を製剤化した低分子化合物Eg5阻害剤も含まれる。一定用量を製剤化する場合、合剤として有効用量範囲内の本発明化合物と、認可された用量範囲内の他の薬剤とを用いる。合剤とするのが適切でない場合、本発明の方法に用いる化合物は既知の抗ガン剤又は細胞毒性薬剤と経時的に投与してもよい。本発明は連続投与に限定されるものではない；Eg5タンパク質の低分子化合物阻害剤は既知の抗ガン剤又は細胞毒性薬剤の投与前又は投与後に投与することができる。

併用療法の場合、Eg5タンパク質の低分子化合物阻害剤および抗腫瘍剤はそれらが単独投与される場合よりも少ない用量で本発明の治療効果を達成することができ、それ故に毒性による副作用を回避又は最小に押さえることが期待される。

#### 【0019】

発明の背景で述べたように、Eg5はキネシン様モータータンパク質であって細胞周期の有糸分裂における紡錘体両極化を助長する。より詳しくは、Eg5は有糸分裂において紡錘体の微小管を束ねて選別するために働く。従って、Eg5はサイクルのM期における紡錘体チェックポイントを通じて細胞周期制御に関与する。いずれの理論にも束縛されないことを希望するが、本発明の方法に使用される化合物はEg5阻害剤として作用するものである。本発明の方法に使用される化合物はまた、他のモータータンパク質、例えば限定はされないが、Xklp2、MKLP1、CH01、クロモキネシン、Nod、Cenp-E、MCAK、BimCファミリー、Kar3ファミリー等に対応するヒトモータータンパク質をも阻害することが考えられる。かくして本発明はまた、Xklp2、MKLP1、CH01、クロモキネシン、Nod、Cenp-E、MCAK、BimCファミリー、Kar3ファミリー等に対応するモータータンパク質を制御することにより、ガンのような増殖性疾患を含む病気を治療する方法を与える。その方法は、そのような治療を要する哺乳類に当該モータータンパク質の低分子化合物阻害剤を少なくともひとつ、その有効量を投与することからなり、他の抗ガン剤と併用してもよい。更に、本発明の方法に使用される化合物はまた、他のキネシン又はキネシン様タンパク質の阻害剤として作用することが想定されるので、他のキネシン又はキネシン様タンパク質に関連する疾患の治療にも有効である。従って、本発明はキネシン又はキネシン様タンパク質を制御することにより、ガンのような増殖性疾患を含む病気を治療する方法を与える。その方法は、そのような治療を要する哺乳類に当該キネシン又はキネシン様タンパク質の低分子化合物阻害剤を少なくともひとつ、その有効量を投与することからなり、他の抗ガン剤と併用してもよい。

#### 【0020】

本発明の方法で使用される化合物は、両極性紡錘体を崩壊させ、紡錘体チェックポイントを開始させ、有糸分裂を停止させ、プログラム化された細胞死を誘起してガン細胞の増殖を抑制する。レチノイン酸やモナストロールがそれぞれEg5の発現又は作用を制御することにより有糸分裂を一過性に停止させることに比べて、本発明の方法に使用される低分子化合物はEg5モータータンパク質の作用を阻害して細胞周期を停止させるが、それは一過性のものでなく、むしろプログラム化された細胞死を進行させる。更に本発明の方法に使用される化合物は効力が強くヒト細胞に対してin vitroで有糸分裂を停止させアポトーシスを誘起する。好ましい化合物の場合、約10μMと同濃度若しくはそれ以下でかかる効果を発現する。

レチノイン酸のような薬剤は細胞に対して多指向性的効果を発現するが、これに比して本発明の低分子化合物は多くの制御的遺伝子の発現に直接作用を及ぼさない。

微小管作用薬に比して、本発明は微小管の動的不安定性を損なうことはない。本発明は、Eg5モータータンパク質の阻害することにより、より特異的に増殖細胞の紡錘体を標的化することができ、既存の抗ガン剤とは異なった毒性を与えることができる。

本発明のある種の化合物は、以下のスキームと当業者の通常の知識に従って一般的に調製可能である。本発明化合物の溶媒和物（例えば水和物）もまた本発明の範囲内にある。溶

10

20

30

40

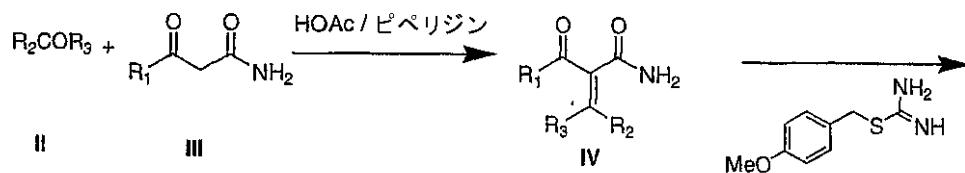
50

媒和の方法は当業者に一般に知られている。従って、本発明化合物は遊離体若しくは水和物の形で、以下のスキームで例示される方法により得ることができる。

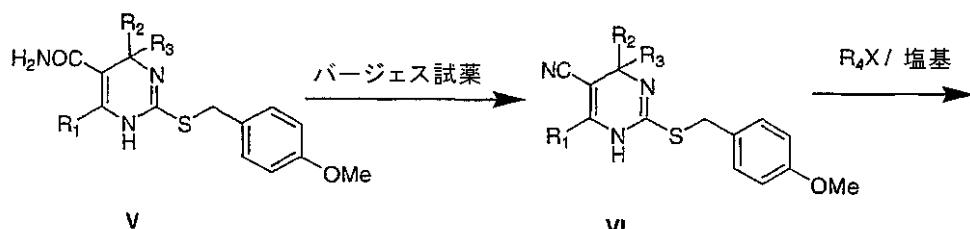
【0021】

【化3】

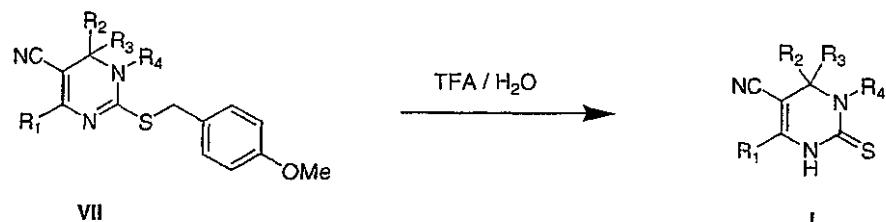
スキームI



10



20

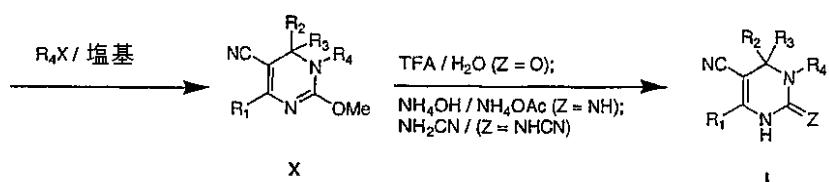
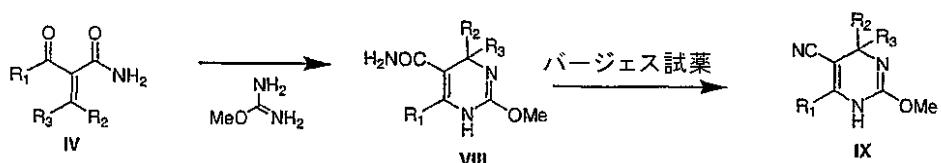


30

ZがSである式Iの化合物はスキーム1に従って製造される。ケトン又はアルデヒドI（例えばベンズアルデヒドではR<sup>2</sup>がフェニル、R<sup>3</sup>がH）とアセトアセタミドIIを縮合させるとクネーフェナーゲル(Knoevenagel)生成物IVが異性体混合物として得られる。S-パラメトキシベンジルチオウレアと反応させると保護されたジヒドロピリジンチオンVが得られる。例えば、バージェス(Burgess)試薬、(メトキシカルボニルスルファモイル)トリエチルアンモニウムヒドロキシド・分子内塩のような脱水剤を用いて、Vの一級アミド基を脱水させることによりV-Iにおけるシアノ置換基に誘導できる。N3置換基がR<sup>4</sup>Xとの反応により導入でき、ここでR<sup>4</sup>はアルキル若しくはアシリル、Xは脱離基であるか、又はR<sup>4</sup>Xはイソシアネート若しくはハロホルムである。保護基は水の存在下酸で処理することにより除去することができ、ZがSである式Iの化合物を与える。

【化4】

## スキームII



10

クネーフェナーゲル(Knoevenagel)生成物IVをO-メチルイソウレアと反応させて得られるO-メチルジヒドロピリミジンVIIから、ZがO、NH又はNR<sup>8</sup>である式Iの化合物が製造される。バージェス(Burgess)試薬のような脱水剤を用いて一级アミドをニトロリル基に変換する。N3置換基がR<sup>4</sup>Xとの反応により導入でき、ここでR<sup>4</sup>はアルキル若しくはアシル、Xは脱離基であるか、又はR<sup>4</sup>Xはイソシアネート若しくはハロホルムである。メチルエーテル保護基は水の存在下、酸で処理することによりZがOである式Iの化合物が製造される。或いは式Xの化合物をアンモニウムアセテートの存在下水酸化アンモニウムと反応させて又はメタノール中シアナミドと反応させてZがNH又はNR<sup>8</sup>である式Iの化合物が製造される。

20

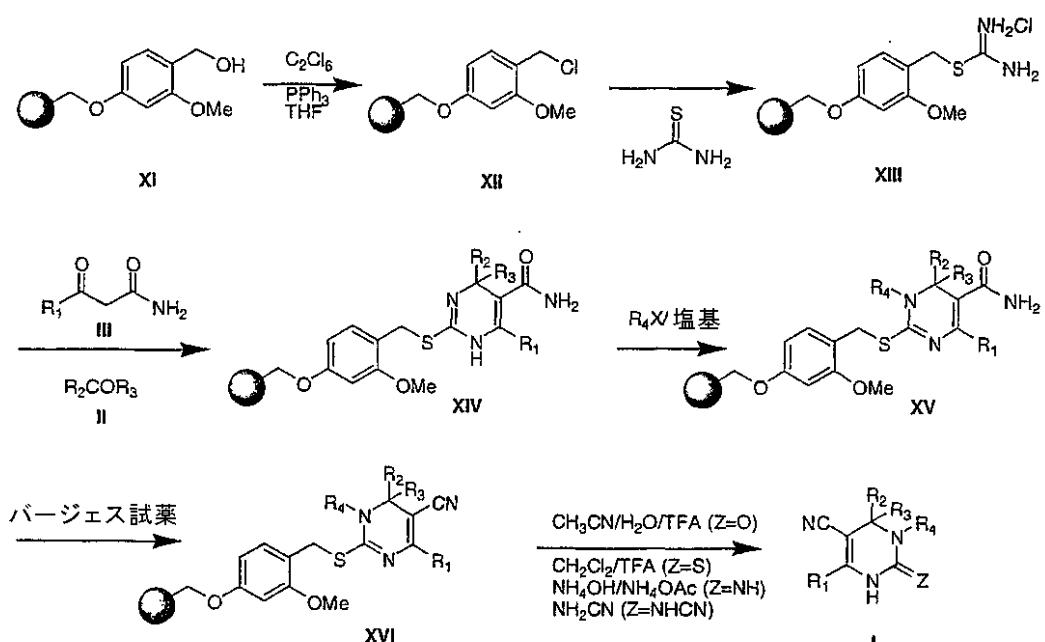
式Iの化合物はビグネリ(Bignelli)反応[D.J.Brown in The Pyrimidines, Wiley: New York, 1962, 440]を用いて製造することもできる。

【0022】

【化5】

## スキームIII

## 固相合成



30

40

式Iの化合物はスキームIIIに概略を示すように固体支持体上で製造することもできる。出発化合物XVIは、固相合成に用いる樹脂に結合したベンジルアルコールを意味し、示されるメリフィールド樹脂と、2-メトキシ-4-ヒドロキシベンズアルデヒドとを

50

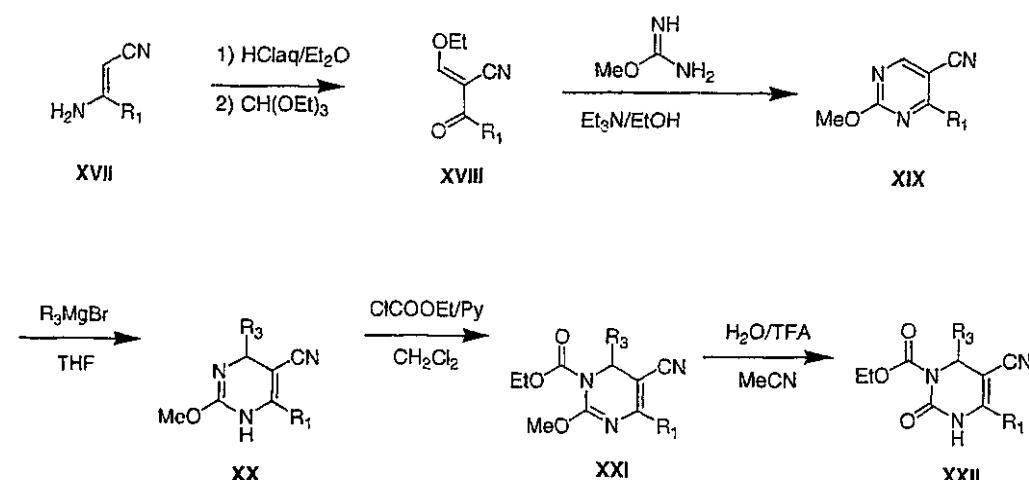
反応させ  $\text{NaBH}_4$  のような還元剤でアルデヒドを還元して製造される。ベンジルアルコールは、THF中ヘキサクロロエタンとトリフェニルホスフィンのような試薬によりベンジルクロリドに変換し、式XIIの樹脂を製造する。クロリドをチオウレアで置換してイソチオウレア樹脂XIIIを製造する。得られた樹脂を、式 $\text{R}^2\text{COR}^3$ のケトン若しくは式 $\text{R}^2\text{CHO}$ のアルデヒドの存在下、過剰量のケトアミド、例えばアセタミド(II)、 $\text{R}^1$ は $\text{CH}_3$ )、で処理し、式XIVの樹脂に結合したピリミジンチオンを製造する。N3置換基が $\text{R}^4\text{X}$ との反応により導入でき、ここでXは脱離基であり、 $\text{R}^4$ はアルキル若しくはアシルであるか、又は $\text{R}^4\text{X}$ はイソシアネート若しくはハロホルムであって、塩基の存在下式XVの構造を形成させる。バージェス(Burgess)試薬のような試薬を用いて一級アミドを脱水してシアノ基に変換し、式XVIの化合物を得る。種々の条件下で生成物を樹脂から切断し式Iの化合物を得るが、Zは用いた切断条件により決定される。水性の酸条件下で切断するとZがOである式Iの化合物、無水の酸条件下で切断するとZがSである式Iの化合物がそれぞれ得られる。或いは、構造XVIの樹脂を酢酸アンモニウムの存在下で水酸化アンモニウムで処理するとZがNHである式Iの化合物が得られ、シアナミドで処理するとZがNHCNである式Iの化合物が得られる。

10

【0023】

【化6】

## スキームIV



20

式XVIIの化合物はスキームIVに図示した方法により3-アミノ-3-アルキルアクリロニトリルXIIから得ることができる。式XVIIの化合物を塩酸のような水性の酸で処理しオルトギ酸エチルと反応させると式XVIIIの化合物が得られる。次いで、トリエチルアミンのような塩基の存在下で式XVIIIの化合物をO-メチルイソウレアと反応させると式XIXのピリミジンが得られる。式XIXのピリミジンを例えばグリニヤール(Grignard)試薬、 $\text{R}^3\text{MgBr}$ のような有機金属種とエーテル若しくはTHFのような溶媒中で反応させると、式XXのピリミジン、即ち式XIXの化合物で $\text{R}^2$ がHのものを与える。スキームIIと同様にして、式XXの化合物は式XXIの化合物、即ち、式Iで $\text{R}^4$ がエトキシカルボニル、 $\text{R}^2$ がHである化合物に変換できる。

30

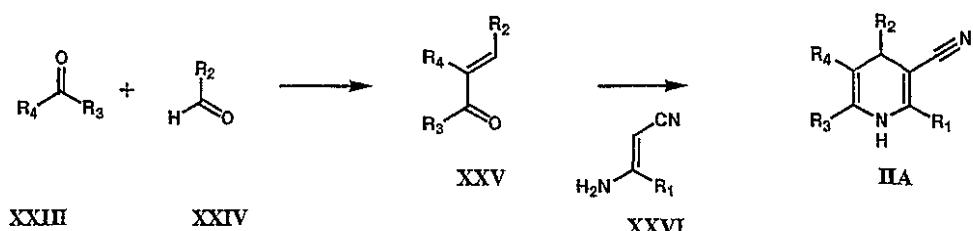
上記すべての図式において、2-アセチルアセトニトリル誘導体、 $\text{R}^1\text{COCH}_2\text{CN}$ を式IIの化合物に置き換えることが可能である。

40

式IIAのジヒドロピリジン類縁体もスキームVに記載された一般法に従って製造できる。

【化7】

## スキームV



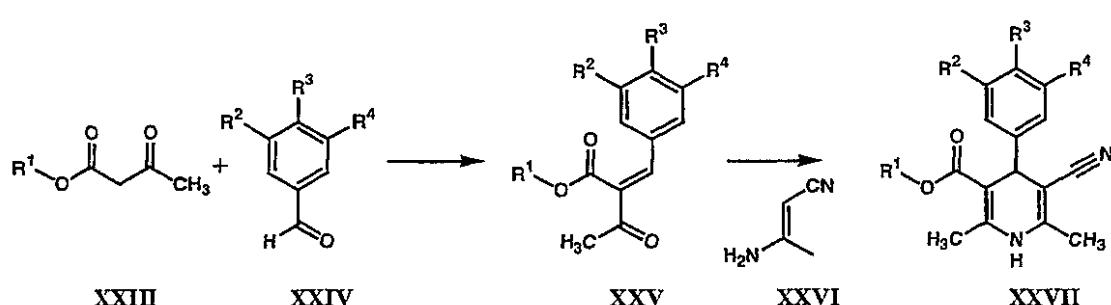
かくして、適切な式IIIAのジヒドロピリジン誘導体が、構造XXIIIIのアセテートと構造XXIVのアルデヒドとを酢酸とピリジンを用いて水を共沸蒸留で除きながら(Chem. Pharm.Bull., 1992,40,2423-31)、又はビスマストリクロリドを用いて反応させ(Chem.Lett., 1992,10,1945-6)、式XXVの化合物を得る。これら化合物はエタノール中で加熱して3-アミノ-クロトンニトリル(XXVII)と縮合させ、式IIIAの化合物を高収率で得ることができる。

より詳しくは、式IIIAの化合物(XXVII)はスキームVIにより得られる；

【0024】

【化8】

## スキームVI



式XXIIIIのアセトアセテートと式XXIVのアルデヒドとを酢酸とピリジン中で水を共沸蒸留で除きながら(Chem.Pharm.Bull., 1992,40,2423-31)、又はビスマストリクロリドを用いて反応させ(Chem.Lett., 1992,10,1945-6)、式XXVのベンジリデン化合物を得る。これらベンジリデン(XXV)はエタノール中で加熱して3-アミノ-クロトンニトリル(XXVII)と縮合させ、式XXVIIのジヒドロピリジンを高収率で与える。

本発明の化合物は薬学的性質を有する；特に、本発明の方法に用いられる低分子化合物は有糸分裂を停止させEg5阻害剤と考えられる。本発明の新規化合物は種々の増殖性疾患(Eg5モータータンパク質の作用制御を介して治療し得る疾患有むが、これらに限定されない)、例えばガン、自己免疫疾患、ウィルス病、真菌感染病、神経変性疾患、心血管性障害の治療に有用である。

【0025】

本発明は種々のガンの治療方法を提供する；これらのガンには以下のものが含まれるがこれらに限定されない。

1. 膀胱、乳房、直腸、腎臓、肝臓、肺(小細胞癌を含む)、卵巣、前立腺、精巣、すい臓、食道、胃、胆のう、頸部、甲状腺、皮膚(扁平上皮癌を含む)等を含む癌腫

2. 急性リンパ性白血病、急性リンパ芽球性白血病、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、有毛細胞リンパ腫、バーケッツ(Burkitts)リンパ腫等を含むリンパ系列の造血性腫瘍

3. 急性および慢性骨髄性白血病、骨髄異形性症候群、前骨髄性白血病等を含む骨髄性系列の造血性腫瘍

4. 星細胞腫、神経芽細胞腫、神経膠腫、シュワン腫等を含む中枢および末梢神経系の腫瘍

10

20

30

40

50

癌

5 . 腺維肉腫、横紋筋肉腫、骨肉腫等を含む間葉起源の腫瘍

6 . 黒色腫、色素性乾皮症、角質棘細胞腫、精上皮腫、甲状腺濾胞ガン、奇形癌腫等を含むその他の腫瘍

【 0 0 2 6 】

本発明のより好ましい具体例では、本発明の方法は癌性腫瘍の治療に用いられる。本発明は、腫瘍発育の減少、腫瘍による負担の軽減又は哺乳類宿主の腫瘍退行に有利である。

本発明の方法又は組成物の用途に適した抗腫瘍剤には、限定はされないが以下のものを含む；微小管の安定化薬剤、例えばパクリタキセル（登録商標：タキソールとして知られる）<sup>10</sup>）、ドセタキセル（登録商標：タキソテールとしても知られる）、7 - O - メチルチオメ

チルパクリタキセル（米国特許5646176号に開示、参考のため併記した）、3 - tert - ブチル - 3 - N - tert - ブチルオキシカルボニル - 4 - デアセチル - 3 - デフェニル - 3 - N - デベンゾイル - 4 - O - メトキシカルボニル - パクリタキセル（米国特許同時係属出願、2000年2月3日出願、60/179,965に開示、参考のため併記した）C-4 メチルカーボネートパクリタキセル（WO 94/14787に開示、参考のため併記した）、エポチロンA、エポチロンB、エポチロンC、エポチロンD、デスオキシエポチロンA、デスオキシエポチロンB、[1S-[1R\*,3R\*(E),7R\*,10S\*,11R\*,12R\*,16S]]-7-11-ジヒドロキシ-8,8,10,12,16-ペンタメチル-3-[1-メチル-2-(2-メチル-4-チアゾリル)エテニル]-4-アザ-17-オキサビシクロ[14.1.0]ヘプタデカン-5,9-ジオン（WO 99/02514に開示、参考のため併記した）、[1S-[1R\*,3R\*(E),7R\*,10S\*,11R\*,12R\*,16S\*]]-3-[2-(アミノメチル)-4-チアゾリル]-1-メチルエテニル]-7,11-ジヒドロキシ-8,8,10,12,16-ペンタメチル-4,17-ジオキサビシクロ[14.1.0]-ヘプタデカン-5,9-ジオン（米国特許同時係属出願、2000年2月17日出願、09/506,481に開示、参考のため併記した）、その他これらの誘導体；微小管の破壊薬；サイクリン依存性キナーゼの阻害剤（米国特許6040321号に開示済みのものを含む、参考のため併記した）；ファルネシルトランスフェラーゼの阻害剤；アルキル化薬；抗代謝剤；エピドフィロトキシン(epidophyllotoxin)、抗悪性腫瘍酵素；トポイソメラーゼ阻害薬；プロカルバジン；ミトキサンtron；白金配位錯体；生物学的応答調節剤；成長因子阻害剤；ホルモン／抗ホルモン療法剤；造血成長因子等。<sup>20</sup>

【 0 0 2 7 】

本発明の用途に適した抗悪性腫瘍剤の種類としては、限定されないが以下のものが含まれる；アントラサイクリン系薬剤、ピンカ薬、マイトマイシン、ブレオマイシン、細胞毒性ヌクレオチド、タキサン、エポチロン、ディスクデルモライド(discodermolide)、ブテリジン系薬剤、ダイネン(diynenes)、アロマターゼ阻害剤、ポドフィロトキシン等。特に有用なものは、例えば、パクリタキセル、ドセタキセル、7 - O - メチルチオメチルパクリタキセル、3 - tert - ブチル - 3 - N - tert - ブチルオキシカルボニル - 4 - デアセチル - 3 - デフェニル - 3 - N - デベンゾイル - 4 - O - メトキシカルボニル - パクリタキセル、C-4 メチルカーボネートパクリタキセル、エポチロンA、エポチロンB、エポチロンC、エポチロンD、デスオキシエポチロンA、デスオキシエポチロンB、[1S-[1R\*,3R\*(E),7R\*,10S\*,11R\*,12R\*,16S]]-7-11-ジヒドロキシ-8,8,10,12,16-ペンタメチル-3-[1-メチル-2-(2-メチル-4-チアゾリル)エテニル]-4-アザ-17-オキサビシクロ[14.1.0]ヘプタデカン-5,9-ジオン、[1S-[1R\*,3R\*(E),7R\*,10S\*,11R\*,12R\*,16S\*]]-3-[2-(アミノメチル)-4-チアゾリル]-1-メチルエテニル]-7,11-ジヒドロキシ-8,8,10,12,16-ペンタメチル-4,17-ジオキサビシクロ[14.1.0]-ヘプタデカン-5,9-ジオン、ドキソルビシン、カルミノマイシン(carminomycin)、ダウノルビシン、アミノブテリン、メトトレキサート、メトブテリン(methopterin)、ジクロロ-メトトレキサート、マイトマイシンC、ポルフィロマイシン(porfirromycin)、5 - フルオロウラシル、6-メルカプトプリン、ゲムシタビン、シトシンアラビノシド、ポドフィロトキシン、ポドフィロトキシン誘導体(エトポシド、リン酸エトポシド、テニポシド等)、メルファラン、ビンプラスチン、ビンクリスチン、ロイロシジン(leurosidine)、ビンデシン、ロイロシン(leurosine)等。<sup>30</sup>

【 0 0 2 8 】

他の有用な抗悪性腫瘍剤としては、エストラムスチン、シスプラチン、カルボプラチニン、シクロフォスファミド、ブレオマイシン、タモキシフェン、イフオスファミド、メルファン、ヘキサメチルメラミン、チオテバ、シタラビン、イダトレキサート (idatrexate) 、

トリメトレキサート、ダカルバジン、L-アスパラギナーゼ、カンプトテシン、CPT-11、トポテカン、アラ(ara)-C、ビカルタミド、フルタミド、リュープロリド、ピリドベンゾインドール誘導体、インターフェロン、インターロイキン、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤（例えば限定はされないが米国特許6040321号のものを含む；参考のために併記した）、ファルネシルトランスクフェラーゼ阻害剤（例えば限定はされないが米国特許6011029号のものを含む；参考のために併記した）等が含まれる。

好ましい抗悪性腫瘍剤の種類としては、タキサンおよびエポチロンであり、好ましい抗悪性腫瘍剤としては、パクリタキセル、ドセタキセル、7-O-メチルチオメチルパクリタキセル、3-tert-ブチル-3-N-tert-ブチルオキシカルボニル-4-デアセチル-3-デフェニル-3-N-デベンゾイル-4-O-メトキシカルボニル-パクリタキセル、C-4メチルカーボネットパクリタキセル、エポチロンA、エポチロンB、エポチロンC、エポチロンD、デスオキシエポチロンA、デスオキシエポチロンB、[1S-[1R\*,3R\*(E),7R\*,10S\*,11R\*,12R\*,16S]]-7-11-ジヒドロキシ-8,8,10,12,16-ペントメチル-3-[1-メチル-2-(2-メチル-4-チアゾリル)エテニル]-4-アザ-17-オキサビシクロ[14.1.0]ヘプタデカン-5,9-ジオン、[1S-[1R\*,3R\*(E),7R\*,10S\*,11R\*,12R\*,16S\*]]-3-[2-[2(アミノメチル)-4-チアゾリル]-1-メチルエテニル]-7,11-ジヒドロキシ-8,8,10,12,16-ペントメチル-4,17-ジオキサビシクロ[14.1.0]-ヘプタデカン-5,9-ジオン、米国特許6040321号に例示されるサイクリン依存性キナーゼ、(R)-7-シアノ-2,3,4,5-テトラヒドロ-1-(1H-イミダゾール-4-イルメチル)-3-(フェニルメチル)-4-(2-チエニルスルフォニル)-1H-1,4-ベンゾジアゼピン・メシル酸塩の他米国特許6011029号に例示されるファルネシルトランスクフェラーゼ阻害剤等がある。

### 【0029】

本発明の方法は少なくともひとつの低分子化合物Eg5タンパク質阻害剤を含む薬学的組成物を使用することができる。好ましい化合物は式I、IIIA、IIIA又は米国特許出願（シリアル番号未定、2002年3月22日出願、代理人事件整理番号LD0300）に開示された式を有し、薬学的に許容される担体と、追加的に他の少なくともひとつの抗腫瘍剤を含んでいてもよい。本発明で使用される組成物はさらに他の薬学的に許容される添加物、例えば、ミョウバン、安定剤、抗菌剤、緩衝剤、着色剤、着香剤等をひとつ又はそれ以上含んでもよい。本発明における抗悪性腫瘍剤、Eg5タンパク質の低分子化合物阻害剤および組成物は経口的に又は静脈注、筋肉注、腹腔内、経皮、直腸若しくは局所投与を含んで非経口的に投与することができる。

経口投与のためには、本発明の抗悪性腫瘍剤、Eg5タンパク質の低分子化合物阻害剤および組成物は例えば錠剤、カプセル剤、水溶液又は懸濁液として投与できる。経口投与のための錠剤の場合、通常使用される担体としてはラクトース、コーンスタークが含まれ、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤を通常添加する。経口投与のためのカプセル剤の場合、有用な担体としてはラクトース、コーンスタークが含まれる。経口投与のために水性懸濁液を用いる場合は、通常、乳化剤および/又は懸濁化剤を加える。加えて、甘味剤および/又は着香剤を経口用組成物に炭化してもよい。筋肉注、腹腔内、経皮、静脈注投与の場合は、有効成分を通常蒸留水に溶かし、溶液のpHを適切に調節して緩衝化する。静脈注投与の場合は、等張液となるように溶質の総濃度を調節しなければならない。

### 【0030】

本発明の併用療法はまた、他のよく知られた療法であって、治療しようとする症状に対する特別の有用性のために選択された療法と併せて使用することができる。一定用量を製剤化する場合、本発明に係る併用組成物の有効成分は有効な用量の範囲内で用いられる。或いは、抗悪性腫瘍剤と低分子化合物は適切な用量範囲内で別個に投与してもよい。本発明の好ましい具体例は、本発明化合物の有効用量内での投与に先立って、抗悪性腫瘍剤の有

10

20

30

40

50

効用量を投与するものである。

本発明はガンの治療方法を包含する。それは、少なくともひとつの抗悪性腫瘍剤と少なくともひとつの本発明化合物を同時に又は経時的に投与する方法である。ここで、ある併用治療の場合には抗悪性腫瘍剤と本発明の化合物よりなる薬学的な組成物が有利かも知れないし、他の治療においては抗悪性腫瘍剤の前投与が有利かも知れない。また、本発明に係る抗悪性腫瘍剤とEg5蛋白質の低分子化合物阻害剤との併用は、他のガン治療法（好ましくはガン性腫瘍）、例えは限定はされないが放射線療法や外科的方法と組み合わせて使用できることを理解すべきである。

抗悪性腫瘍剤、放射線療法、Eg5蛋白質の低分子化合物阻害剤のヒトに対する一日用量は通常、処方する医者により決定され、その用量は患者の兆候の重篤度と同様、年齢、体重、個々の患者の応答により変化する。10

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0031】

本発明の更なる理解を容易にするため、以下の試験例と実施例を提供するが基本的にはより具体的な詳細を図示するための目的に過ぎない。発明の範囲は実施例により限定されるとみなしてはならず、特許請求の範囲に記載した事項全体を包含する。

##### 【0032】

#### 試験例

本発明のEg5阻害剤の薬理学的性質は多くの薬理学的試験により確かめられる。以下に例示された薬理学的試験は本発明の化合物およびその塩について実施した。実施例1から同32の化合物は抗増殖活性を示した。20

#### 細胞培養

株化細胞は10%ウシ胎児血清を含むRPMI-1640中で維持した。以下のひとつ又はそれ以上の試験例で用いたヒト株化細胞は、限定されないが次のものを含む；A2780卵巣ガン細胞、HCT116、結腸直腸ガン細胞、HT-29、結腸直腸腺ガン細胞、SK-BR-3、哺乳類腺ガン細胞、Saos-2、骨肉腫細胞、PC-3、前立腺ガン細胞、LX-1、肺ガン細胞等。カンガルーラットの腎臓上皮細胞、PTK2もまた用いた。

#### 72時間増殖試験

用いた株化細胞により3000から6000個／ウェルの密度で、細胞を96ウェルプレート上に蒔いた。培養は終夜行った。用量応答曲線を7つの異なる濃度で、それぞれ3回ずつ試験して求めた。DMSOの最大濃度は0.5%を超えたかった。細胞を被験化合物に約72時間さらした。増殖はプロメガ（Promega）のXTT又はMTSを用いて測定した。式I又はIIAの化合物は72時間細胞増殖試験で活性を示し、IC<sub>50</sub>値が約10μMと同等若しくはそれより小さい値で細胞増殖を阻害した。30

#### クローン原性成長試験

コロニー成長阻害活性を標準的なクローン原性試験を用いて測定した。簡単には、約200個／ウェルの細胞を6ウェル組織培養プレート（ファルコン；Falcon, Franklin Lakes, NJ）上に蒔き、18時間かけて付着させた。試験培地は10%ウシ胎児血清を含むRPMI-1640を用いた。用量応答曲線を6つの異なる濃度で、それぞれ2回ずつ試験して求めた。DMSOの最大濃度は0.25%を超えたかった。細胞を被験化合物に約4から24時間さらした。その後、被験化合物を除去して、細胞をPBSで2回洗浄した。それから通常の培養の培地に置き換えた。コロニーには3日毎に新鮮な培地を与えた。オプティマクス（Optimax）イメージステーションを用いて、10日から14日後のコロニー数を数えた。コロニー形成を90%又は50%阻害するのに要する被験化合物濃度（それぞれIC<sub>90</sub>又はIC<sub>50</sub>）を非線形回帰分析により決定した。本発明化合物は細胞に約24時間さらした場合にクローン原性試験において活性を示した。40

##### 【0033】

#### 併用研究-クローン原性成長試験

他の抗悪性腫瘍剤と併用した場合の本発明に係るEg5阻害剤の用途を試験した。被験化合物の扱い以外は標準的なコロニー成長試験と本質的に同一である。併用の研究において50

は、細胞を式Iの化合物と他の抗悪性腫瘍剤の両方で処理した。被験化合物は同時に又は経時に投与した；投与の順序および間隔（約1時間から24時間）は変化させた。データの評価は、薬剤の単独使用の場合と併用した場合との生存率を比較しアイソボログラムを用いて作用の相乗性を分析して行った。

#### 細胞周期分析

本発明化合物で処理した細胞の細胞周期プロファイルをフローサイトメトリーで追跡した。簡単には、約 $2 \times 10^5$ 個／ウェルの細胞を標準的6ウェル培養プレート上に蒔き、17時間成長させた。その後細胞を本発明化合物に2から24時間さらした；被験化合物の濃度は種々変化させた。被験化合物にさらした後、細胞群を収集してDNA含量決定のためヨウ化プロピジウムで染色し、また有糸分裂およびアポトーシスのタンパク質生物マークーに対する適切な免疫学的試薬で染色した；例えば限定はされないが、抗リン酸トレオニンプロリン、抗Mフェースホスホプロテイン2(MMP2)、抗p85PARP等。本発明化合物は細胞周期分析において活性を示し、全細胞集団に対するアポトーシスおよび有糸分裂の比率を有意に増加させた。10

#### 免疫細胞化学試験

細胞を200から2000個／ウェルの密度で4チャンバーグラススライド上に蒔き、終夜で付着させた。その後細胞を本発明化合物（濃度は100nMから50μM）で4時間から30時間処理し、続く染色のために固定化して透過性にした。染色試薬としては、例えばヨウ化プロピジウム、DAPI、ローダミンファロイシン、抗チューブリン、抗チューブリン、抗チューブリン、その他適切な蛍光標識化された二次抗体等が挙げられる。細胞は蛍光および共焦点蛍光顕微鏡により観察した。本発明化合物は両極性紡錘体形成を阻害し、微小管の单一星状配列を誘起した。20

#### 【実施例】

##### 【0034】

###### 実施例1

5-シアノ-3,6-ジヒドロ-4-メチル-6-(3-ニトロフェニル)-2-チオキソ-1-(2H)-ピリミジンカルボン酸 1-エチルエステル

###### A.ステップ1

アセトアセタミド6.42g、3-ニトロベンズアルデヒド8.0g、酢酸0.61mL、ピペリジン0.21mLおよびトルエン30mLの混合物を加熱還流した。ディーンスタルク(Dean-Stark)トラップを用いて生成する水を共沸させて除去した。2時間還流後、反応混合物を室温まで冷却すると多くの固体が析出した。EtOAc300mLとMeOH25mLで処理して固体を濾別し、EtOAc15mLで2回洗浄して目的物3.1gを収率25%で得た。30

###### B.ステップ2

実施例1・ステップ1の化合物200mg、2-(4-メトキシベンジル)-2-チオシュードウレア塩酸塩198mg、酢酸ナトリウム84mgおよびDMF3.6mLの混合物を85℃で15時間加熱し、それから室温まで冷却した。得られた反応混合物を調製用HPLC(YMC S5 ODS 20 x 100 mm)カラムを用いて生成し、目的の分画を濃縮乾固した。飽和NaHCO<sub>3</sub>(50mL)を加えてEtOAc(3 x 50mL)で抽出した。合一したEtOAc抽出液を飽和食塩水30mLで洗浄しMgSO<sub>4</sub>上で乾燥した。濾過して減圧下に濃縮し所望の生成物126.1mgを36%収率で得た。40

###### C.ステップ3

実施例1・ステップ2の化合物(86.5 mg)とBurgess試薬(150mg)および無水THF7.0mLの混合物を室温で1時間攪拌し、減圧下で濃縮し、YMC S5 (ODS 20 x 100 mm)を用いた調製用HPLCで生成して所望の生成物80.8mgを収率87%で得た。

###### D.ステップ4

実施例1・ステップ3の化合物(60mg)、ピリジン(0.1mL)をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>0.6mLに溶解し、クロロギ酸エチル17μLを加えて2.5時間攪拌し、更にクロロギ酸エチル22μLを加えて反応混合物を2時間攪拌した。トリフルオロ酢酸0.3mLを加えてから混合物を更に1時間攪拌し、減圧下で濃縮してDMF、MeOHおよび少量のCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>を加えて濾過し、(YMC S5 ODS 20 x 100 mm)カラムを用いる調製用HPLCで精製して生成物22.5mgを収率42.7%で得た。50

$\text{MS}(\text{M}-\text{H})^+ = 345.$

HPLC RT = 2.85 min (YMC S5 ODS カラム 4.6 x 50 mm; 10-90% 水性メタノール、グラデイエント 4分間 ; 0.2%リン酸含有 ; 流速 4ml/min ; 検出 220nm)

【 0 0 3 5 】

実施例2

5-シアノ-3,6-ジヒドロ-4-メチル-6-(3-ニトロフェニル)-2-オキソ-1-(2H)-ピリミジンカルボン酸1-エチルエステル

A.ステップ1

実施例1・ステップ1の化合物 7.83 g および O-メチルイソウレア硫酸水素酸塩 7.48 g を DMF(100ml)に溶解し、 $\text{NaHCO}_3$  10.92 g を少しづつ加えたら、気体が発生した。反応混合物を 2 時間攪拌し、その後 65 度で終夜攪拌した。室温にまで冷却し、 $\text{EtOAc}$  800ml で希釈して水(2 x 100ml)、飽和食塩水(1 x 100ml)でそれぞれ洗浄した。有機層を  $\text{MgSO}_4$  上で乾燥し濾過し減圧下で濃縮して得られた残渣を  $\text{EtOAc-CH}_2\text{Cl}_2$ -ヘキサン中で粉碎して所望の生成物 5.48 g を固体として得た(56%)。

B.ステップ2

実施例2・ステップ1の化合物(209mg)と Burgess試薬(274.5mg)の混合物を  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (5ml)および THF(10ml)中で終夜攪拌した。反応混合物を減圧下で濃縮し、 $\text{EtOAc}$  150ml で希釈して  $\text{NaHCO}_3$ (2 x 30ml) および 鮑和食塩水(1 x 30ml) でそれぞれ洗浄し  $\text{MgSO}_4$  上で乾燥した。減圧下で濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーで精製して所望の生成物 136mg(69.4%)を得た。

C.ステップ3

実施例2・ステップ2の化合物 2.075 g を  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (30ml)に溶解し、アルゴンガス雰囲気下 0 度でピリジン 1.23ml を加え、次いでクロロギ酸エチル 0.87ml をゆっくり加えた。反応混合物を室温にまで戻し、3時間攪拌してから飽和  $\text{NaHCO}_3$ (50ml) と 鮑和食塩水(50ml)を加えて  $\text{EtOAc}$  で 3 回抽出した。有機層を合一して洗浄し、 $\text{MgSO}_4$  上で乾燥して濾過し、減圧下に濃縮した。シリカゲルクロマトグラフィーで精製して所望の生成物 2.57g(98%)を得た。

D.ステップ4

実施例2・ステップ3の化合物 1.44 g を  $\text{CH}_3\text{CN}$ (25ml) および  $\text{H}_2\text{O}$ (2.5ml) に溶解し、TFA 2.5ml を加えて反応混合物を 2 時間攪拌すると多くの白色固体が析出した。固体を濾別して  $\text{CH}_3\text{CN}$ (3 x 20ml) および ヘキサン(2 x 20ml)で洗浄し空気中で乾燥して所望の生成物 860mg(62.2%)を得た。濾液を減圧下に濃縮し、得られた個体を  $\text{CH}_3\text{CN}$  から再結晶して更に目的物 320mg(23.2%)を得た。

$\text{MS}(\text{M}-\text{H})^+ = 329.$

HPLC RT = 2.53 min (YMC S5 ODS カラム 4.6 x 50 mm; 10-90% 水性メタノール、グラデイエント 4分間 ; 0.2%リン酸含有 ; 流速 4ml/min ; 検出 220nm)

【 0 0 3 6 】

実施例3

5-シアノ-3,6-ジヒドロ-4-メチル-6-(3-ニトロフェニル)-2-オキソ-1-(2H)-ピリミジンカルボン酸 1-エチルアミド

A.ステップ1

実施例2・ステップ2の化合物(100mg; 0.37mmol)とピリジン(0.74mmol; 18μl)をジクロロメタン(40ml)に溶解し、クロロギ酸エチル(81mg; 0.40mmol)を加えて得られた溶液を室温で 1.5 時間攪拌した。反応混合物を飽和  $\text{NaHCO}_3$ (30ml) で希釈し酢酸エチル(3 x 50ml)で抽出し  $\text{MgSO}_4$  上で乾燥した。減圧下で濃縮して白色の泡状物質を得た。クロマトグラフィー( $\text{SiO}_2$ : 20%  $\text{EtOAc}$ /ヘキサン)に付して所望の生成物(99mg; 62%)を無色の泡状物質として得た。

B.ステップ2

実施例3・ステップ1の化合物(12mg; 27nmol)を THF(0.1ml)に溶解して 2M エチルアミン THF 溶液(15μl; 30mmol)を室温で一度に加え、得られた黄色溶液を 30 分間攪拌した。反応混合物をメタノール(1.8ml)で希釈して得られる黄色個体を吸引濾過し調製用 HPLC にて精製

10

20

30

40

50

して標記化合物を白色固体(20mg; 22%)として得た。

上記実施例2の場合と比較して、この場合2-メトキシ基が単離精製中に加水分解されTFAで処理することなくジヒドロピリミジノン環を与えた。

### 【0037】

#### 実施例4

5-シアノ-3,6-ジヒドロ-4-メチル-6-(3-ニトロフェニル)-2-オキソ-1-(1-オキソブチル)-(2H)-ピリミジン

#### A.ステップ1

実施例2・ステップ2の化合物52mgとピリジン0.15mlを無水のCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>0.6mlに溶解し、ブチリルクロリド23.7μlを加えて、反応混合物を1時間攪拌し、ブチリルクロリド24μlを加えて、反応混合物を更に1.5時間攪拌した。YMC S5 (ODS 20 x 100 mm)カラムを用いる調製用HPLCにより精製して所望の目的物30mgを得た。

#### B.ステップ2

実施例4・ステップ1の化合物30mg、H<sub>2</sub>O2mlおよびTFA0.2mlをCH<sub>3</sub>CN1.2mlに溶解して1.5時間攪拌し、更にTFA0.1mlを加えて2.5時間攪拌した。反応混合物を減圧下に濃縮し、YMC S5 (ODS 20 x 100 mm) カラムを用いる調製用HPLCで精製して所望の目的物11.8mgを得た。  
MS(M-H)<sup>+</sup> = 327.

HPLC RT = 3.06 min (YMC S5 ODS カラム 4.6 x 50 mm; 10-90% 水性メタノール、グラディエント4分間; 0.2%リン酸含有; 流速 4ml/min; 検出 220nm)

#### 実施例5

エナンチオ 5-シアノ-3,6-ジヒドロ-4-メチル-6-(3-ニトロフェニル)-2-オキソ-1-(2H)-ピリミジンカルボン酸 1-エチルエステル(エナンチオマーA)

実施例2・ステップ4の化合物53mgを無水EtOHに溶解し、調製用カラム [Chiralcel OD-H S5 (4.6 x 250 mm)] を用いて不斉分離を行い、エナンチオマーA 20mgとエナンチオマーB 27mgを得た。

MS(M-H)<sup>+</sup> = 329.

HPLC キラルRT= 10.44 min (Chiralcel OD-H, S5, カラム 4.6 x 250 mm; 溶出液 10%MeOH/10%EtOH/ヘプタン; 流速 1.0ml/min; 検出 220nm; 94.7% ee)

### 【0038】

#### 実施例6

エナンチオ 5-シアノ-3,6-ジヒドロ-4-メチル-6-(3-ニトロフェニル)-2-オキソ-1-(2H)-ピリミジンカルボン酸 1-エチルエステル(エナンチオマーB)

MS(M-H)<sup>+</sup> = 329.

HPLC キラルRT= 10.44 min (Chiralcel OD-H, S5, カラム 4.6 x 250 mm; 溶出液 10%MeOH/10%EtOH/ヘプタン; 流速 1.0ml/min; 検出 220nm; 99.64% ee)

#### 実施例7

5-シアノ-3,6-ジヒドロ-4-メチル-6-(3-アミノフェニル)-2-オキソ-1-(2H)-ピリミジンカルボン酸 1-エチルエステル

実施例1・ステップ4の化合物12mgをエタノールに溶解し、塩化第二スズ(II)100mgで処理してアルゴン下90分間加熱還流した。反応液を室温まで冷却し飽和NaHCO<sub>3</sub>溶液でクエンチしEtOAc(3 x 50 ml)で抽出した。有機層を合わせて水洗し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥し減圧下に濃縮した。ヘキサンとエーテル中で粉碎して粗生成物8mgを得た。調製用HPLCにより更に生成して所望の生成物3mgをTFA塩として得た。

MS(M+H)<sup>+</sup> = 301.

HPLC RT = 1.685 min (YMC S5 ODS カラム 4.6 x 50 mm; 10-90% 水性メタノール、グラディエント 4分間; 0.1%TFA含有; 流速 4ml/min; 検出 220nm)

### 【0039】

#### 実施例8

5-シアノ-3,6-ジヒドロ-4-メチル-6-(3-(N,N-ジメチル)アミノフェニル)-2-オキソ-1-(2H)-ピリミジンカルボン酸 1-エチルエステル

10

20

30

40

50

実施例7の化合物12mgをCH<sub>3</sub>CN(1ml)に溶解し、パラホルムアルデヒド(40mg)、シアノ水素化ホウ素ナトリウム(30mg)を加えて酢酸2滴を加えた。反応混合物を室温で2時間攪拌し飽和NaHCO<sub>3</sub>溶液でクエンチしNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥して減圧下に濃縮した。得られた残渣を調製用HPLCで精製して所望の生成物3.2mgをTFA塩として得た。

MS:(M+H)<sup>+</sup> = 329.

HPLC RT = 1.76 min (YMC S5 ODS カラム 4.6 x 50 mm; 10-90% 水性メタノール、グラディエント4分間；0.1%TFA含有；流速 4ml/min；検出 220nm)

実施例9から実施例15は、実施例2の方法に従ってステップ1で適切なベンズアルデヒドを置換させることにより調製した。

実施例9

10

5-シアノ-3,6-ジヒドロ-4-メチル-6-(3-トリフルオロメチルフェニル)-2-オキソ-1-(2H)-ピリミジンカルボン酸 1-エチルエステル

HPLC-HI 100% at 2.84 min (YMC S5 ODS カラム 4.6 x 50 mm; 10-90%水性メタノール、グラディエント 4分間；0.1%TFA含有；流速 4ml/min；検出 220nm).

MS:(M+H)<sup>+</sup> = 354.

実施例10

20

5-シアノ-3,6-ジヒドロ-4-メチル-6-(2,3-ジクロロフェニル)-2-オキソ-1-(2H)-ピリミジンカルボン酸 1-エチルエステル

HPLC-HI 100% at 3.2 min (YMC S5 ODS カラム 4.6 x 50 mm; 10-90%水性メタノール、グラディエント 4分間；0.1%TFA含有；流速 4ml/min；検出 220nm).

MS:(M-H)<sup>-</sup> = 352.

実施例11

20

5-シアノ-3,6-ジヒドロ-4-メチル-6-(3-メトキシフェニル)-2-オキソ-1-(2H)-ピリミジンカルボン酸 1-エチルエステル

HPLC-HI 100% at 2.42 min (YMC S5 ODS カラム 4.6 x 50 mm; 10-90%水性メタノール、グラディエント 4分間；0.1%TFA含有；流速 ml/min；検出 220nm).

MS:(M+H)<sup>+</sup> = 316.

【0040】

実施例12

30

5-シアノ-3,6-ジヒドロ-4-メチル-6-(3,5-ジクロロフェニル)-2-オキソ-1-(2H)-ピリミジンカルボン酸 1-エチルエステル

HPLC-HI 87% at 3.26 min (YMC S5 ODS カラム 4.6 x 50 mm; 10-90%水性メタノール、グラディエント 4分間；0.1%TFA含有；流速 4ml/min；検出 220nm).

MS:(M-H)<sup>-</sup> = 352.

実施例13

40

5-シアノ-3,6-ジヒドロ-4-メチル-6-(3,4-ジクロロフェニル)-2-オキソ-1-(2H)-ピリミジンカルボン酸 1-エチルエステル

HPLC-HI 100% at 3.197 min (YMC S5 ODS カラム 4.6 x 50 mm; 10-90%水性メタノール、グラディエント 4分間；0.1%TFA含有；流速 4ml/min；検出 220nm).

MS:(M-H)<sup>-</sup> = 352.

実施例14

40

5-シアノ-3,6-ジヒドロ-4-メチル-6-(3-シアノフェニル)-2-オキソ-1-(2H)-ピリミジンカルボン酸 1-エチルエステル

HPLC-HI 93% at 2.32 min (YMC S5 ODS カラム 4.6 x 50 mm; 10-90%水性メタノール、グラディエント 4分間；0.1%TFA含有；流速 4ml/min；検出 220nm).

MS:(M+H)<sup>+</sup> = 311.

実施例15

50

5-シアノ-3,6-ジヒドロ-4-メチル-6-(4-メトキシフェニル)-2-オキソ-1-(2H)-ピリミジンカルボン酸 1-エチルエステル

HPLC-HI 100% at 2.55 min (YMC S5 ODS カラム 4.6 x 50 mm, 10-90%水性メタノール、

グラディエント 4分間；0.1%TFA含有；流速 4ml/min；検出220nm).

MS:  $(M+H)^+$  = 316.

### 【0041】

#### 実施例16

5-シアノ-3,6-ジヒドロ-4-メチル-6-(4-メチルフェニル)-2-オキソ-1-(2H)-ピリミジンカルボン酸 1-エチルエステル

#### A.ステップ1

15%塩酸(115ml)に対して3-アミノクロトンニトリル(41g, 0.5mol)のEt<sub>2</sub>O(500ml)混濁溶液を0℃で激しく攪拌しながら30分間かけて滴下し、更に反応混合物を0℃で15分間攪拌した。水溶液を分液し、Et<sub>2</sub>O(2 x 125ml)で抽出し、有機層を合わせてNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥した。オルトギ酸エチル(83ml)を滴下ロートと蒸留セットを装備した500mlの三ツ口フラスコに入れ、60-65℃のオイルバス上で攪拌しながら上記のエーテル溶液を滴下した。滴下速度はエーテルの蒸留速度と等しくなるように調節した。エーテル溶液の滴下が半分完了した時点で、更にオルトギ酸エチル83mlを追加し、オイルバス温度を徐々に100℃まで加熱して反応混合物を5時間攪拌した。蒸留(150-155 /2mmHg)により、所望の化合物26.6g(38%)を赤色固体として得た。

#### B.ステップ2

O-メチルイソウレア硫酸塩(9.9g, 80mmol)、実施例16・ステップ1の化合物(7.4g, 53mmol)およびエタノール(90ml)の混合物にトリエチルアミン(11ml, 80mmol)を加えた。混合物を室温で15分攪拌し、次いで66℃で3時間攪拌してからEtOHを除去して濃縮した。EtOAc(80ml)とH<sub>2</sub>O(80ml)を加え、水層を分液してEtOAc(2 x 80ml)で抽出し有機層を合わせてNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥した。濃縮して得られた褐色個体をEtOAcに溶解しシリカゲルパッドで濾過し、EtOAc / ヘプタン(1 / 1)で洗浄して暗色を除き濾液を濃縮した。得られた個体をヘプタン / EtOAcより再結晶して黄色結晶5.18gを収率65%で得た。

#### C.ステップ3

実施例16・ステップ2の化合物(75mg, 0.5mmol)をTHF(2ml)に溶解し、アルゴン下p-トリルマグネシウムプロミドのエーテル溶液(1M, 1ml, 1mmol)を0℃で滴下した。反応混合物をその温度で1.5時間攪拌し、グリニヤール(Grignard)試薬3mlを-78℃で追加した。反応溶液をゆっくりと室温まで戻し2分間攪拌してから飽和NH<sub>4</sub>Cl(5ml)とH<sub>2</sub>O(5ml)を加え、混合物をEtOAc(2 x 15ml)で抽出した。有機層を合わせて乾燥し濃縮してシリカゲルのクロマトグラフに付し所望の生成物45.6gを91%収率で得た。

#### D.ステップ4

実施例16・ステップ3の化合物(109mg, 0.45mmol)にピリジン(0.2ml, 2.5mmol)と乾燥CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>を加え、次いでクロロギ酸エチル(0.1ml, 1.05mmol)を加えて得られた混合物を室温で終夜攪拌した。MeOHを加え、得られた混合物を15分間攪拌し、濃縮してシリカゲルのクロマトグラフに付し所望の生成物100mgを無色のオイルとして得た(71%)。

#### E.ステップ5

実施例15・ステップ4の化合物(100mg, 0.32mmol)、H<sub>2</sub>O(0.7ml)、CH<sub>3</sub>CN(0.5ml)およびTFA(7ml)の混合物を室温で2時間攪拌した。その後CH<sub>3</sub>CNを除去して濃縮しNaHCO<sub>3</sub>を加えて混合物を塩基性とし、析出した固体を濾取して水洗し乾燥して所望の生成物64mgを得た。粗生成物を乾燥しEtOH / H<sub>2</sub>Oより再結晶して所望の生成物を更に20mg得た。

MS:  $(M+H)^+$  = 300.

HPLC RT = 3.40 min (YMC S5 ODS カラム 4.6 x 50 mm; 10-90%水性メタノール、グラディエント 4分間；0.2%リン酸含有；流速 4ml/min；検出 220nm)

### 【0042】

#### 実施例17

5-シアノ-3,6-ジヒドロ-4-メチル-6-シクロヘキシル-2-オキソ-1-(2H)-ピリミジンカルボン酸 1-エチルエステル

実施例16・ステップ2の化合物(30mg, 0.2mmol)をTHF(1.2ml)に溶解し、シクロヘキシルマグネシウムクロリドのエーテル溶液(2M溶液, 1.0ml, 2mmol)をアルゴン下-44℃で加え、

10

20

30

40

50

反応液を徐々に室温まで戻して10分間攪拌した。飽和NH<sub>4</sub>Clを加え得られた混合物をEtOAcで数回抽出し、有機層を合わせて乾燥しシリカゲルパッドで濾過して濃縮し黄色オイルを得た。そのオイルをCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(2ml)に溶解し、ピリジン(80μl, 0.9mmol)とクロロギ酸エチル(50μl, 0.5mmol)を加えて室温で30分間攪拌した。その後更に10分間攪拌してから、H<sub>2</sub>O(25μl)とEtOAcを加え、混合物をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥し、シリカゲルパッドで濾過して濃縮し黄色オイルを得た。そのオイルをCH<sub>3</sub>CN(2ml)に溶解して、H<sub>2</sub>O(0.3ml)およびTFA(0.2ml)を加え、混合物を室温で2時間攪拌した。飽和NaHCO<sub>3</sub>溶液とEtOAcを加え、水層を分液してEtOAcで抽出し有機層を合わせてNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥し濃縮してシリカゲルクロマトグラフに付し、所望の生成物35mgを黄色の泡状物質として得た(60%)。

MS(M+H)<sup>+</sup> = 392.

10

HPLC RT = 3.60 min (YMC S5 ODS カラム 4.6 x 50 mm; 10-90%水性メタノール、グラディエント 4分間；0.2%リン酸含有；流速 4ml/min；検出220nm)

#### 実施例18

5-シアノ-3,6-ジヒドロ-4-メチル-6-フェニル-2-オキソ-1-(2H)-ピリミジンカルボン酸 1-エチルエステル

実施例16・ステップ2の化合物(55mg, 0.37mmol)を乾燥THF(2ml)に溶解し、フェニルマグネシウムプロミドのTHF溶液(2M, 2ml, 4mmol)をアルゴン下-78°で滴下した。滴下後、反応液を徐々に室温まで戻し、出発物質が消滅するまで約10分間攪拌した。飽和NH<sub>4</sub>Cl溶液とH<sub>2</sub>Oを加え混合物をEtOAcで二度抽出し、有機層を合わせてNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥し、濃縮してシリカゲルクロマトグラフに付し、固体の中間体を得た。その固体をCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(5ml)に溶解し、ピリジン(0.15ml, 1.8mmol)とクロロギ酸エチル(0.1ml, 1mmol)を加えて反応混合物を室温で0.5時間攪拌した。反応を50μlのH<sub>2</sub>Oでクエンチし、EtOAcで希釈して得られた混合物をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥しシリカゲルパッドで濾過して中間体をオイルとして得た。そのオイルをCH<sub>3</sub>CN(5ml)に溶解して、H<sub>2</sub>O(0.5ml)とTFA(0.4ml)を加え、反応混合物を1.5時間攪拌して減圧下に濃縮した。飽和NaHCO<sub>3</sub>溶液を加えて混合物を中和し、沈殿物を濾取して空气中で乾燥しEtOAc/ヘプタンから再結晶して生成物70mgを固体として得た(収率66%)。

20

MS(M+H)<sup>+</sup> = 286.

HPLC RT = 1.28 min. (Phenom-Prime S5 C18 4.6 x 30 mm; 10-90%水性メタノール、グラディエント 2分間；0.1%TFA含有；流速 5ml/min；検出 220nm)

30

実施例19から実施例24は実施例18の方法で適切なアリールマグネシウムハライドと反応させることにより調製した。

#### 【0043】

#### 実施例19

5-シアノ-3,6-ジヒドロ-4-メチル-6-(2-メチルフェニル)-2-オキソ-1-(2H)-ピリミジンカルボン酸 1-エチルエステル

MS(M+H)<sup>+</sup> = 300.

HPLC RT = 1.41 min. (Phenom-Prime S5 C18 4.6 x 30 mm; 10-90%水性メタノール、グラディエント 2分間；0.1%TFA含有；流速 5ml/min；検出 220nm)

40

#### 実施例20

5-シアノ-3,6-ジヒドロ-4-メチル-6-(3-クロロフェニル)-2-オキソ-1-(2H)-ピリミジンカルボン酸 1-エチルエステル

MS(M+H)<sup>+</sup> = 320.

HPLC RT = 1.43 min. (Phenom-Prime S5 C18 4.6 x 30 mm; 10-90%水性メタノール、グラディエント 2分間；0.1%TFA含有；流速 5ml/min；検出 220nm).

#### 実施例21

5-シアノ-3,6-ジヒドロ-4-メチル-6-(3-フルオロフェニル)-2-オキソ-1-(2H)-ピリミジンカルボン酸 1-エチルエステル

MS(M+H)<sup>+</sup> = 304.

HPLC RT = 1.29 min. (Phenom-Prime S5 C18 4.6 x 30 mm; 10-90%水性メタノール、グラ

50

ディエント 2分間 ; 0.1%TFA含有 ; 流速 5ml/min ; 検出 220nm) .

実施例22

5-シアノ-3,6-ジヒドロ-4-メチル-6-(4-クロロフェニル)-2-オキソ-1-(2H)-ピリミジンカルボン酸 1-エチルエステル

MS(M+H)<sup>+</sup> = 320.

HPLC RT = 1.44 min. (Phenom-Prime S5 C18 4.6 x 30 mm; 10-90%水性メタノール、グラディエント 2分間 ; 0.1%TFA含有 ; 流速 5ml/min ; 検出 220nm) .

実施例23

5-シアノ-3,6-ジヒドロ-4-メチル-6-(4-フルオロフェニル)-2-オキソ-1-(2H)-ピリミジンカルボン酸 1-エチルエステル

MS(M+H)<sup>+</sup> = 304.

HPLC RT = 3.21 min. (YMC S5 ODS カラム 4.6 x 50 mm; 10-90%水性メタノール、グラディエント 4分間 ; 0.2%リン酸含有 ; 流速 4ml/min ; 検出 220nm) .

実施例24

5-シアノ-3,6-ジヒドロ-4-メチル-6-(2-フルオロフェニル)-2-オキソ-1-(2H)-ピリミジンカルボン酸 1-エチルエステル

MS(M+H)<sup>+</sup> = 304.

HPLC RT = 3.05 min. (YMC S5 ODS カラム 4.6 x 50 mm; 10-90%水性メタノール、グラディエント 4分間 ; 0.2%リン酸含有 ; 流速 4ml/min ; 検出 220nm) .

【0044】

実施例25

5-シアノ-2,6-ジメチル-4-(3-ニトロフェニル)-1,4-ジヒドロピリジン-3-カルボン酸エチルエステル

A.2-アセチル-3-(3-ニトロフェニル)-アクリル酸エチルエステル  
アセト酢酸エチル(8.6g, 66mmol)、3-ニトロベンズアルデヒド(10g, 66mmol)、酢酸(0.8g)、ピリジン(0.26mL)およびトルエン(30mL)の混合物をディーンスタルク(Dean-Stark)トラップを備えたフラスコ中で加熱還流した。2時間後に水1.1mLが回収されたので混合物を冷却し酢酸エチルで希釈して水(100mL)、飽和炭酸水素ナトリウム溶液(100mL)および飽和食塩水(100mL)で洗浄した。有機層を集めて硫酸ナトリウム上で乾燥し濾過して濃縮した。残渣をエーテル-ヘキサンより再結晶して白色個体を得た(6g, 35%)。

B.5-シアノ-2,6-ジメチル-4-(3-ニトロフェニル)-1,4-ジヒドロピリジン-3-カルボン酸エチルエステル

ステップAのベンジリデン(2.63g, 10mmol)、3-アミノクロトンニトリル(0.86g, 11mmol)およびエタノール(50mL)の混合物を24時間加熱還流した。混合物を減圧下に濃縮し残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、ヘキサン/酢酸エチル(1:1)で溶出して固体の生成物を得た(2.0g, 61%)。

HPLC-HI 100% at 2.84 min (YMC S5 ODS カラム 4.6 x 50 mm; 10-90%水性メタノール、グラディエント 4分間 ; 0.1%TFA含有 ; 流速 4ml/min ; 検出 220nm) .

MS: Found (M+H)<sup>+</sup> = 328.

元素分析 Calculated for C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> : C 62.37; H 5.23; N 12.83. Found: C 62.08, H 5.18, N 12.67.

実施例26

5-シアノ-2,6-ジメチル-4-(4-ニトロフェニル)-1,4-ジヒドロ-ピリジン-3-カルボン酸エチルエステル

5-シアノ-2,6-ジメチル-4-(4-ニトロフェニル)-1,4-ジヒドロピリジン-3-カルボン酸エチルエステルを、ステップAにおいて4-ニトロベンズアルデヒドを用いること以外は実施例25と同様にして調製した。

HPLC-HI 93% at 2.89 min (YMC S5 ODS カラム 4.6 x 50 mm; 10-90%水性メタノール、グラディエント 4分間 ; 0.1%TFA含有 ; 流速 4ml/min ; 検出 220nm) .

MS: Found (M+H)<sup>+</sup> = 328.

10

20

30

40

50

## 【0045】

## 実施例27

5-シアノ-4-(3-シアノフェニル)-2,6-ジメチル-1,4-ジヒドロピリジン-3-カルボン酸エチルエステル

5-シアノ-4-(3-シアノフェニル)-2,6-ジメチル-1,4-ジヒドロ-ピリジン-3-カルボン酸エチルエステルを、ステップAにおいて3-シアノベンズアルデヒドを用いること以外は実施例25と同様にして調製した。

HPLC-HI 83% at 2.71 min (YMC S5 ODS カラム 4.6 x 50 mm; 10-90%水性メタノール、グラディエント 4分間；0.1%TFA含有；流速 4ml/min；検出 220nm)

MS: Found (M+H)<sup>+</sup> = 308.

10

## 実施例28

5-シアノ-2,6-ジメチル-4-(3-トリフルオロメチルフェニル)-1,4-ジヒドロピリジン-3-カルボン酸エチルエステル

5-シアノ-2,6-ジメチル-4-(3-トリフルオロメチルフェニル)-1,4-ジヒドロ-ピリジン-3-カルボン酸エチルエステルを、ステップAにおいて3-トリフルオロメチルベンズアルデヒドを用いること以外は実施例25と同様にして調製した。

HPLC-HI 95% at 3.21min (YMC S5 ODS カラム 4.6 x 50 mm; 10-90%水性メタノール、グラディエント 4分間；0.1%TFA含有；流速 4ml/min；検出 220nm)

MS: Found (M+H)<sup>+</sup> = 351.

20

## 実施例29

5-シアノ-2,6-ジメチル-4-(3-メトキシフェニル)-1,4-ジヒドロ-ピリジン-3-カルボン酸エチルエステル

5-シアノ-2,6-ジメチル-4-(3-メトキシフェニル)-1,4-ジヒドロ-ピリジン-3-カルボン酸エチルエステルを、ステップAにおいて3-メトキシベンズアルデヒドを用いること以外は実施例25と同様にして調製した。

HPLC-HI 97% at 2.81min (YMC S5 ODS カラム 4.6 x 50 mm; 10-90%水性メタノール、グラディエント 4分間；0.1%TFA含有；流速 4ml/min；検出 220nm)

MS: Found (M+H)<sup>+</sup> = 313.

## 実施例30

5-シアノ-2,6-ジメチル-4-(3-ニトロフェニル)-1,4-ジヒドロ-ピリジン-3-カルボン酸イソプロピルエステル

5-シアノ-2,6-ジメチル-4-(3-ニトロフェニル)-1,4-ジヒドロ-ピリジン-3-カルボン酸イソプロピルエステルを、ステップAにおいてアセト酢酸イソプロピルを用いること以外は実施例25と同様にして調製した。

HPLC-HI 82% at 3.04 min(YMC S5 ODS カラム 4.6 x 50 mm; 10-90%水性メタノール、グラディエント 4分間；0.1%TFA含有；流速 4ml/min；検出 220nm)

MS: Found (M+H)<sup>+</sup> = 342.

30

## 【0046】

## 実施例31

5-シアノ-4-(3,4-ジクロロフェニル)-2,6-ジメチル-1,4-ジヒドロピリジン-3-カルボン酸エチルエステル

A.2-アセチル-3-(3,4-ジクロロフェニル)-アクリル酸エチルエステル

アセト酢酸エチル(1.3g, 10mmol)、3,4-ジクロロベンズアルデヒド(1.8g, 10mmol)およびBiCl<sub>3</sub>(315mg)の混合物を80°で3時間加熱した。混合物を冷却後、酢酸エチル(100ml)で希釈し、10%炭酸水素ナトリウム溶液、10%硫酸水素ナトリウム溶液および飽和食塩水で洗浄した。有機層を集めて硫酸ナトリウム上で乾燥し濃縮した。得られたベンジリデン生成物は精製せずステップBで用いた。

B.5-シアノ-4-(3,4-ジクロロフェニル)-2,6-ジメチル-1,4-ジヒドロ-ピリジン-3-カルボン酸エチルエステル

ステップAのベンジリデン(0.13g, 0.4mmol)、3-アミノクロトンニトリル(44mg, 0.5mmol)

40

50

およびエタノール(1ml)の混合物を24時間加熱還流した。混合物を減圧下に濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィーに付し、ヘキサン／酢酸エチル(7:3)で溶出して生成物を固体として得た(15mg, 11%)。

HPLC-HI 95% at 3.64 min (YMC S5 ODS カラム 4.6 x 50 mm; 10-90%水性メタノール、グラディエント 4分間；0.1%TFA含有；流速 4ml/min；検出 220nm)

MS: Found (M+H)<sup>+</sup> = 352.

### 実施例32

5-シアノ-4-(3,5-ジクロロフェニル)-2,6-ジメチル-1,4-ジヒドロピリジン-3-カルボン酸エチルエステル

5-シアノ-4-(3,5-ジクロロフェニル)-2,6-ジメチル-1,4-ジヒドロピリジン-3-カルボン酸エチルエステルを、ステップAにおいて3,5-ジクロロベンズアルデヒドを用いること以外は実施例31と同様にして調製した。 10

HPLC-HI 90% at 3.50 min (YMC S5 ODS カラム 4.6 x 50 mm; 10-90%水性メタノール、グラディエント 4分間；0.1%TFA含有；流速 4ml/min；検出 220nm)

MS: Found (M+H)<sup>+</sup> = 352.

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
10 October 2002 (10.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/078639 A2

(51) International Patent Classification: A61K (74) Agents: GIBBONS, Maureen et al.; Bristol-Myers Squibb Company, P.O. Box 4000, Princeton, NJ 08543-4000 (US).

(21) International Application Number: PCT/US02/09817

(22) International Filing Date: 28 March 2002 (28.03.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/279,956 29 March 2001 (29.03.2001) US  
60/280,366 30 March 2001 (30.03.2001) US

(71) Applicant (for all designated States except US): BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY [US/US]; P.O. Box 4000, Route 206 and Provinceline Road, Princeton, NJ 08543-4000 (US).

(72) Inventors: and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): KIMBALL, Spencer, David [US/US]; 13 Churred Oak Lane, East Windsor, NJ 08520 (US). LOMBARDO, Louis, J. [US/US]; 49 West Street, Bellie Mead, NJ 08502 (US). RAWLINS, David, B. [US/US]; 219 Vernon Road, Morrisville, PA 19067 (US). XIAO, Hai-Yun [US/US]; 173 Jonathan Dayton Court, Princeton, NJ 08540 (US). ROUSSELL, Deborah, L. [US/US]; 1728 Riverside Drive, Trenton, NJ 08618 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PI, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TI, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NL, SN, TD, TG).

Published:  
without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/078639 A2

(54) Title: A METHOD OF TREATING PROLIFERATIVE DISEASES USING EG5 INHIBITORS

(57) Abstract: The invention provides a method for treating a condition via modulation of the Ig5 protein activity comprising administering to a mammalian species in need of such treatment an effective amount of at least one small molecule Ig5 protein inhibitor. The invention also provides a method for treating a condition via modulation of the Eg5 protein activity comprising administering to a mammalian species in need of such treatment an effective amount of at least one small molecule Eg5 protein inhibitor in combination with at least one other anti-cancer agent.

WO 02/078639

PCT/US02/09817

**A METHOD OF TREATING PROLIFERATIVE DISEASES USING Eg5 INHIBITORS****RELATED APPLICATIONS**

- 5 This application claims the benefit under 35 U.S.C. Section 119(e) of U.S. Provisional Patent Application No. 60/279,956 filed March 29, 2001, and Provisional Patent Application No. 60/280,366 filed March 30, 2001.

**FIELD OF INVENTION**

- 10 This invention relates to methods of treating proliferative diseases, such as cancer, using an inhibitor of the kinesin-like Eg5 motor protein and to methods of treating cancer using an Eg5 inhibitor in combination with other antineoplastic agents.

**BACKGROUND**

- 15 The maintenance of cell populations within an organism is governed by the cellular processes of cell division and programmed cell death. Within normal cells, the cellular events associated with the initiation and completion of each process is highly regulated. In proliferative disease such as cancer, one or both of these processes may be perturbed. For example, a cancer cell may have lost its regulation  
20 (checkpoint control) of the cell division cycle through either the overexpression of a positive regulator or the loss of a negative regulator, perhaps by mutation. Alternatively, a cancer cell may have lost the ability to undergo programmed cell death through the overexpression of a negative regulator. Hence, there is a need to develop new chemotherapeutic drugs that will restore the processes of checkpoint control and programmed cell death to cancerous cells.

- 25 One approach to the treatment of human cancers is to target a protein that is essential for cell cycle progression. In order for the cell cycle to proceed from one phase to the next, certain prerequisite events must be completed. There are checkpoints within the cell cycle that enforce the proper order of events and phases.  
30 One such checkpoint is the spindle checkpoint that occurs during the metaphase stage of mitosis. Small molecules that target proteins with essential functions in mitosis may initiate the spindle checkpoint to arrest cells in mitosis. Of the small molecules that arrest cells in mitosis, those which display anti-tumor activity in the clinic also induce apoptosis, the morphological changes associated with programmed cell death.

WO 02/078639

PCT/US02/09817

An effective chemotherapeutic for the treatment of cancer may thus be one which induces checkpoint control and programmed cell death. Unfortunately, there are few compounds available for controlling these processes within the cell. Most compounds known to cause mitotic arrest and apoptosis act as tubulin binding agents. These 5 compounds alter the dynamic instability of microtubules and indirectly alter the function/structure of the mitotic spindle thereby causing mitotic arrest. Because most of these compounds specifically target the tubulin protein which is a component of all microtubules, they may also affect one or more of the numerous normal cellular processes in which microtubules have a role. Hence, there is also a need for small 10 molecules that more specifically target proteins associated with proliferating cells.

Eg5 is one of several kinesin-like motor proteins that are localized to the mitotic spindle and known to be required for formation and/or function of the bipolar mitotic spindle. Recently, there was a report of a small molecule that disturbs 15 bipolarity of the mitotic spindle (Mayer, T.U. et. al. 1999. Science 286(5441) 971-4, herein incorporated by reference). More specifically, the small molecule induced the formation of an aberrant mitotic spindle wherein a monoastral array of microtubules emanated from a central pair of centrosomes, with chromosomes attached to the distal ends of the microtubules. The small molecule was dubbed "monastrol" after the monoastral array. This monoastral array phenotype had been previously observed in 20 mitotic cells that were immunodepleted of the Eg5 motor protein. This distinctive monoastral array phenotype facilitated identification of monastrol as a potential inhibitor of Eg5. Indeed, monastrol was further shown to inhibit the Eg5 motor-driven motility of microtubules in an *in vitro* assay. The Eg5 inhibitor monastrol had no apparent effect upon the related kinesin motor or upon the motor(s) responsible for 25 golgi apparatus movement within the cell. Cells that display the monoastral array phenotype either through immunodepletion of Eg5 or monastrol inhibition of Eg5 arrest in M-phase of the cell cycle. However, the mitotic arrest induced by either immunodepletion or inhibition of Eg5 is transient (Kapoor, T.M., 2000. J Cell Biol 150(5) 975-80). Both the monoastral array phenotype and the cell cycle arrest in 30 mitosis induced by monastrol are reversible. Cells recover to form a normal bipolar mitotic spindle, to complete mitosis and to proceed through the cell cycle and normal cell proliferation. These data suggest that a small molecule inhibitor of Eg5 which

WO 02/078639

PCT/US02/09817

induced a transient mitotic arrest may not be effective for the treatment of cancer cell proliferation. Nonetheless, the discovery that monastrol causes mitotic arrest is intriguing and hence there is a need to further study and identify compounds which can be used to modulate the Eg5 motor protein in a manner that would be effective in  
5 the treatment of human cancers. There is also a need to explore the use of these compounds in combination with other antineoplastic agents.

Another recent report proposes that retinoic acid interferes with the cell cycle and delays progression through G2/M phase by modulation of Eg5 gene expression (Kaiser, A., et. al., 1999. J Biol Chem 274(27), 18925-31, herein incorporated by  
10 reference). Like the mitotic arrest induced by the immunodepletion of Eg5 protein and by monastrol's inhibition of Eg5, the mitotic arrest induced by retinoic acid is transient.

It is, therefore, an object of the present invention to provide a method for the treatment of proliferative diseases, such as cancer, using an Eg5 inhibitor.

15 Additionally, it is an object of the present invention to provide a method for the treatment of cancer using a combination that consists of an Eg5 inhibitor and other antineoplastic agents. These and other objects of the present invention will become more apparent from the description thereof set forth below.

20

#### SUMMARY

The present invention provides a method for treating a condition via modulation of Eg5 protein activity comprising administering to a mammalian species in need of such treatment an effective amount of at least one small molecule Eg5  
25 protein inhibitor. The invention also provides a method for treating a condition via modulation of Eg5 protein activity comprising administering to a mammalian species in need of such treatment an effective amount of at least one small molecule Eg5 protein inhibitor in combination with at least one other anti-cancer agent.

30

#### DESCRIPTION

Listed below are definitions of various terms used to describe the compounds used in the methods of the instant invention. These definitions apply to the terms as

WO 02/078639

PCT/US02/09817

they are used throughout the specification (unless they are otherwise limited in specific instances) either individually or as part of a larger group.

The term "alkyl" herein alone or as part of another group refers to a monovalent alkane (hydrocarbon) derived radical containing from 1 to 12 carbon atoms unless otherwise defined. An alkyl group is an optionally substituted straight, branched or cyclic saturated hydrocarbon group. When substituted, alkyl groups may be substituted with up to four substituent groups, R as defined, at any available point of attachment. When the alkyl group is said to be substituted with an alkyl group, this is used interchangeably with "branched alkyl group". Exemplary unsubstituted such groups include methyl, ethyl, propyl, isopropyl, n-butyl, t-butyl, isobutyl, pentyl, hexyl, isoheptyl, heptyl, 4,4-dimethylpentyl, octyl, 2,2,4-trimethylpentyl, nonyl, decyl, undecyl, dodecyl, and the like. Exemplary substituents may include but are not limited to one or more of the following groups: halo (such as F, Cl, Br, I), haloalkyl (such as CCl<sub>3</sub> or CF<sub>3</sub>), alkoxy, alkylthio, hydroxy, carboxy (-COOH), alkylxycarbonyl (-C(O)R), alkylcarbonyloxy (-OCOR), amino (-NH<sub>2</sub>), carbamoyl (-NHCOOR- or -OCONHR-), urea (-NHCONHR-) or thiol (-SH). Alkyl groups as defined may also comprise one or more carbon to carbon double bonds or one or more carbon to carbon triple bonds.

The term "alkenyl" herein alone or as part of another group refers to a hydrocarbon radical straight, branched or cyclic containing from 2 to 12 carbon atoms and at least one carbon to carbon double bond.

The term "alkynyl" herein alone or as part of another group refers to a hydrocarbon radical straight, branched or cyclic containing from 2 to 12 carbon atoms and at least one carbon to carbon triple bond.

The numbers in the subscript after the symbol "C" define the number of carbon atoms a particular group can contain. For example "C<sub>1-6</sub> alkyl" means a straight or branched saturated carbon chain having from one to six carbon atoms; examples include methyl, ethyl, n-propyl, isopropyl, n-butyl, sec-butyl, isobutyl, t-butyl, n-pentyl, sec-pentyl, isopentyl, and n-hexyl. Depending on the context, "C<sub>1-6</sub> alkyl" can also refer to C<sub>1-6</sub> alkylene which bridges two groups; examples include propane-1,3-diyl, butane-1,4-diyl, 2-methyl-butane-1,4-diyl, etc. "C<sub>2-6</sub> alkenyl" means a straight or branched carbon chain having at least one carbon-carbon double

WO 02/078639

PCT/US02/09817

bond, and having from two to six carbon atoms; examples include ethenyl, propenyl, isopropenyl, butenyl, isobutenyl, pentenyl, and hexenyl. Depending on the context, "C<sub>2</sub>-6 alkenyl" can also refer to C<sub>2</sub>-6 alkenediyl which bridges two groups; examples include ethylene-1,2-diy (vinylene), 2-methyl-2-butene-1,4-diy, 2-hexene-1,6-diy, etc. "C<sub>2</sub>-6 alkynyl" means a straight or branched carbon chain having at least one carbon-carbon triple bond, and from two to six carbon atoms; examples include ethynyl, propynyl, butynyl, and hexynyl.

The term "cycloalkyl" herein alone or as part of another group is a specie of alkyl containing from 3 to 15 carbon atoms, without alternating or resonating double bonds between carbon atoms. It may contain from 1 to 4 rings. Exemplary unsubstituted such groups include cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, cyclohexyl, adamantyl, etc. Exemplary substituents include one or more of the following groups: halogen, alkyl, alkoxy, alkyl hydroxy, amino, nitro, cyano, thiol and/or alkylthio.

The terms "alkoxy" or "alkylthio" herein alone or as part of another group denote an alkyl group as described above bonded through an oxygen linkage (-O-) or a sulfur linkage (-S-), respectively.

The term "alkyloxycarbonyl" herein alone or as part of another group denotes an alkoxy group bonded through a carbonyl group. An alkoxy carbonyl radical is represented by the formula: -C(O)OR, where the R group is a straight or branched C<sub>1</sub>-6 alkyl group.

The term "alkylcarbonyl" herein alone or as part of another group refers to an alkyl group bonded through a carbonyl group.

The term "alkylcarbonyloxy" herein alone or as part of another group denotes an alkylcarbonyl group which is bonded through an oxygen linkage.

The term "arylalkyl" herein alone or as part of another group denotes an aromatic ring bonded to an alkyl group as described above.

The term "aryl" herein alone or as part of another group refers to monocyclic or bicyclic aromatic rings, e.g. phenyl, substituted phenyl and the like, as well as groups which are fused, e.g., napthyl, phenanthrenyl and the like. An aryl group thus contains at least one ring having at least 6 atoms, with up to five such rings being present, containing up to 22 atoms therein, with alternating (resonating) double bonds between adjacent carbon atoms or suitable heteroatoms. Aryl groups may optionally

WO 02/078639

PCT/US02/09817

be substituted with one or more groups including, but not limited to halogen, alkyl, alkoxy, hydroxy, carboxy, carbamoyl, alkyloxycarbonyl, nitro, trifluoromethyl, amino, cycloalkyl, cyano, alkyl S(O)<sub>m</sub> (m=0, 1, 2), or thiol.

- The term "carbocyclic ring" herein alone or as part of another group refers to
- 5 stable, saturated or partially unsaturated monocyclic ring hydrocarbyls of 3 to 7 carbon atoms such as cyclopropyl, cyclobutyl, cyclopentyl, cyclohexyl and cycloheptyl. The carbocyclic ring may be optionally substituted meaning that the carbocyclic ring may be substituted at one or more substitutable ring positions by one or more groups independently selected from alkyl (preferably lower alkyl), alkoxy (preferably lower alkoxy), nitro, monoalkylamino (preferably a lower alkylamino), dialkylamino (preferably a di[lower]alkylamino), cyano, halo, haloalkyl (preferably trifluoromethyl), alkanoyl, aminocarbonyl, monoalkylaminocarbonyl, dialkylaminocarbonyl, alkyl amido (preferably lower alkyl amido), alkoxyalkyl (preferably a lower alkoxy[lower]alkyl), alkoxy carbonyl (preferably a lower alkoxy carbonyl), alkylcarbonyloxy (preferably a lower alkylcarbonyloxy) and aryl (preferably phenyl), said aryl being optionally substituted by halo, lower alkyl and lower alkoxy groups.

- The term "cycloalkyl" herein alone or as part of another group refers to fully saturated and partially unsaturated hydrocarbon rings of 3 to 9, preferably 3 to 7 carbon atoms. Further, a cycloalkyl may be substituted. A substituted cycloalkyl refers to such rings having one, two, or three substituents, preferably one, selected from the group consisting of halo, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, alkynyl, nitro, cyano, oxo (=O), hydroxy, alkoxy, thioalkyl, -CO<sub>2</sub>H, -C(=O)H, CO<sub>2</sub>-alkyl, -C(=O)alkyl, keto, =N-OH, =N-O-alkyl, aryl, heteroaryl, heterocyclo, a five or six membered ketal (*i.e.* 1,3-dioxolane or 1,3-dioxane), -NR'R'', -C(=O)NR'R'', -CO<sub>2</sub>NR'R'', -C(=O)NR'R'', -NR'CO<sub>2</sub>R'', -NR'C(=O)R'', -SO<sub>2</sub>NR'R'', and -NR'SO<sub>2</sub>R'', wherein each of R' and R'' is independently selected from hydrogen, alkyl, substituted alkyl, and cycloalkyl, or R' and R'' together form a heterocyclo or heteroaryl ring.

- 30 The term "heteroaryl" herein alone or as part of another group refers to substituted and unsubstituted aromatic 5 or 6 membered monocyclic groups, 9 or 10 membered bicyclic groups, and 11 to 14 membered tricyclic groups which have at

WO 02/078639

PCT/US02/09817

- least one heteroatom (O, S or N) in at least one of the rings. Each ring of the heteroaryl group containing a heteroatom can contain one or two oxygen or sulfur atoms and/or from one to four nitrogen atoms provided that the total number of heteroatoms in each ring is four or less and each ring has at least one carbon atom.
- 5 The fused rings completing the bicyclic and tricyclic groups may contain only carbon atoms and may be saturated, partially saturated, or unsaturated. The nitrogen and sulfur atoms may optionally be oxidized and the nitrogen atoms may optionally be quaternized. Heteroaryl groups which are bicyclic or tricyclic must include at least one fully aromatic ring but the other fused ring or rings may be aromatic or non-
- 10 aromatic. The heteroaryl group may be attached at any available nitrogen or carbon atom of any ring. The heteroaryl ring system may contain zero, one, two or three substituents selected from the group consisting of halo, alkyl, substituted alkyl, alkenyl, alkynyl, nitro, cyano, hydroxy, alkoxy, thioalkyl, -CO<sub>2</sub>H, -C(=O)H, -CO<sub>2</sub>-alkyl, -C(=O)alkyl, phenyl, benzyl, phenylethyl, phenyloxy, phenylthio, cycloalkyl,
- 15 substituted cycloalkyl, heterocyclo, heteroaryl, -NR'R'', -C(=O)NR'R'', -CO<sub>2</sub>NR'R'', -C(=O)NR'R'', -NR'CO<sub>2</sub>R'', -NR'C(=O)R'', -SO<sub>2</sub>NR'R'', and -NR'SO<sub>2</sub>R'', wherein each of R' and R'' is independently selected from hydrogen, alkyl, substituted alkyl, and cycloalkyl, or R' and R'' together form a heterocyclo or heteroaryl ring.

Exemplary monocyclic heteroaryl groups include pyrrolyl, pyrazolyl,  
 20 pyrazolinyl, imidazolyl, oxazolyl, isoxazolyl, thiazolyl, thiadiazolyl, isothiazolyl, furanyl, thienyl, oxadiazolyl, pyridyl, pyrazinyl, pyrimidinyl, pyridazinyl, triazinyl and the like.

Exemplary bicyclic heteroaryl groups include indolyl, benzothiazolyl,  
 benzodioxolyl, benzoxaxolyl, benzothienyl, quinolinyl, tetrahydroisoquinolinyl,  
 25 isoquinolinyl, benzimidazolyl, benzopyranyl, indolizinyl, benzofuranyl, chromonyl, coumarinyl, benzopyranyl, cinnolinyl, quinoxalinyl, indazolyl, pyrrolopyridyl, furopyridinyl, dihydroisoindolyl, tetrahydroquinolinyl and the like.

Exemplary tricyclic heteroaryl groups include carbazolyl, benzidolyl,  
 phenanthrrollinyl, acridinyl, phenanthridinyl, xanthenyl and the like.  
 30

The term "heterocycloalkyl" herein alone or as part of another group refers to a cycloalkyl group (nonaromatic) in which one of the carbon atoms in the ring is

WO 02/078639

PCT/US02/09817

replaced by a heteroatom selected from O, S or N, and in which up to three additional carbon atoms may be replaced by said heteroatoms.

The term "heterocyclic ring" herein alone or as part of another group refers to a stable, saturated, or partially unsaturated monocyclic ring system containing

- 5 5 to 7 ring members of carbon atoms and other atoms selected from nitrogen, sulfur and/or oxygen. Preferably, a heterocyclyl is a 5 or 6-membered monocyclic ring and contains one, two, or three heteroatoms selected from nitrogen, oxygen and/or sulfur. The heterocyclic ring may be optionally substituted which means that the heterocyclic ring may be substituted at one or more substitutable ring positions by one or more
- 10 groups independently selected from alkyl (preferably lower alkyl), alkoxy (preferably lower alkoxy), nitro, monoalkylamino (preferably a lower alkylamino), dialkylamino (preferably a di[lower]alkylamino), cyano, halo, haloalkyl (preferably trifluoromethyl), alkanoyl, aminocarbonyl, monoalkylaminocarbonyl, dialkylaminocarbonyl, alkyl amido (preferably lower alkyl amido), alkoxyalkyl
- 15 (preferably a lower alkoxy[lower]alkyl), alkoxy carbonyl (preferably a lower alkoxy carbonyl), alkyl carbonyloxy (preferably a lower alkyl carbonyloxy) and aryl (preferably phenyl), said aryl being optionally substituted by halo, lower alkyl and lower alkoxy groups. Examples of such heterocyclic rings are isoxazolyl, imidazolyl, thiazolyl, imidazolidinyl, pyrrolyl, pyrrolinyl, pyranyl, pyrazinyl,
- 20 piperidyl, morpholinyl and triazolyl. The heterocyclic ring may be attached to the parent structure through a carbon atom or through any heteroatom of the heterocyclyl that results in a stable structure.

- The term "heterocyclyl" herein alone or as part of another group as used herein refers to a stable, saturated, or partially unsaturated, monocyclic, bridged monocyclic, bicyclic, and spiro ring system containing carbon atoms and other atoms selected from nitrogen, sulfur and/or oxygen. Preferably, a heterocyclyl is a 5 or 6-membered monocyclic ring or an 8-11 membered bicyclic ring which consists of carbon atoms and contains one, two, or three heteroatoms selected from nitrogen, oxygen and/or sulfur. The term "optionally substituted" as it refers to "heterocyclyl" herein indicates that the heterocyclyl group may be substituted at one or more substitutable ring positions by one or more groups independently selected from alkyl (preferably lower alkyl), alkoxy (preferably lower alkoxy), nitro, monoalkylamino (preferably a lower

WO 02/078639

PCT/US02/09817

- alkylamino), dialkylamino (preferably a di[lower]alkylamino), cyano, halo, haloalkyl (preferably trifluoromethyl), alkanoyl, aminocarbonyl, monoalkylaminocarbonyl, dialkylaminocarbonyl, alkyl amido (preferably lower alkyl amido), alkoxyalkyl (preferably a lower alkoxy[lower]alkyl), alkoxycarbonyl (preferably a lower alkoxy carbonyl), alkylcarbonyloxy (preferably a lower alkylcarbonyloxy) and aryl (preferably phenyl), said aryl being optionally substituted by halo, lower alkyl and lower alkoxy groups. Examples of such heterocycl groups are isoxazolyl, imidazolinyl, thiazolinyl, imidazolidinyl, pyrrolyl, pyrrolinyl, pyranyl, pyrazinyl, piperidyl, morpholinyl and triazolyl. The heterocycl group may be attached to the parent structure through a carbon atom or through any heteroatom of the heterocycl that results in a stable structure.

The term "heteroatom" means O, S or N, selected on an independent basis. It should be noted that any heteroatom with unsatisfied valences is assumed to have the hydrogen atom to satisfy the valences.

- 15 The term "halogen" or "halo" refers to chlorine, bromine, fluorine or iodine selected on an independent basis.

The term "amino" herein alone or as part of another group refers to -NH<sub>2</sub>. An "amino" may optionally be substituted with one or two substituents, which may be the same or different, such as alkyl, aryl, arylalkyl, alkenyl, alkynyl, heteroaryl, heteroarylalkyl, cycloheteroalkyl, cycloheteroalkylalkyl, cycloalkyl, cycloalkylalkyl, haloalkyl, hydroxyalkyl, alkoxyalkyl, thioalkyl, carbonyl or carboxyl. These substituents may be further substituted with a carboxylic acid, any of the alkyl or aryl substituents set out herein. In some embodiments, the amino groups are substituted with carboxyl or carbonyl to form N-acyl or N-carbamoyl derivatives

- 20 25 When a functional group is termed "protected", this means that the group is in modified form to preclude undesired side reactions at the protected site. Suitable protecting groups for the compounds of the present invention will be recognized from the present application taking into account the level of skill in the art, and with reference to standard textbooks, such as Greene, T. W. et al., *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley, N.Y. (1991).

WO 02/078639

PCT/US02/09817

As used herein, the phrase "radiation therapy" includes, but is not limited to, x-rays or gamma rays which are delivered from either an externally applied source such as a beam or by implantation of small radioactive sources.

As used herein, the phrase "antineoplastic agent" refers to compounds which prevent cancer cells from multiplying. In general, the antineoplastic agents of this invention prevent cancer cells from multiplying by: (1) interfering with the cell's ability to replicate DNA, or (2) inducing apoptosis in the cancerous cells.

As used herein, the term "patient" encompasses all mammalian species.

Suitable examples of salts of the compounds used in the methods of the invention with inorganic or organic acids are hydrochloride, hydrobromide, sulfate, methanesulfonate, maleate, fumarate, and phosphate. Salts which are unsuitable for pharmaceutical uses but which can be employed, for example, for the isolation or purification of free compounds I or their pharmaceutically acceptable salts, are also included.

All stereoisomers of the compounds of the instant invention are contemplated, either in admixture or in pure or substantially pure form. The definition of the compounds according to the invention embraces all possible stereoisomers and their mixtures. It very particularly embraces the racemic forms and the isolated optical isomers having the specified activity. The racemic forms can be resolved by physical methods, such as, for example, fractional crystallization, separation or crystallization of diastereomeric derivatives or separation by chiral column chromatography. The individual optical isomers can be obtained from the racemates by conventional methods, such as, for example, salt formation with an optically active acid followed by crystallization.

It should be understood that the present invention includes prodrug forms of the compounds of formula I. Various forms of prodrugs are well known in the art. For examples of such prodrug derivatives, see:

(a) Design of Prodrugs, edited by H. Bundgaard (Elsevier, 1985); and Methods in Enzymology, Vol. 42, pp. 309-396, edited by K. Widder et al., (Academic Press, 1985);

(b) A Textbook of Drug Design and Development, edited by Krosgaard-Larsen and H. Bundgaard, Chapter 5, "Design and

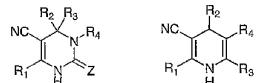
WO 02/078639

PCT/US02/09817

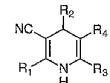
- Application of Prodrugs," by H. Bundgaard, pp. 113-191 (1991);  
 (c) H. Bundgaard, Advanced Drug Deliver Reviews, 8, pp. 1-38 (1992);  
 (d) H. Bundgaard et al., Journal of Pharmaceutical Sciences, 77, 285 (1988); and  
 (e) N. Kayeka et al., Chem. Phar. Bull., 32, 692 (1984).
- 5 The present invention relates to a method of treating a condition via modulation of the Eg5 protein activity comprising administering to a mammalian species in need of such treatment an effective amount at least one small molecule Eg5 protein inhibitor. The invention also provides a method for treating a condition via modulation of the Eg5 protein activity comprising administering to a mammalian species in need of such  
 10 treatment a combination (simultaneous or sequential) of at least one antineoplastic agent and at least one small molecule Eg5 protein inhibitor. In a preferred embodiment, the condition treated is a proliferative disease such as cancer. Any compounds that act as antineoplastic agents and any small molecule which modulates the Eg5 protein sufficiently to induce mitotic arrest and apoptosis can be used in the  
 15 instant invention. Monastrol has not been shown to induce apoptosis and is not included within the scope of this invention. In addition, the instant invention does not include antisense oligonucleotides designed from the HsEg5 gene sequence.

The small molecule Eg5 motor protein inhibitor can be any compound, such as those described in the U.S. Patent Application that was filed on March 22, 2002 with  
 20 the attorney docket number LD 0300, entitled "Cyano-substituted Dihydropyrimidine Compounds and their Use to Treat Diseases" (serial number to be determined), the disclosure of which is herein incorporated by reference, or pharmaceutically acceptable salts thereof, that has shown efficacy in treating cancer through the induction of mitotic arrest and apoptosis, or the potential to treat cancer through the  
 25 induction of mitotic arrest and apoptosis. Preferred compounds used in the methods of the instant invention include compounds having formulae I, IIa, or IIIa, shown below.

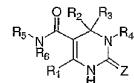
30



I



IIA



IIIa

II

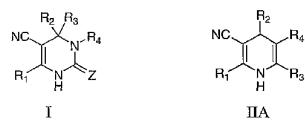
WO 02/078639

PCT/US02/09817

- their enantiomers, diastereomers, pharmaceutically acceptable salts, prodrugs and solvates thereof wherein R<sub>1</sub> is hydrogen, alkyl or cycloalkyl; R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub> are each independently H, alkyl, aryl, heteroaryl, arylalkyl, cycloalkylalkyl,
- 5 heterocycloalkylalkyl or heteroarylalkyl. Alternatively, R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub> may be taken together to form a either a carbocyclic or heterocyclic ring. R<sub>4</sub> is alkyl, arylalkyl, cycloalkylalkyl, heteroarylalkyl, heterocycloalkylalkyl, CN, COR<sub>5</sub>, CO<sub>2</sub>R<sub>5</sub> or CONR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>. R<sub>5</sub> and R<sub>6</sub> are each independently H, alkyl, arylalkyl, cycloalkylalkyl, heteroarylalkyl or heterocycloalkylalkyl. Z is O, S or NR<sub>8</sub>; R<sub>8</sub> is H, CN,
- 10 sulfonamido, OR<sub>7</sub>, alkyl, cycloalkyl, aryl, arylalkyl, heterocyclyl, heteroaryl or heteroarylalkyl. R<sub>7</sub> is H, alkyl, arylalkyl, cycloalkylalkyl, heterocycloalkylalkyl, or heteroarylalkyl.

In a preferred embodiment, the small molecules used in the methods of the instant invention comprise compounds of formula I or II A

15



- One preferred embodiment of the instant invention are compounds of formula
- 20 I or II A wherein R<sub>1</sub> is alkyl; R<sub>2</sub> is selected from the group consisting of aryl and heteroaryl; R<sub>3</sub> is H; R<sub>4</sub> is selected from the group consisting of alkyl, arylalkyl, CO<sub>2</sub>R<sub>5</sub>, and CONR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>; R<sub>5</sub> and R<sub>6</sub> are independently selected from the group consisting of H, alkyl and arylalkyl; Z is selected from the group consisting of O, S, and NR<sub>8</sub>; and R<sub>8</sub> is selected from the group consisting of H and CN.

- 25 In another preferred embodiment, the invention comprises compounds of formula I or II A as defined above, wherein R<sub>4</sub> is selected from the group consisting of alkyl, arylalkyl, CO<sub>2</sub>R<sub>5</sub>, and CONR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>.

- In yet another preferred embodiment, the instant invention comprises the
- 30 compounds of formula I or II A, as defined above, wherein R<sub>4</sub> is CO<sub>2</sub>R<sub>5</sub> or CONR<sub>5</sub>R<sub>6</sub> and Z is O.

WO 02/078639

PCT/US02/09817

In yet a further preferred embodiment, the instant invention comprises the compounds of formula I or II<sub>A</sub>, as defined above, wherein R<sub>4</sub> is selected from the group consisting of alkyl and arylalkyl, and Z is O.

In still yet another preferred embodiment, the instant invention comprises the 5 compounds of formula I or II<sub>A</sub>, as defined above, wherein R<sub>1</sub> is CH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub> is aryl; R<sub>4</sub> is CO<sub>2</sub>R<sub>5</sub>; R<sub>5</sub> is alkyl; and Z is O.

In still yet another preferred embodiment, the instant invention comprises the compounds of formula I or II<sub>A</sub>, as defined above, wherein R<sub>1</sub> is CH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub> is aryl; R<sub>4</sub> is CONR<sub>3</sub>R<sub>6</sub>; R<sub>5</sub> is alkyl, R<sub>6</sub> is H; and Z is O.

10 When the invention employs combination (administered together or sequentially) therapy, the small molecule Eg5 protein inhibitor may be used with known anti-cancer treatments such as radiation therapy or with cytostatic or cytotoxic agents, such as for example, but not limited to, DNA interactive agents, such as cisplatin or doxorubicin; topoisomerase II inhibitors, such as etoposide; 15 topoisomerase I inhibitors such as CPT-11 or topotecan; tubulin interacting agents, such as paclitaxel, docetaxel or the epothilones; hormonal agents, such as tamoxifen or Casodex; thymidilate synthase inhibitors, such as 5-fluorouracil; inhibitors of farnesyltransferase, such as BMS-214662; inhibitors of cyclin dependent kinases such as flavopiridol, and anti-metabolites, such as methotrexate.

20 Furthermore, combination therapy may include the small molecule Eg5 inhibitor formulated in a fixed dose with the other anti-cancer agent(s). If formulated as a fixed dose, such combination products employ the compounds of this invention within the effective dosage range and the other pharmaceutically active agent or treatment within its approved dosage range. Compounds used in the methods of the 25 instant invention may also be administered sequentially with known anticancer or cytotoxic agents when a combination formulation is inappropriate. The invention is not limited in the sequence of administration; small molecule Eg5 protein inhibitor(s) may be administered either prior to or after administration of the known anticancer or cytotoxic agent(s).

30 When combination therapy is employed, it is anticipated that the therapeutic effect of the instant invention may be achieved with smaller amounts of the antineoplastic agents and Eg5 protein inhibitors than would be required if such

WO 02/078639

PCT/US02/09817

antineoplastic agents and Eg5 inhibitors were administered alone, thereby avoiding or minimizing adverse toxicity effects.

As discussed in the background section, Eg5 is a kinesin-like motor protein that facilitates spindle bipolarity during mitosis of the cell cycle. More specifically, 5 the Eg5 protein may act to sort and bundle microtubules of the mitotic spindle during mitosis. Accordingly, Eg5 participates in cell cycle regulation through the spindle checkpoint during the M phase of the cycle. While not wishing to be bound by any theory, it is believed that the compounds used in the methods of the instant invention act as Eg5 inhibitors. The compounds use in the methods of the instant invention are 10 contemplated to also inhibit other motor proteins, for example, including but not limited to, those human motor proteins that correspond to, Xklp2, MKLP1, CHO1, chromokinesins, Nod, Cenp-E, and MCAK, members of the BimC family, and members of the Kar3 family. Thus, the invention also provides a method for treating a condition, including proliferative diseases such as cancer, via modulation of motor 15 proteins that correspond to: Xklp2, MKLP1, CHO1, chromokinesins, Nod, Cenp-E, and MCAK, members of the BimC family, and members of the Kar3 family comprising administering to mammalian species in need of such therapy an effective amount of at least one small molecule inhibitor of said motor proteins and may optionally be used in combination with other anti-cancer agents. Additionally, 20 compounds used in the methods of the instant invention are also envisioned to act as inhibitors of other kinesin or kinesin-like proteins and thus be effective in the treatment of diseases associated with other kinesin or kinesin-like proteins. Hence the invention further provides a method for treating a condition, including proliferative diseases such as cancer, via modulation of kinesin or kinesin-like protein(s) 25 comprising administering to a mammalian species in need of such therapy an effective amount of at least one small molecule kinesin or kinesin-like protein inhibitor and may optionally be used in combination with other anti-cancer agents.

The compound(s) used in the methods of the invention causes disruption of the bipolar spindle, initiates the spindle checkpoint, induces mitotic arrest, induces 30 programmed cell death and inhibits tumor cell proliferation.

In contrast to agents such as retinoic acid and monastrol which have been reported to induce a transient arrest in mitosis through the modulation of Eg5

WO 02/078639

PCT/US02/09817

expression or activity, respectively, the small molecule(s) used in the methods of the instant invention, through inhibition of Eg5 motor protein activity, induces a cell cycle arrest in mitosis that is not transient but rather which progresses into programmed cell death. Furthermore, compounds used in the instant invention 5 exhibit high potency, induce mitotic arrest and apoptosis in human cells *in vitro*, preferable compounds do so at concentrations at or less than about 10 µM.

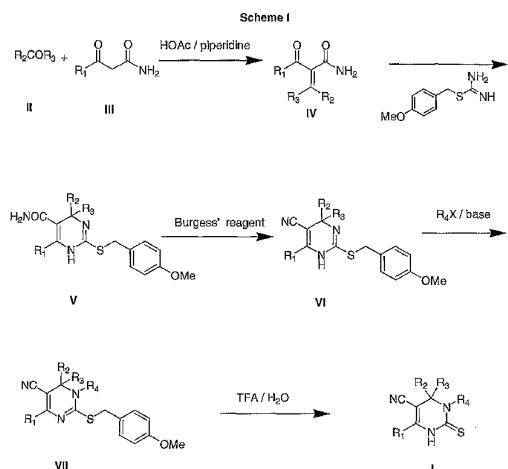
In contrast to agents such as retinoic acid which exert pleiotrophic effects upon cells, the small molecule compounds of the instant invention do not directly modulate the gene expression of numerous regulatory genes.

10 In contrast to microtubule agents, the instant invention does not disrupt the dynamic instability of microtubules. The instant invention, through inhibition of the Eg5 motor protein, may therefore more specifically target the mitotic spindle of proliferating cells, which may provide for different toxicity profiles than those of existing anti-cancer drugs.

15 Certain compounds of the present invention may generally be prepared according to the following schemes and the knowledge of one skilled in the art. Solvates (e.g., hydrates) of the compounds of the instant invention are also within the scope of the present invention. Methods of solvation are generally known in the art. Accordingly, the compounds of the instant invention may be in the free or hydrate form, and may be obtained by methods exemplified by the following schemes below.

WO 02/078639

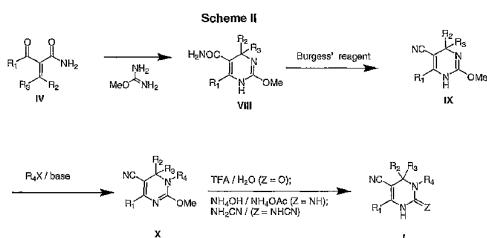
PCT/US02/09817



Compounds of formula I where Z is S may be made in accordance with Scheme I. A ketone or an aldehyde I (e.g., benzaldehyde, where  $R_2$  is phenyl and  $R_3$  is H), is condensed with an acetoacetamide III to give a Knoevenagel product IV as a mixture of isomers. Reaction with S-paramethoxybenzyl thiourea provides the protected dihydropyrimidine thione V. The primary amino group of V is dehydrated to the cyano substituent in VI using a dehydrating agent such as Burgess' reagent (methoxycarbonylsulfazoyl)triethylammonium hydroxide, inner salt. The N3 substituent is introduced by reaction with  $R_4X$  where  $R_4$  is alkyl or acyl, and X is a leaving group, or where  $R_4X$  is an isocyanate or haloformate. The protecting group is removed by treatment with acid in the presence of water to give compounds of formula I where Z is S.

WO 02/078639

PCT/US02/09817



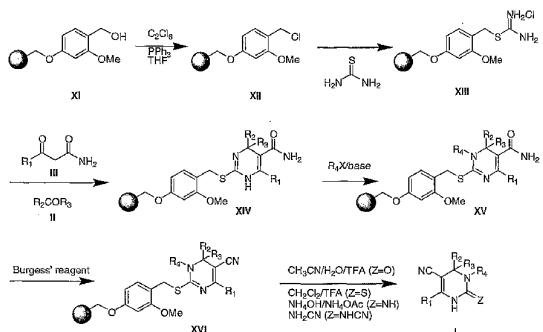
Compounds of formula I where Z is O, NH, or NR<sub>3</sub> are prepared from the reaction of Knoevenagel products IV with O-methyl isourea to provide the O-methyl dihydropyrimidines VII. The primary amide is converted to a nitrile group using a dehydrating agent such as Burgess' reagent. The N3 substituent is introduced by reaction with R<sub>4</sub>X where R<sub>4</sub> is alkyl or acyl, and X is a leaving group, or where R<sub>4</sub>X is an isocyanate or haloformate. The methyl ether protecting group is removed by treatment with acid in the presence of water to give compounds of formula I where Z is O. Alternatively, treatment of compounds of formula X with ammonium hydroxide in the presence of ammonium acetate, or cyanamide in ethanol, provides compounds of formula I where Z is NH or NR<sub>3</sub>.

Compounds of formula I may also be prepared using the Bignelli reaction (D. J. Brown in *The Pyrimidines*, Wiley: New York, 1962, 440).

WO 02/078639

PCT/US02/09817

**Scheme III**  
**SOLID PHASE SYNTHESIS**



Compounds of formula I could be prepared on solid support as outlined in Scheme III. Starting compound XI denotes a resin-bound benzyl alcohol used for solid support synthesis which is prepared from a Merrifield resin denoted as  $\bullet$ , and 2-methoxy-4-hydroxybenzaldehyde, followed by reduction of the aldehyde with reducing agents such as NaBH<sub>4</sub>. The benzyl alcohol is converted into the benzyl chloride using agents such as hexachloroethane and triphenylphosphine in THF to form resins of formula XII. The chloride is displaced with thiourea to form the isothiourea resin XIII. The resulting resin is treated with excess of ketoamides like acetoamide (III, R<sub>1</sub> is CH<sub>3</sub>), in the presence of ketones of formula R<sub>2</sub>COR<sub>3</sub> or aldehydes of formula R<sub>2</sub>CHO to form the resin-bound pyrimidinethiones of formula XIV. The N3 substituent is introduced using R<sub>4</sub>X, where X is a leaving group and R<sub>4</sub> is alkyl or acyl, or R<sub>4</sub>X is an isocyanate, or haloformate, in the presence of base to form structures of formula XV. The primary amide can be dehydrated to the cyano group using reagents such as Burgess' reagent to form compounds of formula XVI. The products can be cleaved from the resin using a variety of conditions to form compounds of formula I, where Z is determined by the cleavage method employed. Cleavage in the presence of aqueous acid will form compounds of formula I with Z being O, whereas cleavage under anhydrous acid conditions will form compounds of

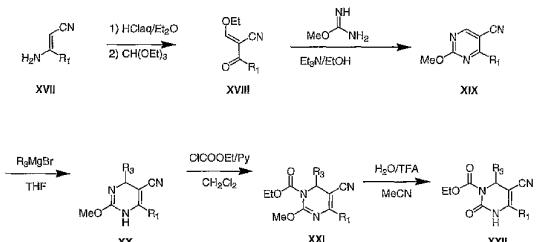
WO 02/078639

PCT/US02/09817

formula I with Z being S. Alternatively, treatment of resins with structure XVI with ammonium hydroxide in the presence of ammonium acetate will form compounds of formula I with Z being NH, while treatment with cyanamide, provides compounds of formula I with Z being NHICN.

5

SCHEME IV



- Compounds of formula XVIII may be prepared from a 3-amino-3-alkyl acrylonitrile XVII using the methods illustrated in Scheme IV. Reaction of a compound of formula XVII with aqueous acid, such as hydrochloric acid, followed by treatment with triethyl orthoformate, provides a compound of formula XVIII. Reaction of a compound of formula XVIII with O-methyl isourea in the presence of a base such as triethylamine, provides a pyrimidine of formula XIX. Pyrimidines of formula XIX may be reacted with organometallic species such as a Grignard reagent, R<sub>3</sub>MgBr, in a solvent such as ether or tetrahydrofuran, to give a pyrimidine of formula XX, which is a compound of formula IX wherein R<sub>2</sub> is H. In analogy with Scheme II, a compound of formula XX may be converted into a compound of formula XXII, which is a compound of formula I in which R<sub>4</sub> is ethoxycarbonyl and R<sub>2</sub> is H.

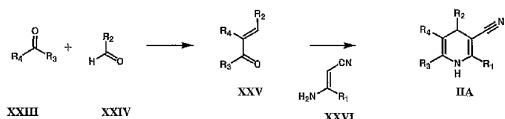
In all of the above schema, a 2-acyl acetonitrile derivative, i.e., R<sub>1</sub>COCH<sub>2</sub>CN, 10 may be substituted for a compound of formula III.

Dihydropyridine analogues of formula IIA may be prepared following the general process described in Scheme V.

WO 02/078639

PCT/US02/09817

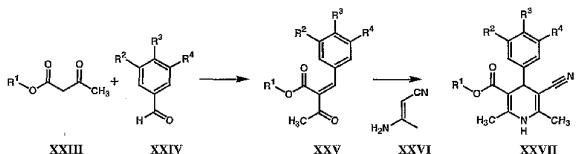
Scheme V



Thus, suitable dihydropyridine derivatives of formula IIA can be synthesized by the condensation of acetates of structure XXIII with aldehydes of structure XXIV using either acetic acid and pyridine with azeotropic removal of water (*Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 2423-31) or bismuth trichloride (*Chem. Lett.* **1992**, *10*, 1945-6) to form the compounds of structure XXV. These compounds (XXV) undergo condensation with 3-aminocrotononitrile (XXVI) upon heating in ethanol to produce the dihydropyridines of structure IIA in high yield.

More specifically, a compound having formula IIA (XXVII) can be obtained by Scheme VI:

Scheme VI



The condensation of acetoacetates of structure XXIII with aldehydes of structure XXIV using either acetic acid and pyridine with azeotropic removal of water (*Chem. Pharm. Bull.* **1992**, *40*, 2423-31) or bismuth trichloride (*Chem. Lett.* **1992**, *10*, 1945-6) to form the benzylidene compounds of structure XXV. These benzylidenes (XXV) undergo condensation with 3-aminocrotononitrile (XXVI) upon heating in ethanol to produce the dihydropyridines of structure XXVII in high yield.

The compounds according to the invention have pharmacological properties; in particular, the small molecules used in the methods of the instant invention induce

WO 02/078639

PCT/US02/09817

mitotic arrest and are believed to be Eg5 inhibitors. The novel compounds of the instant invention are thus useful in the therapy of a variety of proliferative diseases (including but not limited to diseases that could be treated via modulation of the Eg5 motor protein activity) such as cancer, autoimmune diseases, viral diseases, fungal diseases, neurodegenerative disorders and cardiovascular disease.

5 The present invention provides methods for the treatment of a variety of cancers, including, but not limited to, the following:

- 10 1. carcinoma including that of the bladder, breast, colon, kidney, liver, lung (including small cell lung cancer), ovary, prostate, testes, pancreas, esophagus, stomach, gall bladder, cervix, thyroid, and skin (including squamous cell carcinoma);
- 15 2. hematopoietic tumors of lymphoid lineage including leukemia, acute lymphocytic leukemia, acute lymphoblastic leukemia, B-cell lymphoma, T-cell lymphoma, Hodgkins lymphoma, non-Hodgkins lymphoma, hairy cell lymphoma, and Burkitts lymphoma;
- 20 3. hematopoietic tumors of myeloid lineage including acute and chronic myelogenous leukemias, myelodysplastic syndrome, and promyelocytic leukemia;
- 25 4. tumors of the central and peripheral nervous system including astrocytoma, neuroblastoma, glioma, and schwannomas;
5. tumors of mesenchymal origin including fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma, and osteosarcoma; and
6. other tumors including melanoma, xeroderma pigmentosum, keratoactanthoma, seminoma, thyroid follicular cancer, and teratocarcinoma.

In a preferred embodiment of this invention, the method of the present invention is used for the treatment of cancerous tumors. Advantageously, the method of this invention reduces the development of tumors, reduces tumor burden, or produces tumor regression in a mammalian host.

- 30 30 Antineoplastic agents which are suitable for use in the methods and compositions of this invention include, but are not limited to, microtubule-stabilizing agents such as paclitaxel (also known as Taxol®), docetaxel (also known as

WO 02/078639

PCT/US02/09817

Taxotere®), 7-O-methylthiomethylpaclitaxel (disclosed in U.S. 5,646,176, herein incorporated by reference), 3'-*tert*-butyl-3'-N-*tert*-butyloxycarbonyl-4-deacetyl-3'-dephenyl-3'-N-debenzoyl-4-O-methoxycarbonyl-paclitaxel (disclosed co-pending US Application Serial No. 60/179,965 filed on February 3, 2000, herein incorporated by reference), C-4 methyl carbonate paclitaxel (disclosed in WO 94/14787, herein incorporated by reference), epothilone A, epothilone B, epothilone C, epothilone D, desoxyepothilone A, desoxyepothilone B, [1S-[1R\*,3R\*(E),7R\*,10S\*,11R\*,12R\*,16S\*]]-7-11-dihydroxy-8,8,10,12,16-pentamethyl-3-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-4-aza-17-oxabicyclo[14.1.0]heptadecane-5,9-dione (disclosed in co-pending US Application Serial No. 09/506,481 filed on February 17, 2000, herein incorporated by reference), and derivatives thereof; microtubule-disruptor agents; inhibitors of cyclin dependent kinases (including those disclosed in U.S. Patent 6,040,321, herein incorporated by reference); inhibitors of farnesyltransferase; alkylating agents; anti-metabolites; epidophyllotoxin; an antineoplastic enzyme; a topoisomerase inhibitor; procarbazine; mitoxantrone; platinum coordination complexes; biological response modifiers; growth factor inhibitors; hormonal/antihormonal therapeutic agents; and haematopoietic growth factors.

Classes of antineoplastic agents suitable for use in the present invention include, but are not limited to, the anthracycline family of drugs, the vinca drugs, the mitomycins, the bleomycins, the cytotoxic nucleosides, the taxanes, the epothilones, discodermolide, the pteridine family of drugs, diynenes, aromatase inhibitors, and the podophyllotoxins. Particularly useful members of those classes include, for example, paclitaxel, docetaxel, 7-O-methylthiomethylpaclitaxel, 3'-*tert*-butyl-3'-N-*tert*-butyloxycarbonyl-4-deacetyl-3'-dephenyl-3'-N-debenzoyl-4-O-methoxycarbonyl-paclitaxel, C-4 methyl carbonate paclitaxel, epothilone A, epothilone B, epothilone C, epothilone D, desoxyepothilone A, desoxyepothilone B, [1S-[1R\*,3R\*(E),7R\*,10S\*,11R\*,12R\*,16S\*]]-7,11-dihydroxy-8,8,10,12,16-pentamethyl-3-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazolyl)ethenyl]-4-aza-17-oxabicyclo[14.1.0]heptadecane-5,9-dione, [1S-

WO 02/078639

PCT/US02/09817

- [1R\*,3R\*(E),7R\*,10S\*,11R\*,12R\*,16S\*]-3-[2-[2-(aminomethyl)-4-thiazoly]-1-methylethenyl]-7,11-dihydroxy-8,8,10,12,16-pentamethyl-4,17-dioxabicyclo[14.1.0]-heptadecane-5,9-dione, doxorubicin, carminomycin, daunorubicin, aminopterin, methotrexate, methoteparin, dichloro-methotrexate, mitomycin C, porfiromycin, 5-fluorouracil, 6-mercaptopurine, gemcitabine, cytosine arabinoside, podophyllotoxin or podophyllotoxin derivatives such as etoposide, etoposide phosphate or teniposide, melphalan, vinblastine, vincristine, leurosidine, vindesine, leurosine, and the like. Other useful antineoplastic agents include estramustine, cisplatin, carboplatin, cyclophosphamide, bleomycin, tamoxifen, ifosamide, melphalan, hexamethyl melamine, thiotepa, cytarabin, idarubicin, trimetrexate, dacarbazine, L-asparaginase, camptothecin, CPT-11, topotecan, ara-C, bicalutamide, flutamide, leuprolide, pyridobenzoindole derivatives, interferons, interleukins, and inhibitors of cyclin dependent kinases including, but not limited to, those in U.S. 6,040,321, herein incorporated by reference; and inhibitors of farnesyltransferase including, but not limited to, those in U.S. 6,011,029 herein incorporated by reference.

Preferred classes of antineoplastic agents are the taxanes and the epothilones, and the preferred antineoplastic agents are paclitaxel, docetaxel, 7-O-methylthiomethyl paclitaxel, 3'-*tert*-butyl-3'-N-*tert*-butyloxycarbonyl-4-deacetyl-3'-dephenyl-3'-N-debenzoyl-4-O-methoxycarbonyl-paclitaxel, C-4 methyl carbonate paclitaxel, epothilone A, epothilone B, epothilone C, epothilone D, desoxyepothilone A, desoxyepothilone B, [1S-[1R\*,3R\*(E),7R\*,10S\*,11R\*,12R\*,16S\*]-]7,11-dihydroxy-8,8,10,12,16-pentamethyl-3-[1-methyl-2-(2-methyl-4-thiazoly)ethenyl]-4-aza-17-oxabicyclo[14.1.0]heptadecane-5,9-dione, and [1S-[1R\*,3R\*(E),7R\*,10S\*,11R\*,12R\*,16S\*]-]3-[2-[2-(aminomethyl)-4-thiazoly]-1-methylethenyl]-7,11-dihydroxy-8,8,10,12,16-pentamethyl-4,17-dioxabicyclo[14.1.0]heptadecane-5,9-dione, the cyclin dependent kinase exemplified in U.S. 6,040,321; the farnesyltransferase inhibitors exemplified in U.S. 6,011,029 as well as (R)-7-cyano-2,3,4,5-tetrahydro-1-(1H-imidazol-4-ylmethyl)-3-(phenylmethyl)-4-(2-thienylsulfonyl)-1H-1,4-benzodiazepine, mesylate salt.

- The methods of the instant invention may employ pharmaceutical compositions which comprise at least one small molecule Eg5 protein inhibitor. Preferred compounds have formula I, IIa or IIIa, or the formula described in US

WO 02/078639

PCT/US02/09817

Serial No: to be determined, filed March 22, 2002, identified by attorney docket number LD 0300, and a pharmaceutically acceptable carrier and may additionally comprise at least one other antineoplastic agent. The compositions used in the methods of the present invention may further comprise one or more pharmaceutically acceptable additional ingredient(s) such as alum, stabilizers, antimicrobial agents, buffers, coloring agents, flavoring agents, and the like. The antineoplastic agents, small molecule Eg5 protein inhibitors, and compositions of the present invention may be administered orally or parenterally including the intravenous, intramuscular, intraperitoneal, subcutaneous, rectal and topical routes of administration.

For oral use, the antineoplastic agents, small molecule Eg5 protein inhibitors and compositions of this invention may be administered, for example, in the form of tablets or capsules, or as aqueous solutions or suspensions. In the case of tablets for oral use, carriers which are commonly used include lactose and corn starch, and lubricating agents such as magnesium stearate are commonly added. For oral administration in capsule form, useful carriers include lactose and corn starch. When aqueous suspensions are used for oral administration, emulsifying and/or suspending agents are commonly added. In addition, sweetening and/or flavoring agents may be added to the oral compositions. For intramuscular, intraperitoneal, subcutaneous and intravenous use, sterile solutions of the active ingredient(s) are usually employed, and the pH of the solutions should be suitably adjusted and buffered. For intravenous use, the total concentration of the solute(s) should be controlled in order to render the preparation isotonic.

The combinations of the present invention may also be used in conjunction with other well known therapies that are selected for their particular usefulness against the condition that is being treated. If formulated as a fixed dose, the active ingredients of the combination compositions of this invention are employed within effective dosage ranges. Alternatively, the antineoplastic agents and small molecules may be administered separately in the appropriate effective dosage ranges. In a preferred embodiment of the present invention, the antineoplastic agent is administered in the effective dosage range prior to administration of the compounds of the present invention in the effective dosage range.

WO 02/078639

PCT/US02/09817

The present invention encompasses a method for the treatment of cancer wherein at least one antineoplastic agent and at least one compound of the present invention is administered simultaneously or sequentially. Thus, while a pharmaceutical formulation comprising an antineoplastic agent and a compound of  
5 the present invention may be advantageous for administering the combination for one particular treatment, prior administration of the antineoplastic agent may be advantageous in another treatment. It is also understood that the instant combination of antineoplastic agent and small molecule Eg5 protein inhibitor may be used in conjunction with other methods of treating cancer (preferably cancerous tumors)  
10 including, but not limited to, radiation therapy and surgery.

Daily dosages for human administration of the antineoplastic agent, radiation therapy and small molecule Eg5 protein inhibitors will normally be determined by the prescribing physician with the dosages generally varying according to the age, weight, and response of the individual patient, as well as the severity of the patient's  
15 symptoms.

In order to facilitate a further understanding of the invention, the following assays and examples are presented primarily for the purpose of illustrating more specific details thereof. The scope of the invention should not be deemed limited by the examples, but encompass the entire subject matter defined by the claims.  
20

**ASSAYS**  
The pharmacological properties of the Eg5 inhibitors of this invention may be confirmed by a number of pharmacological assays. The exemplified pharmacological assays which follow have been carried out with the compounds according to the  
25 invention and their salts. The compounds of examples 1 to 32 exhibited antiproliferative activity.

**Cell Culture**  
Cell lines were maintained in RPMI-1640 plus 10% fetal bovine serum. Human cell  
30 lines used in one or more of the following assays described below included but were not limited to A2780 ovarian carcinoma, HCT116, colorectal carcinoma; HT-29, colorectal adenocarcinoma; SK-BR-3, mammary adenocarcinoma; Saos-2,

WO 02/078639

PCT/US02/09817

osteosacroma; PC-3, prostate adenocarcinoma; and LX-1, lung carcinoma. The kangaroo rat kidney epithelial cell line, PTK2, was also used.

72-Hour Proliferation Assay

- 5 Cells were plated at a density of about 3,000-6,000 cells/well, depending upon the cell line used, in a 96-well plate. The cultures were grown overnight. Cells were then treated in triplicate with a seven concentration dose-response curve. The maximum concentration of DMSO never exceeded 0.5%. Cells were exposed to compound for about 72 hours. Proliferation was measured using XTT or MTS from Promega.. The  
10 compounds having formulae I and IIA exhibited activity in the 72-hour cell proliferation assay, inhibiting cell proliferation with an IC<sub>50</sub> less than or equal to about 10 µM.

Clonogenic Growth Assay

- Colony growth inhibition was measured using a standard clonogenic assay. Briefly,  
15 about 200 cells/well were seeded into 6-well tissue culture plates (Falcon, Franklin Lakes, NJ) and allowed to attach for 18 hours. Assay medium consisted of RPMI-1640 plus 10% fetal bovine serum. Cells were then treated in duplicate with a six concentration dose-response curve. The maximum concentration of DMSO never exceeded 0.25%. Cells were exposed to compound for about 4 to 24 hours.  
20 Compound was then removed and the cells were washed with 2 volumes of PBS. The normal growth medium was then replaced. Colonies were fed with fresh media every third day. Colony number was scored on day 10-14 using a Optimax imaging station. The compound concentration required to inhibit 50% or 90% of colony formation (IC<sub>50</sub> or IC<sub>90</sub>, respectively) was determined by non-linear regression analysis. When  
25 exposed to cells for about 24 hours, the compounds of the present invention exhibited activity in the clonogenicity assay.

Combination Studies - Clonogenic Growth Assays

- Combination studies to examine the use of the Eg5 inhibitors of the present invention  
30 in combination with other antineoplastic agents were conducted essentially the same as the standard colony growth assay with the exception of compound treatment. In the combination studies, the cells were treated with both a compound of formula I and

WO 02/078639

PCT/US02/09817

another antineoplastic agent. The compounds were administered simultaneously or sequentially; both the order of sequence and length of treatment (about 1 to 24 hours) were varied. Data evaluation was based upon the isobologram analysis and the envelope of additivity, using the line of multiplicity which compares the survival fractions of combination treatments with those of single drug treatments.

Cell Cycle Analysis

The cell cycle profile of cells treated with compounds of the present invention was monitored by flow cytometry. Briefly, cells were seeded at a density of about 2 x 10<sup>5</sup> per well in standard 6 well culture plates and permitted to grow for about 17 hours. Cells were then exposed to compounds of the present invention at varying concentrations for about 2 to 24 hours. Following exposure, cell populations were harvested, stained with propidium iodide to determine DNA content and also stained with the appropriate immunological reagent for protein biomarkers of mitosis and apoptosis, including, but not limited to, for example, anti-phospho-ThreonineProline, anti-M Phase Phospoprotein 2 (MMP2), and anti-p85 PARP. The compounds of the present invention exhibited activity in the cell cycle profile analysis assay, producing significant increases in the mitotic and apoptotic fractions of the total cell population.

20 Immunocytochemistry Assays

Cells were plated at a density of 200 to 2000 cells per well in 4 chamber glass slides and allowed to attach overnight. Cells were then treated with compounds of the present invention at concentrations of 100 nM to 50  $\mu$ M for about 4 to 30 hours, fixed and permeabilized for subsequent staining. Stain reagents included, for example, propidium iodide, DAPI, rhodamine phalloidin, anti- $\alpha$ tubulin, anti- $\beta$ tubulin, anti- $\gamma$ tubulin, and the appropriate fluorescent-tagged secondary antibodies. Cells were imaged by fluorescent and confocal fluorescent microscopy. The compounds of the present invention inhibited bipolar spindle formation and induced a monoastral array of microtubules.

30

WO 02/078639

PCT/US02/09817

**Example 1****5-Cyano-3,6-dihydro-4-methyl-6-(3-nitrophenyl)-2-thioxo-1-(2H)-pyrimidinecarboxylic acid, 1-ethyl ester****A. Step 1**

- 5 A mixture of 6.42 g of acetoacetamide, 8.0 g of 3-nitrobenzaldehyde, 0.61 ml of acetic acid, and 0.21 ml of piperidine in 30 ml of toluene was heated to reflux. A Dean Stark trap was used to azeotrope the water produced. After refluxed for 2 h, the reaction mixture was cooled to room temperature, with a lot of solid appeared, it was treated with a solution of 300 ml of EtOAc and 25 ml MeOH, the solid was then  
10 filtered off, rinsed with 15 ml of EtOAc twice to give 3.1 g of desired product in 25% yield.

**B. Step 2**

- A mixture of 200 mg of the compound of Example 1, Step 1, 198 mg of 2-(4-methoxybenzyl)-2-thiopseudourea HCl salt, 84 mg of sodium acetate in 3.6 ml DMF  
15 was heated at 85 °C for 15 h, then cooled to room temperature. The resulting reaction mixture was purified by preparative HPLC using a (YMC S5 ODS 20 X 100 mm) column, the desired fraction was concentrated to dryness. Saturated NaHCO<sub>3</sub> (50 ml) was added and extracted with EtOAc (3 x 50 ml), combined EtOAc extracts were  
20 washed with 30 ml of brine, dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under vacuum to give 126.1 mg desired product in 36% yield.

**C. Step 3**

- A mixture of the compound of Example 1, Step 2 (86.5 mg) and Burgess reagent (150 mg) in 7.0 ml of anhydrous THF was stirred at room temperature for 1 h, concentrated  
25 under vacuum, then purified by preparative HPLC using a YMC S5 (ODS 20 X 100 mm) column to give 80.8 mg of desired product in 87% yield.

**D. Step4**

- 30 To a solution of the compound of Example 1, Step 3 (60 mg) and pyridine (0.1 ml) in 0.6 ml of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 17 µl of ethylchloroformate was added, after stirring for 2.5 h, another 22 µl of ethylchloroformate was added, the reaction mixture was stirred for 2

WO 02/078639

PCT/US02/09817

h, then 0.3 ml of trifluoroacetic acid was added, the resulting mixture was stirred for another 1 h, and concentrated under vacuum, diluted with DMF, MeOH and a little CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, filtered, then purified by preparative HPLC using a (YMC S5 ODS 20 X 100 mm) column to give 22.5 mg of product in 42.7% yield. MS (M-H)<sup>+</sup> = 345. HPLC RT = 2.85 min (YMC S5 ODS column 4.6 x 50 mm, 10-90% aqueous methanol over 4 minutes containing 0.2% phosphoric acid, 4ml/min, monitoring at 220 nm)

**Example 2****5-Cyano-3,6-dihydro-4-methyl-6-(3-nitrophenyl)-2-oxo-1-(2H)-****10 pyrimidinocarboxylic acid, 1-ethyl ester****A. Step 1**

10.92 g of NaHCO<sub>3</sub> was added portionwise to a solution of 7.83 g of the compound of Example 1, Step 1 and 7.48g of o-methylisourea hydrogen sulfate in DMF (100 ml), there was gas evolved. The reaction mixture was stirred for 2 h, then heated at 65°C overnight, cooled to room temperature, diluted with 800 ml of EtOAc, washed with water (2 x 100 ml) and brine (1 x 100 ml). The organic layer was dried MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under vacuum. The resulting residue was triturated in EtOAc-CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-hexane to give 5.48 g of desired product as solid (56%).

**20 B. Step 2**

A mixture of the compound of Example 2, Step 1 (209 mg) and Burgess reagent (274.5 mg) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml) and THF (10 ml) was stirred overnight. The reaction mixture was concentrated under vacuum, diluted with 150 ml of EtOAc, then washed with saturated NaHCO<sub>3</sub> (2 x 30 ml) and brine (1 x 30 ml), dried with MgSO<sub>4</sub>, concentrated under vacuum. The resulting residue was purified silica gel chromatography to give 136 mg (69.4%) of desired product.

**C. Step 3**

1.23 ml of pyridine was added to a solution of 2.075 g of the compound of Example 2, Step 2 in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (30 ml) under argon at 0 °C, then 0.87 ml of ethyl chloroformate was added slowly. The reaction mixture was warmed to room temperature and stirred for 3 h, diluted with a mixture of saturated of NaHCO<sub>3</sub> (50 ml) and brine (50 ml),

WO 02/078639

PCT/US02/09817

extracted with EtOAc three times, the combined layers were washed with brine and dried with MgSO<sub>4</sub>, filtered and concentrated under vacuum, purified by silica gel chromatography to give 2.57 g (98%) of desired product.

## 5 D. Step 4

- 2.5 mL of TFA was added to a solution of 1.44 g of the compound of Example 2, Step 3 in CH<sub>3</sub>CN (25 mL) and H<sub>2</sub>O (2.5 mL), the reaction mixture was stirred for 2 h, a lot of white solid appeared. The solid was filtered off, rinsed with CH<sub>3</sub>CN (3 x 20 mL) and hexane (2 x 20 mL), dried in air to give 860 mg (62.2%) desired product. The 10 filtrate was concentrated under vacuum, the solid was recrystallized in CH<sub>3</sub>CN to give another 320 mg (23.2%) of product. MS (M-H)<sup>+</sup> = 329. HPLC RT = 2.53 min (YMC S5 ODS column 4.6 x 50 mm, 10-90% aqueous methanol over 4 minutes containing 0.2% phosphoric acid, 4mL/min, monitoring at 220 nm)

15 **Example 3****5-Cyano-3,6-dihydro-4-methyl-6-(3-nitrophenyl)-2-oxo-1-(2H)-pyrimidinecarboxylic acid, 1-ethyl amide.**

## A. Step 1

- To a solution of the compound of Example 2, Step 2 (100 mg; 0.37 mmol) and 20 pyridine (0.74 mmol; 18 μL) in dichloroethane (40 mL) was added ethyl chloroformate (81 mg; 0.40 mmol) and the resulting solution was stirred at room temperature for 1.5 hours. The reaction mixture was diluted with saturated NaHCO<sub>3</sub> (30 mL), extracted with ethyl acetate (3 x 50 mL), dried (MgSO<sub>4</sub>) and concentrated in vacuo to afford a white foam. Purification by chromatography (SiO<sub>2</sub>; 20% EtOAc/hexane) afforded the desired compound as a colorless foam (99 mg; 62%)

## B. Step 2

- To a solution of the compound of Example 3, Step 1 (12 mg; 27 μmol) in THF (0.1 mL) was added 2M ethylamine in THF solution (15 μL; 30 mmol) in one portion at 30 room temperature and the resulting yellow solution was stirred 30 minutes. Dilution of the reaction mixture with methanol (1.8 mL) afforded a yellow solid which was

WO 02/078639

PCT/US02/09817

collected by suction filtration and purified by preparative HPLC to afford the title compound as a white solid (20 mg; 22%).

In contrast to the method of Example 2 above, in this case the 2-methoxy group  
5 hydrolyzed during isolation and purification to afford the dihydropyrimidinone ring without the need for treatment with TFA (Example 2, Step 4).

**Example 4**

**5-Cyano-3,6-dihydro-4-methyl-6-(3-nitrophenyl)-2-oxo-1-(1-oxobutyl)-(2H)-**

10 **pyrimidine**  
A. Step 1  
23.7  $\mu$ l of butyryl chloride was added to a solution of 52 mg of the compound of Example 2, Step 2 and 0.15 ml of pyridine in 0.6 ml of anhydrous  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , the reaction mixture was stirred for 1h, then 24  $\mu$ l of butyryl chloride was added, the  
15 reaction was stirred for 1.5 h, purified by preparative HPLC using a YMC S5 (ODS 20 x 100 mm) column to give 30 mg desired product.

B. Step 2  
A solution of 30 mg of the compound of Example 4, Step 1, 0.2 ml of  $\text{H}_2\text{O}$  and 0.2 ml  
20 of TFA in 1.2 ml  $\text{CH}_3\text{CN}$  was stirred for 1.5 h, it was added another 0.1 ml of TFA and stirred for another 2.5 h. The reaction mixture was concentrated under vacuum, and purified by preparative HPLC using a YMC S5 (ODS 20 x 100 mm) column to give 11.8 mg desired product. MS (M-H) $^+$  = 327. HPLC RT = 3.06 min (YMC S5 ODS column 4.6 x 50 mm, 10-90% aqueous methanol over 4 minutes containing  
25 0.2% phosphoric acid, 4ml/min, monitoring at 220 nm)

**Example 5**

**enantio 5-Cyano-3,6-dihydro-4-methyl-6-(3-nitrophenyl)-2-oxo-1-(2H)-pyrimidinecarboxylic acid, 1-ethyl ester (enantiomer A)**

30 53 mg of the compound of Example 2, Step 4 was dissolved in absolute EtOH, preparative chiral separation was carried out using a Chiralcel OD-H S5 (4.6 x 250 mm) column, 20 mg of enantiomer A and 27 mg of enantiomer B were obtained. MS

WO 02/078639

PCT/US02/09817

(M-H)<sup>+</sup> = 329. HPLC-Chiral RT = 10.44 min (Chiracel OD-H, S5, column 4.6 x250 mm, 10% MeOH / 10% EtOH /Heptane, 1.0 ml /min, monitoring at 220 nm, 94.7% ee)

5 **Example 6**

*enantiomer 5-Cyano-3,6-dihydro-4-methyl-6-(3-nitrophenyl)-2-oxo-1-(2H)-pyrimidinecarboxylic acid, 1-ethyl ester (enantiomer B)*  
MS (M-H)<sup>+</sup> = 329. HPLC-Chiral RT = 12.92 min (Chiracel OD-H, S5, column 4.6 x250 mm, 10% MeOH / 10% EtOH /Heptane, 1.0 ml /min, monitoring at 220 nm,  
10 99.64% ee)

**Example 7**

*5-Cyano-3,6-dihydro-4-methyl-6-(3-aminophenyl)-2-oxo-1-(2H)-pyrimidinecarboxylic acid, 1-ethyl ester*  
A solution of 12 mg of the compound of Example 1, Step 4 in ethanol was treated with 100 mg of tin (II) chloride and heated to reflux under argon for 90 min., the reaction was cooled down and quenched with saturated NaHCO<sub>3</sub> solution and extracted with EtOAc (3 x 50 mL). The combined organic layer was washed with H<sub>2</sub>O,  
20 dried with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated under vacuum. It was triturated with hexane and ether to give 8 mg of crude product, which was further purified by preparative HPLC to afford 3 mg of desired product as TFA salt. MS (M+H)<sup>+</sup> = 301. HPLC RT = 1.685 min (YMC S5 ODS column 4.6 x 50 mm, 10-90% aqueous methanol over 4 minutes containing 0.1% of TFA, 4mL/min, monitoring at 220 nm)

25

**Example 8**

*5-Cyano-3,6-dihydro-4-methyl-6-(3-(N,N-dimethyl)aminophenyl)-2-oxo-1-(2H)-pyrimidinecarboxylic acid, 1-ethyl ester*  
A solution of 12 mg of the compound of Example 7 in CH<sub>3</sub>CN (1 mL) was added  
30 paraformaldehyde (40 mg), sodium cyanoborohydride (30 mg) followed by 2 drops of acetic acid. The reaction mixture was stirred at room temperature for 2 h, then quenched with saturated NaHCO<sub>3</sub> solution and extracted with EtOAc three times. The

WO 02/078639

PCT/US02/09817

combined organic layer was washed with brine, dried with  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  and concentrated under vacuum. The resulting residue was purified by preparative HPLC to yield 3.2 mg of desired product as TFA salt. MS ( $\text{M}+\text{H}^+$ ) = 329. HPLC RT = 1.76 min (YMC S5 ODS column 4.6 x 50 mm, 10-90% aqueous methanol over 4 minutes containing 0.1% of TFA, 4ml/min, monitoring at 220 nm)

Examples 9 through 15 were prepared using the methods of Example 2 with the substitution of an appropriate benzaldehyde in Step 1.

10                   **Example 9**

**5-Cyano-3,6-dihydro-4-methyl-6-(3-trifluoromethylphenyl)-2-oxo-1-(2H)-pyrimidinecarboxylic acid, 1-ethyl ester**

HPLC-HI 100% at 2.84 min (YMC S5 ODS column 4.6 x 50 mm, 10 - 90% aqueous methanol over 4 minutes containing 0.1% of TFA , 4 ml/min, monitoring at 220 nm).

15                  MS:  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 354$ .

**Example 10**

**5-Cyano-3,6-dihydro-4-methyl-6-(2,3-dichlorophenyl)-2-oxo-1-(2H)-pyrimidinecarboxylic acid, 1-ethyl ester**

20                  HPLC-HI 100% at 3.2 min (YMC S5 ODS column 4.6 x 50 mm, 10 - 90% aqueous methanol over 4 minutes containing 0.1% of TFA , 4 ml/min, monitoring at 220 nm).  
MS:  $[\text{M}-\text{H}]^- = 352$ .

**Example 11**

25                  **5-Cyano-3,6-dihydro-4-methyl-6-(3-methoxyphenyl)-2-oxo-1-(2H)-pyrimidinecarboxylic acid, 1-ethyl ester**

HPLC-HI 100% at 2.42 min (YMC S5 ODS column 4.6 x 50 mm, 10 - 90% aqueous methanol over 4 minutes containing 0.1% of TFA , 4 ml/min, monitoring at 220 nm).  
MS:  $[\text{M}+\text{H}]^+ = 316$ .

30

WO 02/078639

PCT/US02/09817

**Example 12**

- 5-Cyano-3,6-dihydro-4-methyl-6-(3,5-dichlorophenyl)-2-oxo-1-(2H)-pyrimidinecarboxylic acid, 1-ethyl ester**  
HPLC-HI 87% at 3.26 min (YMC S5 ODS column 4.6 x 50 mm, 10 - 90% aqueous methanol over 4 minutes containing 0.1% of TFA , 4 ml/min, monitoring at 220 nm).  
MS: [M-H]<sup>-</sup> = 352.

**Example 13**

- 5-Cyano-3,6-dihydro-4-methyl-6-(3,4-dichlorophenyl)-2-oxo-1-(2H)-pyrimidinecarboxylic acid, 1-ethyl ester**  
HPLC-HI 100% at 3.197 min (YMC S5 ODS column 4.6 x 50 mm, 10 - 90% aqueous methanol over 4 minutes containing 0.1% of TFA , 4 ml/min, monitoring at 220 nm).  
MS: [M-H]<sup>-</sup> = 352.

**Example 14**

- 5-Cyano-3,6-dihydro-4-methyl-6-(3-cyanophenyl)-2-oxo-1-(2H)-pyrimidinecarboxylic acid, 1-ethyl ester**  
HPLC-HI 93% at 2.32 min (YMC S5 ODS column 4.6 x 50 mm, 10 - 90% aqueous methanol over 4 minutes containing 0.1% of TFA , 4 ml/min, monitoring at 220 nm).  
MS: [M+H]<sup>+</sup> = 311.

**Example 15**

- 5-Cyano-3,6-dihydro-4-methyl-6-(4-methoxyphenyl)-2-oxo-1-(2H)-pyrimidinecarboxylic acid, 1-ethyl ester**  
HPLC-HI 100% at 2.55 min (YMC S5 ODS column 4.6 x 50 mm, 10 - 90% aqueous methanol over 4 minutes containing 0.1% of TFA , 4 ml/min, monitoring at 220 nm).  
MS: [M+H]<sup>+</sup> = 316.

**Example 16**

- 5-Cyano-3,6-dihydro-4-methyl-6-(4-methylphenyl)-2-oxo-1-(2H)-pyrimidinecarboxylic acid, 1-ethyl ester**  
A. Step 1

WO 02/078639

PCT/US02/09817

A cloudy solution of 3-aminocrotononitrile (41 g, 0.5 mol) in Et<sub>2</sub>O (500 ml) was added dropwise to the 15% HCl solution (115 ml) at 0°C over 30 min with vigorous stirring, and the reaction mixture was stirred at 0°C for 15 min. The aqueous solution was then separated, extracted with Et<sub>2</sub>O (2 x 125 ml), the combined organic phases 5 dried with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Triethyl orthoformate (83 ml) in a 500 ml three-neck flask equipped with addition funnel and distillation set was stirred in 60°C-65°C oil bath, the above ether solution was added dropwise such that the rate of addition was equal to the rate of distillation. An additional 83 ml of triethyl orthoformate was added to the reaction when the addition of the ether solution was half complete, the oil bath 10 temperature was slowly raised to 100°C, and the reaction mixture was then stirred for 5 h. Distillation gave 26.6 g (38%) of desired red solid product at 150-155°C/2mm Hg.

B. Step 2

15 To a mixture of O-methylisourea sulfate (9.9 g, 80 mmol), the compound of Example 16, Step 1 (7.4 g, 53 mmol) and ethanol (90 ml) was added Et<sub>3</sub>N (11 ml, 80 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 15 min, then stirred at 66°C for 3 h, and concentrated to remove EtOH. EtOAc (80 ml) and H<sub>2</sub>O (80 ml) were added, the aqueous layer were separated and extracted with EtOAc (2 x 80 ml), the combined 20 organic layer were dried with Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, concentrated to give brown solid, which was dissolved in EtOAc, filtered through a silica gel pad, washed with EtOAc/heptane (1/1) to remove dark color, and the combined filtrate was concentrated. The solid thus obtained was recrystallized in heptane / EtOAc to give yellow crystal 5.18 g in 65% yield.

25 C. Step 3

A solution of p-tolylmagnesium bromide in ether (1M, 1 ml, 1 mmol) was added dropwise to a solution of the compound of Example 16, Step 2 (75 mg, 0.5 mmol) in THF (2 ml) at 0°C under argon. The reaction mixture was stirred at the temperature 30 for 1.5 h, another 3 ml of Grignard reagent was added at -78°C, the reaction was slowly warmed to room temperature and stirred for 2 min. Saturated NH<sub>4</sub>Cl (5 ml) and H<sub>2</sub>O (5 ml) were added, the mixture was extracted with EtOAc (2 x 15 ml), the

WO 02/078639

PCT/US02/09817

combined organic layer was dried, concentrated and chromatographed on silica gel to give 45.6 mg of desired product in 91% yield.

D. Step 4

- 5 To a solution of the compound of Example 16, Step 3 (109 mg, 0.45 mmol) was added pyridine (0.2 ml, 2.5 mmol) in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml) followed by ethyl chloroformate (0.1 ml, 1.05 mmol), and the resulting reaction mixture was stirred at room temperature overnight. MeOH was added, the resulting mixture was stirred for 15 min, concentrated, and chromatographed on silica gel column to give 100 mg  
10 desired product as colorless oil (71%).

E. Step 5

- A mixture of the compound of Example 15, Step 4 (100 mg, 0.32 mmol), H<sub>2</sub>O (0.7 ml), CH<sub>3</sub>CN (0.5 ml) and TFA (7 ml) was stirred at room temperature for 2 h. The  
15 solution was then concentrated to remove CH<sub>3</sub>CN, saturated NaHCO<sub>3</sub> was added to make the mixture basic, the white solid precipitate was filtered, washed with H<sub>2</sub>O, and dried to give the desired product (64 mg). The crude product was dried and recrystallized from EtOH / H<sub>2</sub>O to give another 20 mg desired product as white solid.  
MS (M+H)<sup>+</sup> = 300. HPLC RT = 3.40 min (YMC S5 ODS column 4.6 x 50 mm, 10-  
20 90% aqueous methanol over 4 minutes containing 0.2% phosphoric acid, 4 ml/min, monitoring at 220 nm)

**Example 17**

- 25 5-Cyano-3,6-dihydro-4-methyl-6-cyclohexyl-2-oxo-1-(2H)-pyrimidinecarboxylic acid, 1-ethyl ester**
- To a solution of the compound of Example 16, Step 2 (30 mg, 0.2 mmol) in THF (1.2 ml) was added cyclohexylmagnesium chloride (2 M in ether, 1.0 ml, 2 mmol) at -44°C under argon, the reaction was slowly warmed to room temperature, and stirred for 10 min. Saturated NH<sub>4</sub>Cl was added, the resulting mixture was extracted several  
30 times with EtOAc, the combined organic layer dried, filtered through a silica gel pad, and concentrated to give yellow oil. The oil was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 ml), then pyridine (80 µl, 0.9 mmol) and ethyl chloroformate (50 µl, 0.5 mmol) were added, the mixture was stirred at room temperature for 30 min, stirred for another 10 min after

WO 02/078639

PCT/US02/09817

which H<sub>2</sub>O (25 µl) and EtOAc were added, and the mixture dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered through a silica gel pad, and concentrated to give yellow oil. The oil was dissolved in CH<sub>3</sub>CN (2 ml), H<sub>2</sub>O (0.3 ml) and TFA (0.2 ml) were added, and the mixture stirred at room temperature for 2 h. Saturated NaHCO<sub>3</sub> solution and EtOAc were added, the aqueous layer was separated and extracted with EtOAc, and the combined organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, concentrated and chromatographed on silica gel to give 35 mg of desired product as yellow foam (60%). MS (M+H)<sup>+</sup> = 392. HPLC RT = 3.60 min (YMC S5 ODS column 4.6 x 50 mm, 10-90% aqueous methanol over 4 minutes containing 0.2% phosphoric acid, 4 ml/min, monitoring at 220 nm)

**Example 18****5-Cyano-3,6-dihydro-4-methyl-6-phenyl-2-oxo-1-(2H)-pyrimidinecarboxylic acid, 1-ethyl ester**

To a solution of the compound of Example 16, Step 2 (55 mg, 0.37 mmol) in dry THF (2 ml) was added phenylmagnesium bromide (2 M in THF, 2 ml, 4 mmol) dropwise at -78°C under argon. After addition, the reaction was slowly warmed to room temperature and stirred for about 10 min, until starting material disappeared. Saturated NH<sub>4</sub>Cl solution and H<sub>2</sub>O were added, the mixture was extracted with EtOAc for two times, and the combined organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, concentrated and chromatographed on silica gel to give solid intermediate. The solid was dissolved in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 ml), pyridine (0.15 ml, 1.8 mmol) and ethyl chloroformate (0.1 ml, 1 mmol) were added, and the reaction mixture was stirred at room temperature for 0.5 h. The reaction was quenched with 50 µl of H<sub>2</sub>O, diluted with 5 ml of EtOAc, the resulting mixture was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered through silica gel column to give the intermediate as an oil. The oil was dissolved in CH<sub>3</sub>CN (5 ml), H<sub>2</sub>O (0.5 ml) and TFA (0.4 ml) were added, the reaction mixture stirred for 1.5 h, and concentrated in vacuo. Saturated NaHCO<sub>3</sub> solution was added to neutralize the mixture, and the precipitate was then filtered and air dried. Recrystallization in EtOAc / heptane to give 70 mg solid product in 66% yield. MS (M+H)<sup>+</sup> = 286. HPLC RT = 1.28 min. (Phenomenal-Preme S5 C18 4.6 x 30 mm, 10-90 % aqueous methanol over 2 minutes containing 0.1 % TFA, 5 ml/min, monitoring at 220 nm)

WO 02/078639

PCT/US02/09817

Examples 19 through 24 were prepared using the method of Example 18 with the substitution of an appropriate arylmagnesiumhalide.

**Example 19**

- 5 5-Cyano-3,6-dihydro-4-methyl-6-(2-methylphenyl)-2-oxo-1-(2H)-  
pyrimidinecarboxylic acid, 1-ethyl ester  
MS (M+H)<sup>+</sup> = 300. HPLC RT = 1.41 min. (Phenom-Prime S5 C18 4.6 x 30 mm, 10-  
90 % aqueous methanol over 2 minutes containing 0.1 % TFA, 5 ml/min, monitoring  
at 220 nm)

10

**Example 20**

- 5-Cyano-3,6-dihydro-4-methyl-6-(3-chlorophenyl)-2-oxo-1-(2H)-  
pyrimidinecarboxylic acid, 1-ethyl ester  
MS (M+H)<sup>+</sup> = 320. HPLC RT = 1.43 min. (Phenom-Prime S5 C18 4.6 x 30 mm, 10-  
90 % aqueous methanol over 2 minutes containing 0.1 % TFA, 5 ml/min, monitoring  
at 220 nm)

15

**Example 21**

- 5-Cyano-3,6-dihydro-4-methyl-6-(3-fluorophenyl)-2-oxo-1-(2H)-  
pyrimidinecarboxylic acid, 1-ethyl ester  
MS (M+H)<sup>+</sup> = 304. HPLC RT = 1.29 min. (Phenom-Prime S5 C18 4.6 x 30 mm, 10-  
90 % aqueous methanol over 2 minutes containing 0.1 % TFA, 5 ml/min, monitoring  
at 220 nm)

20

**Example 22**

- 5-Cyano-3,6-dihydro-4-methyl-6-(4-chlorophenyl)-2-oxo-1-(2H)-  
pyrimidinecarboxylic acid, 1-ethyl ester  
MS (M+H)<sup>+</sup> = 320. HPLC RT = 1.44 min. (Phenom-Prime S5 C18 4.6 x 30 mm, 10-  
90 % aqueous methanol over 2 minutes containing 0.1 % TFA, 5 ml/min, monitoring  
at 220 nm)

25

**Example 23**

- 5-Cyano-3,6-dihydro-4-methyl-6-(4-fluorophenyl)-2-oxo-1-(2H)-  
pyrimidinecarboxylic acid, 1-ethyl ester

WO 02/078639

PCT/US02/09817

MS (M+H)<sup>+</sup> = 304. HPLC RT = 3.21 min (YMC S5 ODS column 4.6 x 50 mm, 10-90% aqueous methanol over 4 minutes containing 0.2% phosphoric acid, 4 ml/min, monitoring at 220 nm)

5                   **Example 24**

**5-Cyano-3,6-dihydro-4-methyl-6-(2-fluorophenyl)-2-oxo-1-(2H)-pyrimidinecarboxylic acid, 1-ethyl ester**

MS (M+H)<sup>+</sup> = 304. HPLC RT = 3.05 min (YMC S5 ODS column 4.6 x 50 mm, 10-90% aqueous methanol over 4 minutes containing 0.2% phosphoric acid, 4 ml/min, 10 monitoring at 220 nm)

**Example 25**

**5-Cyano-2,6-dimethyl-4-(3-nitro-phenyl)-1,4-dihydro-pyridine-3-carboxylic acid ethyl ester**

A. 2-Acetyl-3-(3-nitro-phenyl)-acrylic acid ethyl ester

A mixture of ethyl acetoacetate (8.6 g, 66 mmol), 3-nitrobenzaldehyde (10 g, 66 mmol), acetic acid (0.8 g), and pyridine (0.26 mL) in toluene (30 mL) was heated at reflux in a flask fitted with a Dean-Stark trap. After 2 hours 1.1 mL of water had been collected and the mixture was cooled and diluted with ethyl acetate, washed with water (100 mL), saturated sodium bicarbonate solution (100 mL), and brine (100 mL). The organic layer was collected, dried over sodium sulfate, filtered and concentrated. The residue was recrystallized from ether hexanes to yield a white solid (6 g, 35%).

25

B. 5-Cyano-2,6-dimethyl-4-(3-nitro-phenyl)-1,4-dihydro-pyridine-3-carboxylic acid ethyl ester

A mixture of benzylidene from Step A (2.63 g, 10 mmol) and 3-aminoacetonitrile (0.86 g, 11 mmol) in ethanol (50 mL) was heated at reflux for 24 hours. The mixture was concentrated in vacuo and the residue was purified by silica gel chromatography eluting with hexanes/ethyl acetate (1:1) to yield the product as a solid (2.0 g, 61%). HPLC-HI 100% at 2.84 min (YMC S5 ODS column 4.6 x 50 mm, 10-90% aqueous methanol over 4 minutes containing 0.1% TFA, 4 mL/min, monitoring at 220 nm). MS: Found (M+H)<sup>+</sup> 328. Calculated for

WO 02/078639

PCT/US02/09817

C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: C 62.37; H 5.23; N 12.83. Found: C 62.08, H 5.18, N 12.67.

**Example 26**

- 5-Cyano-2,6-dimethyl-4-(4-nitro-phenyl)-1,4-dihydro-pyridine-3-carboxylic acid ethyl ester  
5-Cyano-2,6-dimethyl-4-(4-nitro-phenyl)-1,4-dihydro-pyridine-3-carboxylic acid ethyl ester, was synthesized according to the procedure for Example 25 with the only exception being the use of 4-nitrobenzaldehyde in Step A. HPLC-HI 93% at 2.89 min  
10 (YMC S5 ODS column 4.6 x 50 mm, 10-90% aqueous methanol over 4 minutes containing 0.1% TFA, 4 mL/min, monitoring at 220 nm). MS: Found (M+H)<sup>+</sup> 328.

**Example 27**

- 15 5-Cyano-4-(3-cyano-phenyl)-2,6-dimethyl-1,4-dihydro-pyridine-3-carboxylic acid ethyl ester  
5-Cyano-4-(3-cyano-phenyl)-2,6-dimethyl-1,4-dihydro-pyridine-3-carboxylic acid ethyl ester, was synthesized according to the procedure for Example 25 with the only exception being the use of 3-cyanobenzaldehyde in Step A. HPLC-HI 83% at 2.71  
20 min (YMC S5 ODS column 4.6 x 50 mm, 10-90% aqueous methanol over 4 minutes containing 0.1% TFA, 4 mL/min, monitoring at 220 nm). MS: Found (M+H)<sup>+</sup> 308.

**Example 28**

- 25 5-Cyano-2,6-dimethyl-4-(3-trifluoromethyl-phenyl)-1,4-dihydro-pyridine-3-carboxylic acid ethyl ester  
5-Cyano-2,6-dimethyl-4-(3-trifluoromethyl-phenyl)-1,4-dihydro-pyridine-3-carboxylic acid ethyl ester, was synthesized according to the procedure for Example 25 with the only exception being the use of 3-trifluoromethylbenzaldehyde in Step A.  
30 HPLC-HI 95% at 3.21 min (YMC S5 ODS column 4.6 x 50 mm, 10-90% aqueous methanol over 4 minutes containing 0.1% TFA, 4 mL/min, monitoring at 220 nm).  
MS: Found (M+H)<sup>+</sup> 351.

WO 02/078639

PCT/US02/09817

**Example 29**

**5-Cyano-2,6-dimethyl-4-(3-methoxy-phenyl)-1,4-dihydro-pyridine-3-carboxylic acid ethyl ester**

5 5-Cyano-2,6-dimethyl-4-(3-methoxy-phenyl)-1,4-dihydro-pyridine-3-carboxylic acid ethyl ester, was synthesized according to the procedure for Example 25 with the only exception being the use of 3-methoxybenzaldehyde in Step A. HPLC-HI 97% at 2.81 min (YMC S5 ODS column 4.6 x 50 mm, 10-90% aqueous methanol over 4 minutes containing 0.1% TFA, 4 mL/min, monitoring at 220 nm). MS: Found (M+H)<sup>+</sup> 313.

10

**Example 30**

**5-Cyano-2,6-dimethyl-4-(3-nitro-phenyl)-1,4-dihydro-pyridine-3-carboxylic acid isopropyl ester**

15 5-Cyano-2,6-dimethyl-4-(3-nitro-phenyl)-1,4-dihydro-pyridine-3-carboxylic acid isopropyl ester, was synthesized according to the procedure for Example 25 with the only exception being the use of isopropyl acetoacetate in Step A. HPLC-HI 82% at 3.04 min (YMC S5 ODS column 4.6 x 50 mm, 10-90% aqueous methanol over 4 minutes containing 0.1% TFA, 4 mL/min, monitoring at 220 nm). MS: Found (M+H)<sup>+</sup>

20 342.

**Example 31**

25 **5-Cyano-4-(3,4-dichloro-phenyl)-2,6-dimethyl-1,4-dihydro-pyridine-3-carboxylic acid ethyl ester**

A. 2-Acetyl-3-(3,4-dichloro-phenyl)-acrylic acid ethyl ester  
A mixture of ethyl acetoacetate (1.3 g, 10 mmol), 3,4-dichlorobenzaldehyde (1.8 g, 10 mmol), and BiCl<sub>3</sub> (315 mg) was heated at 80 °C for 3 hours. After cooling the mixture was diluted with ethyl acetate (100 mL) and washed with 10% sodium bicarbonate solution, 10% sodium hydrogensulfate, and brine. The organic layer was collected, dried over sodium sulfate, and concentrated. The resulting benzylidene product was used crude in Step B.

30 B. 5-Cyano-4-(3,4-dichloro-phenyl)-2,6-dimethyl-1,4-dihydro-pyridine-3-carboxylic acid ethyl ester

WO 02/078639

PCT/US02/09817

A mixture of benzylidene from Step A (0.13 g, 0.4 mmol) and 3-aminocrotononitrile (44 mg, 0.5 mmol) in ethanol (1 mL) was heated at reflux for 24 hours. The mixture was concentrated in vacuo and the residue was purified by silica gel chromatography eluting with hexanes/ethyl acetate (7:3) to yield the product as a solid (15 mg, 11%). HPLC-HI 95% at 3.64 min (YMC S5 ODS column 4.6 x 50 mm, 10-90% aqueous methanol over 4 minutes containing 0.1% TFA, 4 mL/min, monitoring at 220 nm). MS: Found (M+H)<sup>+</sup> 352.

## Example 32

10       **5-Cyano-4-(3,5-dichloro-phenyl)-2,6-dimethyl-1,4-dihydro-pyridine-3-carboxylic acid ethyl ester**  
5-Cyano-4-(3,5-dichloro-phenyl)-2,6-dimethyl-1,4-dihydro-pyridine-3-carboxylic acid ethyl ester, was synthesized according to the procedure for Example 31 with the  
15 only exception being the use of 3,5-dichlorobenzaldehyde in Step A. HPLC-HI 90% at 3.50 min (YMC S5 ODS column 4.6 x 50 mm, 10-90% aqueous methanol over 4 minutes containing 0.1% TFA, 4 mL/min, monitoring at 220 nm). MS: Found (M+H)<sup>+</sup> 352.

WO 02/078639

PCT/US02/09817

## Claims:

What is claimed is:

1. A method for treating a condition via modulation of Eg5 protein activity comprising administering to a mammalian species in need of such treatment an effective amount of at least one small molecule Eg5 protein inhibitor.

2. The method of claim 1 wherein said small molecule induces mitotic arrest and apoptosis.

10

3. The method of claim 1 wherein said small molecule has an IC<sub>50</sub> value of less than about 10 uM in a cell proliferation assay.

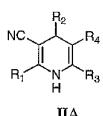
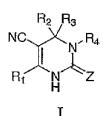
15

4. The method of claim 1 further comprising administering to said mammalian species at least one other anti-cancer agent in combination with said small molecule.

20

5. The method according to claim 1 wherein the condition is cancer.

6. The method according to claim 1 wherein said small molecule is a compound of formula I or IIa:



25 or an enantiomer, diastereomer, pharmaceutically acceptable salt, prodrug or solvate thereof, wherein

R<sub>1</sub> is selected from the group consisting of hydrogen, alkyl and cycloalkyl;

R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub> are each independently selected from the group consisting of H, alkyl, aryl, heteroaryl, arylalkyl, cycloalkyl, cycloalkylalkyl, heterocycloalkylalkyl

30 and heteroarylalkyl; R<sub>2</sub> and R<sub>3</sub> may also be taken together to form a carbocyclic or heterocyclic ring;

WO 02/078639

PCT/US02/09817

R<sub>4</sub> is selected from the group consisting of alkyl, arylalkyl, heterocycloalkyl, aminoalkyl, cycloalkylalkyl, heteroarylalkyl, heterocycloalkylalkyl, CN, COR<sub>5</sub>, CO<sub>2</sub>R<sub>5</sub> and CONR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>;

5 R<sub>5</sub> and R<sub>6</sub> are each independently selected from the group consisting of H, alkyl, arylalkyl, cycloalkylalkyl, heteroarylalkyl and heterocycloalkylalkyl; Z is selected from the group consisting of O, S and NR<sub>8</sub>;

10 R<sub>8</sub> is selected from the group consisting of H, CN, sulfonamido, OR<sub>7</sub>, alkyl, cycloalkyl, aryl, arylalkyl, heterocycl, heteroaryl and heteroarylalkyl; and R<sub>7</sub> is selected from the group consisting of H, alkyl, arylalkyl, cycloalkylalkyl, heterocycloalkylalkyl and heteroarylalkyl.

7. The method according to claim 6 wherein R<sub>4</sub> is selected from the group consisting of alkyl, arylalkyl, CO<sub>2</sub>R<sub>5</sub>, and CONR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>.

15 8. The method according to claim 6 wherein R<sub>4</sub> is CO<sub>2</sub>R<sub>5</sub> and Z is O.

9. The method according to claim 6 wherein R<sub>4</sub> is CONR<sub>5</sub>R<sub>6</sub> and Z is O.

10. The method according to claim 6 wherein R<sub>4</sub> is selected from the group consisting of alkyl and arylalkyl; and Z is O.

11. The method according to claim 6 wherein R<sub>1</sub> is CH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub> is aryl; R<sub>4</sub> is CO<sub>2</sub>R<sub>5</sub>; R<sub>5</sub> is alkyl; and Z is O.

25 12. The method according to claim 6 wherein R<sub>1</sub> is CH<sub>3</sub>; R<sub>2</sub> is aryl; R<sub>4</sub> is CONR<sub>5</sub>R<sub>6</sub>; R<sub>5</sub> is alkyl; and Z is O.

## 【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
10 October 2002 (10.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
**WO 02/078639 A3**(51) International Patent Classification<sup>5</sup>: A61K 31/505,  
31/445, 31/44

(21) International Application Number: PCT/US02/09817

(22) International Filing Date: 28 March 2002 (28.03.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/279,956 29 March 2001 (29.03.2001) US  
60/280,366 30 March 2001 (30.03.2001) US

(71) Applicant (for all designated States except US): BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY [US/US]; P.O. Box 4000, Route 206 and ProvinceLine Road, Princeton, NJ 08543-4000 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): KIMBALL, Spencer, David [US/US]; 13 Charred Oak Lane, East Windsor, NJ 08520 (US); LOMBARDO, Louis, J. [US/US]; 49 West Street, Belle Mead, NJ 08802 (US); RAWLINS, David, B. [US/US]; 219 Vernon Road, Morrisville, PA 19067 (US); XIAO, Hai-Yun [US/US]; 173 Jonathan Dayton Court, Princeton, NJ 08540 (US); ROUSSELL, Deborah, L. [US/US]; 1720 Riverside Drive, Trenton, NJ 08618 (US).

(74) Agents: GIBBONS, Maureen et al.; Bristol-Myers Squibb Company, P.O. Box 4000, Princeton, NJ 08543-4000 (US).

(81) Designated States (national): AL, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, FE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, IIR, IIU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TL, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIGO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

## Published:

— with international search report  
before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(88) Date of publication of the international search report:

10 April 2003

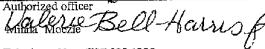
For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

**WO 02/078639****A3**

(54) Title: A METHOD OF TREATING PROLIFERATIVE DISEASES USING EG5 INHIBITORS

(57) Abstract: The invention provides a method for treating a condition via modulation of the Eg5 protein activity comprising administering to a mammalian species in need of such treatment an effective amount of at least one small molecule Eg5 protein inhibitor. The invention also provides a method for treating a condition via modulation of the Ig5 protein activity comprising administering to a mammalian species in need of such treatment an effective amount of at least one small molecule Ig5 protein inhibitor in combination with at least one other anti-cancer agent.

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/09817
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC(7) : A61K 31/505, 31/445, 31/44 US CL : 514/258, 277, 315 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 514/258, 277, 315		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS USPATFULL PCTFULL WPIDS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,536,724 A (DEGRAW et al.) 16 July 1996 (16.07.1996), abstract, col.1-2, 4-5, and claims 6, 14-24, see entire document.	1-12
Y	EP 0 330 470 A2 (AJINOMOTO CO., INC) 30 August 1989 (30.08.1989), abstract, page 2-3, see entire document.	1-12
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"B" earlier application or patent published on or after the international filing date</p> <p>"C" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"F" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the prior art relevant to the claimed invention</p> <p>"G" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"H" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"I" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 10 June 2002 (10.06.2002)	Date of mailing of the international search report <b>27 JAN 2003</b>	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230	Authorized officer  Telephone No. (703)305-1235	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 0 5
// C 0 7 D 239/36	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 0 7 D 239/40	C 0 7 D 239/36	
	C 0 7 D 239/40	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 スペンサー・デイビッド・キンボール

アメリカ合衆国 0 8 5 2 0 ニュージャージー州イースト・ウィンザー、チャード・オーク・レイン  
13番

(72)発明者 ルイス・ジェイ・ロンバード

アメリカ合衆国 0 8 5 0 2 ニュージャージー州ベル・ミード、ウエスト・ストリート 4 9 番

(72)発明者 デイビッド・ビー・ローリングス

アメリカ合衆国 1 9 0 6 7 ペンシルベニア州モリスビル、バーノン・ロード 2 1 9 番

(72)発明者 ハイ・ユン・シャオ

アメリカ合衆国 0 8 5 4 0 ニュージャージー州プリンストン、ジョナサン・デイトン・コート 1 7  
3 番

(72)発明者 デボラ・エル・ルーセル

アメリカ合衆国 0 8 6 1 8 ニュージャージー州トレントン、リバーサイド・ドライブ 1 7 2 8 番

F ターム(参考) 4C084 AA17 ZB21 ZB26

4C086 AA01 BC42 MA01 MA04 NA14 ZB21 ZB26