ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Carlos
Carbajales Pérez

Tesis doctoral

DESCUBRIMIENTO Y OPTIMIZACIÓN DE NUEVOS AGENTES ANTITUMORALES EMPLEANDO REACCIONES MULTICOMPONENTE

Santiago de Compostela, 2023

Programa de doctorado en Ciencia y Tecnología Química

ESCOLA DE DOUTORAMENTO
INTERNACIONAL DA USC

TESIS DOCTORAL

DESCUBRIMIENTO Y OPTIMIZACIÓN DE NUEVOS AGENTES ANTITUMORALES EMPLEANDO REACCIONES MULTICOMPONENTE

Autor

Carlos Carbajales Pérez

Director: Alberto José Coelho Cotón y Eddy Sotelo Pérez

Tutor/a: Alberto José Coelho Cotón

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA QUÍMICA

SANTIAGO DE COMPOSTELA / LUGO

RESUMEN

Esta Tesis Doctoral abordó la aplicación de una estrategia multidisciplinar aplicada a la obtención de nuevos fármacos antitumorales que incluyó tres ejes fundamentales: por una parte, se estudió el diseño de nuevos fármacos de perfil antitumoral, mediante la observación y el empleo de procedimientos de **diseño por ordenador basado en la estructura de la diana** (*Structure based Drug Design*, SBDD), particularmente, el docking o bien por otras técnicas de modelado molecular (MM, o *Molecular Modeling*) como el modelado de receptores por homología (*Homology Modeling)*. Por otra parte, se investigó el diseño y síntesis *ad hoc* de **reacciones multicomponente (RMC)** como herramienta de diversificación estructural para la síntesis de fármacos con perfil antitumoral. El trabajo estudió, asimismo, la **evaluación farmacológica** de los diversos prototipos sintetizados, el establecimiento de las relaciones estructura actividad (REA) preliminares y el análisis computacional que establece el modo de unión fármaco-diana.

La Memoria se distribuyó en dos bloques bien diferenciados:

1. **Bloque I:** Descubrimiento de nuevos fármacos antimitóticos basado en la aplicación de una estrategia sintética basada en reacciones Ugi dirigidas, ciclaciones de los aductos intermedios y decoración final del scaffold de bencimidazol (*Targeted Oriented Synthesis*).
2. **Bloque II:** Descubrimiento de nuevos fármacos sobre el receptor A_{2B}, empleando la reacción de Biginelli, una nueva aproximación al descubrimiento de nuevos antitumorales.

En la primera parte de la Tesis (correspondiente a las publicaciones y/o capítulos 1, 2 y 3) se analizó el estado actual del descubrimiento de fármacos antimitóticos empleando reacciones multicomponente. Se investigó el diseño computacional, la síntesis y evaluación farmacológica de prototipos directamente diseñados para la inhibición de la quinesina mitótica del huso mitótico, KSP (*Kinesin Spindle Protein*) basados en una estructura de tipo bencimidazol, obtenidos mediante reacciones específicamente diseñadas para el sitio de unión alostérico Eg5, de la diana KSP.

En la segunda parte (publicación y/o capítulo 4), se introdujo una línea de investigación basada en el diseño y síntesis de derivados antagonistas de los receptores A_{2B} de adenosina como agentes anticancerígenos. Se identificó una nueva familia de ligandos antagonistas de A_{2B} distintos de la xantina, estructuralmente simples, potentes y selectivos, y se confirmó su comportamiento antagónico mediante experimentos funcionales. Esto constituye el primer ejemplo de reconocimiento enantioespecífico en el receptor de adenosina A_2B y abre nuevas posibilidades en el diseño de ligandos para este receptor, el cual está implicado en procesos cancerígenos, a través del papel del antagonismo de A_{2B} en la progresión de varios tipos de cánceres.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

AGRADECIMIENTOS

Hace ya unos años, Abel Crespo, un amiguete con el que solía quedar para tomar algo al salir de clase y que había comenzado su tesis un par de años antes, me comentó que en su grupo necesitaban gente. Él sabía de mi curiosidad y que tenía bastante tiempo libre. Era mi último año y solo me quedaban tres asignaturas para acabar la carrera de Farmacia.

Así empezó mi relación con la Unidad de Química Combinatoria adscrita al Instituto de Farmacia Industrial, sólo el nombre asustaba y fascinaba al mismo tiempo. Estaba dirigido por Eddy Sotelo, acompañado de Alberto Coelho, dos investigadores del *Programa Parga Pondal* que habían decidido encaminar su carrera por esta parcela de la Orgánica montando su propio grupo. En aquel joven grupo, encontré el que sería mi modo de vida durante los siguientes años. El diseño, la planificación, el método y la paciencia serían mi guía para avanzar a través de los problemas que cada trabajo nos plantease. Y esto es lo más valioso que me llevo de este tiempo.

Así días enteros, noches, fines de semana, de ordenador, reacciones, purificaciones, caracterización y mucho fregadero.

Estas líneas van dedicadas a agradecer a todos los que me han acompañado y ayudado a llegar hasta aquí.

Gracias a los incontables compañeros que han pasado por el grupo y que me sería imposible mencionar sin dejarme inmerecidamente alguno por el camino.

Gracias a Abel por haberme abierto la puerta de este mundo y enseñarme a moverme entre matraces y columnas.

Gracias a Aziz, a Jhonny y a Luz por ser mis auténticos maestros en la buena práctica de laboratorio, por su amistad y compañía, y sobre todo por mostrarme la belleza de la rutina, la constancia y el orden como clave de bóveda para la excelencia.

Gracias a Vicente, Paula, Cris y Belén, compañeros en aquellos primeros días de laboratorios en sótanos y campanas ruidosas. Con ellos las horas de espera eran más cortas y los problemas pequeños.

Gracias a los chicos que he tutelado durante la experimental, Raluka, Alessandra, Jacobo, y especialmente a Ángel, Antonio y Ana. En las horas que hemos compartido he aprendido mucho más de lo que yo haya podido enseñaros. En verdad, os tengo en mi corazón.

Mi agradecimiento a todo el personal de apoyo a la investigación que colaboró en la obtención de este trabajo. Especialmente a Xosé, sobra decir que su labor es imprescindible para todo el departamento de Orgánica de Farmacia, también a Ramón Gesto, Esteban Guitián y al personal del CIQUS. Gracias a todos ellos nuestros trabajos pueden brillar.

Gracias a todos los coautores que han participado en los artículos que conforman esta tesis y aquellos en los que he colaborado. Mención especial merecen Miguel Ángel, Hugo Gutiérrez de Terán, Giovanni Marzaro, Junichi Sawada y Akira Asai, por su gigante implicación y compromiso en ellos. Con ellos he vivido en primera persona que la interrelación entre áreas de conocimiento y el trabajo en equipo son el mejor camino a la buena ciencia.

Finalmente, gracias a Alberto cuya energía y visión me han acompañado incesantemente, más intensamente cuando más lo necesitaba. Y a Eddy, brillante líder, que vive con pasión su trabajo y tiene como guía la cultura del esfuerzo, *ad astra per aspera.* A los dos os debo esta memoria y los éxitos de estos años. Infinitas gracias por

vuestro apoyo constante, vuestra paciencia y empuje. Gracias por dedicarme tantas horas de trabajo. De verdad, gracias por ofrecerme esta aventura.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

"Las verdades que revela la ciencia superan siempre a los sueños que destruye."

Joseph E. Renan

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A Alba, mi mejor descubrimiento.

A Bruno, nuestra mejor síntesis.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN…….17

1.1. El cáncer y su tratamiento terapéutico. Breve repaso histórico y estrategias actuales……..……..17

1.2. Fármacos antimitóticos: Introducción…….22

1.2.1. Mecanismos de acción de los antimitóticos……..24

1.2.2 Nuevas dianas antimitóticas prometedoras: Quinasas y Quinesinas……...25

1.2.2.1 Inhibidores de la Quinesina mitótica KSP……31

1.2.3. Limitaciones de los fármacos antimitóticos y de los inhibidores de KSP…….31

1.3. Los receptores de adenosina y su papel en el cáncer……....33

1.3.1 Importancia y funciones fisiológicas de la adenosina……...33

1.3.2 Síntesis y degradación de la adenosina……..33

1.3.3 Receptores de adenosina, expresión y funciones……...34

1.3.4 La adenosina en el cáncer y sus funciones inmunosupresoras…34

1.3.4.1 Influencia de la Adenosina en los Hallmarks del Cáncer……...34

1.3.4.1.1 Evasión de la supresión de señales de crecimiento…….34

1.3.4.1.2 Resistencia a la muerte celular programada.....35

1.3.4.1.3 Inducción de la angiogénesis……...35

1.3.4.1.4 Habilitación de la replicación ilimitada…….35

1.3.4.1.5 Capacidad para invadir tejidos circundantes y formar metástasis……..…….....35

1.3.4.2. Roles de los receptores A_2A y A_2B en la inmunoterapia del cáncer……36

1.3.5 Antagonistas de los Receptores A_{2B} en el Tratamiento del Cáncer……37

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS……....……39

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. METODOLOGÍA…….....…...41

3.1. Antecedentes metodológicos y resultados previos……..……..41

3.1.1. Aplicación de las Reacciones Multicomponente "*ad hoc*": Quimiotecas dirigidas hacia la obtención de ligandos que modulen las funciones de la diana KSP o el receptor A_2B de adenosina…….41

3.3.1.1 Síntesis orientada a la diversidad frente a síntesis orientada a la diana……..41

3.1.2 Conceptos extrínsecos aplicables a las RMC: Utilización de reactivos soportados (scavengers) para eliminar exceso de isonitrilo en procesos de work up……..46

3.1.3 Empleo de herramientas computacionales que asistan el proceso de síntesis de fármacos inhibidores de la KSP o moduladores del receptor A_2B y que aceleren la generación de quimiotecas……..47

3.1.4 Evaluación farmacológica de los prototipos sintetizados en los apartados anteriores……..49

3.1.5 Evaluación farmacológica y otras metodologías para la modulación del receptor A_2B…….....50

4. COMPENDIO DE PUBLICACIONES …….....53

4.1.Publicación 1:

Multicomponent reactions in antimitotic drug discovery……55

4.2.Publicación 2:

Structure-based design of new KSP-Eg5 inhibitors assisted by a targeted multicomponent reaction…….77

4.3. Publicación 3:

Multicomponent Assembly of the Kinesin Spindle Protein Inhibitor CPUYJ039 and Analogues as Antimitotic Agents……..149

4.4.Publicación 4:

Enantiospecific Recognition at the A_2B Adenosine Receptor by Alkyl 2-Cyanoimino-4-substituted-6-methyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylates……227

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS……245

5.1.CAPÍTULO I:

REACCIONES MULTICOMPONENTE EN DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS ANTIMITÓTICOS……..246

5.1.1. Objetivo específico del trabajo……..246

5.1.2. Fuentes de información empleadas……...246

5.1.3. Aspectos más destacables comentados en la revisión…….246

5.1.4. Conclusiones específicas en el marco de la Tesis……..248

5.2.CAPÍTULO II:

DISEÑO BASADO EN LA ESTRUCTURA DE NUEVOS INHIBIDORES DE KSP-EG5 ASISTIDO POR UNA REACCIÓN MULTICOMPONENTE DIRIGIDA……249

5.2.1. Objetivo específico del trabajo……..249

5.2.2. Desarrollo experimental……250

5.2.2.1.Diseño de una quimioteca de ligandos de tipo Bencimidazol a partir de la observación de la estructura de la diana KSP. Diseño computacional……250

5.2.2.2. Síntesis química: Aplicación de las reacciones de Ugi dirigidas al sitio de unión alostérico Eg5 de la KSP……253

5.2.2.3.Otras herramientas y metodologías empleadas en estas síntesis……..254

5.2.2.4.Ensayos de actividad antitumoral……255

5.2.2.5.Relaciones estructura actividad preliminares……....256

5.2.3. Conclusiones específicas en el marco de la Tesis…….256

5.3.CAPÍTULO III:

ENSAMBLAJE MULTICOMPONENTE DEL INHIBIDOR DE LA PROTEÍNA DEL HUSOMITÓTICO DE LA QUINESINA CPUYJ039 Y ANÁLOGOS COMO AGENTES ANTIMITÓTICOS……..257

5.3.1. Objetivo específico del trabajo……..257

5.3.2. Desarrollo del trabajo experimental…….257

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.3.2.1.Diseño de una quimioteca dirigida en base a la información estructural……...257
5.3.2.2.Herramentas computacionales……....258
5.3.2.3.Diseño del procedimiento químico……..259
5.3.2.4.Resultados de actividad antitumoral……...261
5.3.3. Conclusiones específicas de en el contexto de la Tesis……..263

5.4.CAPÍTULO IV:
RECONOCIMIENTO ENANTIOESPECÍFICO EN EL RECEPTOR DE ADENOSINA A2B POR ALQUIL 2-CIANOIMINO-6-METIL-1,2,3,4 TETRAHIDROPIRIMIDINA-5-CARBOXILATOS -4-SUSTITUIDOS……..265
5.4.1 Introducción y objetivo el trabajo……265
5.4.2 Diseño……..267
5.4.3. Química……...267
5.4.4. Evaluación bilógica……268
5.4.4.1 Experimentos funcionales. Ensayos de cAMP……269
5.4.5 Análisis de relación estructura-actividad y modelado molecular……...…….272
5.4.6 Consideraciones generales sobre los experimientos de evaluación farmacológica y modelado computacional……276
5.4.7 Conclusiones específicas de este trabajo en el contexto de la Tesis…….……277

6. CONCLUSIONES GENERALES……279
7. BIBLIOGRAFÍA……...281
8. ANEXOS…….....295
8.1.Permisos de publicación de los artículos recogidos en esta tesis…….....297
8.2.Permisos de reproducción de figuras recogidos en esta tesis…….301

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El cáncer y su tratamiento terapéutico. Breve repaso histórico y estrategias actuales

El cáncer es una enfermedad que afecta a millones de personas en todo el mundo y representa una de las principales causas de muerte. A lo largo de las últimas décadas, se han logrado importantes avances en el diagnóstico y tratamiento del cáncer, gracias a la investigación y el desarrollo de nuevas terapias más efectivas y menos invasivas. Sin embargo, aún queda mucho por hacer en este ámbito, especialmente en lo que se refiere a la prevención y el diagnóstico temprano.

En comparación con otras enfermedades temidas, como las enfermedades cardiovasculares, el cáncer ha sido históricamente más difícil de tratar debido a la complejidad de su biología y la variabilidad de las respuestas individuales a los tratamientos. No obstante, en la actualidad, la investigación en cáncer está avanzando a un ritmo sin precedentes, y se espera que en el futuro se logren importantes avances en la prevención, diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad. Por lo tanto, el cáncer sigue siendo a día hoy la enfermedad más temida por la humanidad a pesar de los enormes avances en el campo de la Medicina y las medidas de salud pública que se van adoptando según avanza el conocimiento sobre los hábitos de vida y los tumores. Las previsiones sobre casos de cáncer en el año 2023, elaboradas por la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM),[1] indican que se van a diagnosticar 279.260 nuevos casos, una cifra bastante similar a la de 2022, con 280.199 casos. A nivel mundial, al igual que con la incidencia, está previsto un incremento de la mortalidad por cáncer en los próximos años cercano a 16 millones para 2040 (Figura 1.1a). En España, se ha estimado que la mortalidad por cáncer se incrementará de 112.000 casos en 2020 a más de 159.000 en 2040.

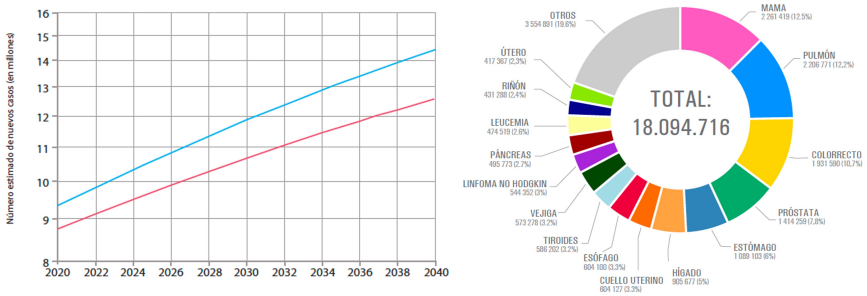


Figura 1.1a. Izquierda: Incidencia estimada de cánceres en la población mundial por sexo entre los años 2020 y 2040 (se excluyen aquí los cánceres cutáneos no melanoma). Derecha: Carcinomas más frecuentemente diagnosticados en el mundo, año 2020, ambos sexos (excluidos tumores cutáneos no melanoma). Modificado de ref.1.

La calidad de vida de las personas ha mejorado significativamente durante los últimos 100 años. Sin lugar a duda, el siglo XX trajo al mundo un significativo avance en el campo del descubrimiento de fármacos y, por ende, en la Medicina. Hoy en día, disfrutamos de una esperanza de vida mayor, debido a los tratamientos con fármacos efectivos, disponibles para muchas enfermedades para las cuales antes no había cura. La

Química Farmacéutica dio sus primeros pasos con el aislamiento e identificación de sustancias bioactivas tan importantes como la morfina (1806, Sertürner), la quinina (1820, Pierre Joseph Pelletier y Joseph Bienaimé Caventou), el salvarsán (P. Ehrlich, 1906), el paracetamol (1877, Harmon Northrop Morse) o la aspirina (1897, Hoffman) en el siglo XIX. Durante el siglo XX, verdadera época dorada del descubrimiento de fármacos, se combinó la serendipia, el descubrimiento de estructuras arquetípicas y el conocimiento de las características de los diferentes sistemas biológicos, dando lugar a fármacos que son paradigmáticos hoy en día. La historia de la química farmacéutica en la lucha contra el cáncer se remonta precisamente a principios del siglo XX (Figura 1.1b), cuando se descubrieron las primeras sustancias químicas con propiedades antitumorales, los agentes alquilantes, como las mostazas nitrogenadas,[2] que se utilizó por primera vez en la década de 1940 para tratar la leucemia. En la década de 1950, la vincristina y la vinblastina, alcaloides de la vinca,[3] se convirtieron en los primeros agentes antitumorales derivados de plantas en ser aprobados para su uso clínico. Precedieron por lo tanto al placitaxel, (taxol)[4] que al igual que los alcaloides de la Vinca, actúa a nivel de los microtúbulos, y que fue comercializado en 1993. Otro agente antitumoral importante descubierto en la década de 1960 fue la doxorrubicina, un antibiótico que se usa ampliamente en la quimioterapia de diversos tipos de cáncer. Durante décadas, se realizaron investigaciones en la búsqueda de compuestos capaces de inhibir el crecimiento de células cancerosas, y en la década de 1950 se descubrieron los primeros agentes citotóxicos efectivos, como el metotrexato y la ciclofosfamida.[5-6] Desde entonces, se han desarrollado muchos otros agentes quimioterapéuticos, algunos de los cuales se han utilizado ampliamente en el tratamiento del cáncer. En las últimas décadas, la investigación en química farmacéutica se ha centrado en el diseño y desarrollo de fármacos más selectivos y específicos, que sean más eficaces y menos tóxicos para las células sanas. Entre los avances más recientes se encuentran los inhibidores de proteínas quinasas, los agentes epigenéticos y las terapias basadas en la inmunidad, como los anticuerpos monoclonales y las terapias CAR-T.[7-9]

El siglo XXI representa la era postgenómica. El avance meteórico de la informática, la secuenciación del ADN y los avances en cristalografía de proteínas, la química combinatoria, los procesos de cribado farmacológico de alta eficacia, entre otros muchos avances, han aportado grandes avances en el arsenal terapéutico en general, y en la oncología en particular. Este avance ha cristalizado en la obtención para la Humanidad de fármacos paradigmáticos para muchas dolencias. Por poner unos ejemplos, los *inibs* (inhibidores de tirosina quinasa) así como los *umabs* (anticuerpos monoclonales), los medicamentos biotecnológicos más modernos de hoy en día, con estructuras moleculares cada vez más complejas están basados en un diseño racional y un conocimiento de las bases moleculares y biológicas de cada patología. Los fármacos *inibs* son inhibidores de tirosina quinasa, que bloquean las señales de crecimiento celular en las células cancerosas. Algunos ejemplos son el imatinib[10] para leucemia mieloide crónica y el erlotinib[11] para cáncer de pulmón. Los fármacos *umabs* son anticuerpos monoclonales, que se unen a proteínas específicas en la superficie de las células cancerosas para activar el sistema inmunológico y destruir las células. Algunos ejemplos son el rituximab,[12] trastuzumab[13-14] para cáncer de mama HER2-positivo y el pembrolizumab[15] para melanoma y cáncer de pulmón. Ambos tipos de fármacos han tenido un gran impacto en el tratamiento del cáncer, mejorando significativamente las tasas de supervivencia y la calidad de vida de los pacientes.

Las terapias CAR-T (Chimeric Antigen Receptor T-cell) son una forma de inmunoterapia adoptiva en la que se extraen células inmunitarias (como los linfocitos T) del paciente y se les modifican genéticamente en el laboratorio para que expresen un receptor quimérico de antígeno (CAR, por sus siglas en inglés) específico para el antígeno

de la célula cancerosa. Estos linfocitos T modificados se multiplican en el laboratorio y se infunden nuevamente en el paciente, donde pueden reconocer y atacar las células cancerosas que expresan el antígeno específico. Esta terapia ha demostrado ser muy efectiva en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer hematológicos, como la leucemia linfoblástica aguda y el linfoma de células B. Sin embargo, todavía hay desafíos a superar para mejorar la eficacia y la seguridad de la terapia CAR-T en otros tipos de cáncer sólidos y evitar efectos secundarios graves.

En resumen, a la aportación clave de los primeros grandes investigadores como Paul Ehrlich (pionero en la Química Médica y padre de la terapia inmunológica, desarrolló la teoría de la "quimioterapia selectiva" y diseñó el primer fármaco quimioterapéutico eficaz, el salvarsán, para tratar la sífilis) o Louis Pasteur (precursor de la Teoría de la biogénesis), se sumó la de otros muchos y más recientes como Gertrude Elion (co-inventora de medicamentos que revolucionaron el tratamiento de la leucemia y el trasplante de órganos, entre ellos el azatioprina y la trimetoprima) o César Milstein y George Köhler (descubridores del potencial terapéutico de los anticuerpos monoclonales). Con contribuciones como estas, es como la Humanidad aprendió a abordar la quimioterapia en general y la lucha contra microorganismos en particular pasando del descubrimiento casual o la serendipia al diseño racional de fármacos.

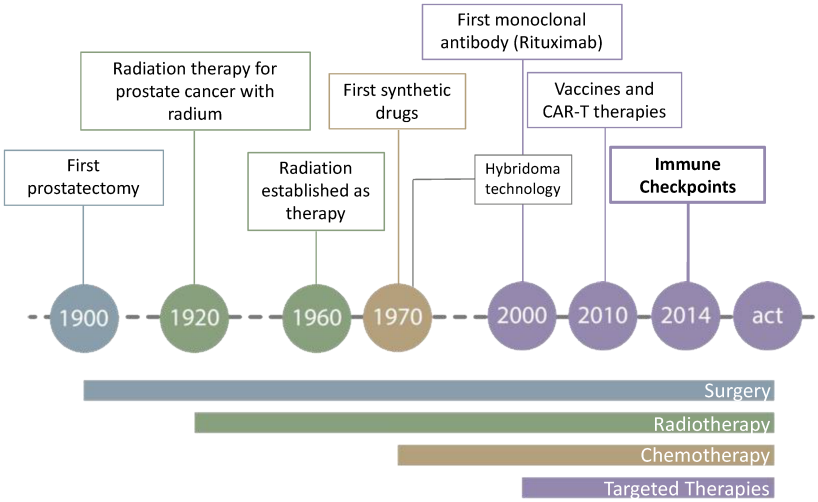


Figura 1.1b: Evolución del tratamiento del cáncer (Graziano, 2023).[16]

El tratamiento farmacológico del cáncer se basa en la administración de diferentes tipos de fármacos que actúan sobre distintas dianas moleculares, dependiendo del tipo de cáncer y de la etapa de la enfermedad. Podríamos resumir los principales tipos de fármacos antitumorales y las dianas terapéuticas a las que se dirigen en los siguientes:

• **Quimioterapia:** los fármacos quimioterápicos[17] son los más utilizados en el tratamiento del cáncer y actúan destruyendo las células tumorales en diferentes fases del ciclo celular. Los principales fármacos quimioterápicos se clasifican según su estructura química y su mecanismo de acción, y pueden incluir alcaloides de la vinca, taxanos, compuestos basados en platino, antraciclinas, antimetabolitos, entre otros.

• **Terapia dirigida:** este tipo de terapia se basa en el uso de fármacos que actúan sobre dianas moleculares específicas presentes en las células tumorales. Los principales tipos de fármacos de terapia dirigida[18] incluyen inhibidores de la tirosina quinasa como el previamente mencionado imatinib, los inhibidores de la angiogénesis, los inhibidores del proteosoma, o los fármacos epigenétcos, entre otros.

La estrategia antitumoral basada en **"fármacos a la carta"**[19-21] se refiere al uso de la información genética de un paciente para diseñar terapias personalizadas contra su enfermedad. En lugar de utilizar un enfoque de "talla única" para todos los pacientes, esta estrategia se enfoca en identificar las características genéticas únicas de cada tumor y utilizar esa información para desarrollar terapias específicas para combatirlo (Figura 1.1c). Esta estrategia tiene un gran potencial para mejorar los resultados del tratamiento del cáncer. Al personalizar los tratamientos, se pueden maximizar los efectos terapéuticos mientras se minimizan los efectos secundarios. Además, el uso de terapias personalizadas también puede ayudar a evitar tratamientos ineficaces y reducir el costo y el tiempo de tratamiento. Sin embargo, esta estrategia también presenta algunos desafíos importantes. Uno de los mayores desafíos es el acceso a tecnologías de secuenciación genética y análisis de datos, que son esenciales para identificar las mutaciones genéticas específicas en el tumor de un paciente. Además, el desarrollo de terapias personalizadas también puede ser costoso y requerir mucho tiempo, lo que puede limitar su disponibilidad y accesibilidad para algunos pacientes. En resumen, la estrategia antitumoral basada en "fármacos a la carta" tiene el potencial de ser un avance importante en la lucha contra el cáncer, pero aún enfrenta algunos desafíos importantes que deben ser abordados.

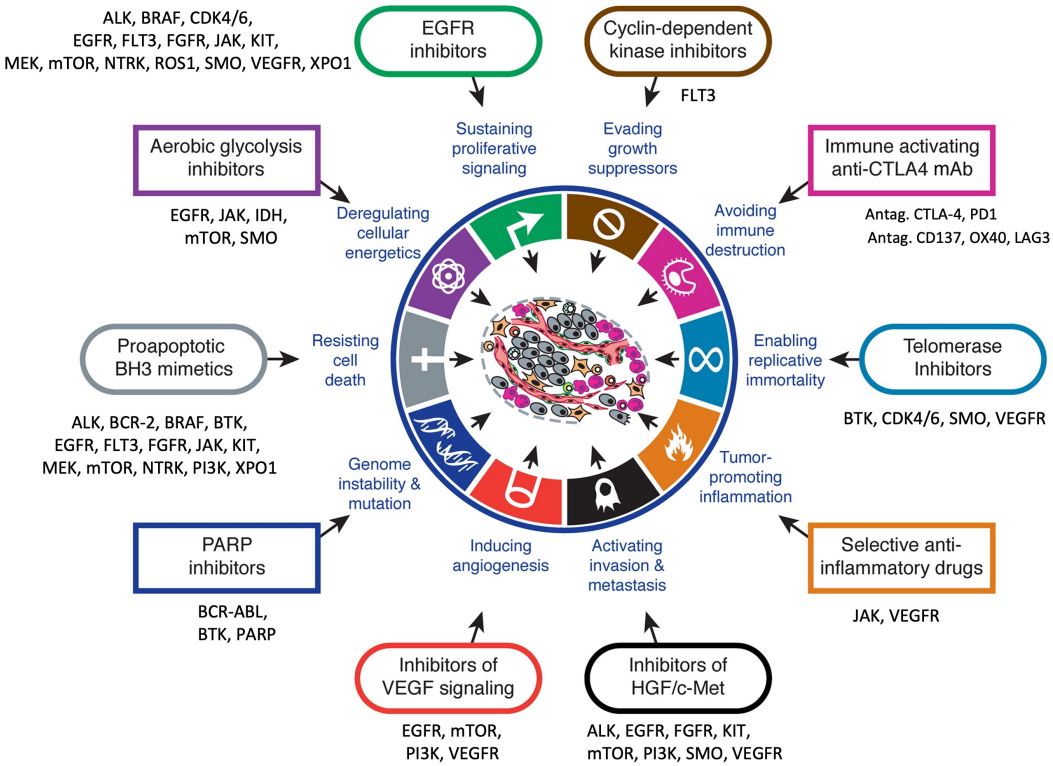


Figura 1.1c: Orientación terapéutica de las características del cáncer.[22] Se han desarrollado fármacos que interfieren con cada una de las capacidades adquiridas necesarias para el crecimiento y la progresión del tumor y se encuentran en ensayos clínicos o, en algunos casos, aprobados para uso clínico en el tratamiento de ciertas formas de cáncer humano (Modificado de ref. 22).

• **Inmunoterapia:** los fármacos inmunoterápicos[23-25] actúan estimulando el sistema inmunológico del paciente para que ataque y destruya las células tumorales. Los principales tipos de fármacos basados en la inmunoterapia incluyen inhibidores de puntos de control inmunitarios, terapia celular adoptiva, entre otros. La inmunoterapia ha tenido un gran impacto en los últimos años en el tratamiento del cáncer. Estos fármacos actúan estimulando el sistema inmunitario del paciente para que ataque las células tumorales, y han demostrado ser efectivos en el tratamiento de varios tipos de cáncer, como el

melanoma, el cáncer de pulmón y el cáncer renal. Por ejemplo, el trastuzumab,[26] un anticuerpo monoclonal que se dirige a la proteína HER2, se utiliza ahora en combinación con otros fármacos en el tratamiento del cáncer de mama HER2-positivo. El rituximab, es también un anticuerpo monoclonal utilizado en inmunoterapia contra el cáncer. Es un anticuerpo monoclonal quimérico que se dirige al antígeno CD20, que se encuentra en la superficie de los linfocitos B. Se utiliza principalmente para el tratamiento de linfomas no Hodgkin y ha demostrado ser efectivo en combinación con otros agentes quimioterapéuticos o inmunoterapéuticos. El rituximab fue aprobado por primera vez por la FDA en 1997. Otros fármacos de inmunoterapia incluyen inhibidores de puntos de control inmunológico, como el ipilimumab[27] y el pembrolizumab,[28] y terapias celulares, como las células CAR-T. Estos fármacos han proporcionado nuevas opciones de tratamiento para pacientes con cánceres avanzados que antes no tenían opciones de tratamiento efectivo. Estos fármacos actúan bloqueando la interacción entre las células tumorales y las células T del sistema inmunológico, lo que permite que las células T ataquen y destruyan las células tumorales. Ambos fármacos son anticuerpos monoclonales. El ipilimumab es un anticuerpo monoclonal IgG1 y el pembrolizumab es un anticuerpo monoclonal IgG4. Los anticuerpos monoclonales son moléculas diseñadas para reconocer y unirse específicamente a proteínas diana, y se utilizan ampliamente en la terapia contra el cáncer debido a su alta selectividad y afinidad. Tanto las pequeñas moléculas como los anticuerpos monoclonales son herramientas importantes en la lucha contra el cáncer y tienen ventajas y desventajas. Las pequeñas moléculas, como los inhibidores de quinasas, tienen la capacidad de penetrar en las células y dirigirse a objetivos intracelulares específicos, lo que los hace útiles para el tratamiento de tumores con mutaciones genéticas específicas. También pueden ser más fáciles de administrar y producir en grandes cantidades que los anticuerpos monoclonales. Por otro lado, los anticuerpos monoclonales tienen una mayor especificidad y afinidad por los objetivos extracelulares, como proteínas de superficie celular, y pueden activar respuestas inmunitarias específicas contra las células tumorales. Además, los anticuerpos monoclonales se han utilizado con éxito en la inmunoterapia contra el cáncer, un enfoque terapéutico que ha dado lugar a respuestas duraderas en algunos pacientes con cáncer. En resumen, ambas herramientas tienen sus propias ventajas y limitaciones, y su elección dependerá del tipo de cáncer, el objetivo terapéutico y las características del paciente.

- **Radioterapia:** la radioterapia consiste en la aplicación de radiación ionizante para destruir las células tumorales. Se utiliza principalmente en combinación con otros tratamientos como la cirugía y la quimioterapia. Cabe mencionar que el tratamiento del cáncer es cada vez más personalizado y depende del tipo de tumor, de las características moleculares del mismo y de la salud general del paciente. Además, se están desarrollando nuevas estrategias terapéuticas, como la terapia génica, la nanoterapia y la epigenética, que tienen el potencial de mejorar el tratamiento del cáncer en el futuro.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.2 Fármacos antimitóticos: Introducción

La mitosis es un proceso fundamental en el ciclo celular de los organismos eucariotas. Se trata de la división celular en la que se separan los cromosomas replicados y se distribuyen de manera equitativa en dos células hijas (Figura 1.2a). Durante la mitosis, el material genético de la célula madre se duplica y se distribuye en dos juegos idénticos en las células hijas. Este proceso es esencial para el crecimiento y la reparación de los tejidos en organismos multicelulares. En el contexto del cáncer, la mitosis juega un papel importante ya que el crecimiento celular descontrolado y la proliferación excesiva de células cancerosas es el resultado de una regulación defectuosa de la división celular. Las células cancerosas pueden adquirir mutaciones genéticas que alteran los procesos normales de la mitosis y permiten una proliferación celular descontrolada. Por ejemplo, las células cancerosas pueden dividirse más rápidamente de lo normal, lo que conduce a una rápida expansión del tumor. Además, los cambios en los genes que regulan la división celular pueden hacer que las células cancerosas se dividan incluso en condiciones en las que normalmente no deberían hacerlo, como la ausencia de estímulos de crecimiento externos.

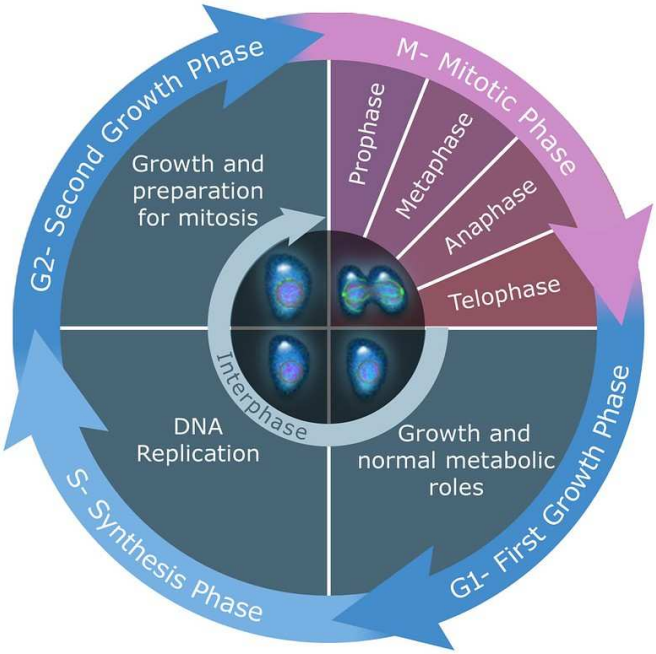


Figura 1.2a: Esquema general del ciclo celular y mitosis.[29]

La mitosis consta de varias etapas: profase, prometafase, metafase, anafase y telofase, seguidas de la citocinesis o división del citoplasma. En el ciclo celular normal, la mitosis es una etapa crítica que asegura que las células hijas tengan el mismo número de cromosomas que la célula madre y que la información genética se distribuya de manera uniforme. Sin embargo, en el cáncer, la regulación normal del ciclo celular se pierde y las células pueden proliferar de manera descontrolada. Las células cancerosas a menudo tienen alteraciones en los mecanismos de control del ciclo celular, lo que les permite dividirse incluso cuando no debería ocurrir. Por ejemplo, las células cancerosas pueden ignorar señales de detención del ciclo celular y seguir dividiéndose sin control.

La mitosis es, por lo tanto, una etapa crítica para el crecimiento y la propagación de las células cancerosas. Muchos fármacos anticancerígenos se dirigen precisamente a las células en mitosis para prevenir la proliferación de las células cancerosas. Además, los

estudios de la mitosis y sus mecanismos de regulación son importantes para comprender los defectos en el ciclo celular que conducen al cáncer y para desarrollar nuevas terapias para tratar esta enfermedad.

Existen dos tipos de paradas mitóticas:[30-34]

- **Parada mitótica normal:** Ocurre durante la metafase de la mitosis y es un proceso normal que se produce para garantizar que las cromátidas se unan correctamente a los microtúbulos antes de que la célula se divida. Si la célula detecta algún error en la unión de los microtúbulos a las cromátidas, se detendrá en la metafase y se activarán los mecanismos de corrección necesarios para solucionar el problema antes de continuar con la división celular.
- **Parada mitótica anormal:** Se produce cuando la célula detecta algún tipo de estrés celular que impide que la división celular progrese. Este tipo de parada mitótica se produce, por ejemplo, cuando se introduce un fármaco que impide la formación de los microtúbulos necesarios para la correcta separación de los cromosomas durante la división celular. En este caso, la célula se detiene en la metafase de la mitosis y puede sufrir daños irreparables que lleven a la apoptosis (muerte celular programada) o a la aparición de mutaciones genéticas que puedan dar lugar a la formación de células cancerosas.

En resumen, la parada mitótica normal es un mecanismo importante para asegurar la correcta segregación de los cromosomas durante la mitosis, mientras que la parada mitótica anormal puede tener consecuencias graves para la célula, pudiendo llevar a la muerte celular o a la aparición de células cancerosas.

Los fármacos antimitóticos son aquellos que interfieren con la división celular y se utilizan principalmente en el tratamiento del cáncer y otras enfermedades que implican un crecimiento celular descontrolado. Estos fármacos se han utilizado con éxito durante décadas en la quimioterapia para reducir el tamaño de los tumores y prolongar la supervivencia de los pacientes.

Tal y como se ha mencionado previamente, existen varios fármacos antimitóticos llamados “clásicos”, aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) de EE. UU. que se utilizan en la práctica clínica (Figura 1.2b). Algunos de ellos son:

- **Paclitaxel:** Este fármaco se utiliza en el tratamiento del cáncer de mama, de ovario, de pulmón y otros tipos de cáncer. Actúa inhibiendo la descomposición de los microtúbulos, una estructura que ayuda a las células a dividirse, lo que resulta en la muerte de las células cancerosas.
- **Docetaxel:** Este fármaco también se utiliza en el tratamiento del cáncer de mama, de próstata y de pulmón, entre otros. Actúa de manera similar al paclitaxel, inhibiendo la descomposición de los microtúbulos y deteniendo la división celular.
- **Vinblastina:** Este fármaco se utiliza en el tratamiento del linfoma de Hodgkin y otros tipos de cáncer. Actúa impidiendo la formación de los microtúbulos y, por lo tanto, detiene la división celular.
- **Vincristina:** Este fármaco se utiliza en el tratamiento del cáncer de mama, de pulmón, de ovario y otros tipos de cáncer. Actúa de manera similar a la vinblastina, inhibiendo la formación de los microtúbulos.
- **Eribulina:** Este fármaco se utiliza en el tratamiento del cáncer de mama metastásico. Actúa inhibiendo la formación de los microtúbulos y, por lo tanto, detiene la división celular.[35]

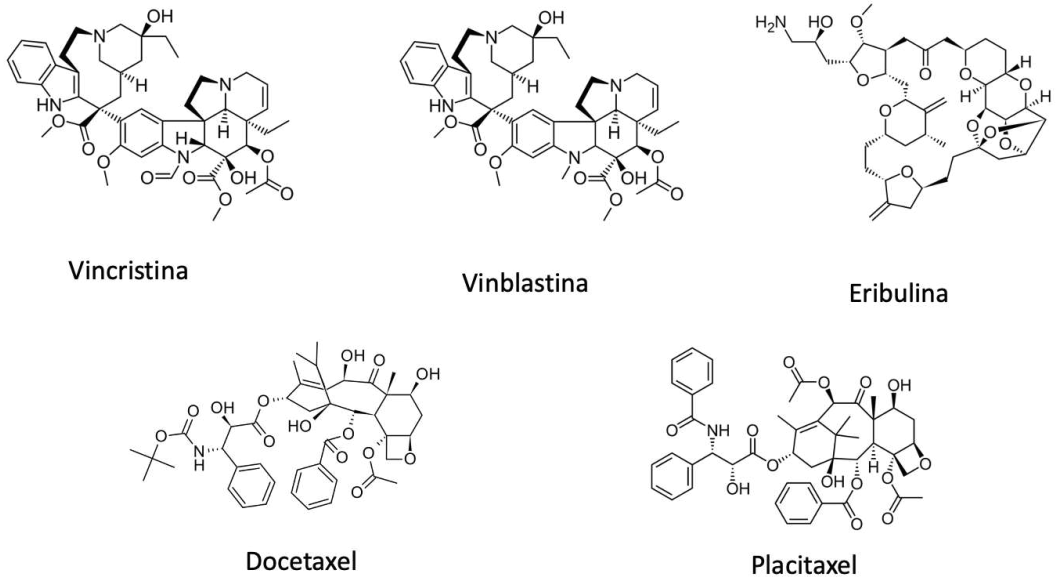


Figura 1.2b: Principales antimitóticos clásicos en uso.

Estos fármacos antimitóticos se administran típicamente por vía intravenosa en el hospital o en un centro médico especializado, bajo la supervisión de un médico y un equipo de enfermería experimentado. Es importante tener en cuenta que estos fármacos pueden tener efectos secundarios significativos y que su uso debe ser siempre supervisado cuidadosamente por un profesional de la salud capacitado.

1.2.1. Mecanismos de acción de los antimitóticos

Los antimitóticos pueden clasificarse en dos grupos: los que estabilizan los microtúbulos y los que los desestabilizan. Los antimitóticos que desestabilizan los microtúbulos son los más utilizados en la clínica, ya que inducen la detención de la célula en la fase mitótica y la apoptosis. Un ejemplo de antimitótico que actúa sobre la dinámica de los microtúbulos es la vinblastina, un alcaloide de la pervinca de Madagascar que se utiliza en el tratamiento de varios tipos de cáncer, incluyendo el linfoma y el cáncer de mama. La vinblastina inhibe la formación del huso mitótico al unirse a los microtúbulos y provocar su despolimerización. Otros ejemplos de antimitóticos que actúan sobre los microtúbulos son la vincristina, la paclitaxel y la docetaxel. Por lo tanto, el taxol (paclitaxel) y los alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina, entre otros) son dos tipos de fármacos antimitóticos que se utilizan en el tratamiento del cáncer, pero actúan de manera diferente sobre el proceso de división celular.

El Taxol actúa estabilizando los microtúbulos durante la fase de mitosis de la célula, lo que interfiere con la capacidad de la célula para completar la división celular. El taxol se une a los microtúbulos y previene su despolimerización, lo que impide la separación de los cromosomas durante la mitosis. Esto provoca la detención del ciclo y la muerte celular. Los alcaloides de la vinca, por el contrario, actúan bloqueando la formación de los microtúbulos en la fase de mitosis. Los alcaloides de la vinca se unen a la proteína tubulina, que es un componente importante de los microtúbulos, lo que impide la formación de los microtúbulos necesarios para la segregación adecuada de los cromosomas durante la mitosis. Esto provoca la detención del ciclo y la muerte celular.

En resumen, mientras que el taxol actúa estabilizando los microtúbulos y previniendo su despolimerización durante la mitosis, los alcaloides de la vinca actúan bloqueando la formación de los microtúbulos necesarios para la correcta segregación de

los cromosomas. Estas diferencias en el mecanismo de acción pueden tener implicaciones importantes en la selección y uso clínico de estos fármacos antimitóticos en el tratamiento del cáncer.

En cuanto a las perspectivas de futuro de las terapias basadas en fármacos antimitóticos, hay varias líneas de investigación y desarrollo en curso que podrían mejorar su eficacia y reducir sus efectos secundarios. Estos incluyen:

- **Nuevos fármacos antimitóticos:** Se están desarrollando nuevos fármacos que tienen como objetivo mejorar la especificidad y selectividad de los fármacos antimitóticos existentes, lo que significa que pueden apuntar a las células cancerosas de manera más efectiva y reducir los efectos secundarios en las células sanas.
- **Terapias combinadas:** Se están estudiando nuevas combinaciones de fármacos antimitóticos con otros tipos de terapias, como la inmunoterapia, para mejorar la eficacia del tratamiento.
- **Terapias personalizadas:** Con los avances en la genómica y la biología molecular, se están desarrollando terapias personalizadas que se basan en las características moleculares y genéticas de un tumor específico. Esto permitiría la selección de fármacos antimitóticos que sean más efectivos contra las células cancerosas de un paciente en particular.

Por lo tanto, las terapias basadas en fármacos antimitóticos continuarán siendo una parte importante del arsenal terapéutico contra el cáncer y otras enfermedades relacionadas con el crecimiento celular descontrolado. Se están realizando avances significativos en el desarrollo de nuevos fármacos y terapias combinadas, así como en la personalización de los tratamientos para mejorar su eficacia y reducir sus efectos secundarios.

1.2.2 Nuevas dianas antimitóticas prometedoras: Quinasas y Quinesinas

Las quinasas mitóticas son proteínas enzimáticas que regulan la progresión del ciclo celular y la mitosis, activando y desactivando otras proteínas a través de la fosforilación. Por otro lado, las quinesinas (también llamadas cinesinas) mitóticas son proteínas motoras que se encargan del movimiento y la distribución de los cromosomas durante la mitosis. Ambas tienen funciones importantes en la mitosis, pero su actividad y función son distintas.

Las quinasas mitóticas son importantes para la regulación del ciclo celular y la entrada en mitosis, mientras que las quinesinas mitóticas son responsables del movimiento y la distribución de los cromosomas en la célula durante la mitosis. En general, las quinasas mitóticas actúan en la regulación de la actividad de proteínas motoras como las quinesinas mitóticas.

En cuanto a las dianas antimitóticas más prometedoras, una de las principales dianas terapéuticas en el campo de la oncología es la proteína **Aurora quinasa**. Esta enzima regula la segregación de los cromosomas durante la mitosis y su sobreexpresión se ha asociado con muchos tipos de cáncer.

Se han desarrollado varios fármacos que inhiben la actividad de Aurora quinasa, que han demostrado actividad antitumoral en ensayos clínicos. Además, se está investigando el uso combinado de inhibidores de Aurora quinasa con otros agentes antitumorales para mejorar la eficacia del tratamiento. Otra diana antimitótica prometedora es la proteína PLK (**Polo-Like Kinase**), que es una quinasa que regula varios procesos durante la mitosis, incluyendo la separación de los cromosomas. Varios inhibidores de PLK se encuentran en diferentes fases de desarrollo clínico y algunos de ellos han demostrado actividad antitumoral en ensayos clínicos.

Se conocen alrededor de 10 quinesinas mitóticas que participan en diferentes procesos durante la mitosis. Algunas de las quinesinas mitóticas[36-38] importantes incluyen:

1. Quinesina-5 (Eg5): involucrada en la formación del huso mitótico y separación de los cromosomas.
2. Quinesina-12 (Kif15): participa en la estabilización de los microtúbulos y en la segregación de los cromosomas.
3. Quinesina-13 (MCAK): importante en la dinámica de los microtúbulos y en la separación de los cromosomas durante la mitosis.
4. Quinesina-14 (HSET): contribuye en la organización del huso mitótico y en la separación de los cromosomas.
5. Quinesina-10 (CENP-E): involucrada en la alineación de los cromosomas en la placa metafásica.
6. Kif14: también conocida como CHO1/MKLP1, participa en la citocinesis y en la regulación de la dinámica de microtúbulos durante la mitosis.
7. Kif23: también conocida como MKLP2, juega un papel importante en la citocinesis y la estabilidad del huso mitótico.
8. Kif18A: regula la dinámica de los microtúbulos y la separación de cromosomas durante la mitosis.

¿Cómo se relacionan las familas Aurora y Polo con las quinesinas mitóticas? Las quinasas Aurora y Polo, junto con las quinesinas, son proteínas esenciales que regulan la progresión de la mitosis. La Aurora B y Polo son quinasas mitóticas que regulan la segregación de los cromosomas y la citocinesis, mientras que las quinesinas, como la quinesina-5 (Eg5), son motores que se encargan del movimiento de los microtúbulos durante la mitosis. La quinasa Aurora B es una proteína central en la citocinesis y la segregación de los cromosomas. Esta quinasa es necesaria para la correcta formación del huso mitótico y para la separación de los cromosomas durante la anafase. Por su parte, la quinasa Polo se encarga de regular la actividad de la Aurora B y otros componentes del huso mitótico. La quinesina Eg5 también es importante en la coordinación de la mitosis, ya que se encarga del movimiento de los microtúbulos y su organización en el huso mitótico. La actividad de la quinesina Eg5 está regulada por las quinasas Aurora B y Polo, que controlan su localización y actividad (Figura 1.2.2a).[39-42] En conjunto, estas proteínas regulan de forma coordinada la progresión de la mitosis, asegurando la correcta segregación de los cromosomas y la formación de dos células hijas viables.

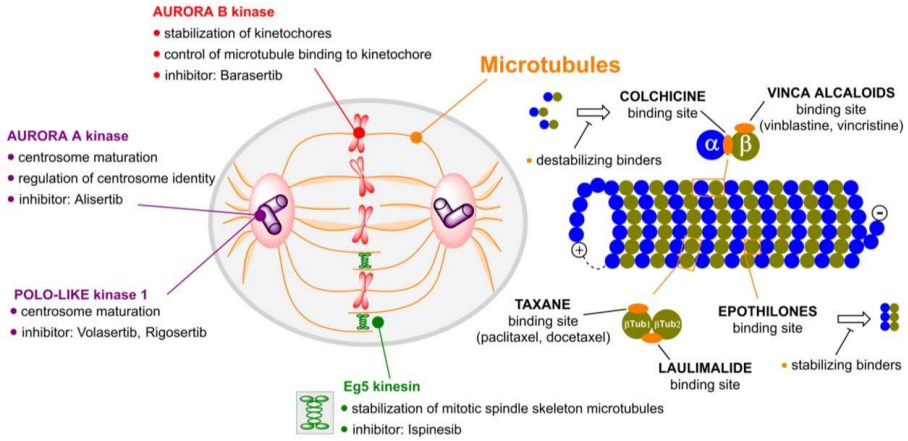


Figura 1.2.2a: "Venenos mitóticos" y sus dianas.[42]

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Existen cinco tipos de PLK (Polo-like kinase)[43-44] conocidos: PLK1, PLK2, PLK3, PLK4 y PLK5. Dentro de la familia Polo (PLK), el subtipo más importante es la proteína Polo-like kinase 1 (PLK1), ya que es la más estudiada y se ha demostrado que desempeña un papel clave en la regulación de la mitosis. Las proteínas de la familia PLK, incluyendo a PLK1, interactúan con otras proteínas de la célula para controlar la progresión de la mitosis y asegurar que las células se dividan correctamente. Por ejemplo, PLK1 interacciona con proteínas como Aurora A, Aurora B y la quinesina mitótica Eg5 para coordinar la formación y la separación de los husos mitóticos durante la mitosis. Además, PLK1 tiene múltiples funciones en la mitosis, como la regulación del ensamblaje del huso mitótico, la promoción de la entrada en anafase y la inhibición de la citocinesis prematura. Por tanto, PLK1 es esencial para la correcta progresión de la mitosis y la división celular.

De entre estas isoformas de PLK, la más relevante en la mitosis es PLK1, ya que desempeña una función crucial en la regulación de la progresión de la mitosis y la citocinesis. A continuación, se podría decir que PLK2 es la siguiente en relevancia, aunque su función en la mitosis no está completamente definida. PLK3 y PLK4 parecen estar más involucradas en la regulación del ciclo celular en general y en la respuesta celular al estrés.

A continuación, podemos clasificar los diferentes inhibidores publicados (Figura 1.2.2b) para cada una de estas dianas, ordenados por importancia:

- **Inhibidores de PLK-1:**[45-47]

Volasertib: ha mostrado actividad antitumoral significativa en varios estudios preclínicos y clínicos, y se encuentra en ensayos clínicos avanzados para el tratamiento del cáncer.
BI 2536: es uno de los inhibidores más potentes y selectivos de PLK-1 descubiertos hasta la fecha y ha demostrado una actividad antitumoral significativa en ensayos clínicos.
GSK461364: también es un inhibidor altamente selectivo de PLK-1 que ha mostrado actividad antitumoral en ensayos preclínicos y clínicos.

- **Inhibidores de AURKA:**[48-49]

Alisertib (MLN8237): ha mostrado actividad antitumoral en varios tipos de cáncer y actualmente se encuentra en ensayos clínicos avanzados para el tratamiento del cáncer.
Danusertib (PHA-739358): también es un inhibidor potente y selectivo de AURKA que ha demostrado actividad antitumoral en ensayos clínicos.
Barasertib (AZD1152): se encuentra en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer y ha mostrado una actividad antitumoral significativa en ensayos preclínicos y clínicos.

- **Inhibidores de AURKB:**

ZM447439: es uno de los inhibidores más potentes y selectivos de AURKB descubiertos hasta la fecha y ha mostrado actividad antitumoral en ensayos preclínicos y clínicos.
Barasertib (AZD1152): también es un inhibidor potente y selectivo de AURKB que se encuentra en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer.
GSK1070916: ha demostrado actividad antitumoral en ensayos preclínicos y clínicos y se encuentra en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer.

- **Inhibidores de CENP-E:**[50-51]

GSK923295: es un inhibidor potente y selectivo de CENP-E que ha mostrado actividad antitumoral en ensayos preclínicos y clínicos.
GSK923295A: es un análogo de GSK923295 que ha demostrado una mayor potencia y selectividad contra CENP-E en ensayos preclínicos.
PF-2771: es otro inhibidor potente y selectivo de CENP-E que ha mostrado actividad antitumoral en ensayos preclínicos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

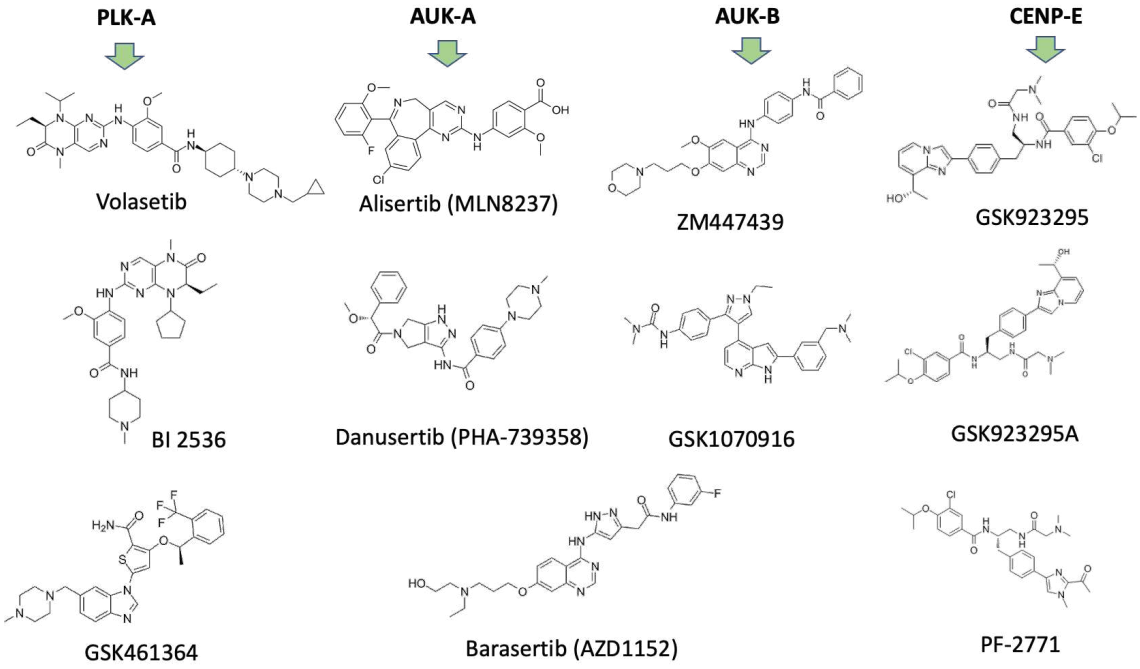


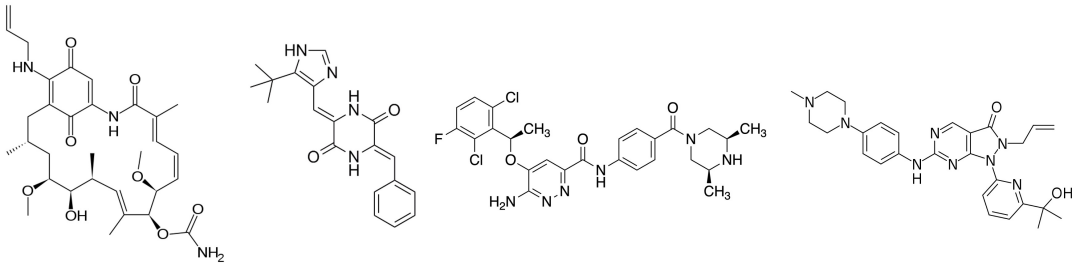
Figura 1.2.2b: Fármacos inhibidores de quinasas mitóticas que han demostrado actividad inhibidora de AUK en estudios preclínicos y ensayos clínicos, y algunos de ellos han sido evaluados en varias indicaciones de cáncer.

Por otra parte, hay varios fármacos antimitóticos en fase de estudio clínico en la actualidad (Figura 1.2.2c). Algunos de ellos son:

- **Tanespimicina:** Es un inhibidor de la proteína Hsp90, que se encuentra en varias vías de señalización celular implicadas en la división celular. Está siendo evaluado en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer de pulmón, de mama y otros tipos de cáncer.
- **Plinabulina:** Es un análogo sintético de la halichondrina B, que se une a los microtúbulos y los estabiliza, evitando su descomposición. Se está evaluando en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer de pulmón, de mama y otros tipos de cáncer.
- **Ensartinib:** Es un inhibidor de la proteína cinasa ALK (anaplastic lymphoma kinase), que se encuentra en varios tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de pulmón. Además de inhibir la señalización de ALK, también se ha demostrado que ensartinib interfiere con la división celular.
- **Adavosertib:** Es un inhibidor de molécula pequeña de la tirosina quinasa WEE1 con potencial actividad sensibilizante antineoplásica. Está siendo desarrollado por AstraZeneca. Se está investigando como tratamiento para el cáncer de páncreas con un ensayo de fase 1.

Es importante tener en cuenta que estos fármacos antimitóticos en estudio aún no han sido aprobados para su uso en la práctica clínica y se encuentran en diferentes etapas de desarrollo clínico. Además, su eficacia y seguridad aún deben ser evaluadas y confirmadas a través de ensayos clínicos rigurosos antes de su aprobación por las autoridades reguladoras.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



Tanespimicina Plinabulina Ensartinib Adavosertib

Figura 1.2.2c: Fármacos antimitóticos en fase de estudio clínico en la actualidad.

1.2.2.1 Inhibidores de la Quinesina mitótica KSP

Los inhibidores de la quinasa mitótica del huso (KSP, por sus siglas en inglés, Kinesin Spindle Protein) son una clase de fármacos antimitóticos que actúan al interferir con la función de la proteína quinesina mitótica del huso (Figura 1.2.2.1a). Esta proteína es esencial para la correcta segregación de los cromosomas durante la mitosis y su inhibición puede provocar la muerte celular.

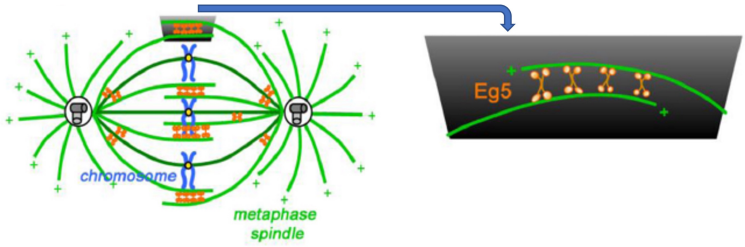


Figura 1.2.2.1a: Representación del huso mitótico y las moléculas Eg5 tetraméricas que cruzan los microtúbulos del huso.[52] Modificado de ref. 52.

Los inhibidores de la KSP son conocidos por su capacidad para bloquear la división celular en la mitosis, lo que resulta en la acumulación de células en mitosis y finalmente en la muerte celular.[53] El mecanismo exacto por el cual los inhibidores de la KSP inducen la muerte celular no se comprende completamente, pero se han propuesto varias hipótesis. Una de ellas sugiere que la inhibición de la KSP conduce a la activación de la proteína quinasa p38 MAPK, lo que a su vez activa la proteína quinasa c-Jun N-terminal (JNK) y la caspasa-3, una proteasa responsable de la apoptosis. Además, se ha sugerido que la inhibición de la KSP puede aumentar la actividad de la proteína quinasa B (Akt) y la proteína quinasa C (PKC), lo que también puede desencadenar la apoptosis. Otra hipótesis es que la inhibición de la KSP causa la formación anormal de husos mitóticos y la acumulación de células en mitosis prolongada, lo que finalmente desencadena la muerte celular por apoptosis o necrosis. También se ha demostrado que la inhibición de la KSP puede afectar la segregación de los cromosomas y la formación del huso mitótico, lo que contribuye a la muerte celular.

En resumen, aunque no se conoce completamente el mecanismo exacto de muerte celular inducido por los inhibidores de la KSP, se han propuesto varias hipótesis que implican la activación de vías de señalización de apoptosis, la formación anormal del huso mitótico y la segregación de los cromosomas.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

En 2022, una excelente revisión de Shanin[54] recopila los principales logros de los inhibidores de KSP y su recorrido en ensayos clínicos. Algunos ejemplos de estos inhibidores de KSP (Figura 1.2.2.1b) incluyen:

• **Ispinesib:** Ispinesib es un inhibidor selectivo de la quinesina KSP que ha sido evaluado en ensayos clínicos para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de pulmón de células no pequeñas y el cáncer de mama metastásico.
SB-743921:[55] Es otro inhibidor selectivo de KSP que se ha evaluado en ensayos clínicos para el tratamiento del cáncer de mama metastásico y otros tipos de cáncer. Dos ensayos clínicos Fase I/II completados Ambos completados. Colangiocarcinoma, tumores sólidos y linfoma.
• **Filanesib ARRY-520:**[56] El Filanesib es un inhibidor de la quinesina KSP que ha sido investigado en ensayos clínicos para el tratamiento del mieloma múltiple recurrente o refractario. Ha demostrado actividad antitumoral y se ha estudiado tanto en monoterapia como en combinación con otros agentes terapéuticos. Actualmente, 8 ensayos clínicos Fase I/II completada. 1 activo y 7 completados. Leucemia mieloide avanzada, mieloma y tumor sólido avanzado
• **MK-0731 (Epidasib):** El Epidasib es un inhibidor oral de la quinesina KSP que ha sido estudiado en ensayos clínicos en el tratamiento de tumores sólidos avanzados, incluyendo el cáncer de mama, el cáncer de ovario y el cáncer de próstata resistente a la castración. Siete ensayos clínicos, de ellos seis completados y uno terminado. Fase I completada con respuesta estable de la enfermedad en el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas, tumores sólidos, cáncer de ovario, cáncer gástrico, cáncer de próstata y leucemia aguda.
• **ARQ-751:** Es un inhibidor selectivo de la quinesina KSP y ha mostrado actividad antitumoral en estudios preclínicos. Se ha evaluado en ensayos clínicos en pacientes con tumores sólidos avanzados, incluyendo cáncer de ovario, cáncer de mama y tumores neuroendocrinos. Un estudio clínico detenido después de la fase I. Neoplasias malignas hematológicas y tumores sólidos metastásicos
• **AZD4877**: Es un inhibidor de KSP que ha sido estudiado en ensayos clínicos en pacientes con tumores sólidos avanzados. Ha mostrado actividad antitumoral en estudios preclínicos y se ha evaluado en combinación con otros fármacos en ensayos clínicos.
• **EMD534085**: Es otro inhibidor de la quinesina KSP que ha sido evaluado en ensayos clínicos en pacientes con tumores sólidos avanzados. Se ha investigado tanto en monoterapia como en combinación con otros agentes terapéuticos. Un estudio clínico
Tumores sólidos refractarios, linfoma de Hodgkin o linfoma no Hodgkin.
Los inhibidores de KSP han pasado por diferentes etapas de desarrollo clínico y se espera que en el futuro se puedan utilizar en el tratamiento de varios tipos de cáncer.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

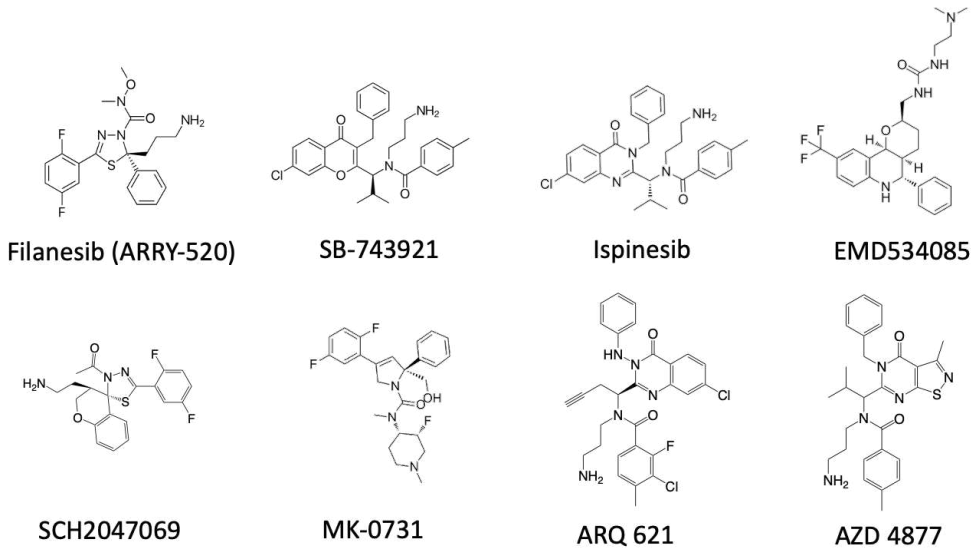


Figura 1.2.2.1b: Principales representantes de inhibidores de KSP en ensayos clínicos.

1.2.3. Limitaciones de los fármacos antimitóticos y de los inhibidores de KSP

Podemos clasificar los principales problemas asociados con los fármacos antimitóticos aprobados por la FDA actualmente y que constituyen aspectos a mejorar:

- **Toxicidad sistémica:** Muchos fármacos antimitóticos pueden tener efectos tóxicos en todo el cuerpo debido a su mecanismo de acción que afecta la proliferación celular en general. Esto puede dar lugar a efectos secundarios graves, como supresión de la médula ósea, daño a órganos vitales y problemas gastrointestinales.
- **Efectos adversos hematológicos:** Los fármacos antimitóticos pueden afectar la producción de células sanguíneas en la médula ósea, lo que puede dar lugar a anemia, trombocitopenia (baja cantidad de plaquetas) y leucopenia (baja cantidad de glóbulos blancos). Estos efectos pueden aumentar el riesgo de infecciones, hemorragias y otros trastornos hematológicos.
- **Resistencia al fármaco:** Con el tiempo, las células cancerosas pueden desarrollar resistencia a los fármacos antimitóticos, lo que disminuye su eficacia y limita las opciones de tratamiento. La resistencia puede surgir debido a cambios genéticos o adaptaciones de las células cancerosas.

El problema de la resistencia multifármaco (*Multidrug Resistance*, MDR)[57-59] en la quimioterapia antimitótica es un desafío común en el tratamiento del cáncer. La MDR se refiere a la capacidad de las células cancerosas para resistir múltiples fármacos antimitóticos diferentes, lo que hace que los tratamientos sean menos efectivos y, en algunos casos, completamente inútiles. La MDR puede ocurrir debido a varios mecanismos, como la sobreexpresión de proteínas transportadoras de fármacos, como las bombas de expulsión de fármacos, o cambios en la permeabilidad de la membrana celular. Esto puede llevar a una disminución de la concentración intracelular del fármaco antimitótico y, por lo tanto, a una disminución de su eficacia. Existen varias estrategias para abordar la MDR, incluyendo el desarrollo de fármacos que sean menos propensos a ser expulsados por las proteínas transportadoras, el uso de combinaciones de fármacos que sean eficaces contra células que han desarrollado resistencia y la modificación de la administración de fármacos para mejorar su biodisponibilidad y aumentar su concentración en el sitio tumoral. Algunos estudios también han investigado la posibilidad de utilizar inhibidores de las proteínas transportadoras de fármacos, como las bombas de expulsión de fármacos, para mejorar la eficacia de los fármacos antimitóticos.

Además, las terapias dirigidas a las proteínas y vías de señalización que se cree que están implicadas en la MDR también se han investigado como posibles estrategias para superar la resistencia a los fármacos antimitóticos.

- **Toxicidad en tejidos sanos:** Además de atacar las células cancerosas, los fármacos antimitóticos también pueden afectar a células sanas que se dividen rápidamente, como las células de la médula ósea, las células del revestimiento del tracto gastrointestinal y las células del folículo piloso. Esto puede resultar en efectos secundarios como pérdida de cabello, mucositis oral y problemas gastrointestinales.
- **Problemas de tolerancia:** Algunos pacientes pueden tener dificultades para tolerar los efectos secundarios de los fármacos antimitóticos, lo que puede afectar su calidad de vida y su adherencia al tratamiento. Los síntomas como náuseas, vómitos, fatiga y debilidad pueden requerir medidas de apoyo adicionales para controlarlos.
- **Interacciones medicamentosas:** Los fármacos antimitóticos pueden interactuar con otros medicamentos, lo que puede afectar su eficacia o aumentar el riesgo de efectos secundarios. Es importante que los pacientes informen a sus médicos sobre todos los medicamentos que están tomando para evitar interacciones no deseadas.
- **Síntesis laboriosas:** Por lo general, este tipo de ligandos se obtuvieron a través de rutas muy complicadas y laboriosas de síntesis, a pesar de no ser moléculas excesivamente grandes (por lo general PM inferior a 500 umas).

En términos generales, aunque los fármacos antimitóticos han demostrado ser eficaces en el tratamiento de algunos tipos de cáncer, como el cáncer de mama, el cáncer de ovario y el cáncer de pulmón, su uso ha estado limitado por varios factores. Uno de los principales desafíos es la toxicidad. Los fármacos antimitóticos no solo actúan sobre las células cancerosas, sino que también pueden afectar a las células normales que se dividen activamente, como las células de la médula ósea y las células del tracto gastrointestinal. Esto puede provocar efectos secundarios significativos, como la supresión de la médula ósea, la mucositis y la diarrea. Además, la resistencia a los fármacos es un problema importante en el tratamiento del cáncer con terapias antimitóticas. Las células cancerosas pueden desarrollar mutaciones que les permiten resistir la acción de los fármacos antimitóticos y seguir dividiéndose y creciendo. También pueden activar rutas de señalización alternativas que les permiten evadir la acción de los fármacos. Otro factor que ha limitado la eficacia de los fármacos antimitóticos es que a menudo se administran en combinación con otros fármacos antitumorales, como la quimioterapia, lo que puede hacer difícil evaluar su contribución específica al tratamiento del cáncer. A pesar de estos desafíos, los fármacos antimitóticos siguen siendo una parte importante del arsenal terapéutico para el tratamiento del cáncer y se continúan investigando nuevas formas de mejorar su eficacia y reducir su toxicidad.

En lo que respecta a los inhibidores de KSP, aunque ya se han completado varios ensayos clínicos de fase I/II que evalúan el uso de inhibidores de KSP para el tratamiento de tumores malignos, ARRY520 (filanesib) sigue siendo el único inhibidor de KSP que ha mostrado algunos resultados clínicos prometedores cuando se usa en combinación con otros medicamentos contra el cáncer, especialmente contra las neoplasias hematológicas.

A pesar del gran entusiasmo que estos fármacos generaron hace una década, la razones por las cuales estos agentes altamente específicos no consiguieron inhibir el crecimiento tumoral en pacientes podrían especularse a partir de los ensayos clínicos. Una hipótesis bastante plausible es que estos compuestos solo causarían daño a células cuando está ocurriendo la mitosis. Teóricamente, la quimioterapia debería ser más eficaz si las células tumorales (o la mayoría de ellas) estuvieran sincronizadas, ya que muchos fármacos quimioterapéuticos presentan un ciclo de especificidad de fase que ha demostrado que la cantidad (y fracción) de tiempo dedicado a la mitosis (que oscila entre

0,5 y 2,5 h) es menos (a menudo mucho menor) del 10 % del ciclo celular. Este hecho restringe en gran medida la eficacia de los inhibidores de KSP. Por lo tanto, parece claro que, en los modelos con tiempos de duplicación rápidos, las células que no están en mitosis son refractarias a la terapia y pueden repoblar las células tumorales que se dividen rápidamente a menos que se utilice una administración frecuente.[60] Por otra parte, los tumores humanos tienen tiempos de duplicación muy largos, en contraste con los modelos in vitro. La consecuencia de los tiempos rápidos de duplicación de los modelos *in vitro* es una vulnerabilidad a los inhibidores de KSP, la cual no ocurrirá en los tumores de crecimiento más lento en los pacientes.[61] Esto hace que estos tumores sean insensibles a los fármacos que se dirigen a la proliferación celular o a las proteínas que se expresan principalmente en la fase M del ciclo celular o, en menor medida, en la fase G2.

1.3 Los receptores de adenosina y su papel en el cáncer

1.3.1 Importancia y funciones fisiológicas de la adenosina

La adenosina es un ligando endógeno que juega roles centrales en diversos procesos fisiológicos esenciales para el funcionamiento del organismo. Aunque es reconocida principalmente como un componente crítico en la generación de energía celular, a través del trifosfato de adenosina (ATP), su papel se extiende mucho más allá.[62] En el sistema nervioso, la adenosina funciona como un neuromodulador, [63,64] siendo clave en la regulación de la actividad neuronal, al disminuir la excitabilidad de las células nerviosas. Su efecto es especialmente importante en la regulación del sueño y la vigilia, [65]donde se acumula en el cerebro durante el día y se disipa durante el sueño. Además, la adenosina juega un papel crucial en la regulación del sistema cardiovascular, donde induce la vasodilatación y regula la frecuencia cardíaca, lo que ayuda al organismo a adaptarse a las demandas metabólicas cambiantes. [66]

1.3.2 Síntesis y degradación de la adenosina

La biosíntesis de adenosina comienza con la unión de una molécula de adenina a una ribosa-5-fosfato, catalizada por la enzima adenilosuccinato sintetasa.[67,68] Esta reacción es el punto de partida para la síntesis de ATP, una fuente principal de energía celular. Por otro lado, la degradación de la adenosina es una parte igualmente crucial de su regulación fisiológica. Dos enzimas, la adenosina desaminasa y la adenina fosforribosiltransferasa, son responsables de convertir la adenosina en productos finales inactivos, como la inosina y la adenina, respectivamente.[68] Estas vías de síntesis y degradación mantienen un equilibrio delicado para asegurar niveles óptimos de adenosina en el organismo (Figura 1.3.2).

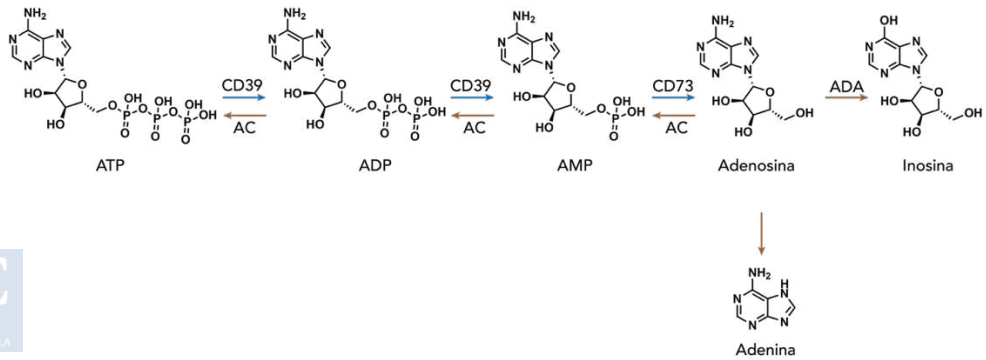


Figura 1.3.2. Síntesis y degradación de la adenosina.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.3.3 Receptores de adenosina, expresión y funciones

La adenosina ejerce la mayoría de sus efectos fisiológicos a través de la unión a receptores específicos en la superficie de las células. Cuatro subtipos de receptores de adenosina, denominados A_1, A_{2A}, A_{2B} y A_3, han sido identificados. La expresión de estos receptores varía en diferentes tejidos y órganos, lo que determina respuestas fisiológicas precisas y específicas. Los receptores A_1 y A_3 están predominantemente relacionados con efectos inhibidores, como la disminución de la actividad neuronal y la reducción de la frecuencia cardíaca. En contraste, los receptores A_{2A} y A_{2B} están asociados con efectos estimuladores, como la vasodilatación y la modulación de la respuesta inflamatoria. Estos receptores desempeñan un papel esencial en la homeostasis y la adaptación del organismo a cambios en el entorno.

1.3.4 La adenosina en el cáncer y sus funciones inmunosupresoras

En el contexto de la terapia del cáncer, la adenosina ha emergido recientemente como un regulador crítico del microambiente tumoral. Las células tumorales y las células inmunitarias en el entorno del tumor liberan grandes cantidades de adenosina. Esa adenosina actúa, principalmente, a través de los receptores A_{2A} y A_{2B} para ejercer efectos inmunosupresores. Estos efectos incluyen la inhibición de la activación y la función de las células T, lo que permite a las células tumorales evadir la respuesta inmune y promover la inmunosupresión en el microambiente tumoral. Además, la adenosina estimula la angiogénesis y promueve la proliferación de las células tumorales, contribuyendo así al crecimiento del tumor.

1.3.4.1 Influencia de la Adenosina en los *Hallmarks* del Cáncer

Como se ha comentado en la introducción de esta memoria, la naturaleza compleja y cambiante del cáncer dificulta el entendimiento y tratamiento de la enfermedad. Para comprenderlo mejor se han establecido los "*Hallmarks del cáncer*", que son las características fundamentales que subyacen al desarrollo y la progresión de los tumores malignos.[22,69-71] Entre los *Hallmarks* del cáncer se incluyen la evasión de la supresión de señales de crecimiento, la resistencia a la muerte celular programada, la capacidad para inducir la angiogénesis, la habilitación de la replicación ilimitada, la resistencia a la apoptosis, la capacidad para invadir tejidos circundantes y la capacidad para formar metástasis (Figura 1.3.4.1). Curiosamente, la adenosina, una molécula clave en la regulación de numerosos procesos fisiológicos, también ha sido identificada como un actor central que afecta muchos de los *Hallmarks del cáncer*. [72]

1.3.4.1.1 Evasión de la supresión de señales de crecimiento

Uno de los *Hallmarks* del cáncer es la capacidad de las células tumorales para evadir las señales de supresión de crecimiento, permitiéndoles proliferar de manera descontrolada. La adenosina contribuye a esta evasión al actuar como un mediador inhibidor del crecimiento celular a través de los receptores A_{2A} y A_{2B}. [73,74] La estimulación de estos receptores por la adenosina suprime la proliferación celular y promueve la formación de un microambiente tumoral que favorece el crecimiento del tumor.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Figura 1.3.4.1.1 Hallmarks del cáncer.

1.3.4.1.2 Resistencia a la muerte celular programada

La resistencia a la muerte celular programada, o apoptosis, es otro *Hallmark* del cáncer que desempeña un papel fundamental en la supervivencia y proliferación de las células tumorales. La adenosina puede aumentar la resistencia a la apoptosis al activar los receptores A_{2A} y A_{2B}, lo que inhibe las señales pro-apoptóticas y promueve la supervivencia tumoral.[75,76]

1.3.4.1.3 Inducción de la angiogénesis

La angiogénesis, o formación de nuevos vasos sanguíneos, es esencial para el suministro de nutrientes y oxígeno a los tumores en crecimiento. La adenosina estimula la angiogénesis a través de la activación de los receptores A_{2B}, lo que promueve el desarrollo de vasos sanguíneos en el microambiente tumoral y favorece la expansión del tumor. [77,78]

1.3.4.1.4 Habilitación de la replicación ilimitada

La replicación celular ilimitada es un *Hallmark* crucial para el desarrollo del cáncer. La adenosina puede influir en este proceso al actuar sobre los receptores A_{2A} y A_{2B}, promoviendo la supervivencia y proliferación celular en el entorno tumoral. [79]

1.3.4.1.5 Capacidad para invadir tejidos circundantes y formar metástasis

La adenosina también tiene un rol en impulsar la invasión y metástasis, características distintivas del cáncer. Al interactuar con los receptores A_{2B}, la adenosina fomenta la movilidad de las células cancerosas,[80,81] debilitando las conexiones intercelulares, facilitando su propagación a áreas lejanas del cuerpo y su eventual penetración en tejidos adyacentes.[80]

USC DE COMPOSTELA

En resumen, la adenosina ejerce una influencia significativa en los *Hallmarks* del cáncer al actuar a través de los receptores A_{2A} y A_{2B}.[72]Su capacidad para promover la evasión de la supresión de señales de crecimiento, la resistencia a la apoptosis, la angiogénesis, la replicación ilimitada y la formación de metástasis la convierte en una molécula clave en el desarrollo y la progresión de tumores malignos. El entendimiento de esta influencia podría abrir nuevas vías terapéuticas en la lucha contra el cáncer, centrándose en la modulación de los efectos de la adenosina en los procesos fundamentales de la enfermeda.[68,75,80,82,83]

1.3.4.2 Roles de los receptores A_{2A} y A_{2B} en la inmunoterapia del cáncer

La inmunoterapia, especialmente mediante el empleo de anticuerpos terapéuticos, ha transformado el enfoque terapéutico del cáncer al amplificar la habilidad del sistema inmunológico para atacar las células cancerosas y su microentorno.[84]Sin embargo, aunque ha tenido éxitos notables, no todos los pacientes responden de manera igual, y los tumores a menudo desarrollan mecanismos para evadir la respuesta inmune. En este contexto, los receptores A_{2A} y A_{2B} de adenosina han emergido como actores clave en la regulación de la respuesta inmune antitumoral, y su inhibición selectiva se ha convertido en una estrategia prometedora en la inmunoterapia del cáncer.[85-88]

Los receptores A_{2A} y A_{2B}, miembros de la familia de receptores acoplados a proteínas G, se encuentran en la superficie de diversas células, incluyendo células inmunitarias y células tumorales.[89-91]Su activación por la adenosina, un compuesto que se acumula en el microambiente tumoral, desencadena una cascada de eventos que suprimen la respuesta inmune antitumoral. En particular, los receptores A_{2A} están altamente expresados en células inmunitarias,[88,92] como linfocitos T, y su estimulación inhibe la activación y la función de estas células, reduciendo su capacidad para atacar el tumor. Por otro lado, los receptores A_{2B} están involucrados en la promoción de la angiogénesis y la proliferación de células tumorales, contribuyendo al crecimiento del tumor y al desarrollo de un microambiente inmunosupresor.[77,81]

La estrategia de bloqueo de estos receptores se ha convertido en un enfoque atractivo para potenciar la inmunoterapia del cáncer. Los antagonistas de los receptores A_{2A} y A_{2B}, diseñados para inhibir específicamente la señalización de estos receptores, se están sometiendo a ensayos clínicos para evaluar su eficacia en el tratamiento del cáncer.[93-95] La inhibición selectiva de estos receptores tiene el potencial de revertir la inmunosupresión en el microambiente tumoral, lo que permite una respuesta inmune más efectiva contra las células cancerosas.

Lo que hace aún más atractiva esta estrategia es su capacidad para actuar en sinergia con otros enfoques inmunoterapéuticos.[96] Se ha observado que la combinación de antagonistas de los receptores A_{2A} y A_{2B} con terapias como los inhibidores de puntos de control inmunológico [por ejemplo, anti-PD-1(Programmed Cell Death Protein 1) o anti-CTLA-4 Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4] o terapias de células CAR-T puede tener efectos sinérgicos. Esto significa que la terapia combinada puede ser más efectiva que cualquiera de las terapias por sí solas, aumentando así la probabilidad de controlar el crecimiento tumoral y lograr respuestas duraderas

En resumen, los receptores A_{2A} y A_{2B} de adenosina se han convertido en elementos cruciales en el panorama de la inmunoterapia del cáncer.[82] Su inhibición selectiva ofrece la promesa de revertir la inmunosupresión en el microambiente tumoral, potenciando así la capacidad del sistema inmunológico para eliminar las células cancerosas. Además, la posibilidad de combinar esta estrategia con otras terapias inmunoterapéuticas abre nuevas perspectivas en la lucha contra el cáncer y representa un

USC COMPOSTELA

emocionante avance en la búsqueda de tratamientos más efectivos y personalizados para los pacientes con cáncer.

1.3.5 Antagonistas de los Receptores A_{2B} en el Tratamiento del Cáncer

Como ya se ha comentado anteriormente, en la búsqueda constante de enfoques terapéuticos innovadores para combatir el cáncer, los antagonistas de los receptores A_{2B} han emergido como una clase de fármacos polivalentes que ofrecen nuevas perspectivas en la lucha contra esta enfermedad. Estos compuestos representan una prometedora estrategia que no solo se enfoca en revertir la inmunosupresión en el microambiente tumoral, sino que también aborda directamente el crecimiento y la invasión de las células tumorales, lo que los convierte en candidatos excepcionales para el tratamiento oncológico del futuro.

Los receptores A_{2B}, pertenecientes a la familia de los receptores de adenosina, desempeñan un papel crítico en esta inmunosupresión. La adenosina, liberada en grandes cantidades en el microambiente tumoral, se une a estos receptores, lo que inhibe la actividad de las células inmunitarias, especialmente las células T. Esto permite que las células tumorales evadan la detección y el ataque del sistema inmunológico, lo que contribuye al crecimiento y la propagación del cáncer. Los antagonistas de los receptores A_{2B} representan una herramienta poderosa en la lucha contra esta inmunosupresión. Al bloquear selectivamente estos receptores, se pueden revertir los efectos inhibidores de la adenosina en las células inmunitarias, restaurando así su capacidad para reconocer y destruir las células tumorales. Esta acción por sí sola podría mejorar significativamente la eficacia de la inmunoterapia, una estrategia prometedora que ha demostrado resultados impresionantes en el tratamiento de algunos tipos de cáncer.

Pero la versatilidad de los antagonistas de los receptores A_{2B} no termina ahí. Además de su impacto en la respuesta inmunitaria, se ha descubierto que estos compuestos tienen la capacidad de atacar directamente a las células cancerosas. Los receptores A_{2B} se expresan no solo en las células inmunitarias, sino también en las propias células tumorales. La activación de estos receptores en las células cancerosas desencadena una serie de señales pro-tumorales que, como ya se ha explicado, promueven el crecimiento y la invasión del cáncer. Al bloquear los receptores A_{2B} en las células tumorales, se puede inhibir esta cascada de eventos y frenar el desarrollo del cáncer en su raíz. En resumen, los antagonistas de los receptores A_{2B} representan una estrategia terapéutica versátil y prometedora en la lucha contra el cáncer. Su capacidad para revertir la inmunosupresión, inhibir directamente el crecimiento tumoral y mejorar la eficacia de la inmunoterapia los convierte en candidatos excepcionales para el tratamiento del cáncer en el futuro. A medida que se avanza en la investigación y el desarrollo de nuevas terapias, la modulación de los receptores A_{2B} se presenta como una herramienta invaluable en el arsenal contra esta enfermedad implacable. Por estos motivos, el desarrollo de antagonistas para los receptores A_{2B} ha avanzado mucho en los últimos años. El desarrollo temprano de antagonistas A_{2B} estuvo influenciado por derivados naturales como la cafeína. En la adenosina, agonista no selectivo, el núcleo de adenina es la parte que se une al receptor y la ribosa es el residuo que lo activa (Figura 1.3.5). Las adeninas sin ribosa generalmente son antagonistas de receptores de adenosina, y los derivados de alquilxantina son ejemplos prototípicos.[97-99]La cafeína y la teofilina, alcaloides naturales, actúan como antagonistas de receptores de adenosina débiles y no selectivos. Se ha investigado en profundidad la relación entre la estructura y actividad de los derivados de xantina. El **CGS15943** fue el primer antagonista sintético de AR descubierto,[100]

USC DE COMPOSTELA

destacando por su estructura de triazolo[1,5-c]pirimidina y su alta afinidad por los subtipos de AR.

A pesar de lograr derivados con buena afinidad para A_{2B}AR, las propiedades fisicoquímicas derivadas del esqueleto de xantina y su complicada síntesis, presentaron desafíos.[99] Por ello, en investigaciones recientes se han centrado en el desarrollo de antagonistas A_{2B} no xantínicos, en particular ligandos basados en pirimidina que combinan novedad estructural, alta afinidad, selectividad y factibilidad sintética.[101-106] El grupo del Profesor Sotelo ha contribuido de forma importante al desarrollo de antagonistas selectivos del receptor A_{2B} (Figura 1.3.5, compuestos **4,9–15**). Empleando estrategias preparativas basadas en la reacción de Biginelli, el grupo descubrió un nuevo farmacóforo que ha sido refinado y optimizado los perfiles farmacodinámicos y farmacocinéticos de diferentes familias de compuestos y proponiendo varios candidatos a fármacos.[101-106]

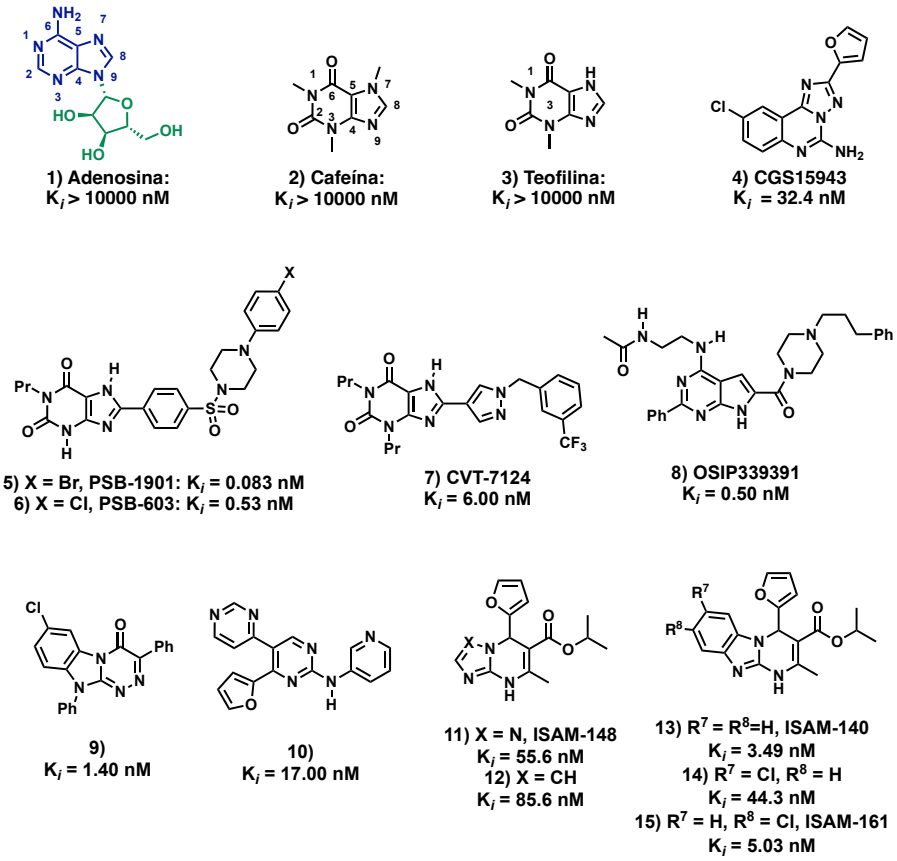


Figura 1.3.5. Estructura y datos de afinidad de antagonistas A_{2B} relevantes comparados con la Adenosina.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis inicial planteada en este trabajo partió de la idea de un **diseño de procedimientos sintéticos basados en la aplicación de reacciones multicomponente dirigidas**, especialmente diseñadas para la interacción con **sitios de unión específicos de dianas tumorales,** a partir de un conocimiento de su estructura.
Esta estrategia se apoyaría en la aplicación de herramientas computacionales que utilizan la información estructural de las dianas en cuestión y que "guiarían" la síntesis de moléculas. Estas herramientas utilizarían y analizarían la información estructural disponible, bien a través de estructuras 3D cristalográficas (disponibles en la base de datos *Protein Data Bank*), como en el caso del *docking*, o bien a través de la creación de modelos de receptor elaborados a partir de la técnica computacional llamada modelado por homología (*homology modeling*). El ensamblaje multicomponente y, en general, el diseño de procesos sintéticos en pocos pasos de síntesis aceleraría la obtención de ligandos afines a las dianas en cuestión.

Teniendo en consideración la hipótesis principal descrita en el párrafo anterior, así como la experiencia en la materia y antecedentes del grupo de investigación en el cual inicié este trabajo experimental, **el objetivo principal de esta Tesis Doctoral fue la obtención de nuevos agentes antitumorales, mediante la aplicación de un abordaje multidisciplinar dirigido a la interacción con sitios de unión específicos de dos dianas implicadas en procesos tumorales:**

- La quinesina del huso mitótico KSP (Kinesin Spindle Protein) y
- El receptor de A_{2B} de adenosina

Este **abordaje multidisciplinar desarrollado está basado en tres ejes**: **bioinformática, síntesis multicomponente dirigida y evaluación farmacológica.** Se pretendió la obtención rápida y eficiente de nuevos prototipos con perfil antitumoral, adaptados a las dianas antes mencionadas, para la obtención de nuevas moléculas activas capaces de modular estas dianas específicas tumorales que sirvan de base para nuevos desarrollos.

Los objetivos específicos de esta Tesis están contenidos en dos bloques claramente diferenciados (KSP y el receptor de A_{2B} de adenosina) y cuatro capítulos, en los que se pueden distinguir los siguientes objetivos generales:

1. Realizar un repaso bibliográfico sobre el **estado del arte en materia de antimitóticos obtenidos mediante reacciones multicomponente** y los posibles nichos de intervención y mejora de los fármacos actualmente disponibles que actúan mediante la intervención en procesos mitóticos. Esta temática se aborda en el capítulo I de la discusión de la memoria.
2. **El diseño y síntesis dirigida (*Targeted Oriented Synthesis*) hacia la quinesina KSP, de una quimioteca de compuestos derivados del núcleo de bencimidazol**, apropiadamente decorado, a través de reacciones multicomponente y estrategias de ciclación y decoración adecuadas de los

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

aductos generados por la reacción multicomponente. La filosofía inicial del proyecto contempló el empleo de pocos pasos de síntesis para acceder a los productos finales. Esta temática se aborda en los capítulos II y III de la discusión de la memoria.

3. **La evaluación farmacológica de los prototipos sintetizados como agentes antimitóticos**, principalmente a través de ensayos de inhibición ATPasa de la enzima KSP, estudios de citotoxicidad en líneas tumorales, así como estudios fenotípicos de inhibición de la quinesina KSP. Establecimiento de las Relaciones estructura-actividad (REA) preliminares. Esta temática se aborda en los capítulos II y III de la discusión de la memoria.
4. **La síntesis multicomponente (mediante reacciones Biginelli) de ligandos de tipo pirimidina, especialmente diseñados para su interacción con el receptor A_{2B} de adenosina.** Por último, la **evaluación farmacológica de los prototipos sintetizados en el apartado anterior**, mediante el estudio de unión al receptor A_{2B}. Esta temática se aborda en el capítulo IV de la discusión de la memoria.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3. METODOLOGÍA

3.1. Antecedentes metodológicos y resultados previos

Las principales herramientas metodológicas que se han empleado en la realización de este trabajo experimental están basadas en la filosofía y la experiencia previa de las investigaciones del grupo de investigación. Particularmente las relativas a la aplicación de metodologías que permitan un acceso rápido a estructuras bioactivas, aunque también otras estrategias como la aplicación de reactivos soportados, o la colaboración con grupos de diseño computacional de fármacos y evaluación farmacológica de diversa índole. La presente Tesis supone una primera aproximación a la temática del cáncer en el seno del grupo *Combiomed*, empleando las estrategias metodológicas siguientes:

3.1.1 Aplicación de las Reacciones Multicomponente "*ad hoc*": Quimiotecas dirigidas hacia la obtención de ligandos que modulen las funciones de la diana KSP o el receptor A_2B de adenosina

El descubrimiento de nuevos fármacos es un proceso complejo y fascinante que involucra la identificación y desarrollo de compuestos químicos con propiedades terapéuticas. A lo largo de la historia, se han descubierto y desarrollado numerosos fármacos que han revolucionado la medicina y han mejorado la calidad de vida de las personas. Sin embargo, a pesar de los avances logrados, el espacio químico[107] que queda por explorar en busca de nuevos fármacos es vasto y desafiante. Se estima que solo una fracción muy pequeña de este espacio químico ha sido investigada hasta ahora, lo que significa que existe un enorme potencial sin explorar para descubrir compuestos con propiedades terapéuticas.

El reto principal en el descubrimiento de fármacos radica en encontrar compuestos químicos que sean selectivos, seguros y efectivos en el tratamiento de enfermedades. A medida que se avanza en el conocimiento de la biología y la química de las enfermedades, se abren nuevas oportunidades para explorar enfoques innovadores y estrategias de diseño de fármacos. La problemática de futuro en el descubrimiento de fármacos radica en la complejidad de las enfermedades humanas, muchas de las cuales son multifactoriales y requieren enfoques terapéuticos más precisos y personalizados. Además, el desarrollo de fármacos puede enfrentar desafíos como la resistencia a los medicamentos, la toxicidad y los efectos secundarios indeseables.

Otro aspecto importante y de creciente preocupación en la actualidad referido al descubrimiento de fármacos es el concepto de sostenibilidad. A pesar de la importancia de los fármacos en la salud, por desgracia la gran mayoría adolecen de una característica importante: la capacidad de ser producidos de manera rápida, sostenible y asequible. La química sintética sigue consistiendo en una serie de procesos químicos seguidos de tediosas etapas de purificación de compuestos. Por consiguiente, los fármacos se producen mayormente a través de procesos laboriosos, con multitud de etapas y con frecuencia utilizando materiales tóxicos.

Relacionado con toda esta problemática, el doctor Barry Sharpless, Premio Nobel de Química en los años 2001 y 2022 y precursor de la llamada "*click chemistry*", propuso en su día que, dado que el espacio químico explorado es infinitesimal comparado con el

total por explorar, el enfoque debería estar orientada al empleo de metodologías robustas y versátiles. Su filosofía se centra en la exploración del espacio químico para descubrir nuevas moléculas útiles en diferentes áreas, incluyendo la medicina. En relación con la síntesis de nuevos fármacos, el Dr. Sharpless ha propuesto la idea de la síntesis modular, que consiste en la construcción de moléculas complejas a través de la unión de fragmentos más simples. Esta estrategia permite la síntesis de compuestos de manera más eficiente y rápida, además de proporcionar una mayor flexibilidad en la construcción de estructuras moleculares. la química clic es considerada una síntesis modular debido a su capacidad para unir diferentes módulos o bloques de construcción de manera rápida y eficiente para formar moléculas complejas con una alta especificidad y selectividad. La reacción clic utiliza reactivos de bajo costo, es altamente eficiente y puede ser utilizada en una variedad de aplicaciones, incluyendo la síntesis de fármacos.[108] En este contexto, del mismo modo, las reacciones multicomponente (RMC) son un tipo de síntesis modular que implica la unión simultánea de tres o más componentes para producir un producto complejo. Las RMC se contraponen a las clásicas síntesis lineales en las cuales la diversidad se va introduciendo a través de diferentes etapas de purificación (Figura 3.1.1). Son útiles en la búsqueda de nuevos fármacos, ya que permiten la síntesis de compuestos diversificados en una sola reacción, lo que puede acelerar el proceso de descubrimiento de nuevos medicamentos. En cuanto a la aplicación de las reacciones multicomponente en la búsqueda de nuevos fármacos, se han desarrollado diversas metodologías que han permitido la síntesis de compuestos con actividad biológica. Por ejemplo, se ha utilizado esta estrategia para la síntesis de moléculas con actividad anticancerígena, antiinflamatoria y antimicrobiana, entre otras.[109]

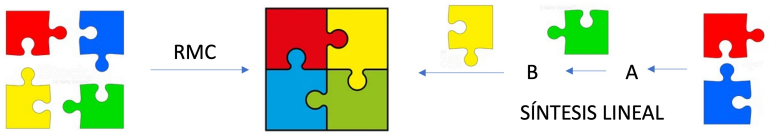


Figura 3.1.1: Reacciones multicompoente vs Síntesis lineales.

Entre las principales características intrínsecas de este tipo de transformaciones destacamos:

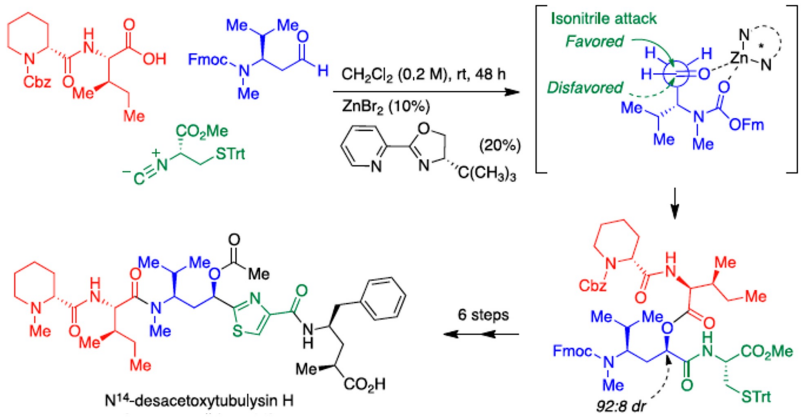
- **Eficiencia:** las reacciones multicomponente permiten la formación de múltiples enlaces en una sola etapa de reacción, lo que conduce a una alta eficiencia en la síntesis de moléculas complejas.
- **Versatilidad:** estas reacciones pueden llevarse a cabo en condiciones suaves y con diferentes tipos de sustratos, lo que las hace versátiles y adaptables a diferentes necesidades sintéticas.
- **Diversidad:** las reacciones multicomponente pueden generar una gran diversidad estructural, lo que las convierte en una herramienta útil para la síntesis de librerías de compuestos.
- **Facilidad de purificación:** las reacciones multicomponente suelen producir una única molécula producto, lo que facilita su purificación y ahorra tiempo y recursos.
- **Economía de átomos:** al generar múltiples enlaces en una sola etapa de reacción, las reacciones multicomponente presentan una alta economía de átomos, lo que las hace respetuosas con el medio ambiente y económicamente viables.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Hoy en día se conocen entre 300-400 reacciones multicomponente diferentes. Entre ellas aproximadamente un 20-25% están basadas en isonitrilos como un

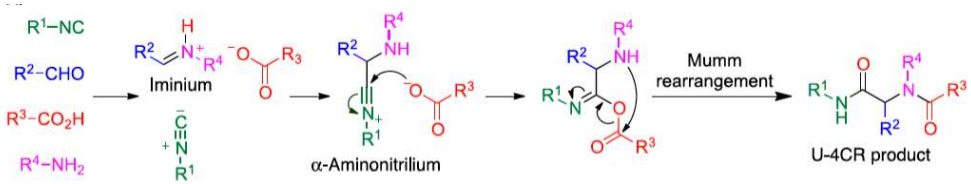
componente de partida. Una reciente revisión de nuestro colega Ángel Cores[50] repasa los principios activos que han sido sintetizados con la ayuda de este tipo de reacciones. Algunas de las reacciones multicomponente más empleadas en química y que han dado lugar a importantes avances en el descubrimiento de fármacos son las siguientes:

• **Reacción de Passerini:** es una reacción de acilación multicomponente que involucra un aldehído, un ácido carboxílico y un isonitrilo. La reacción produce una α-aciloxiamida.



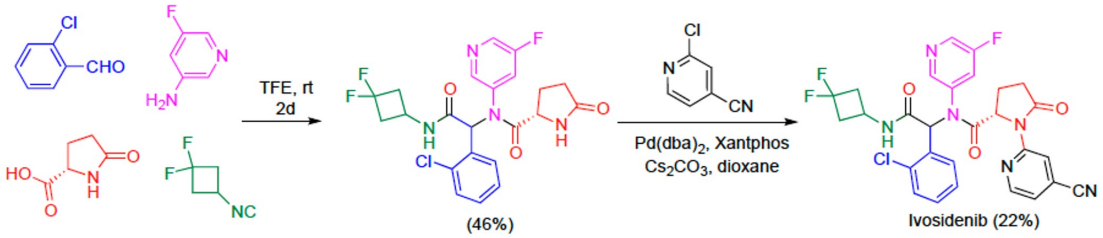
Esquema 3.1.1a: Síntesis de una Tubulisina mediante reacción de Passerini.[109]

• **Reacción de Ugi:** La reacción de Ugi es una reacción multicomponente ampliamente utilizada en la síntesis de compuestos orgánicos. Fue descubierta por el químico alemán Ivar Karl Ugi en 1959. Esta reacción permite la construcción eficiente de una amplia variedad de moléculas complejas mediante la combinación de una amina, un aldehído o cetona, un ácido carboxílico y un isonitrilo. La relevancia de la reacción de Ugi dentro de las reacciones multicomponente radica en su versatilidad y capacidad para generar una amplia diversidad estructural en una sola etapa de reacción. Esto la convierte en una herramienta valiosa en el campo de la síntesis de compuestos bioactivos y fármacos. La reacción de Ugi ha sido ampliamente aplicada en la síntesis de quimiotecas de compuestos, lo que permite la exploración de nuevas estructuras químicas con potencial actividad biológica. Las posibilidades mecanísticas que son posibles con estos cuatro ingredientes de partida pueden exponerse en la siguiente figura:



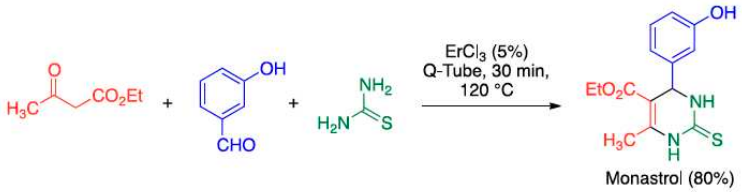
Esquema 3.1.1b: Reacción de Ugi.[109]

Existen muchos ejemplos de aplicación de la reacción Ugi en la síntesis de fármacos. Es destacable la síntesis del antitumoral Ivosidenib:



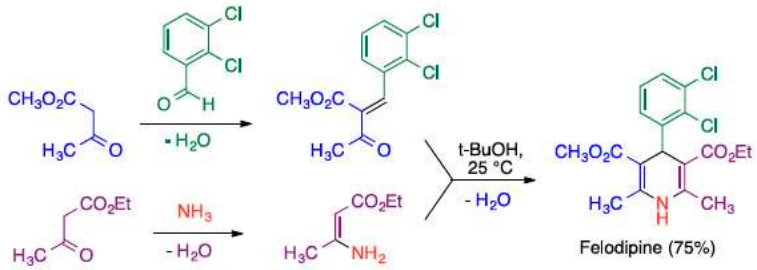
Esquema 3.1.1c: Síntesis del antitumoral ivosidenib mediante reacción de Ugi.[109]

• **Reacción de Biginelli:** es una reacción multicomponente que involucra un aldehído, una cetona y una urea. La reacción produce una dihidropirimidina.



Esquema 3.1.1d: Síntesis del antimitótico monastrol mediante reacción de Biginelli.[109]

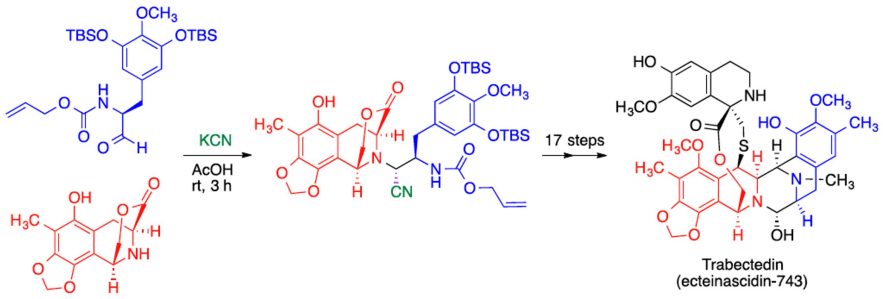
• **Reacción de Hantzsch:** es una reacción multicomponente que involucra una cetona, un aldehído y amoníaco. La reacción produce una dihidropiridina. Destaca la síntesis de la felodipina, que actúa como un bloqueador de los canales de calcio de acción duradera usado en medicina como antihipertensivo.



Esquema 3.1.1d: Síntesis de Hantzsch aplicada a la obtención de la felodipina.[109]

• **Reacción de Strecker:** es una reacción multicomponente que involucra un aldehído, cianuro de hidrógeno y amoníaco. La reacción produce un producto amina.

Estas son solo algunas de las reacciones multicomponente más empleadas en química, pero existen muchas otras que se utilizan ampliamente en la síntesis de compuestos orgánicos complejos.



Esquema 3.1.1f: La síntesis total de la trabectedina requiere un paso clave, la síntesis de Stecker.[110]

3.1.1.1 Síntesis orientada a la diversidad frente a síntesis orientada a la diana

La síntesis orientada a la diversidad (*Diversity Oriented Synthesis*, DOS) y la síntesis orientada a la diana (*target*) (*Targeted Oriented Synthesis*, TOS) son dos enfoques diferentes en el diseño y desarrollo de compuestos químicos, especialmente en el campo de la química medicinal y el descubrimiento de fármacos. El enfoque de síntesis orientada a la diversidad se centra en la generación de bibliotecas de compuestos químicos que abarquen una amplia variedad de estructuras y propiedades. El objetivo principal es explorar un amplio espacio químico en busca de compuestos con actividad biológica interesante, sin tener un objetivo o blanco específico en mente. Se utilizan estrategias sintéticas flexibles y de alto rendimiento para sintetizar una diversidad de moléculas, y luego se evalúan su actividad biológica y propiedades farmacológicas para identificar compuestos prometedores.

Por otro lado, el enfoque de síntesis orientada al *target* se centra en el diseño y síntesis de compuestos específicamente dirigidos a un objetivo terapéutico o una proteína diana particular. En este enfoque, se tienen en cuenta las características estructurales y las interacciones moleculares del objetivo deseado. Se utilizan técnicas de diseño racional y basado en la estructura para optimizar la afinidad y la selectividad de los compuestos hacia el objetivo deseado. El objetivo es desarrollar compuestos que tengan una alta actividad y especificidad hacia el blanco terapéutico seleccionado.

Ambos enfoques tienen sus propias ventajas y desafíos. La síntesis orientada a la diversidad permite la exploración de un amplio espacio químico y el descubrimiento de compuestos con actividades inesperadas, lo que puede conducir a nuevas oportunidades terapéuticas. Sin embargo, puede requerir una optimización adicional para mejorar la actividad y la selectividad de los compuestos identificados. Por otro lado, la síntesis orientada al *target* permite un diseño más preciso y una optimización dirigida de los compuestos hacia un objetivo específico, lo que puede acelerar el proceso de descubrimiento de fármacos. Sin embargo, existe el riesgo de limitarse a un único objetivo y perder la oportunidad de descubrir nuevas actividades o blancos terapéuticos. En última instancia, la elección entre la síntesis orientada a la diversidad y la síntesis orientada al *target* depende del contexto y los objetivos específicos del proyecto de descubrimiento de fármacos. En muchos casos, se pueden combinar ambos enfoques para aprovechar sus fortalezas y maximizar las posibilidades de descubrir nuevos compuestos bioactivos y fármacos prometedores.

En este trabajo experimental hemos "acotado" minuciosamente el espacio de diversidad que queríamos introducir. Esta manera, en función de la diana hemos empleado más o menos reactivos específicos de un tipo u otro en función de la arquitectura final deseada, con el fin de lograr una complementariedad química y topológica con la diana.

Una vez obtenidos los productos de Ugi, se pueden explorar diversas estrategias de ciclación para generar nuevos heterociclos (Figura 3.1.1.1). Estas estrategias pueden incluir reacciones de anillo cerrado, reacciones de cicloadición, reacciones de ciclización intramolecular, entre otras. Estas transformaciones químicas permiten la formación de anillos heterocíclicos, que son estructuras clave presentes en muchos fármacos y compuestos bioactivos. La importancia de estas estrategias de ciclación a partir de los productos de Ugi radica en su capacidad para generar bibliotecas de compuestos con diversidad estructural y actividad biológica potencial. Los heterociclos resultantes pueden tener propiedades interesantes, como la capacidad de interactuar con sitios activos específicos de proteínas o enzimas, lo que los convierte en candidatos prometedores para el desarrollo de nuevos fármacos.

USC DE SANTIAGO

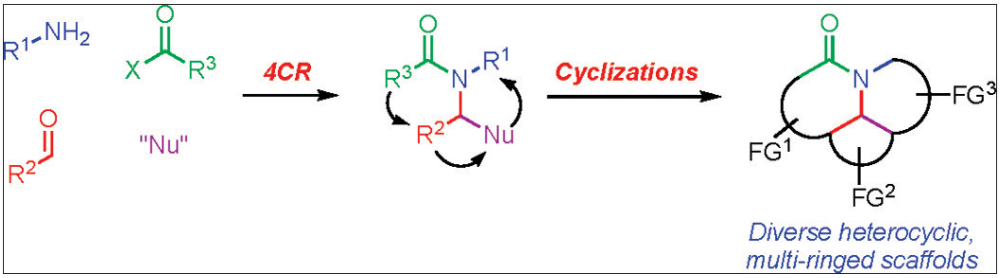


Figura 3.1.1.1: Estrategias de ciclación diversas a partir de los productos de U-4CR.[109]

Por lo tanto, en esta Tesis se han desarrollado dos grandes tipos de reacciones multicomponente para los objetivos químicos y farmacológicos planteados: Las reacciones de Ugi y las reacciones de Biginelli. En el primer caso, además se ha tenido muy en cuenta la estructura de la diana y muy específicamente el sitio de unión, tanto eligiendo los scaffolds de partida como la estrategia adecuada de ciclación que generase el tipo de estructura deseada. Todo este planteamiento se desarrollará en el apartado 4 de esta memoria.

En cuanto a la caracterización estructural de los compuestos generados en la presente memoria, hemos recurrido a diferentes técnicas, que requirieron entrenamiento en el uso e interpretación de los diferentes protocolos de RMN (^{1}H, ^{13}C, ^{19}F, NOESY, COSY), en espectrometría de masas tanto de baja como de alta sensibilidad, de infrarojos, dicroismo circular, etc. En este punto es destacable la utilización del programa de procesamiento de espectros de RMN perteneciente a la empresa MestreLab®, surgida de la Universidade de Santiago de Compostela.

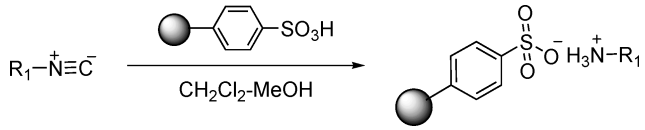
Otro aspecto significativo en el desarrollo de este proyecto ha sido el constante uso de las bases de datos Scifinder® o PubMed®, entre otras, que facilitaron el acceso rápido a información, en especial en los aspectos químicos y de búsqueda de condiciones de reacción apropiadas en el proceso de optimización de las reacciones de Ugi, ciclaciones, desprotecciones, oxidaciones, etc.

3.1.2 Conceptos extrínsecos aplicables a las RMC: Utilización de reactivos soportados (*scavengers*) para eliminar exceso de isonitrilo en procesos de work up

En las reacciones de Ugi, los isonitrilos se utilizan comúnmente como componente clave para la formación de enlaces C-N. Sin embargo, a menudo pueden producir subproductos no deseados, como la formación de cianuros (nitrilos) inestables. Para evitar esto, se pueden utilizar scavengers (secuestradores) de isonitrilos para atrapar los subproductos y evitar su acumulación. Estos scavengers son reactivos soportados sobre matrices poliméricas, que generalmente se basan en sílica o poliestireno, y pueden estar funcionalizados con grupos que reaccionen selectivamente con los subproductos no deseados. Por ejemplo, se pueden utilizar scavengers con grupos de ácido carboxílico para capturar nitrilos inestables (Esquema 3.1.2).

Los scavengers de isonitrilos pueden utilizarse para eliminar los olores fuertes que a menudo están asociados al uso de ellos. Los scavengers pueden capturar el isonitrilo libre y reducir su volatilidad y la intensidad del olor. Además, algunos scavengers también pueden ser utilizados para modificar las propiedades físicas y químicas de los isonitrilos, como su solubilidad en diferentes solventes, lo que puede ser beneficioso en ciertas aplicaciones sintéticas. Anteriormente, el grupo de investigación Combiomed ya había empleado este PS-TsOH en otros trabajos, facilitando la elaboración de las reacciones

multicomponente que emplean isonitrilos (Passerini, Ugi, etc). En esta memoria, se describe la utilización de este reactivo soportado en los capítulos II, III y IV.[110]



Esquema 3.1.2: Empleo de un scavenger ácido polimérico para la eliminación del exceso de isonitrilo en procesos work up.[110]

3.1.3 Empleo de herramientas computacionales que asistan el proceso de síntesis de fármacos inhibidores de la KSP o moduladores del receptor A_2B y que aceleren la generación de quimiotecas

Las tareas de análisis bioinformático que asistieron las síntesis de moléculas de esta memoria fueron realizadas por los grupos del profesor Hugo Gutierrez de Terán (Universidad de Uppsala, Suecia) y por el profesor Giovanni Marzaro (Universidad de Padua, Italia). Las sugerencias de los diseños proporcionados por estos colaboradores fueron visualizadas en nuestro Laboratorio de Química Farmacéutica con ayuda del programa Pymol, para el diseño *de novo*, de nuevos prototipos.

La técnica del *docking* y la técnica de homología molecular (*Homology Modeling*) son dos enfoques diferentes para el diseño de fármacos. La primera técnica se ha utilizado en el primer bloque de esta Memoria (Capítulos I, II y III), mientras la segunda se ha aplicado en segundo bloque (Capítulo IV). El empleo de esta última técnica se realiza cuando no se posee información precisa (por ejemplo, una estructura cristalográfica) de la estructura de la diana, ni tampoco de un ligando de referencia. Es lo que se denomina un "*Diseño basado en la estructura (SBDD) indirecto*". A continuación, se describen algunas de las diferencias más significativas entre ambas técnicas:

- **Fundamentos teóricos:** La técnica de homología molecular utiliza modelos estructurales de proteínas homólogas para diseñar fármacos. La técnica de *docking*, por otro lado, utiliza modelos de interacción entre un ligando y una proteína específica para predecir su capacidad de unión.
- **Uso de información previa:** La técnica de homología molecular requiere información previa sobre proteínas homólogas para crear modelos estructurales, mientras que la técnica de *docking* no requiere información previa sobre la estructura de proteínas relacionadas.
- **Flexibilidad en el tamaño y forma de los ligandos:** La técnica de *docking* es más adecuada para el diseño de ligandos pequeños y rígidos, mientras que la técnica de homología molecular puede ser útil para el diseño de ligandos más grandes y flexibles.
- **Escala de tiempo y recursos computacionales:** La técnica de homología molecular puede requerir más tiempo y recursos computacionales que la técnica de *docking* debido a la necesidad de construir modelos estructurales detallados. La técnica de *docking*, por otro lado, puede realizar simulaciones más rápidas y menos costosas.

En general, ambas técnicas son útiles en el diseño de fármacos y se pueden utilizar de manera complementaria para mejorar la precisión y la eficacia del diseño de fármacos. Existen varios ejemplos de fármacos aprobados que fueron diseñados mediante técnicas de *docking*.[111] Algunos de los más significativos son:

• **Darunavir:** un fármaco antiviral utilizado en el tratamiento del VIH. Fue diseñado utilizando la técnica de docking y fue aprobado por la FDA (Food and Drug Administration) en 2006.
• **Saxagliptina:** un fármaco utilizado en el tratamiento de la diabetes tipo 2. Fue diseñado mediante la técnica de docking y fue aprobado por la FDA en 2009.
• **Venetoclax:** un fármaco utilizado en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer. Fue diseñado utilizando la técnica de docking y fue aprobado por la FDA en 2016.
• **Lemborexant:** un fármaco utilizado en el tratamiento del insomnio. Fue diseñado mediante la técnica de docking y fue aprobado por la FDA en 2019.

Existen, además, fármacos diseñados mediante técnicas de docking que tienen actividad antitumoral. Aquí hay algunos ejemplos:

• **Olaparib:** un fármaco utilizado en el tratamiento del cáncer de ovario y de mama. Fue diseñado mediante técnicas de docking para inhibir la enzima PARP-1, lo que lleva a la muerte celular en células tumorales. Fue aprobado por la FDA en 2014.
• **Palbociclib:** un fármaco utilizado en el tratamiento del cáncer de mama. Fue diseñado mediante técnicas de docking para inhibir la cinasa dependiente de ciclina 4/6 (CDK4/6), lo que interrumpe el ciclo celular y detiene el crecimiento de las células cancerosas. Fue aprobado por la FDA en 2015.
• **Vemurafenib:** un fármaco utilizado en el tratamiento del melanoma metastásico. Fue diseñado mediante técnicas de docking para inhibir la proteína BRAF mutante, que es común en el melanoma. Fue aprobado por la FDA en 2011.
• **Venetoclax:** aunque mencioné anteriormente que este fármaco fue aprobado para ciertos tipos de cáncer, es importante destacar que también tiene actividad antitumoral en varios tipos de leucemia. Fue diseñado mediante técnicas de docking para inhibir la proteína BCL-2, que es importante para la supervivencia de las células tumorales.
• **Imatinib:** también conocido como Gleevec, es un fármaco utilizado para el tratamiento de ciertos tipos de leucemia y otros cánceres. Fue diseñado mediante técnicas de docking para inhibir la proteína quinasa BCR-ABL [el gen BCR (Breakpoint Cluster Region) y el gen ABL (Abelson)], que se encuentra en la mayoría de los casos de leucemia mieloide crónica. Fue aprobado por la FDA en 2001. El descubrimiento del imatinib (*Gleevec*®) (Figura 3.1.3) es considerado como un hito en la historia de la quimioterapia del cáncer, ya que fue el primer fármaco diseñado específicamente para inhibir una proteína quinasa oncogénica, en este caso la proteína quinasa Bcr-Abl implicada en la leucemia mieloide crónica.[112] El enfoque utilizado para el descubrimiento del imatinib, conocido como "diseño basado en la estructura", se basó en la identificación de una estructura cristalina de la proteína quinasa Bcr-Abl, que permitió el diseño de un compuesto capaz de unirse de manera selectiva y reversible a la proteína quinasa. El proceso de diseño del imatinib incluyó la realización de estudios de docking y la síntesis de una serie de análogos estructurales, lo que permitió la optimización de la afinidad, la selectividad y la actividad antitumoral del compuesto. El resultado final fue un fármaco altamente selectivo y eficaz, que ha demostrado ser capaz de inducir respuestas moleculares y clínicas sostenidas en pacientes con leucemia mieloide crónica y otros tipos de cáncer. El descubrimiento del imatinib ha sido pues un gran impulso para el desarrollo de nuevos fármacos diseñados específicamente para inhibir proteínas quinasas oncogénicas, lo que ha llevado a la identificación y síntesis de otros fármacos, como el gefitinib y el erlotinib para el tratamiento del cáncer de pulmón, el dasatinib para la leucemia linfocítica crónica, y el nilotinib y el ponatinib para la leucemia mieloide crónica.

USC DE SANTIAGO

• **Dasatinib:** Es otro fármaco utilizado en el tratamiento de la leucemia mieloide crónica y otros cánceres. Fue diseñado mediante técnicas de docking para inhibir varias proteínas quinasas, incluyendo BCR-ABL y Src. Fue aprobado por la FDA en 2006.
• **Sorafenib:** es un fármaco utilizado en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer renal, hepatocelular y tiroideo. Fue diseñado mediante técnicas de docking para inhibir varias proteínas quinasas, incluyendo Raf y VEGFR. Fue aprobado por la FDA en 2005.
• **Lapatinib:** Es un fármaco utilizado en el tratamiento del cáncer de mama HER2-positivo. Fue diseñado mediante técnicas de docking para inhibir las proteínas quinasas HER1 y HER2. Fue aprobado por la FDA en 2007.

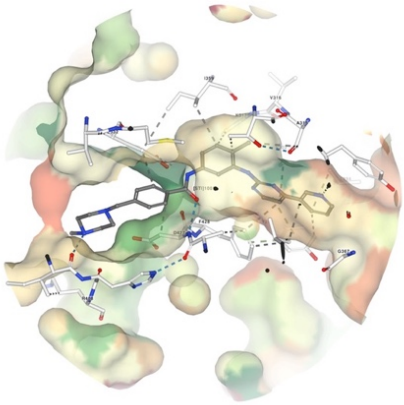


Figura 3.1.3: Detalle del sitio de unión del imatinib. [113]

• **Rucaparib:** Es un fármaco utilizado en el tratamiento del cáncer de ovario. Fue diseñado mediante técnicas de docking para inhibir la enzima PARP-1 [(Poly(ADP-ribose) polymerase-1], lo que lleva a la muerte celular en células tumorales. Fue aprobado por la FDA en 2016. Es importante destacar que estos fármacos antitumorales fueron diseñados mediante técnicas de docking, pero también fueron sometidos a rigurosos ensayos clínicos antes de ser aprobados por la FDA.

En los capítulos II y III de esta Memoria (bloque I) se utilizaron diferentes programas de docking. en una estrategia para identificar compuestos bioactivos sobre la quinesina KSP. Se realizaron experimentos de acoplamiento utilizando softwares como *Surflex* o *GOLD v5*, centrándose en el bolsillo L5/α2/α3 de KSP y en estructuras cristalográficas del Protein Data Bank. En base a estos resultados se hizo una predicción de las posiciones de unión para compuestos específicos y una biblioteca de análogos, todos los cuales se seleccionaron en función de su potencial interacción con KSP, según lo sugerido por los estudios de acoplamiento.
En el cuarto capítulo (Bloque II), dedicado al papel de la adenosina en cáncer se empleó modelado de homología y acoplamiento ligando-receptor para el diseño basado en la estructura de los ligandos de los receptores de adenosina. Se generó la estructura 3D inactiva de los receptores y se acoplaron los ligandos, considerando la flexibilidad de los mismos.

3.1.4 Evaluación farmacológica de los prototipos sintetizados en los apartados anteriores

La evaluación farmacológica de las moléculas sintetizadas a lo largo de este trabajo, fueron llevados a cabo por diferentes grupos.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Evaluación de la actividad en KSP: Ensayos de inhibición ATPasa de una diana: Los ensayos de inhibición ATPasa se utilizan para evaluar la capacidad de un fármaco para inhibir la actividad de una enzima específica conocida como ATPasa. Las ATPasas son enzimas que juegan un papel crucial en la regulación del metabolismo celular y la generación de energía. Algunas ATPasas están sobreexpresadas o mutadas en células tumorales, y su inhibición selectiva puede interferir con la viabilidad y la proliferación de estas células cancerosas. Estos ensayos miden la capacidad del fármaco para interferir con la actividad de la ATPasa y, por lo tanto, evaluar su potencial como agente antitumoral.

Ensayos de actividad celular (citotoxicidad): Los ensayos de actividad celular, también conocidos como ensayos de citotoxicidad, se utilizan para evaluar la capacidad de un fármaco para inducir la muerte celular en células tumorales. Estos ensayos se realizan in vitro utilizando líneas celulares cancerosas cultivadas en placas de cultivo. El fármaco en cuestión se incuba con las células durante un período de tiempo determinado, y luego se evalúa la viabilidad celular utilizando diversos métodos, como ensayos de colorimetría o de fluorescencia. La disminución en la viabilidad celular en comparación con un control sin tratamiento indica la actividad citotóxica del fármaco y su capacidad para inhibir el crecimiento de las células tumorales. Tanto las líneas celulares HCT116 como HeLa son ampliamente utilizadas en estudios de investigación y evaluación de fármacos antitumorales. Estas líneas celulares se han establecido a partir de células tumorales humanas y se utilizan en una variedad de ensayos, incluyendo los ensayos de actividad celular (citotoxicidad). Estos ensayos implican la exposición de las células a diferentes concentraciones del fármaco de interés, seguido de la evaluación de la viabilidad celular y la determinación de la concentración a la que se produce una reducción significativa en la viabilidad celular. Esto proporciona información sobre la citotoxicidad y la eficacia del fármaco en las células tumorales.

Ensayos fenotípicos: Los ensayos fenotípicos son un enfoque más amplio en la evaluación de fármacos antitumorales, ya que se basan en la observación de cambios fenotípicos en las células o tejidos después del tratamiento con un fármaco. Estos ensayos evalúan cómo el fármaco afecta a las células tumorales en términos de morfología, crecimiento, migración, invasión y otros rasgos fenotípicos. Los ensayos fenotípicos proporcionan, por tanto, una visión integral de los efectos del fármaco en la biología del cáncer y pueden ayudar a identificar nuevos mecanismos de acción o características específicas de los tumores que son susceptibles al fármaco evaluado.

Estos ensayos son solo algunos de los métodos utilizados en la evaluación de fármacos antitumorales. Cada uno proporciona información importante sobre la eficacia y el mecanismo de acción potencial de un fármaco en el contexto del cáncer. Es importante tener en cuenta que estos ensayos generalmente se complementan con estudios preclínicos y ensayos clínicos para validar la eficacia y la seguridad de los fármacos antes de su uso generalizado en pacientes.

3.1.5 Evaluación farmacológica y otras metodologías para la modulación del receptor A2B

- **Ensayos de unión de radioligandos:** En el bloque II, dedicado a los receptores de adenosina, se realizaron ensayos de unión de radioligandos para determinar la afinidad de nuevos ligandos por los cuatro subtipos de receptores de adenosina humanos (A_1, A_2A, A_2B y A_3). Los datos se expresaron como K_i (nM) y se realizaron ensayos in vitro utilizando receptores de adenosina humanos

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

expresados en diferentes células transfectadas. Se utilizaron radioligandos específicos para cada receptor (ver capítulo IV).

- **Experimentos funcionales - Ensayos de cAMP:** Se llevaron a cabo ensayos funcionales para evaluar la capacidad del compuesto más prometedor de inhibir la producción de cAMP estimulada por NECA (5'-N-ethyl-carboxamidoadenosina), (10 μM).

- **Análisis de datos**: Los valores de IC50 y K_i se obtuvieron ajustando los datos mediante una regresión no lineal. Además, se calcularon los valores funcionales de K_B a partir de los valores de IC50 utilizando el método de Leff y Dougall.

- **Separación de enantiómeros**: Se decidió separar el compuesto racémico más atractivo identificado en sus respectivos enantiómeros utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) quiral y espectroscopía de dicroísmo circular (CD). La espectroscopía de dicroísmo circular (CD) es una técnica que se utiliza para estudiar la estructura quiral de moléculas, especialmente biomoléculas como proteínas y ácidos nucleicos. Mide la diferencia en la absorbancia de la luz circularmente polarizada en sentido horario y antihorario, lo que proporciona información sobre la asimetría estructural y la disposición de los grupos quirales en la muestra. Esto ayuda a comprender la conformación y la organización de las moléculas en función de la longitud de onda de la luz y es útil en la caracterización de macromoléculas biológicas y materiales químicos. Esta separación permitió asignar la configuración absoluta de cada enantiómero.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

4. COMPENDIO DE PUBLICACIONES

PUBLICACIÓN 1:

Multicomponent reactions in antimitotic drug discovery

Cores, A.[1] Carbajales, C.[1] Coelho, A.*[1,2]
Revista: *Current Topics in Medicinal Chemistry*
Editorial: Bentham Science
ISSN: 1873-4294. Año de publicación: 2014 Volumen: 14 Número: 20
Páginas: 2209-2230
DOI: 10.2174/1568026614666141127115130

[1]Center for Research in Biological Chemistry and Molecular Materials, University of Santiago de Compostela, Spain.
[2]Department of Organic Chemistry, University of Santiago de Compostela, Spain.

Contribución específica en la publicación:
Elaboración y corrección del manuscrito bibliográfico. Adquisición y análisis de datos bibliográficos.

Índices de calidad:
Q1 en el año de publicación de la revista (2014).
Q1 (12/59) Medicinal Chemistry.
Índice de impacto: 3,4.
Artículo de revisión, correspondiente Capítulo 1 de esta memoria.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae

Current Topics in Medicinal Chemistry, 2014, *14*, 2209-2230

Multicomponent Reactions in Antimitotic Drug Discovery

Angel Cores[1], Carlos Carbajales[1] and Alberto Coelho[1,2,*,#]

[1]*Center for Research in Biological Chemistry and Molecular Materials, University of Santiago de Compostela, Spain;* [2]*Department of Organic Chemistry, University of Santiago de Compostela, Spain*

Abstract: As enabling technology, the development and application of multicomponent reactions (MCRs) are now an integral part of the work of any major medical research unit. Targeted MCR approaches focused on specific antimitotic pathways afford new solutions for the medicinal chemistry of the XXI century. In this review, the contribution of these procedures to the discovery of antimitotic drugs that are currently in clinical trials or already in the market is discussed.

Keywords: Antimitotic, Biginelli, Aurora kinases, KSP, Multicomponent reactions, Ugi.

[#]**Author's Profile:** Dr. Alberto Coelho is currently a associate professor at University of Santiago de Compostela (Spain) and a Researcher of the Center for Biological Research and Molecular Materials (CIQUS-USC). His research interests include structure based drug design, targeted multicomponent reactions and Medicinal Chemistry.

INTRODUCTION

Mitosis is an elaborate process in actively proliferating cells, resulting in the division of duplicated sets of chromosomes and two genetically identical daughter cells. Failure of cell-cycle checkpoint regulations often results in aneuploidy and genetic instability, culminating either in cell death or cancer [1]. Despite being the shortest phase of the cell-cycle, mitosis orchestrates major changes in multiple cellular components. Hence, it is considered to be the most fragile period of the cell-cycle, during which it is highly susceptible to cell death when exposed to various harmful events [2].

An ideal antimitotic drug interferes with normal mitotic propagation without seriously affecting quiescent, non-dividing cells. Spurred by the success of paclitaxel and vinblastine for the treatment of various malignancies, mitotic cell death (MCD) is considered to be highly effective in treating tumor cells [3]. The strategy of clinically targeting cancerous cells at their most vulnerable state during mitosis has instigated numerous studies into the MCD pathway [4]. A repertoire of new chemical inhibitors targeting various mitosis-specific kinases, motor proteins and multiprotein complexes has been developed since the relative success of the classical microtubule poisons such as vincas or taxanes. These new drugs are naturally more mitosis-selective yet without the side effect of neurotoxicities [5, 6]. However, dramatic *in vitro* and *in vivo* results do not necessarily translate to clinic efficacy, as seen in the majority of these mitotic therapeutics. One of the main reasons for the difficulty of finding effective antimitotic are, first, the inherent slow growth of human tumors and the rapid development of drug resistance (associated to mitotic slippages both as a cause and as a consequence) limit patients response and curb the full potential of existing mitosis-selective inhibitors. Moreover, the genetic and phenotypic heterogeneity of cancer presents a large challenge to effective chemotherapy. Drug responses vary greatly, not only among disease types, but also among individual patients with the same disease. For certain inhibitors of kinase oncogenes, variation in drug sensitivity can be caused by mutations in the drug binding site [1-7], but for most anticancer drugs, the mechanistic basis of drug sensitivity is poorly understood.

In view of all these problems based in the clinical experience with antimitotic drugs, open questions are still in discussion about the antimitotic therapies: Are these drugs still relevant as a potent chemotherapeutic strategy? How to improve the selectivity of antimitotics towards cancer cells without off-site(s) targeting? Can the balance of therapeutic benefits and reversible side effects be struck in combinatorial treatments consisting of multiple antimitotics targeting different stages of mitosis? What about multi-phasic combinatorial therapies encompassing antimitotics, DNA-damaging agents and/or antiangiogenic drugs? [4]. The answers to these questions necessarily involve clinical evaluation of different therapeutic strategies.

Today, the best results of chemotherapy are based on the concept of "tailored medicine", specific treatments for each patient and type of tumor, for example combining antimitotics with drugs that appropriately modulate apoptotic pathways. These approaches will require new and novel molecular entities that would be found in new chemical spaces, many of them not accessible by traditional organic synthesis but more efficient transformations.

Chemical efficiency in modern terms implies not only the traditional concept of chemical yield but it also takes into account chemo-, regio-, and stereoselectivity, atom economy, and convergence of the reaction. The compliance of these aspects has been the center of many efforts over the second half of the last century [8]. Many aspects of the modern criteria of synthetic efficiency to achieve an easy and rapid production of collections of the above target molecules are covered by the multicomponent reactions (MCRs) [9], as

*Address correspondence to this author at the Center for Research in Biological Chemistry and Molecular Materials. University of Santiago de Compostela. Spain; Tel: ++34-881815739; Fax: ++34-881-815704;
E-mail: albertojose.coelho@usc.es

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1873-5294/14 $58.00+.00 © 2014 Bentham Science Publishers

a powerful tool for the efficient generation of structurally and stereochemically diversified families of the identified biologically validated targets (focused libraries) [10].

The resurgence of the MCRs in the last decade as major supplier of big libraries, has evolved into a trend of more rational design, involving targeted libraries, preferably directed at specific targets involved in a specific disease. With the introduction of molecular biology and high-throughput biological screening, the demand on the number and the quality of compounds for drug discovery has increased enormously. Furthermore, increasing structural information [available on different antimitotic targets such as Kinesin Spindle Protein (KSP-Eg5), Aurora Kinase (AUK), Polo-Like Kinases (PLK), etc.] enables rational discovery of novel potent and selective drugs with a predictable mechanism. Similarly, progress in the discovery of new targeted MCRs, will enable quick access to new drugs that improve the effectiveness of existing antimitotic and evaluate the true potential of antimitotic drugs as effective agents against cancer. This review is focused on the success, scope and future of the multicomponent reactions in the development of new antimitotic treatments.

CURRENT MITOSIS-SELECTIVE STRATEGIES AGAINST CANCER

Although the number of types of enzymes involved in the mitosis is imprecise, kinases have become one of the most intensively pursued classes of drug target with approximately 30 distinct kinase targets being developed to the level of a Phase I clinical trial. The vast majority of these targets are being investigated for the treatment of cancer. Despite a high degree of conservation in the ATP binding site, highly selective small molecules with favourable pharmaceutical properties can be developed [11]. The main enzymes known to date that play key roles in mitosis are presented in Fig. (**1**). Colectively, we can describe four major simplified antimitotic strategies for which there have been discovered various antimitotic drugs: Targeting mitotic entry and the spindle, targeting the Spindle Assembly Checkpoint (SAC) and finally targeting the mitotic exit. The major mitotic kinases are the Cyclin-Dependent Kinase 1, Cdk1 [12] the aurora kinases family (aurora A, B and C) [13] and the polo-like kinases family (Plk1 to PLK4) [14]. Other important enzymes play important roles in mitosis such as kinesines and phosphatases (PP1, PP2A, and is Cdc25 which has dual specificity) [15]. A comprehensive presentation of the molecular mechanisms of mitosis is beyond the scope of this article. Next, we present a brief description of the molecular events that ensure the progression of mitosis.

Targeting Mitotic Entry

One class of new targets involves kinases responsible for directing cells into mitosis. The most prominent mitotic kinase is the cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1), the founding member of the Cdk family of cell-cycle regulators. Generaly, mitotic entry is driven by the activation of a 'mitosis-promoting factor', which comprises the cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1)/cyclin B1 heterodimer [16]. Therefore, inhibition of Cdk1 blocks mitosis and induces cell death. Nevertheless, despite the excitement generated at preclinical stages, several human trials on Cdk drugs failed to deliver significant clinical advantages, with toxicity and side effects [17].

Targeting the Spindle Assembly

Classical Microtubule Poisons

All mitotic drugs currently used in the clinic [taxanes (e.g., paclitaxel, taxotere), vinca alkaloids (e.g., vinblastine, vinorelbine) and epothilones (e.g., ixabepilone, epothilones A, B)] shown in Fig. (**2**), are microtubule poisons that perturb microtubule dynamics, impairing the formation of a proper bipolar spindle. Microtubule drugs are usually classified in two main groups: microtubule-destabilizing agents that inhibit microtubule polymerization (e.g. vinca alkaloids) and microtubule-stabilizing agents (e.g. taxanes) that enhance microtubule polymerization [18]. Despite the great success of these groups of drugs in the treatment of different types of tumors, these drugs are far from ideal prototype antimitotic drug, mainly because of its major side effects. The dose-limiting toxicities of these drugs are largely a consequence of the general disturbance of microtubule dynamics that they induce, causing serious neurotoxicity [19, 20]. In addition, acquisition of resistance is quite common in

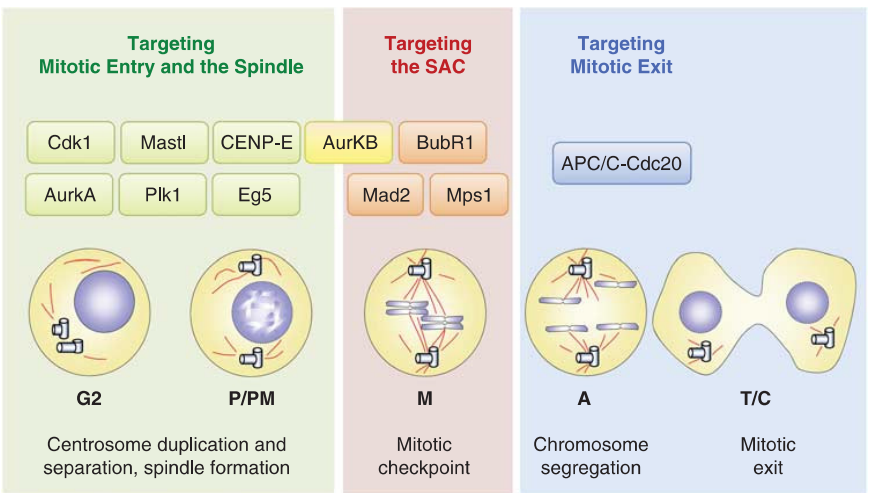


Fig. (1). New spindle targets in mitosis [15].

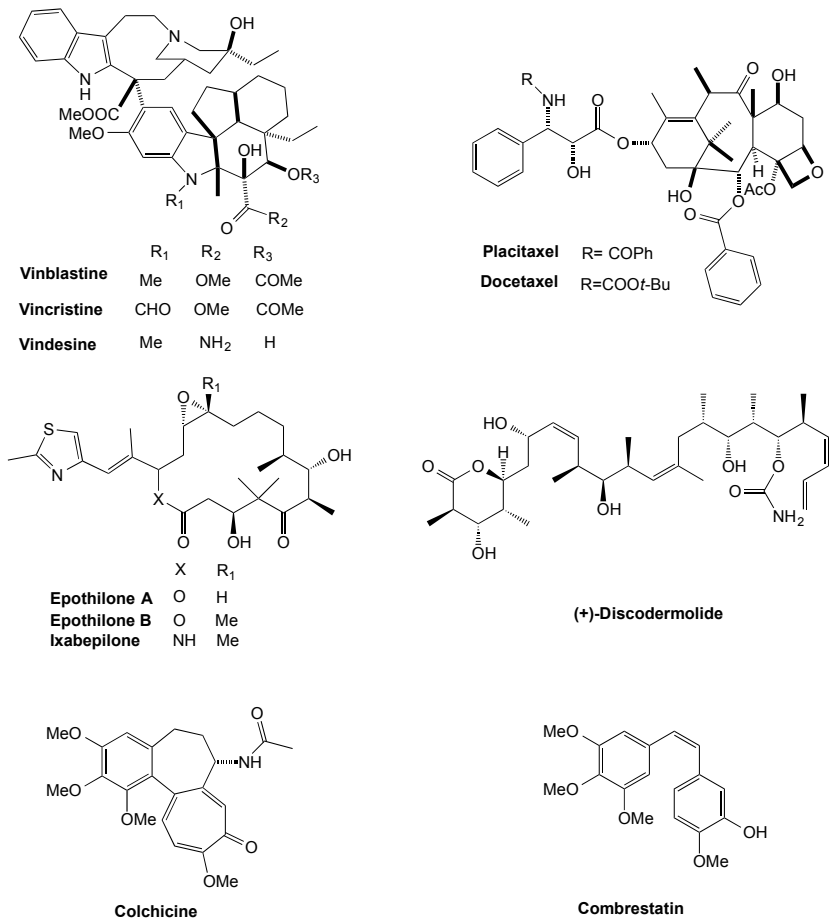


Fig. (2). Classic antimitotic agents acting on microtubules.

patients treated with anti-microtubule drugs [19]. However, this generation of classic antimitotic drugs will continue to be used in clinic in the coming years (either individually or in association with other new drugs), mainly due to their effectiveness compared to the relatively poor results obtained in clinical trials by the new antimitotic drugs that act on new mitotic targets showed in Fig. (**1**). By this reason, it has been speculated that the success of microtubule poisons might be given by its ability to target non-mitotic functions of microtubules [21].

The vinca alkaloids (Fig. **2**) exemplified by vincristine, vinblastine, vindesine, and vinorelbine are β-tubulin binding agents that interfere with proper mitotic spindle formation by preventing the normal dynamics and polymerization of spindle microtubule formation. The vinca alkaloids are important in the treatment of leukemias, lymphomas, small cell lung cancer, and other cancers [22]. These agents are also known as microtubule-destabilizing agents or microtubule polymerization inhibitors or depolymerizers.

Taxanes (Fig. **2**) are exemplified by paclitaxel (taxol) and docetaxel (taxotere) [18]. Paclitaxel increases microtubule polymerization and thus interferes with spindle microtubule dynamics and prevents the dividing cell from progression. These are microtubule-stabilizing agents or polymerizing agents. The taxanes are clinically useful in the treatment of breast, lung, ovarian, head and neck, and bladder carcinomas among others. Epothilones [24] and (+)-discodermolide [25] are also potent microtubule-stabilizing agents that have undergone intensive clinical evaluation. A peculiarity of the microtubule binding agents is their extreme structural diversity and, in many cases, structural complexity (Fig. **2**). Vincas and taxanes are complex molecules, generally difficult to synthesize. The relative ease in accessing the taxol through semisynthesis subdued the impact of total synthesis of taxol on its supply problems. Synthesizing taxol analogues with less molecular complexity and comparable cytotoxicity to the parent molecule is an attractive aim [28].

The third class, typified by colchicine, is comprised of a diverse collection of small molecules that bind to the colchicine binding site. These compounds are microtubule polymerization inhibitors similar to the vinca alkaloids. However they bind to a different site and their depolymerization mechanism of action is also different. Combrestatins (Fig. **2**) are a class of drugs that are in clinical trials as antitumor agents that bind to the colchicine binding site [29]. There are no clinically approved antitumor agents that bind to the colchicine site.

New Spindle Targets

Anti-Motor Proteins (Kinesin Inhibitors)

One of the most important groups of key regulators of the spindle are kinesin motor proteins, which have crucial functions in spindle assembly, chromosome congression and seg-

regation [30]. The superfamily of kinesin ATPases consists of more than a hundred representative proteins, which can be ordered into 14 different families. There have been identified 44 kinesins in the human genome. The growing interest of the kinesins as an antitumor targets emerged from the pioneer identification of monastrol, the first small-molecule inhibitor of kinesin spindle protein (KSP-Eg5) [31]. As a consequence of these promising results, a number of KSP-Eg5 inhibitors have been studied, and some of them (such as ispinesib and AZD-4877) have recently entered into clinical trials. Human KSP-Eg5, a member of the kinesin superfamily, plays a key role in mitosis, as it is required for the formation of a bipolar spindle. Although side effects are moderate, the clinical efficacy of KSP-Eg5 inhibitors has been limited, with only few studies demonstrating a partial response [32]. However, it seems very likely that the effectiveness of these drugs is increased in the presence of other antitumor agents. Given the great interest shown so far about this kinesin, numerous examples of multicomponent reactions applied to obtain new inhibitors have emerged and will be addressed ahead.

In addition to KSP-Eg5, several other mitotic kinesin motor proteins contribute to the proper alignment and segregation of chromosomes [33]. These include MKLP1, Kif4, Kid, MCAK and CENP-E among others, being the KSP by far the most advanced potential drug target in this family of proteins. Kinesin CENP-E has recently emerged as a potential antitumoral target [34]. This kinesin is also a plus end-directed motor protein that appears to have a pivotal role specifically in mitosis. This enzyme accumulates during late G2 and M-phases. It is localized at the kinetochores (Fig. **1**) and is required for proper chromosome congression during metaphase. Moreover, it also stabilizes kinetochore–microtubule attachments and serves as a sensor of SAC by binding to and regulating the activity of BubR1 [35].

Mitotic Kinases

Protein phosphorylation plays a fundamental role in many cellular events and is heavily involved in cell division. Kinases are enzymes that transfer a phosphate group from a high-energy donor molecule, such as ATP, to a target substrate [36]. Currently, the search for kinases inhibitors is one of the priorities in cancer research and, as a result, several kinase inhibitors have been developed as successful anticancer drugs [37]. Two main groups of mitotic kinase families have attracted much attention during the last couple of years, both in academia and in the pharmaceutical industry: the aurora kinases, which are essential for accurately dividing chromosomes to each daughter cell and the polo-like kinases are important during both mitosis and cytokinesis [38]. The mammalian aurora members A, B and C are serine/threonine protein kinases that have multiple essential roles during mitosis. Often times, they are overexpressed in several tumor types, making them ideal targets for cancer therapy [39]. They fulfill important roles during mitosis to ensure proper centrosome function, chromosome alignment and segregation [40-42]. Aurora-A has been shown to be amplified in several tumors and can act as an oncogene [43]. Both aurora-A and aurora-B kinases are key regulators of mitosis with distinct functions that were considered as novel mitotic drug targets due to their frequent overexpression in human cancer [44]. The 0effective role of aurora C is unclear [45] but its known that it is a chromosomal passenger protein, and that it binds directly to INCENP and survivin *in vitro* [46, 47]. Frequent gene amplifications in various tumor entities were only found for aurora-A and overexpression of aurora-A, but not aurora-B is sufficient to transform rodent fibroblasts suggesting that aurora-A rather than aurora-B might represent an oncogene [48].

Targeting the Mitotic Checkpoint

Imparing a functional spindle is monitored by a mitotic checkpoint, known as the spindle assembly checkpoint (SAC), that delays mitosis, providing cells with additional time to resolve errors in microtubule–kinetochore attachment [49]. The SAC involves a group of conserved checkpoint proteins including Mad1, Mad2, Bub1, BubR1, and Bub3 among others, that are recruited specifically to kinetochores that are either not attached to microtubules or that do not exhibit a tension across sister kinetochores, which indicates a lack or incomplete chromosome alignment [50].

Targeting Mitotic Exit

Inhibiting mitotic progression triggers the SAC and inhibits APC/C–Cdc20. During a normal mitosis the APC/C is activated by a co-factor, known as Cdc20 that targets cyclin B for its proteasome mediated degradation leading to the exit from mitosis [50]. Manchado *et al.* have recently shown that the ablation of Cdc20 results in efficient regression of aggressive tumors, whereas current mitotic drugs display limited effects [51].

MULTICOMPONENT REACTIONS IN THE SEARCH OF ANTIMITOTIC AGENTS

Drug discovery is a long process and comprises numerous steps, some of which are severely regulated to control toxicology and target selectivity. In the complex process of the current drug development, the integration of different disciplines is necessary. The recent demands in drug discovery for more diverse small molecules and their efficient synthesis has now shifted the attention of the chemist to the as yet largely unexplored area of chemistry of multicomponent reactions (MCR). Today, with the emergence of combinatorial chemistry and high-speed parallel synthesis, the multicomponent reactions (MCR) are widely employed for the rapid assembly of arrays with high molecular diversity [52].

In a multicomponent reaction (MCR) process (as opposed to linear synthesis, where the chemical diversity is being incorporated at different stages of synthesis), three or more reactants are combined in a single chemical step to produce products that incorporate substantial portions of all the components, and naturally comply with many of the stringent requirements for ideal organic syntheses discussed previously (Fig. **3**).

Although the first examples of this type of reactions dates back to the 19th century (Stecker reaction and Biginelli reaction), the chemistry of the MCRs did not develop until the last century, with examples such as the synthesis of Mannich and others, until the appearance of the isocyanates based on MCR. Overall, MCRs can be subcategorized in two general

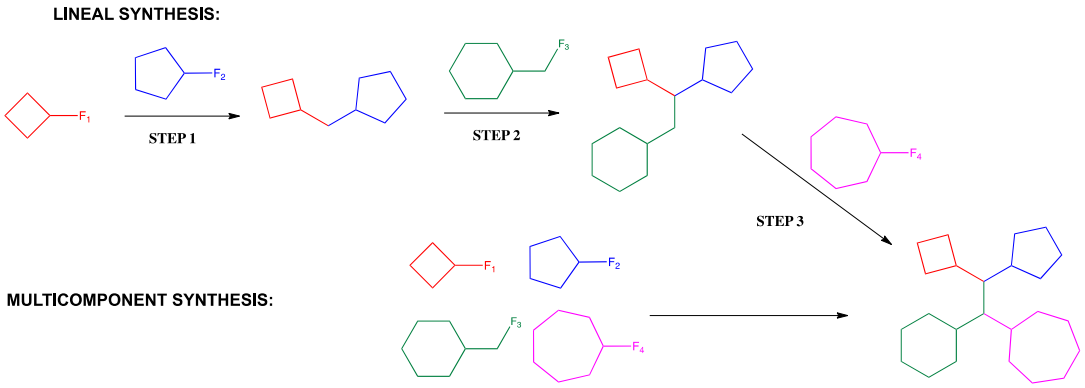
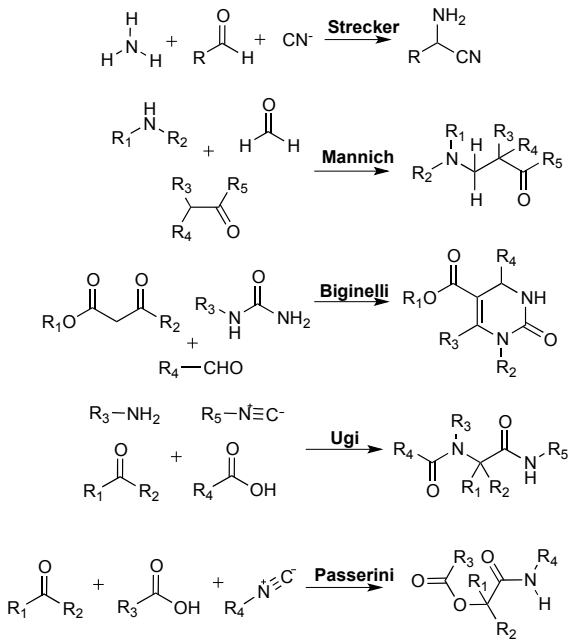


Fig. (3). Linear synthesis and multicomponent synthesis.

classes, i.e. isocyanide-based MCRs [53, 54], and non-isocyanide-based MCRs (Scheme **1**). The main isocyanide-based MCRs are the Passerini (1921) and Ugi reaction (1959). The former, the Stecker MCR, (Scheme **1**), is the reaction between isocyanides, carboxylic acids, and aldehydes or ketones to afford α–acyl carboxamides in a single step [55]. The second and arguably the most important isocyanide-based MCR is the Ugi four component reaction (Scheme **1**) holds a special ''cream of the crop'' status, because of its generality, versatility, experimental simplicity, and atom economy. This elegant four-component reaction, discovered in 1959, is a reaction between isocyanides, carboxylic acids, ketones or (usually) aldehydes and primary amines to afford dipeptide-like structures. Together, the isocyanide based multi-component reactions have experienced a resurgence of interest and appear well positioned for a stronger impact for the post-genomic era in the new millennium [56].



Scheme 1. Examples of the main MCR.

The importance of multicomponent reactions not only lies in being inherently efficient transformations but it also provide new heterocycles formed by cyclization possibilities from the adducts formed (Fig. **4**). Thus the initial MCR derived products can be considered as a synthetic hub to a vast diversity of novel cyclic or acyclic scaffolds by employing different secondary transformations.

Typically, only 1–3 synthetic steps are needed to synthesize libraries of drug-like advanced compounds. In addition, MCRs are adaptable to new working methods of modern organic chemistry, such as miniaturization, parallel synthesis or use of supported reagents within the same reaction processes.

Next, we will describe the main achievements in the synthesis of novel antimitotic agents obtained by MCRs.

Tubulin Polimerization Inhibitors

Tubulysins and Tubugis

Tubulysins are among the most potent antimitotic agents known to date, with an extraordinarily high cytotoxic activity, which also extends to multi-drug-resistant cell lines. It makes the tubulysins a remarkable lead for the development of novel anticancer drugs [57]. These unusual tetrapeptides disrupt the microtubule spindle and were first isolated by Höofle's group from myxobacteria culture broths [58]. The most potent tubulysins possess a rare tertiary amide (this part of the molecule largely determines the cytotoxic activity of the tubulysin) that makes the middle part of the molecule extremely crowded and constitutes the major challenge in their synthesis [57]. Modifications over this part of the tubulysin has led to a decreased activity, as seen in ciclotubulysin D and tubulysin U and V (Scheme **2**).

The use of natural product leads and multiple MCRs together can be considered also a valuable strategy for the generation of new bioactive natural products. Taking this concept into consideration, Wessjohann *et al.* reported the first synthesis of tubulysin natural product analogues (called tubugis) by means of a combination of three different types of isonitrile-based multicomponent reactions in a concise and convergent manner and represents the first example of a target-oriented synthesis approach using multiple MCRs (Scheme **2**) [59].

The synthetic strategy employed for preparing the new analogues are shown in Scheme **3**. Two different MCRs are used for preparing the key precursors **3b** and **tubuvaline 6**,

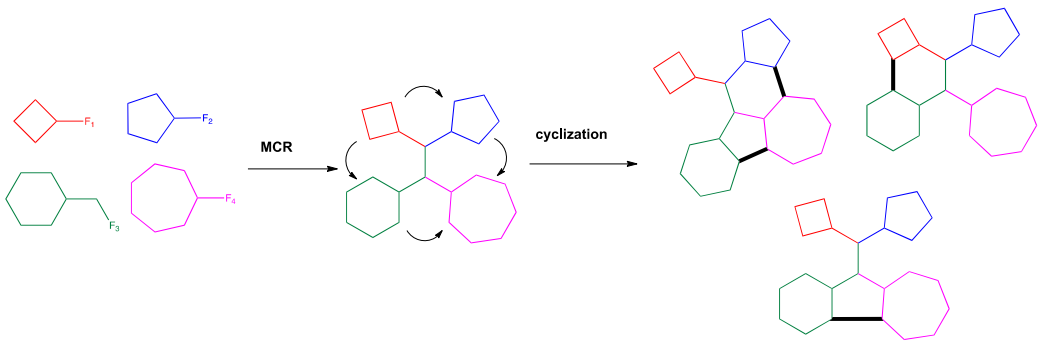
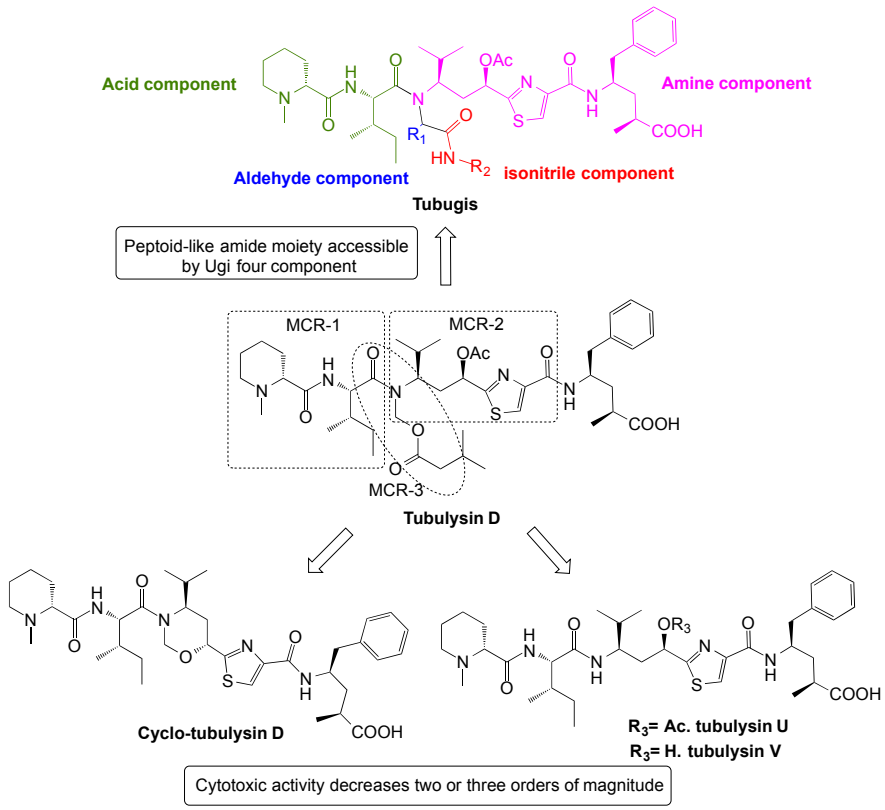


Fig. (4). Construction of new cyclic structures, from intermediates generated by the MCR.



Scheme 2. Natural D-tubulysin D and tubugis.

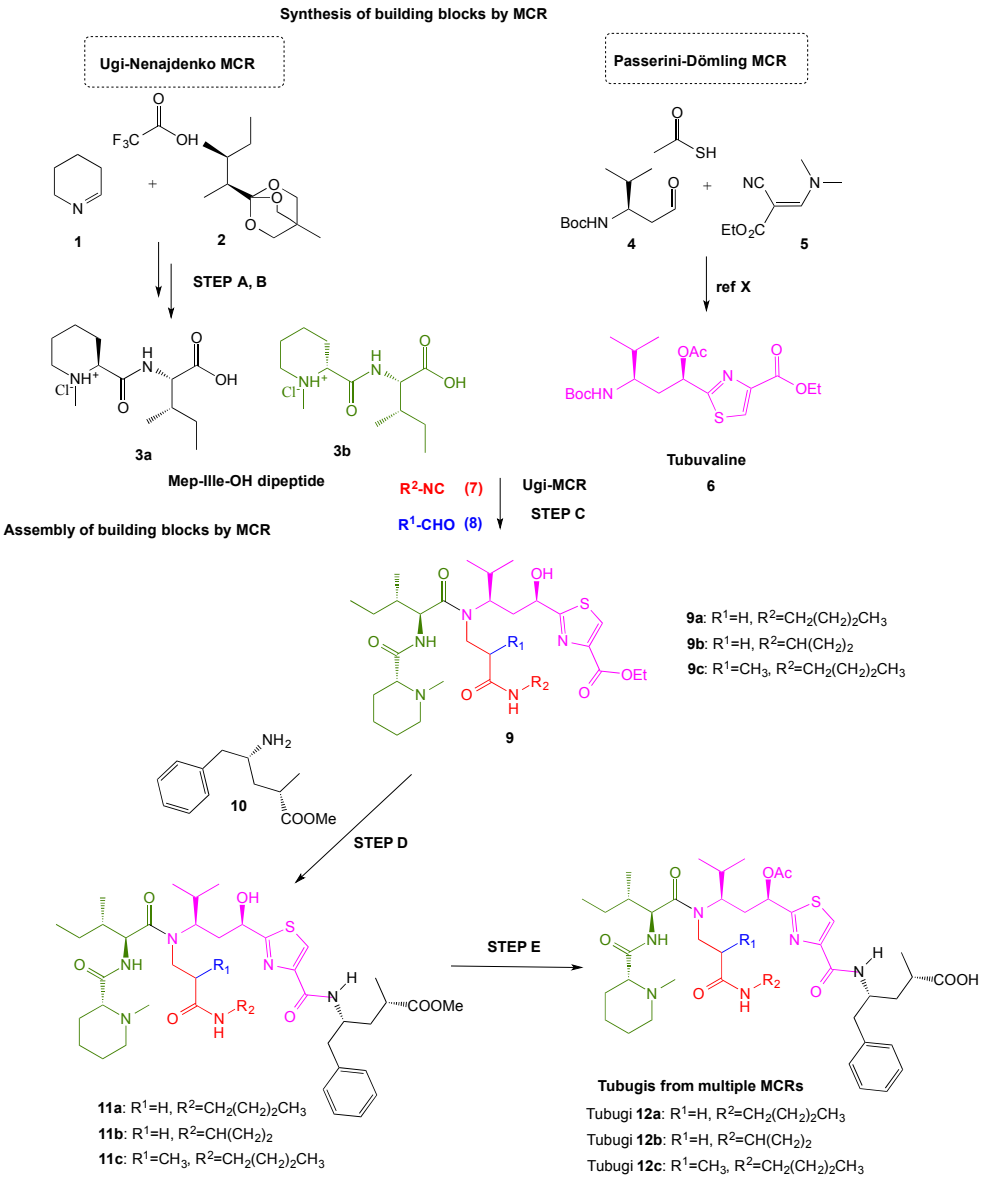
and the synthetic route is complemented by a Ugi reaction (Step C). The Mep-Ile-OH fragment **3b** was synthesized through an Ugi-type MCR involving Δ^1-piperideine (**1**), the 4-methyl-2,6,7-trioxabicyclo[2.2.2]octyl (OBO) ester (**2**) of isoleucine isocyanide, and trifluoroacetic acid. In the other hand, preparation of Boc-protected tubuvaline (Tuv) ethyl ester **6** was performed by using a Passerini-type reaction as the key step and Boc-protected Tuv-Tup-OMe **4** and (*E*)-ethyl 2-cyano-3-(dimethylamino)acrylate **5** [60, 61].

Synthesis of Tubugis **12a**, **12b** and **12c** from the crucial Ugi-4CR-based coupling was initially attempted using as the amino component the Tuv-Tup-OMe dipeptide, which was generated in situ from its Boc-protected derivative tubuvaline (Tuv) ethyl ester **6**; Mep-Ile-OH (**3b**) served as the carboxylic acid component, paraformaldehyde or acetaldehyde **7** as the oxo component and isopropyl isocyanide or butyl isocyanide **8** as the condensing agent (Scheme **3**).

The new cytotoxic tubugis **12a**, **12b** and **12c** (in which the rare peptoid *N*, *O*-acetal-ester functionality has been replaced by a more stable N-branched peptide backbone with retention of the cytotoxic activity) (Scheme **3**) showed prominent biological activities (GI_{50} values in the high picomolar range), most likely acting as microtubule modifiers like their lead natural products [59].

Indolobenzazepinones

In the context of a medicinal chemistry project directed towards finding new antitumor agents, Beaumont *et al.* prepared indolobenzazepinone derivatives of type 1 (Scheme **4**), as analogues of natural products [62]. The cytotoxic activity

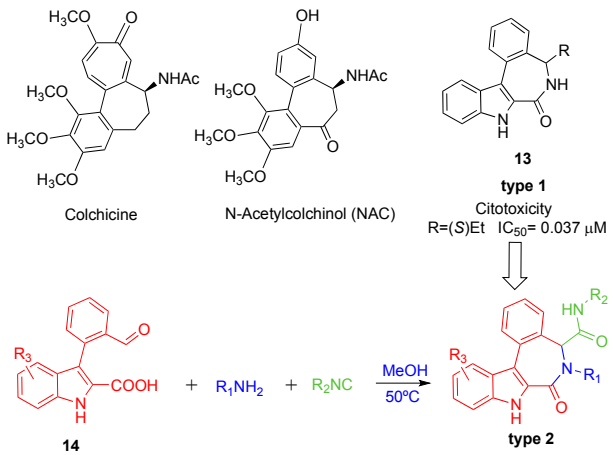


Scheme 3. Reagents and conditions: (**STEP A**) (1) MeOH, stirring, 15 h; (2) CF_3COOH, stirring, 30 min; (3) NaOH, THF/H_2O; no purification. (**STEP B**) (1) $(CH_2O)_n$, $Pd(OH)_2/C$, H_2, $MeOH/H_2O$ (3:1 v/v), stirring, 16 h, separation of the C2 diastereomers; (2) HCl, THF/H_2O (1:1 v/v); **9b** in 31% overall yield. (**STEP C**) (1) CH_2Cl_2/CF_3COOH (4:1 v/v) at 0 _C; (2) $NaHCO_3$; (3) $(CH_2O)_n$ for **9a** and **9b** and CH_3CHO for **9c**, isopropyl isocyanide for **9b** and n-butyl isocyanide for **9a** and **9c**, MeOH; 35−52% overall yield. (**STEP D**) (1) $CF_3COOH/THF/H_2O$ (2:2:1 v/v/v); (2) LiOH in THF/H_2O (1:1 v/v); (3) DIC, PFP, CH_2Cl_2; (4) Tup−OMe **10** HCl, diisopropylethylamine, DMF; 55−62% overall yield. (**STEP E**) (1) LiOH, THF/H_2O (v/v 1:1); (2) Ac_2O/Py (in the case of tubugi **12c**, a catalytic amount of dimethylaminopyridine was added); 71−86% overall yield.

of **13** in a variety of cancer cell lines was first determined and in some cases compared to that of colchicine and *N*-acetylcolchinol-NAC (Scheme **4**). Thus, the cytotoxicity of **13** in all cell lines was of the same order of magnitude as in KB cells, IC_{50}'s ranging from 0.030 μM in MDA-MB231 cells to 0.070 μM in MDA-MB435 and K562 cells, thus clearly indicating an antiproliferative activity regardless of the origin of the tumor cells. The displayed potent antimitotic properties of **type 1** molecules (in the micromolar range) is a consequence of tubulin polymerization inhibition, by the interruption of cancer cell growth at the G2/M stage in the presence of **13**. Finally, these *in vitro* observations were confirmed *in vivo* whereby compound **13**, used in a CAM model of tumor growth at concentrations inhibiting tubulin polymerization, was significantly more effective than colchicine and NAC in causing tumor volume regression after only several days of treatment [62]. Regarding the structure-activity relationships, it was found that the presence of an alkyl side chain at the C-5 position is crucial in order to obtain cytotoxic effects in the nanomolar range (Scheme **4**).

Application of a Ugi multicomponent reaction to oxo acids **14** allows the formation of potentially antimitotic in-

dolobenzazepinones of **type 2** in good yields of up to 72% (Scheme **4**) [63]. The reaction can be applied to a wide range of isocyanides, thereby ensuring introduction of molecular diversity at the key C-5 position. Use of cyclohexenyl isocyanide (Armstrong isocyanide) allows postcondensation modifications, while careful choice of the amine and the indole protecting groups proved to be important for providing the deprotected compounds necessary for biological tests.



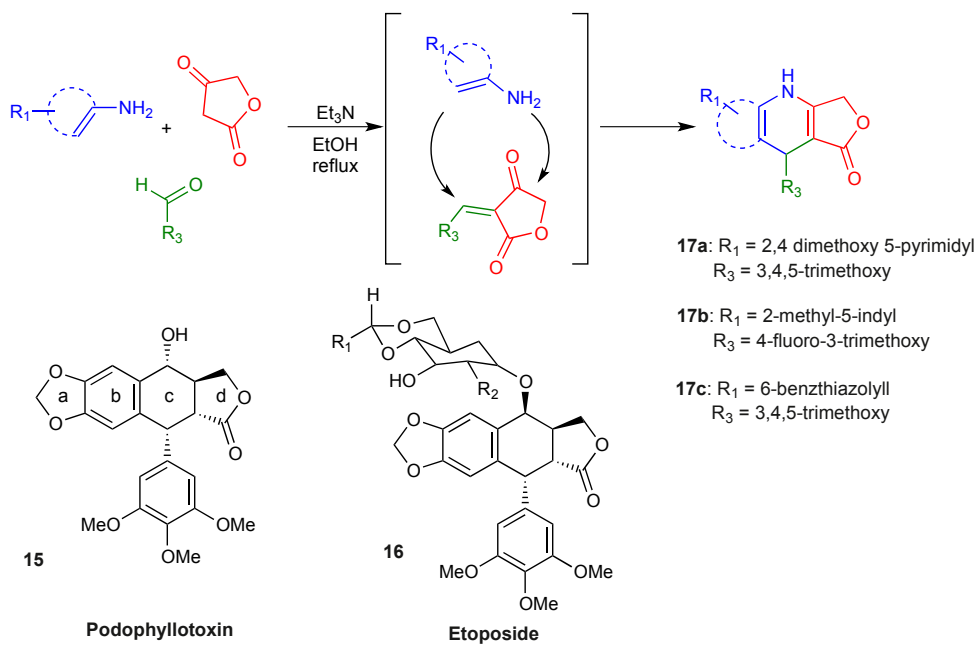
Scheme 4. Intramolecular Ugi-4-CRs starting from oxo acid **14**.

Podophyllotoxin

Podophyllotoxin (**15**, Scheme **5**) is another natural product extracted from *Podophyllum Peltatum L*, also known as the *American Mayapple* and has been investigated as an antitumor agent [64]. Although clinical results were quite disappointing due to severe gastrointestinal side effects, podophyllotoxin is a good tubulin polymerization inhibitor and extensive synthetic efforts in order to overcome these problems have been carried out by a number of researchers. The structural modification of podophylotoxin has led to the discovery of molecules such as the etopoxide **16** (Scheme **5**) and other analogues, which have shown to inhibit DNA topoisomerase-II (topo-II) by stabilizing the covalent topo-II DNA cleavable complex [65] and are used against a variety of cancers. Kalivendi *et al.* reported an efficient access to the construction of a new novel 4-aza-2,3-didehydropodophyllotoxin derivatives **17** applying a multicomponent route involving the condensation of substituted heteroaromatic amines, tetronic acid, and substituted aromatic aldehydes in ethanol. All the compounds showed improved cytotoxicity and inhibition of tubulin polymerization, being significantly cytotoxic with a concentration of the compound that produced 50% inhibition of cell growth (GI_{50}) ranging from 0.1 to 2.9 μM.

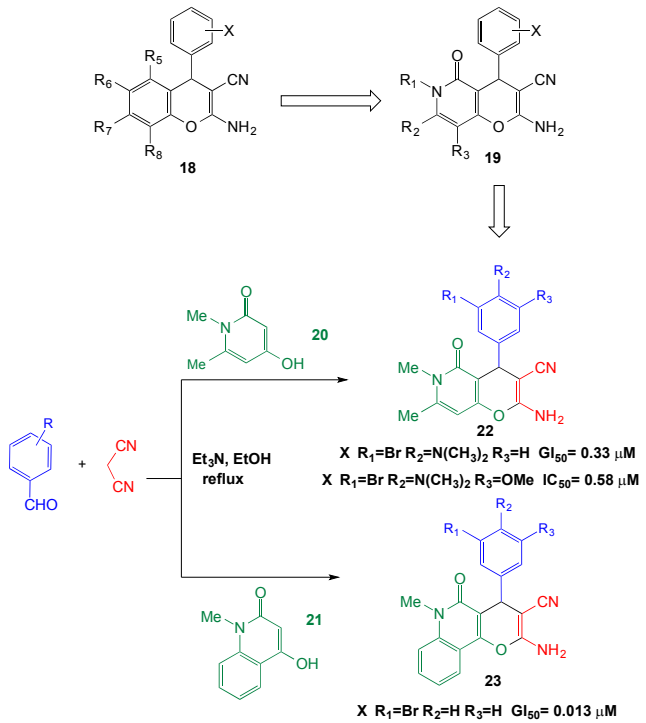
4-Arylpyrano[3,2-c]pyridones

2-Pyridone framework occurs in many natural and synthetic molecules exhibiting diverse biological activities [66]. Somewhat surprisingly, the biology of 4*H*-pyrano[3,2-*c*]pyridin-5(6*H*)-ones (**19**, Scheme **6**) has not been thoroughly investigated with the exception of antibacterial properties associated with some of these compounds [67, 68]. Very similar compounds, such as chromenes **18** inhibit tubulin polymerization and induce apoptosis in cancer cells and exhibit high potency against taxol and vinblastine-resistant, P-glycoprotein overexpressing cell types [69]. Furthermore, chromenes **18** disrupt tumor vasculature in a number of human solid tumor xenografts and they are currently in development as anticancer agents [70, 71]. Based on the structural similarity of these two frameworks, Magedov *et al.* prepared series of 4-arylpyrano[3,2-*c*]pyridones **22** by a one-step cyclocondensation of 4-hydroxy-1,6-dimethylpyridin-2(1*H*)-one **20** with various substituted benzaldehydes and malononitrile (in a 1:1:1 ratio), in refluxing ethanol containing a small quantity of Et_3N. They also reported on the preparation of pyrano[2,3-*c*]quinolones ana-



Scheme 5. Structures of podophylotoxin **15**, etoposide **16** and the MCR synthesis of a library of compounds **17**.

logs **23** via this 3CR using 4-hydroxy-1-methylquinolin-2(1*H*)-one. First, a Knoevenagel adduct is formed from the aldehyde and malonitrile, which then undergoes a Michael-type addition of the pyridone, followed by ring closure as a result of nucleophilic attack of the alcohol moiety [72]. The obtained compounds exhibit micromolar and submicromolar antiproliferative activity in HeLa and induce apoptosis in *Jurkat* cell lines. Structure-activity studies performed on a small library of these compounds showed a pronounced cytotoxicity enhancing effect of the bromo substituent at the *meta* position of the C4 aromatic moiety (Scheme **6**). The flow cytometric cell cycle analysis, performed with pyranopyridones **22** and **23** using *Jurkat* cell line, shows pronounced cell cycle arrest in the G2/M phase. This effect is characteristic of antimitotic agents disrupting microtubule assembly, and is also observed with chromenes **18** that bind to or near the colchicine-binding site on β-tubulin [69]. This observation is indicative of the antitubulin mechanism for pyranopyridones **22** similar to the one established for chromenes **18**.



Scheme 6. Synthesis of 4-arylpyrano[3,2-*c*]pyridones and pyrano[2,3-c] quinolones.

Benzo[b]furan Inhibitors

In 1999, Pinney and co-workers [73] reported a benzo[*b*]thiophene, compound **25** (Scheme **7**) that exhibited some activity as a tubulin polymerization inhibitor and appeared to bind weakly to the colchicine binding domain of tubulin. However, **25** only inhibited the rate and not the extent of tubulin polymerization. The limited activity of **25** was hypothesized to come from poor solubility [74-76], so different analogues were prepared and the most potent of these compounds was **26** (Scheme **7**) [77]. Taking into account the bioisosteric replacement, Flynn *et al.* reported the application of this method to the preparation of various benzo[*b*]furan and indole analogues of **27, 28** and **29** and their effects on tubulin polymerization [77]. The proposed mechanism starts with a deprotonation of iodophenol **30** and a terminal alkyne (**31 or 32**) to generate a magnesium phenolate and a magnesium acetylide, which together undergo a palladium-catalyzed cross-coupling to provide intermediate **33**. When the N_2 atmosphere is afforded, the reaction led to compound **29** via cyclization and reductive elimination of intermediate **35**. If the mixture is placed under a CO atmosphere, induction of a carbonylative heteroannulative coupling reaction between **33** and **34** is produced. This step involves oxidative insertion of the palladium into the Ar–I bond of **34** followed by CO insertion to give a ArC(O)PdI species which then coordinates to the alkyne of **33**, leading to addition, cyclization and finally reductive elimination to afford the product **27** in modest to reasonable yield (30–55%).

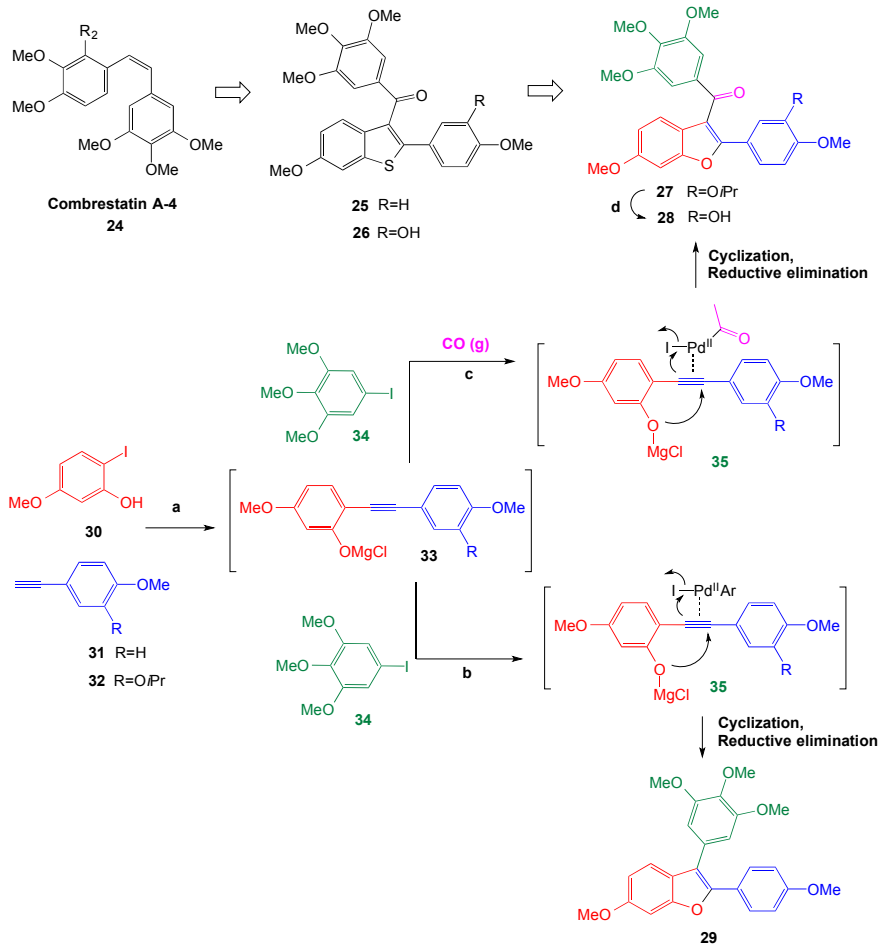
Mitotic Kinesin Inhibitors

KSP-Eg5 Inhibitors

Monastrol, Enastrol, Fluorastrol

The first KSP-Eg5-specific inhibitor identified was *S*-monastrol (**36**, Scheme **8**), identified in a phenotype-based screen [78]. Although a relatively weak inhibitor, *S*-monastrol monastrol (**36**) inhibits both the basal and the MT-stimulated KPS ATPase activity with IC_{50}=6-16 μM and 4-34 μM, respectively (depending on experimental conditions) has been used as a model compound to study its interaction with Eg5 *in vitro* [79-83], and the mechanism of action in cell-based assays [84]. Monastrol is an allosteric inhibitor and binds to the motor domain of Eg5 [79]. Several publications have described the optimization of monastrol-based dihydropyrimidine (DHPM) analogues [85, 86, 87, 88] that showed improved efficiency in cell-based assays (compounds **36**, **37**, **38** and **39**, Scheme **5**). For one of the more potent inhibitors [**39, mon-97**, for this structure both enantiomers can inhibit KSP (IC_{50}=110 nM (basal) and 150 nM (MT-activated) for the (*R*)-enantiomer and IC_{50}=520 nM (basal) and 650 nM (MT-activated) for the (*S*)-enantiomer] the crystal structure of its complex with Eg5 was solved, but surprisingly the *R* enantiomer was found in the active site (Fig. **5**) [89].

Based on these findings, Kappe *et al.* used a combination of *in vitro* and docking techniques to further improve DHPM-based Eg5 inhibitors (**libraries A-D,** Scheme **8**) by chemical optimization [90]. All potential Eg5 inhibitors were initially generated in their racemic form using the well-known Biginelli three-component reaction [88], involving the acid-catalyzed condensation of a 1,3-dicarbonyl component with an aldehyde and urea or thiourea as building blocks (Scheme **8**). The preparation of DHPMs of libraries **A-D** required microwave-assisted Lewis acid catalyzed protocols to obtain the final libraries in moderate to good yields. C5-thioesters **41** were subsequently cross-coupled with arylboronic acids according to the Liebeskind–Srogl protocol [90] to provide the desired 5-aroyl-DHPMs **42** (Scheme **8, library D**). DHPMs of type **D** can be considered close analogues of **mon-97** (**39**), with the important distinction that these derivatives have a carbonyl instead of a thiocarbonyl



Scheme 7. Reagents and conditions: (a) $MeMgCl_2$ equiv, $Pd(PPh_3)_2Cl_2$ 3 mol %, THF, 65 °C, 1.5 h under N_2 (g); (b) cool to room temp, add **34** and DMSO, then heat to 80 °C, 16-18 h; (c) same as (b) except exchange N_2(g) atmosphere for CO(g) atmosphere (balloon); (d) $AlCl_3$, 3 equiv, CH_2Cl_2.

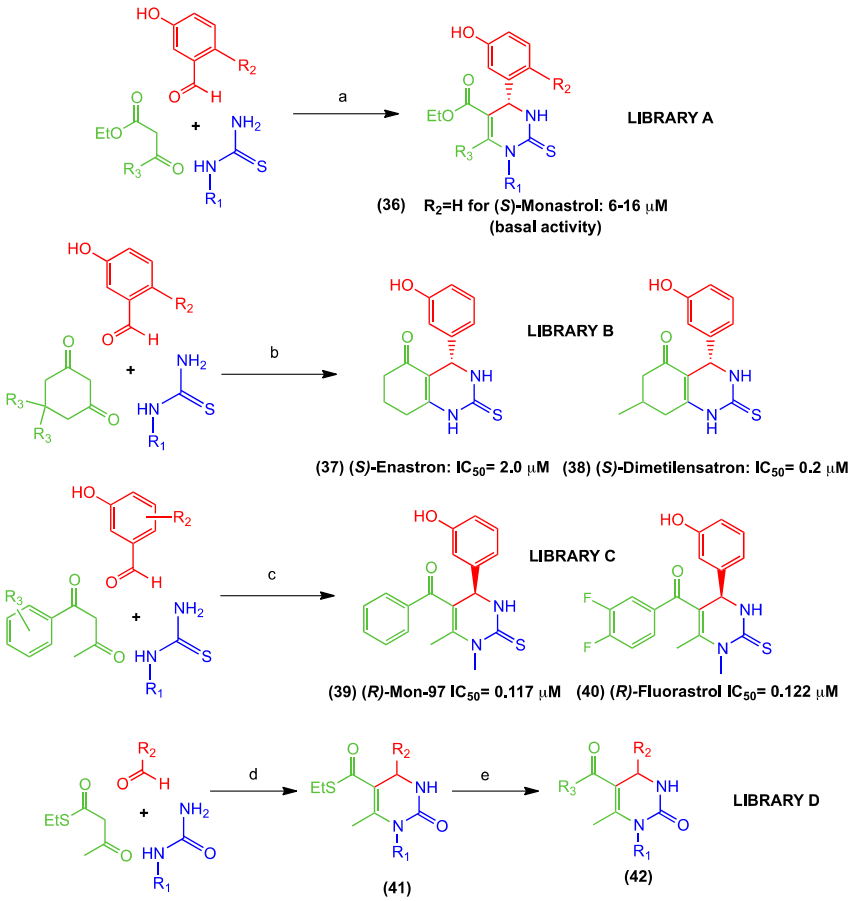
functionality at C2. For the compounds tested, docking predicted that the inhibitors only adopt mainly two distinct docking poses previously described as class I and class II DHPM analogues (Fig. **5**). The most potent class I (exemplified by dimethylenastron **38,** IC_{50}= 200 nM) and class II analogues (e.g., mon-97 **39** and fluorastrol **40**) have similar *in vitro* activities in the nanomolar range. *In vitro*, the most potent compounds were enantiomeric (*R*)-fluorastrol **40** and (*R*)-mon-97 **39** followed by dimethylenastron **38**. Compared with mon-97 **39**, the addition of two fluoro atoms in fluorastrol **40** is slightly beneficial (Fluorastrol is about 5-fold more potent than Mon-97 in the cellular assays).

Experimental cristalographic structures of **36** (PDB ID: 1Q0B) and **39** (PDB ID: 2IEH) and KSP showed that certain pharmacophore features occupy similar positions in the two ligands: the 3-hydroxyphenyl moiety and 6-methyl group stay in similar positions, while the two acceptor features of the ester/ketone group and the thioxo group change their positions.

These results demonstrate that even when a focused library synthesis is performed on targets in which the binding mode of active ligands is known, it is necessary do not rule out different binding modes of new prototypes obtained through MCR.

Ispinesib

Ispinesib (**50**) is a quinazolinone inhibitor of KSP that is currently being tested in multiple phase II clinical trials. The steady-state and pre-steady-state kinetic studies on ispinesib showed that the mechanism of ispinesib inhibition is mostly identical to that of monastrol [92, 93]. Ispinesib provoques an induced-fit pocket formed by helices R_2 and R_3 and loop L5 has been identified as an allosteric site for inhibiting the ATPase activity of the motor domain of the mitotic kinesin KSP (Eg5) (Fig. **6**). Like other KSP inhibitors discovered after the monastrol, higher affinity and greater inhibitory potency of ispinesib is due to a greater number of interactions established in the KSP allosteric binding site, located 10 Å respect to the ATP binding site. Although many potent and distinct chemotypes are known, monastrol and the quinazolinone analogues represented by ispinesib have been the most thoroughly characterized (there is a large structural information available in Protein Data Bank) in both the scientific and patent literature. More importantly, ispinesib resistance mutations were recently observed and could be



Scheme 8. DHPM-based Eg5 inhibitors. a) solvent, catalyst, MW or heat. b) MeCN, $Yb(OTf)_3$, MW, 120ºC, 20 min. c) TMSCl or $Yb(OTf)_3$, MeCN, MW, 120ºC, 10-30 min. d) $Yb(OTf)_3$ or HCl, MeCN or EtOH. MW or heat. e) R_3-$B(OH)_2$, $Pd(OAc)_2$, PPh_3, Cu(I), dioxane, MW, 130ºC, 1h.

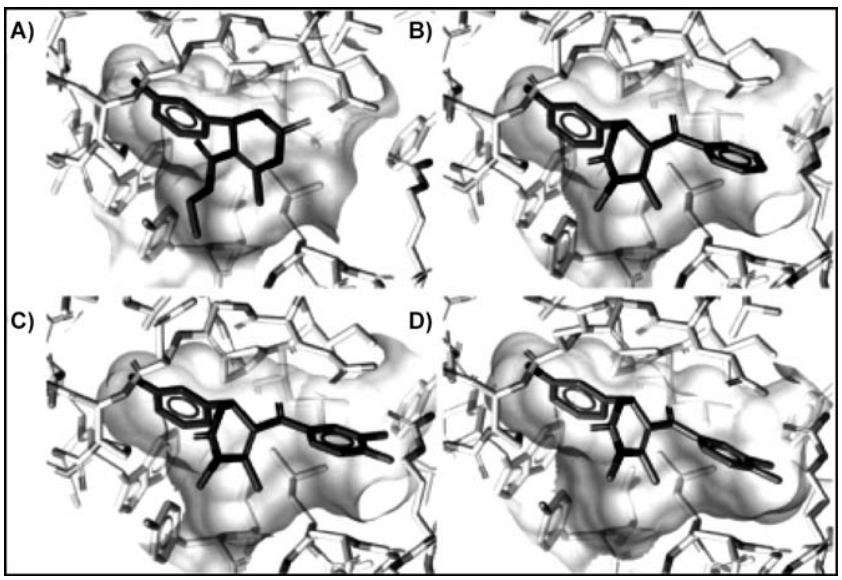


Fig. (5). a) X-ray structure of the (S)-**36**–Eg5 complex (PDB ID: 1Q0B) showing a type I pose. b) X-ray structure of the (R)-**39**–Eg5 complex (PDB ID: 2IEH) showing a type II pose. c) Docked pose that shows the correct geometry for (R)-**40** in the binding site of 2IEH. d) X-ray structure of the (R)-**40**–Eg5 complex (PDB ID: 2X7E). e) Docking suggested a third ligand pose for some S isomers, shown here for (S)-**40** [91].

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

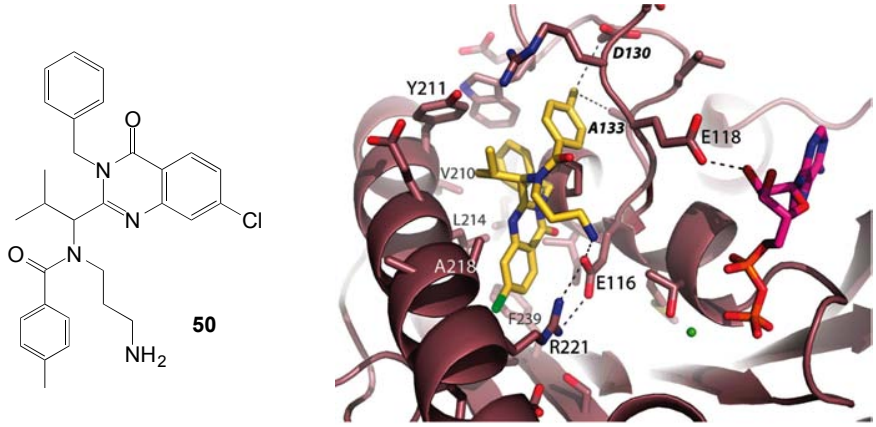


Fig. (6). Binding mode of ispinesib (**50**) to KSP. The left panel depicts the docked conformation of ispinesib (yellow carbon atoms) in complex with KSP3ADP/Mg2þ. KSP side-chain atoms within 5 Å of ispinesib are shown explicitly in stick representation [95].

localized to D130V and A133D in the L5 loop [94]. The colon carcinoma cell line HFT116 harboring these mutations was ca. 100-fold less susceptible to the antiproliferative effect of ispinesib [94].

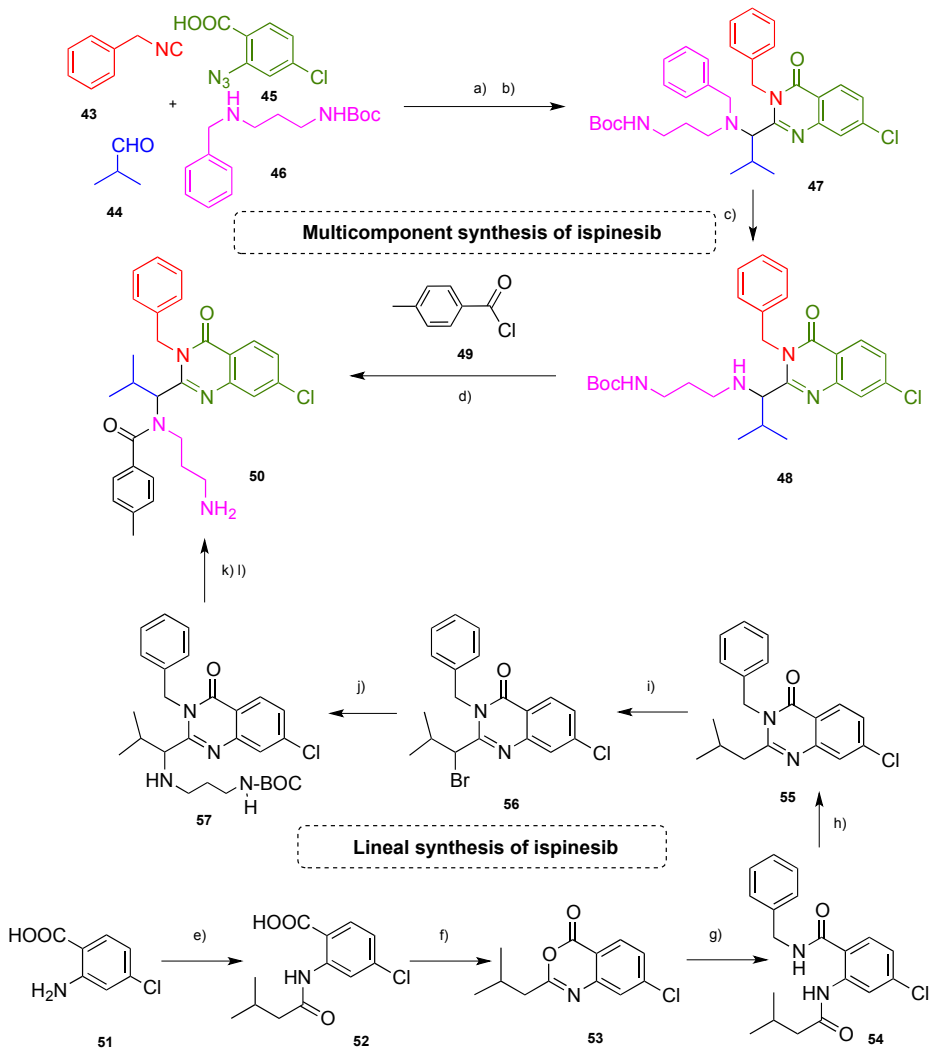
Initially, several synthetic routes for the synthesis of ispinesib have also been reported but all of them required a multistep synthetic approach (linear synthesis, Scheme **9**) [96]. However, as other novel anticancer molecules, other research groups have attempted to synthesize ispinesib by more efficiently methodologies, such as multicomponent reactions. Following this aim, Tron *et al.* described an innovative one-pot multicomponent reaction leading to highly substituted quinazolinones [97]. This work described an alternative synthesis to more complex synthetic methodologies employed by the pharmaceutical industry for the preparation of racemic ispinesib. The synthetic power of this transformation can be exemplified by an abridged (only four steps) synthesis of this molecule, previously obtained in an 8-step sequence in racemic form (Scheme **9**) [98, 99]. They have investigated the Ugi reaction, specifically the deviation from the classical Mumm rearrangement induced by a primary-to-secondary amine swap [100-102]. As a result of the use of this new rearrangement, which provides atypical Ugi adducts along with the use of BOC as a protecting group for a cyclization strategy, racemic ispinesib was obtained [97]. Reaction between benzylisocyanide (**43**), isobutyraldehyde (**44**), 2-azido-4-chlorobenzoic acid (**45**) and the *N*-Boc protected *N*-benzylpropane-1,3-diamine (**46**) afforded the quinazolinone (**47**) in 40% yield. Selective hydrogenolysis of the *N*-benzylamine over the *N*-benzylamide was achieved in 90% yield. Finally, acylation and Boc-deprotection yielded the target molecule (**50**) (Scheme **9**). This novel transformation may open the door for the generation of new and pharmacologically active quinazolinones, and new ways for the synthesis of novel molecular architectures.

Hexahydro-2H-pyrano[3,2-c]quinolines (HHPQs)

Integration of Multicomponent Reactions, Structural-Based Drug Design and High Throughput Screening is now almost essential in a Target Oriented Synthesis program. However, most of the hits found for many of the anti-cancer targets have been obtained from expensive screening of large libraries and not through a 100% rational design based on predictive affinity calculations through bioinformatic programs (docking, QSAR, etc). Schiemann *et al.* reported the discovery and optimization of hexahydro-2*H*-pyrano[3,2-*c*]quinolines (HHPQs) as potent and selective inhibitors of the KSP-Eg5, originally found during a high-throughput screening (HTS) campaign sampling their in-house compound collection of about 1000 HHPQs [103]. The documented SAR could be nicely explained with the X-ray structure of KSP-Eg5 in complex with the most interesting compound, the selected clinical candidate, **EMD 534085** (**68**) (Scheme **10**). The optimized compounds were potently inhibitors of the ATPase activity of KSP-Eg5 and also exhibited consistent cellular activity (cells arrested in mitosis and apoptosis induction could be observed). **EMD 534085** (**68**) caused strong growth inhibition in human tumor xenograft models using Colo 205 colon carcinoma cells. X-ray crystallographic data demonstrated that these inhibitors bind in an allosteric pocket of KSP-Eg5.

Target compounds required a challenging synthesis due to the high number of stereogenic centers. The preparation was optimized, although the overall yield was low because of two steps involving diastereomeric and enantioselective separations. The HHPQs were readily assembled by modification of the Povarov reaction [104] (Scheme **10**). The inverse electron-demand aza Diels–Alder reaction worked well with a wide range of anilines and aromatic aldehydes with dihydropyran in a one-pot reaction using 1 equiv of TFA at room temperature. The product mixture contained 2 diastereomers mainly [surprisingly, in the course of the aza Diels–Alder reaction only two of the likely four diastereomers (in theory 8 isomers possible) were formed in the reaction, in most cases in a 1:1 mixture as shown in Scheme **10** in favor of the *trans*-product]. The alcohol function of the enantiomerically pure compound **63** was then activated by selective mesylation and subsequently substituted with amines. The amines for R_4 = H were further derivatized to the amides, sulfonamides, ureas, and carbamates.

Spherical hydrophobic substituent at the C-9 position gives the most potent compounds in accordance to the protein X-ray structure of KSP-Eg5 in complex with **EMD 534085** (**68**) (Scheme **10**) [105], which can also be compared to co-crystal structures of several other inhibitors described in the literature [106]. The aromatic portion in the western part, in addition with a non-lipophilic *tert*-butyl substituent



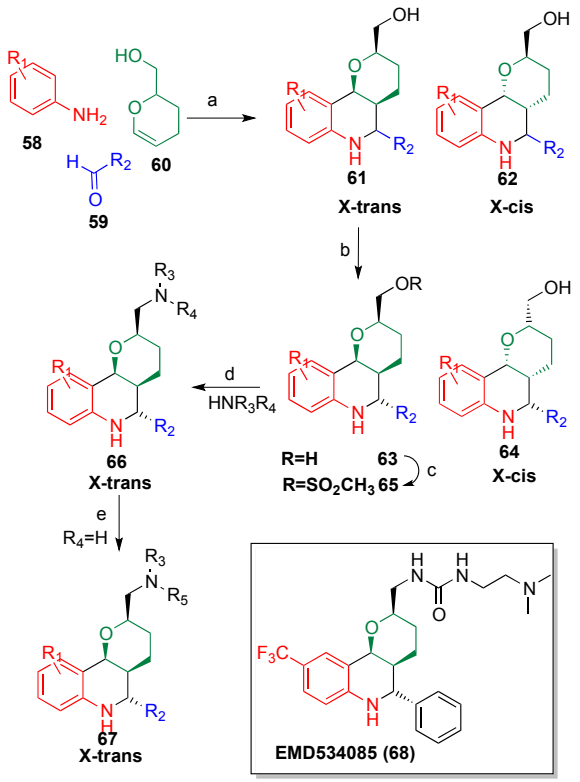
Scheme 9. Multicomponent and linear synthesis of racemic ispinesib (a) CH_2Cl_2, rt. b) PPh_3, toluene, reflux. c) H_2 (1atm), MeOH, Pd/C 10%, rt. d) toluilchloride, CH_2Cl_2, TEA, rt. TFA, CH_2Cl_2, rt. e) 3-methylbutanoyl chloride, DMF. f) Acetic anhydride g) benzylamine, $CHCl_3$. h) Ethylene glicol, NaOH. i) Br_2/AcOH, NaOAc. j) *tert*-butyl (3-aminopropyl)carbamate, EtOH. k) 4-methylbenzoyl chloride, TEA, DCM. l) HCl, THF.

at C-9, fills-up perfectly the hydrophobic pocket of the allosteric binding site of the KSP-Eg5 protein. Interestingly, the spatial arrangement of the 7-membered side chain (containing a dimethylaminoethylureido group) on the tetrahydropyran ring is arranged in the area exposed to solvent (Fig. **7**).

Thiophene Containing Kinesin Spindle Protein (KSP) Inhibitors

Pikerton *et al.* identified and synthesized a series of thiophene containing inhibitors of kinesin spindle protein [108]. SAR studies led to the synthesis of **75 (**Scheme **11**), which was co-crystallized with KSP and determined to bind to an allosteric pocket previously described for other known KSP inhibitors. The compounds described were synthesized as outlined in Scheme **11**. Cyclic ketones **69** were reacted with ethyl cyanoacetate **70** and sulfur with a catalytic amount of morpholine in ethanol to give amino thiophenes **71** in moderate to good yields [109]. Ester hydrolysis followed by activation of the resulting acid with triphosgene and reaction with an amine afforded aminothiophene amides **72**. Reductive amination of the pendant amine provided KSP inhibitors such as **73**. Additionally, **71** could be reacted with acid chlorides to give amides **74** in moderate to excellent yields. Hydrolysis of the free acid and coupling to an amine gave KSP inhibitors of the general structure **75**. These compounds showed sub-micromolar activity in secondary cellular assays and a cell phenotype consistent with KSP inhibition.

As shown in Fig. (**8A**) and (**8B**), compound **75** binds in a similar fashion to known KSP inhibitor **76** at an allosteric site [110]. Alkyl groups in various positions on the cyclohexyl ring enhanced favorable hydrophobic interactions. Substitutions in other positions of the cyclohexylthiophene were less favorable than position 2. Methyl group in position 2 (**75b**) gave a three to four fold boost in potency over **76** in the ATPase assay (0.48 μM vs 1.7 μM). Co-crystallization of **75b** showed that the methyl group occupied an additional part of the main hydrophobic pocket (Fig. **8**).



Scheme 10. Synthesis of highly potent enantiomerically pure HHPQs. Reagents and conditions: (a) trifluoroacetic acid (1 equiv), acetonitrile, 0–5 °C, rt, 8 h; (b) HPLC: Chiralpak AD (ethanol); (c) methane sulfonyl chloride (1 equiv), triethyl amine (2 equiv), methylene chloride, rt, 16 h; (d) HNR_3R_4 (1 equiv), 1-methyl-2-pyrrolidinone, 100 °C, 15 h; (e) various conditions to form amides, sulfonamides, ureas, and carbamates.

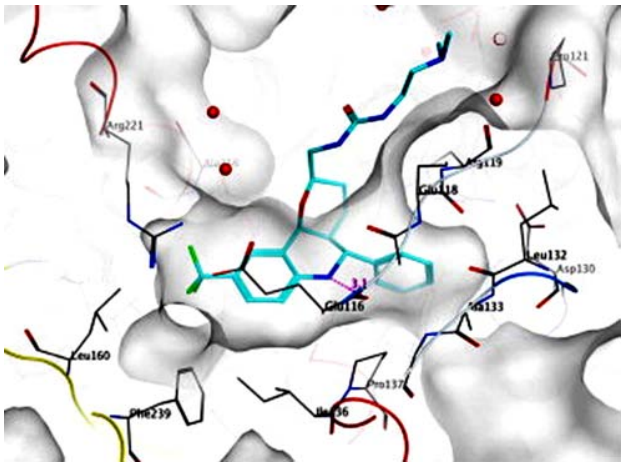
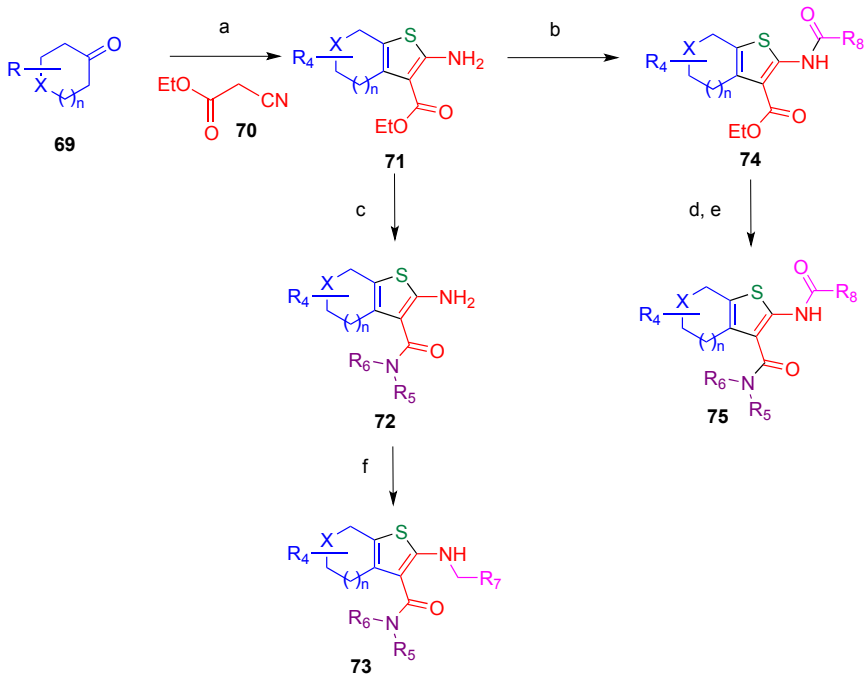


Fig. (7). X-ray structure of **EMD 534085** (**68**) in the allosteric binding pocket of KSP Eg5 [107].

Kinase Inhibitors

CDK-1 Inhibitors

The design of drugs aimed at inhibiting kinases has focused its efforts on achieving good interaction of the inhibitor and the ATP binding site, despite the very similar and high degree of conservation of the binding site between different kinases. Such a design very often requires the presence of functional groups (of donor or acceptor nature of hydrogen bonds) that may interact with the Hinge region. Therefore, procedures that describe the assembly of suitable building blocks to generate structures with great affinity for each kinase hinge region is a matter of great importance and provides quick access to novel inhibitor.



Scheme 11. Reagents and conditions: (a) S, morpholine, EtOH, 50 °C, 40–95%; (b) Et_3N, CH_2Cl_2, rt, 50–80%; (c) i: NaOH, EtOH, 70 °C, 72%; ii: triphosgene, THF, rt, quant.; iii: R_5R_6NH, DMF, 60 °C, 50–90%; (d) LiOH, THF/H_2O, 1:1, 60 °C, 30–70%; (e) R_5R_6NH, HATU, DMF, rt, 20–60%; (f) R_7CHO, $NaBH(OAc)_3$, CH_2Cl_2, rt, 20–50%.

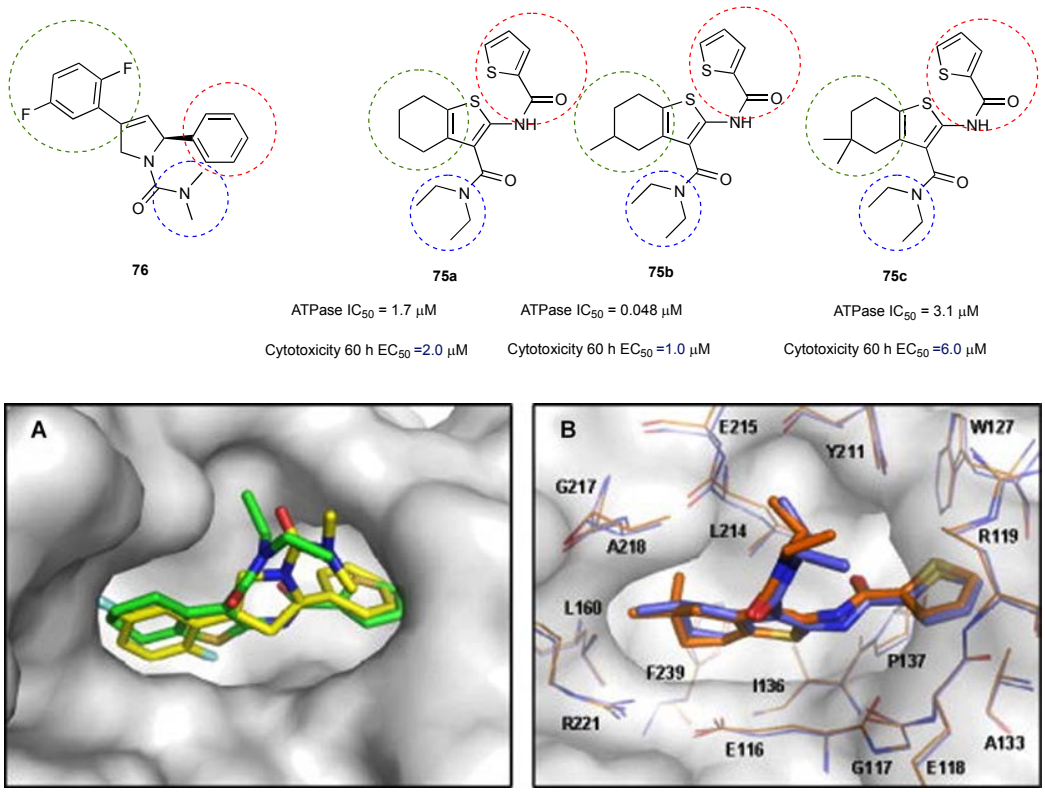


Fig. (8). X-ray structures of compounds in the KSP allosteric binding site. A) **76** (yellow, PDB code 2FL6) and **75a** (green, PDB code 2PG2); B) **75b** (blue, PDB code 2UYI) and **75c** (orange, PDB code 2UYM). Protein surface is shown for KSP/ADP/**76** (A) and KSP/ADP/**75b** (B). Compounds are shown in thick sticks, and protein residues are shown in thin sticks [111].

Pyrazolopyridines have received much attention in the recent years. An interesting biological activity of this kind of compounds is as a potent cyclin dependent kinase 1 (CDK1) inhibitors [112]. Taking as a starting point the disubstituted indazole scaffold, emerged as promising structural core for enzyme inhibitors with excellent potency against numerous kinase targets, Huang *et al.* reported the discovery of the compound **82** [112] (Scheme **12**). This compound was tested for its ability to inhibit CDK1 activity, which was evaluated using CDK1 in complex with cyclin B to phosphorylate a histone-H1 biotinylated peptide substrate. This compound showed high inhibition of CDK1 with an IC_{50} of 23 nM. Nikpassand *et al.* described an efficient method for the regioselective synthesis of new derivatives of pyrazolopyridines **80** or **81** through multicomponent reactions of 3-amino-5- methylpyrazole, azo-linked aldehydes and active methylene compounds using nano-Fe_3O_4 (Scheme **12**) [113].

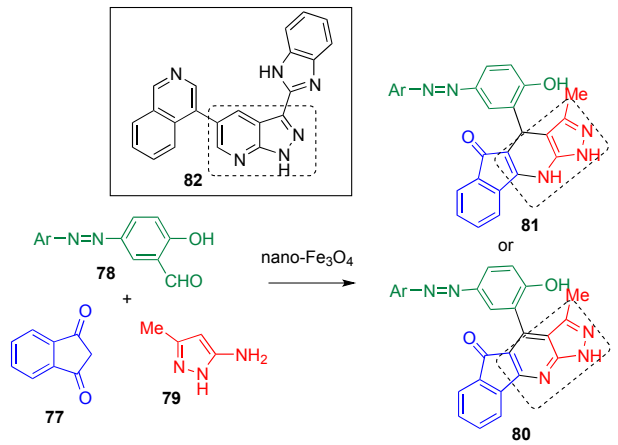
Aurora Kinase Inhibitors

The combination of high-throughput screening and the multicomponent reactions was applied by Wu *et al.* to the discovery of new compounds active on several mitotic targets, such as aurora or CDC25B [114]. They described a novel and highly efficient route for the generation of diverse 1*H*-pyrazolo[5,1-*a*]isoquinolines **93** via a multicomponent reaction of 2-alkynylbenzaldehyde **88**, sulfonohydrazide **89**, alcohol **84**, and α,β-unsaturated aldehyde or ketone **90.** Final structures **93** combine two medicinally interesting scaffolds, i.e. the isoquinoline moiety and a pyrazolo[1,5-*a*]pyridine skeleton (Scheme **13**). The discovery of this new reaction was inspired by the isolation of an unespected byproduct **87** of a side reaction, while they were exploring the scope of a novel MCR of their own discovery (3CR, Scheme **13**) [115]. The initial reaction involved a metal and *N*-heterocyclic carbene cocatalyzed 3CR of *N*-(2-alkynylbenzylidene)hydrazines **83**, metanol and α,β-unsaturated aldehydes **85** to obtain 2-amino-1,2-dihydroisoquinolines **87**. When they treated of 2-alkynylbenzaldehyde **88** with sulfonohydrazide **89** the reaction led to *N*-(2-alkynylbenzylidene)hydrazide **91**, which then underwent cyclization to furnish isoquinolinium intermediate **92** in the presence of suitable metal catalyst. Meanwhile, the enolate was produced in situ via nucleophilic attack of alcohol to the unsaturated aldehyde or ketone **90**. Thus, after subsequent transformation (including intermolecular nucleophilic addition, intramolecular condensation, and aromatization), the desired 1*H*-pyrazolo[5,1-*a*]isoquinolines **93** are afforded. The library was tested in a pannel of diverse kinases. Compound **93a** showed an interesting result as an aurora A inhibitor (IC_{50} 13.43 μM). Other assays included activity against CDC25B (IC_{50}= 2.19 μg/mL), TC-PTP (IC_{50}= 4.50 μg/mL), and PTP1B (IC_{50}= 1.75 μg/mL) [114].

Aurora Kinase/ KSP Dual Inhibitors

Assuming that two main reasons for the failure of many mitosis-selective strategies are the underestimated slowness of human tumor-doubling time [116] (A parameter used to determine tumour aggressiveness, which serves to prognosti-

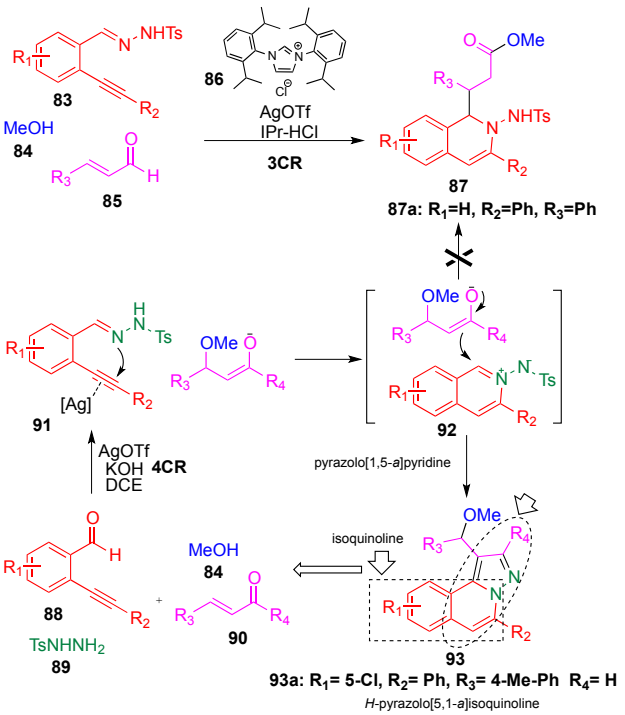
cate, measure therapeutic success, and quantify tumour kinetics and growth rate) and the occurrence of mitotic slippage (exit from mitotic arrest), one can envisage two possible ways to circumvent the complications: (i) antagonizing cancer-specific targets that have oncogenic roles outside mitosis (i.e., important throughout the cell-cycle), and (ii) combining targeted inhibitors to maximize mitotic arrest-cell death and minimize mitotic exit (combinatorial therapy). This line of reasoning makes the development of dual ligands one of the most interesting approaches for developing new anticancer drugs candidates, due to the possibility of selectively block key processes in the development of mitosis. The most viable approach to find new ligands with dual affinity for two different targets involves the use of a rational structure-based drug design.



Scheme 12. Multicomponent synthesis of pyrazolopyrimidines.

Following this working hypothesis, Xu and coworkers designed and synthesized series of dihydropyrazolo[3,4-*b*]pyridines **94** and benzo[4,5]imidazo[1,2-*a*]pyrimidines **95** as dual KSP and aurora-A kinase inhibitors for anticancer agents by introducing some fragments of aurora-A kinase inhibitors into the previous KSP inhibitor **CPUYL064** (**94**) reported by this group [117]. Taking this inhibitor as starting point and two targeted priviliged scaffolds such as 1*H*-pyrazol-3-amine and 1*H*-benzo[*d*]-imidazol-2-amine to afford interactions with hinge region of Aurora, they merged and aligned both pharmacophores to form an hybrid structure which keeps resulting interactions on both targets (Fig. **9**).

The synthesis of the dihydropyrazolo[3,4-*b*]pyridines (**99**) (Scheme **14**) was performed via one-pot three-component condensation reaction of 1*H*-pyrazol-3-amine **97**, *N*-alkyl acetylacetamides **95** and the appropriate aromatic aldehyde **96** in the presence of $FeCl_3$ as a catalyst at ambient temperature. *N*-Alkyl acetylacetamides **95** were prepared by ester/amide exchange reaction. Similarly, compounds (**100**) were prepared using benzo[*d*]imidazol-2-amine **98** as amine component in the presence of ceric ammonium nitrate and absolute etanol. A total of 19 target compounds were evaluated by two related enzyme inhibition assays and a cytotoxicity assay *in vitro*. In the first series of dihydropyrazolo[3,4-*b*]pyridines, it was interesting that compounds **99a**, **99b** with the R_1 group being furyl showed better inhibition activities against aurora-A kinase with the IC_{50}values of 9.25 and 8.10 μM, respectively, compared with the phenyl and thienyl substituted compounds.



Scheme 13. 3CR towards 2-amino-1,2-dihydroisoquinolines and 4CR towards 1*H*-pyrazolo[5,1-α]isoquinolines.

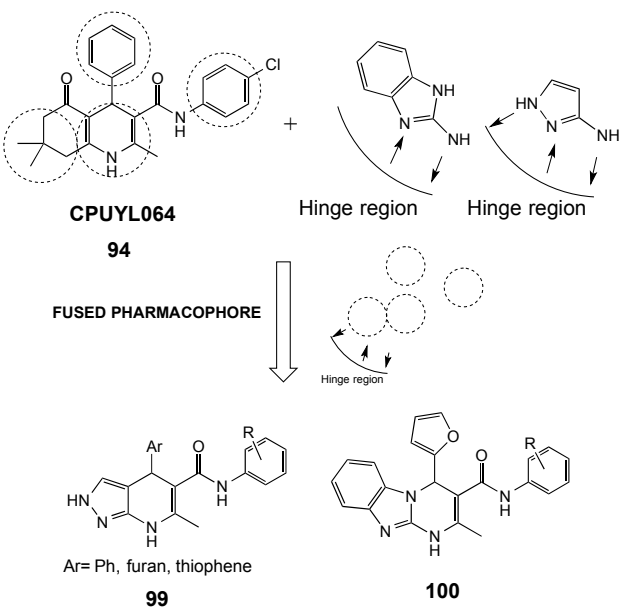
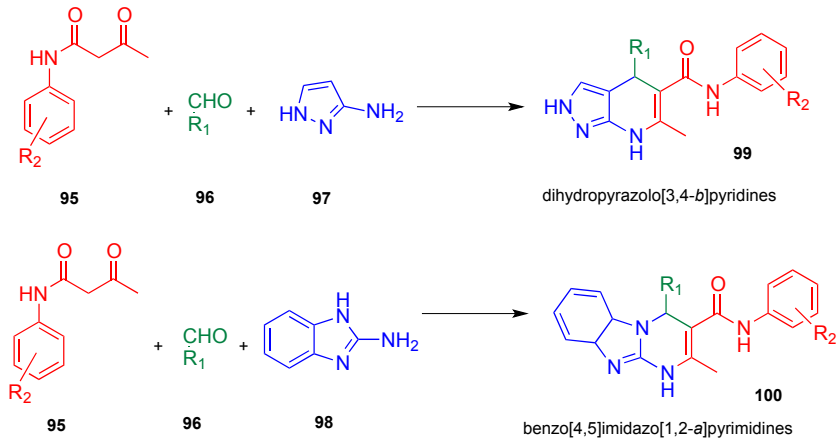


Fig. (9). Design of compounds **99** and **100** as KSP /aurora dual inhibitors.

Although compounds **100a** and **100b** were moderately potent KSP and aurora-A kinase inhibitory fused-molecules, most compounds in these series of benzo[4,5]imidazo[1,2-*a*]pyrimidines displayed more balanced inhibitory activities



Scheme 14. Synthesis of dihydropyrazolo[3,4-*b*]pyridines and benzo[4,5]imidazo[1,2-a]pyrimidines.

against two targets compare to dihydropyrazolo[3,4-*b*]pyridines **99** and showed more potent anti-proliferative activities against the HCT116 cell line with IC_{50} ranging from 4.9 to 11.5 μM (Fig. **10**).

As shown in Figs. (**11**) and (**12**), compound **100b** interacts with KSP through a cavity formed by Glu116, Gly117, Glu118, Trp127, Ala133, Ile136, Pro137, Tyr211, Leu214 and Glu215, and forms a hydrogen bond with the main oxygen chain of the residue Gly117. The furan group of compound **100b** interacted mainly with a cooperative minor pocket surrounded by Arg221 and Ala218. Furthermore, compound **100b** establishes interactions with the hinge region of aurora-kinase through the benzo [4,5]imidazo[1,2-*a*]pyrimidine ring, forming two H-bonds with the main chain of Ala213 as well as hydrophobic interactions with the surrounding residues, including Leu139, Val147, Ala160, and Leu263.

FUTURE DIRECTIONS. INTEGRATION OF MULTICOMPONENT REACTIONS AN STRUCTURE-BASED-DRUG DESIGN

MCRs not only can reduce the time and effort required for the synthesis of drugs already in clinical phase (shortening the number of reaction steps), but the integrated application of structure-based design (SBDD) and MCRs can produce synergistic improvements in the efficiency of drug discovery. The increasing structural information available for many of the new antimitotic targets (mainly crystallographic and NMR structures of mitotic targets (such as Polo, Aurora, KSP and others) will enable the discovery of new ligands in the coming years, even more potent and selective for each of the targets, SBDD and targeted oriented synthesis. In this regard, the methodologies based on High Throughput Synthesis (including MCRs) are tools of great value not only to accelerate the synthesis of new candidates but also for target validation.

At first glance, it might be thought that MCRs and SBDD are two somewhat conflicting tools, because while the former is aimed at the synthesis of large collections of molecules (MCRs can potentially produce millions of compounds, more than are desired or useful by parallel synthesis), the later attempts to select few molecules that are active on a target in question. The limitations and strengths of structure-based design and MCRs are complementary. Structure-based drug design address the problem of which

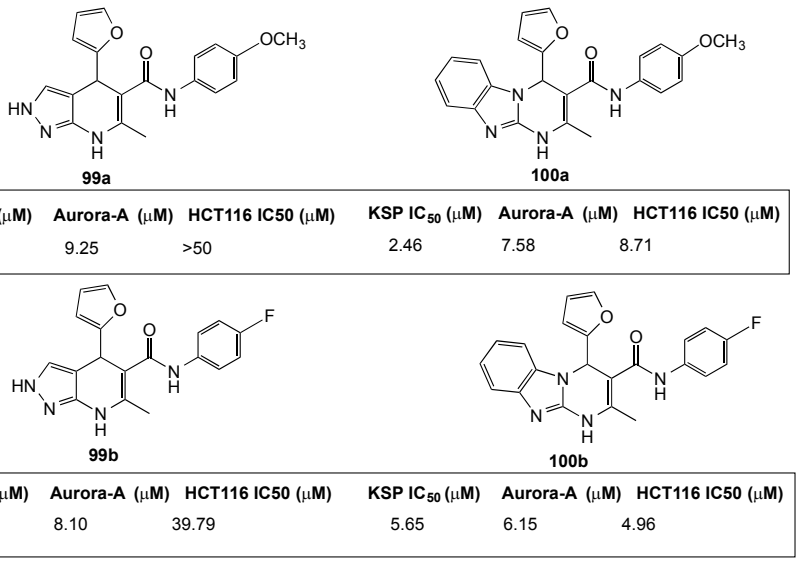


Fig. (10). Inhibitory activities and anti-proliferative activities against the HCT116 for compounds **99a**, **99b**, **100a** and **100b**.

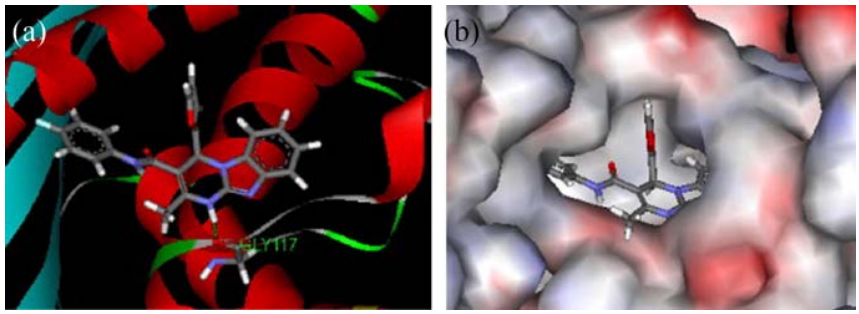


Fig. (11). Model of compound **100b** bound to the KSP. Docking simulation was performed using the program GOLD and the crystal structure of KSP (PDB code 1Q0B) [118].

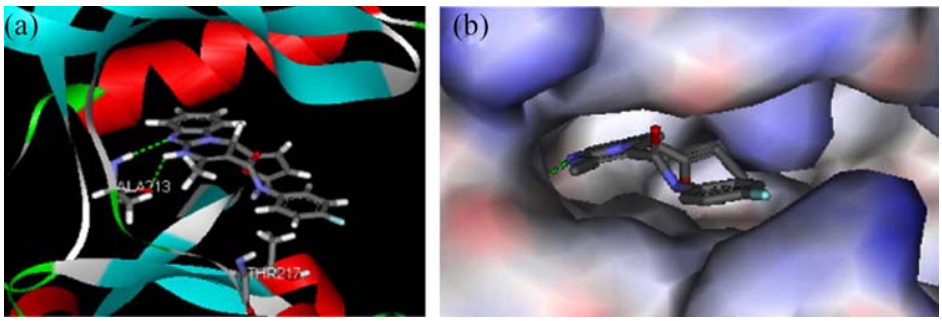


Fig. (12). Model of compound **100b** bound to the Aurora-A kinase. Docking simulation was performed using the program GOLD and the crystal structure of Aurora-A kinase (PDB code 2BMC) [117].

compounds should be prepared by making the search for new leads and development of SAR more directed and by scaling back the numbers of compounds that are synthesized but suffers from the inability to predict the energetic effects of even the most conservative modifications of a lead compound. As a consequence, it is necessary to synthesize many compounds to meet the objectives of a drug discovery program. MCRs addresses this limitation by providing the methodology to synthesize many compounds in parallel so that an extensive array of structure-activity relationships can be developed. The process begins with the design of a library and provides the initial synthesis of a small number of analogues. The process is an iterative one in which SAR data and structural data guide not only the iterative selection of library members for testing, but also the design of later generation library scaffolds. When sufficient SAR data has accumulated and the structures of target complexes with key templates and substituents have been determined, potent compounds with the desired "drug like" compositions are designed and synthesized using a structure-based recombination strategy (Fig. **13**). It is expected that in the coming years, this strategy will lead to the discovery of promising new antimitotic drugs as seen for other anticancer targets [119, 120].

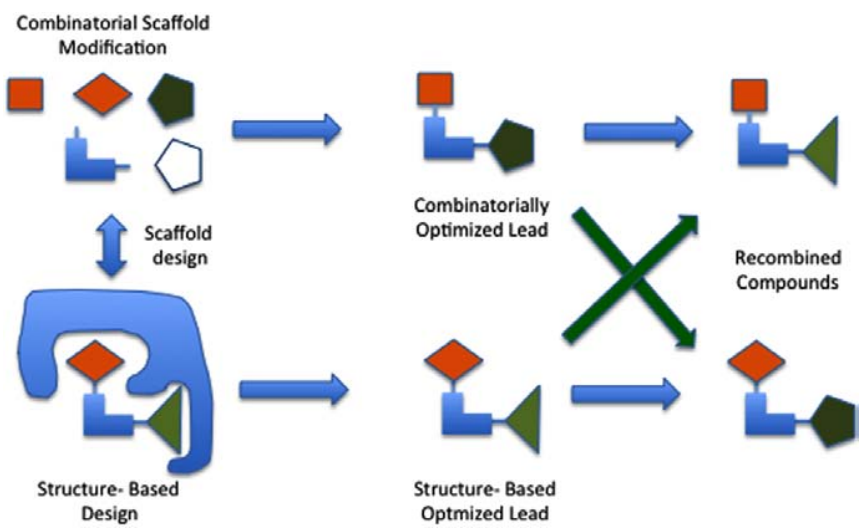


Fig. (13). The combination of structure-based design and MCRs can facilitate the generation of recombined compounds to rapidly produce potent compounds with maximum chemical and structural diversity.

CONCLUSION

As an essential tool in the current landscape of drug discovery, the MCRs can generate high structural complexity in a single step synthesis starting from three or more reactives and can therefore accelerate the creation of libraries of small-molecule targeted antimitotic drugs. The development of novel MCRs is an intellectually challenging task that considers not only the reactivity of the starting materials but also the reactivities of the intermediate molecules generated in situ, their compatibility, and their compartmentalization. There have been some efforts to synthesize antimitotic drugs in recent years by MCRs, but these attempts have mainly focused on the synthesis of drugs aimed to the interaction with microtubules, in many cases as analogues of natural products. However, targeted MCRs toward emerging new antimitotic targets are a powerful tool to obtain new clinically validated drugs in the coming years, and it will help to clarify the true potential of the antimitotic therapies.

CONFLICT OF INTEREST

The authors confirm that this article content has no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by the "Programa Sectorial de Investigacion Aplicada e i+d" of Galician Government (project: 10CSA234012PR). We also thank professors Maria del Carmen Lopez Santamaria and Xerardo García Mera by their support.

REFERENCES

[1] Kastan, M.B.; Bartek, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature,* **2004**, *432*, 316-323.

[2] Rieder, C.L.; Maiato, H. Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. *Dev. Cell*, **2004**, *7*, 637-651.

[3] Hadfield, J.A.; Ducki, S.; Hirst, N.; McGown, A.T. Tubulin and microtubules as targets for anticancer drugs. *Prog. Cell Cycle Res*., **2003**, *5*, 309-325.

[4] Chan, K.S.; Koh, C.G.; Li, H.Y. Mitosis-targeted anti-cancer therapies: where they stand. *Cell Death Dis.,* **2012**, *3*, 411.

[5] Janssen, A.; Medema, R.H. Mitosis as an anti-cancer target. *Oncogene,* **2011**, *30*, 2799-2809.

[6] Manchado, E.; Guillamot, M.; Malumbres, M. Killing cells by targeting mitosis. *Cell Death Differ.*, **2012**, *19*, 369-377.

[7] Barouch-Bentov, R.; Sauer, K. Mechanisms of Drug-Resistance in Kinases. *Exp. Opin. Investig. Drugs*, **2011**, *20*, 153-208.

[8] Andraos, J. Unification of reaction metrics for green chemistry II: Evaluation of named organic reactions and application to reaction discovery. *Org. Process Res. Dev*., **2005**, *9*, 149-163.

[9] Zhu, J.; Bienayme, H. *Multicomponent Reactions*, 1st ed.; Wiley-VCH: Weinheim, Germany, **2005**.

[10] Dondoni, A.; Massi, A. Design and Synthesis of New Classes of Heterocyclic C-Glycoconjugates and Carbon-Linked Sugar and Heterocyclic Amino Acids by Asymmetric Multicomponent Reactions (AMCRs). *Acc. Chem. Res.,* **2006**, *39*, 451-463.

[11] Davies, S.P.; Reddy, H.; Caivano, M.; Cohen, P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.,* **2000**, *351*, 95-105.

[12] Santamaria, D.; Barriere, C.; Cerqueira, A.; Hunt, S.; Tardy, C.; Newton, K.; Cáceres, J.F.; Dubus, P.; Malumbres, M.; Barbacid, M. Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature*, **2007**, *448*, 811-815.

[13] Gautschi, O.; Heighway, J.; Mack, P.C.; Purnell, P.R.; Lara, P.N. Jr.; Gandara, D.R. Aurora kinases as anticancer drug targets. *Clin. Cancer Res.*, **2008**, *14*, 1639-1648.

[14] Lens, S.M.; Voest, E.E.; Medema, R.H. Shared and separate functions of polo-like kinases and aurora kinases in cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **2010**, *10*, 825-841.

[15] Reproduced from ref. [6] with permission. Manchado, E.; Guillamot, M.; Malumbres M. Killing cells by targeting mitosis. *Cell Death Differ*., **2012**, *19*, 369-377.

[16] John, P.C.; Mews, M.; Moore, R. Cyclin/Cdk complexes: their involvement in cell cycle progression and mitotic division. *Protoplasma*, **2001**, *216*, 119-142.

[17] Shapiro, G.I. Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *J. Clin. Oncol.* **2006**, *24*, 1770-1783.

[18] Jordan, M.A.; Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer*, **2004**, *4*, 253-265.

[19] Rowinsky, E.K.; Wright, M.; Monsarrat, B.; Lesser, G.J.; Donehower, R.C. Taxol: pharmacology, metabolism and clinical implications. *Cancer Surv.,* **1993**, *17*, 283-304.

[20] Tuxen, M.K.; Hansen S.W. Neurotoxicity secondary to antineoplastic drugs. *Cancer Treat. Rev.,* **1994**, *20*, 191-214.

[21] Komlodi-Pasztor, E.; Sackett, D.; Wilkerson, J.; Fojo, T. Mitosis is not a key target of microtubule agents in patient tumors. *Nat. Rev. Clin. Oncol.,* **2011**, *8*, 244-250.

[22] Pajk, B.; Cufer, T.; Canney, P.; Ellis, P.; Cameron, D.; Blot, E.; Vermorken, J.; Coleman, R.; Marreaud, S.; Bogaerts, J.; Basaran, G.; Piccart M. Anti-tumor activity of capecitabine and vinorelbine in patients with anthracycline- and taxane-pretreated metastatic breast cancer: findings from the EORTC 10001 randomized phase II trial. *Breast*, **2008**, *17*, 180-185.

[23] Norris, B.; Pritchard, K.I.; James, K.; Myles, J.; Bennett, K.; Marlin, S.; Skillings, J.; Findlay, B.; Vandenberg, T.; Goss, P.; Latreille, J.; Rudinskas, L.; Lofters, W.; Trudeau, M.; Osoba, D.; Rodgers, A. Phase III comparative study of vinorelbine combined with doxorubicin versus doxorubicin alone in disseminated metastatic/recurrent breast cancer: National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study MA8. *J. Clin. Oncol.*, **2000**, *18*, 2385-2394.

[24] Cheng, L.K.; Bradley, T.; Budman, D.R. Novel microtubule-targeting agents – the epothilones. *Biologics*, **2008**, *2*, 789-811.

[25] Gunasekera, S.P.; Gunasekera, M.; Longley, R.E.; Schulte, G.K. Discodermolide: a new bioactive polyhydroxylated lactone from the marine sponge Discodermia dissoluta. *J. Org. Chem.*, **1990**, *55*, 4912-4915.

[26] Longley, R.E.; Caddigan, D.; Harmody, D.; Gunasekera, M.; Gunasekera, S.P. Discodermolide--a new, marine-derived immunosuppressive compound. I. *In vitro* studies. *Transplantation*, **1991**, *52*, 650-655.

[27] Longley, R.E.; Caddigan, D.; Harmody, D.; Gunasekera, M.; Gunasekera, S.P. Discodermolide. A new, marine-derived immunosuppressive compound. II. *In vivo* studies. *Transplantation,* **1991**, *52*, 656-661.

[28] Kaliappan, P.K.; Ravikumar, V.; Punjari S.A. Synthetic studies on taxanes: A domino enyne metathesis/Diels-Alder approach to the AB ring. *J. Chem. Sci*., **2008**, *120*, 205-216.

[29] Jordan, A.; Hadfield, J.A.; Lawrence, N.J.; McGown, A.T. Tubulin as a target for anticancer drugs: agents which interact with the mitotic spindle. *Med. Res. Rev.,* **1998***, 18*, 259-296.

[30] Wordeman, L. How kinesin motor proteins drive mitotic spindle function: Lessons from molecular assays. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, **2010**, *21*, 260-268.

[31] Mayer, T.U.; Kapoor, T.M.; Haggarty, S.J.; King, R.W.; Schreiber, S.L.; Mitchison, T.J. Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science*, **1999**, *286*, 971-974.

[32] Huszar, D.; Theoclitou, M.E.; Skolnik, J.; Herbst, R. Kinesin motor proteins as targets for cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev.*, **2009**, *28*, 197-208.

[33] Moore, A.; Wordeman, L. The mechanism, function and regulation of depolymerizing kinesins during mitosis. *Trends Cell Biol*., **2004**, *14*, 537-546.

[34] Wood, K.W.; Sakowicz, R.; Goldstein, L.S.; Cleveland, D.W. CENP-E is a plus end-directed kinetochore motor required for metaphase chromosome alignment. *Cell*, **1997**, *91*, 357-366.

[35] Yao, X.; Abrieu, A.; Zheng, Y.; Sullivan, K.F.; Cleveland, D.W. CENP-E forms a link between attachment of spindle microtubules to kinetochores and the mitotic checkpoint. *Nat. Cell. Biol*., **2000**, *2*, 484-491.

[36] Manning, G.; Whyte, D.B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. The protein kinase complement of the human genome. *Science*, **2002**, *298*, 1912-1934.

[37] McBrien, K.D.; Gao, Q.; Huang, S.; Klohr, S.E.; Wang, R.R.; Pirnik, D.M.; Neddermann, K.M.; Bursuker, I.; Kadow K.F.; Leet, J.E.; Fusaricide, a new cytotoxic *N*-hydroxypyridone from Fusarium sp. *J. Nat. Prod.,* **1996**, *59*, 1151-1153.

[38] Malumbres, M.; Barbacid, M. Cell cycle kinases in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.,* **2007**, *17*, 60-65.

[39] Brown, J.R.; Koretke, K.K.; Birkeland, M.L.; Sanseau, P.; Patrick, D.R. Evolutionary relationships of Aurora kinases: implications for model organism studies and the development of anticancer drugs. *BMC Evol. Biol.*, **2004**, *4*, 39.

[40] Fu, J.; Bian, M.; Jiang, Q.; Zhang, C. Roles of Aurora Kinases in Mitosis and Tumorigenesis. *Mol. Cancer Res.*, **2007**, *5,* 1-10.

[41] Crane; R.; Kloepfer; A.; Ruderman; J.V. Requirements for the destruction of human Aurora-A. *J. Cell Sci.,* **2004**, *117*, 5975-83.

[42] Marumoto, T.; Zhang, D.; Saya, H. Aurora-A, a guardian of poles. *Nat. Rev. Cancer*, **2005**, *5*, 42-50.

[43] Bischoff, J.R.; Anderson, L.; Zhu, Y.; Mossie, K.; Ng, L.; Souza, B.; Schryver, B.; Flanagan, P.; Clairvoyant, F.; Ginther, C.; Chan, C.S.; Novotny, M.; Slamon, D.J.; Plowman, G.D. A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J*., **1998**, *17*, 3052-3065.

[44] Keen, N.; Taylor, S. Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents. *Nat. Rev. Cancer*, **2004**, *4*, 927-936.

[45] Sasai, K.; Katayama, H.; Stenoien D.L.; Fujii, S.; Honda, R.; Kimura, M.; Okano, Y.; Tatsuka, M.; Suzuki, F.; Nigg, E.A.; Earnshaw, W.C.; Brinkley, W.R.; Sen, S. Aurora-C kinase is a novel chromosomal passenger protein that can complement Aurora-B kinase function in mitotic cells. *Cell. Motil. Cytoskeleton*, **2004**, *59*, 249-263.

[46] Li, X.; Sakashita, G.; Matsuzaki, H.; Sugimoto, K.; Kimura, K.; Hanaoka, F.; Taniguchi, H.; Furukawa, K.; Urano, T. Direct association with inner centromere protein (INCENP) activates the novel chromosomal passenger protein, Aurora-C. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 47201-47211.

[47] Yan, X;, Cao, L.; Li, Q.; Wu, Y.; Zhang, H.; Saiyin, H.; Liu, X.; Zhang, X.; Shi, Q.; Yu, L. Aurora C is directly associated with Survivin and required for cytokinesis. *Genes Cells,* **2005**, *10*, 617-26.

[48] Mountzios, G.; Terpos, E.; Dimopoulos, M.A. Aurora kinases as targets for cancer therapy. *Cancer Treat. Rev.,* **2008**, *34*, 175-82.

[49] Kops, G.J.; Weaver, B.A.; Cleveland, D.W. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat. Rev. Cancer*, **2005**, *5*, 773-785.

[50] Musacchio, A.; Salmon, E.D. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2007**, *8*, 379-393.

[51] Manchado, E.; Guillamot, M.; de Carcer, G.; Eguren, M.; Trickey, M.; Garcia-Higuera, I.; Moreno, S.; Yamano, H.; Cañamero, M.; Malumbres, M. Targeting Mitotic Exit Leads to Tumor Regression *In vivo*: Modulation by Cdk1, Mastl, and the PP2A/B55α,δ Phosphatase. *Cancer Cell*, **2010**, *18*, 641–654.

[52] Weber, L. High-diversity combinatorial libraries. *Curr. Opin. Chem. Biol.,* **2000**, *4*, 295-302.

[53] Dömling, A. Recent developments in isocyanide based multicomponent reactions in applied chemistry. *Chem. Rev.,* **2006**, *106*, 17-89.

[54] Dömling, A.; Ugi, I. Multicomponent Reactions with Isocyanides. *Angew.Chem., Int. Ed*., **2000**, *39*, 3168-3210.

[55] Passerini, M.; Simone, L. Sopra gli isonitrili (I). *Gazz. Chim. Ital*., **1921**, *51*, 126-129.

[56] Hulme, C.; Gore, V. "Multi-component reactions: emerging chemistry in drug discovery" 'from xylocain to crixivan'. *Curr. Med. Chem.*, **2003**, *10*, 151-179.

[57] Steinmetz, H.; Glaser, N.; Herdtweck, E.; Sasse, F.; Reichenbach, H.; Höfle, G. Isolation, crystal and solution structure determination, and biosynthesis of tubulysins--powerful inhibitors of tubulin polymerization from myxobacteria. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **2004**, *43*, 4888-4892.

[58] Sasse, F.; Steinmetz, H.; Heil, J.; Höofle, G.; Reichenbach, H. Tubulysins, new cytostatic peptides from myxobacteria acting on microtubuli. Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.,* **2000**, *53*, 879-885.

[59] Pando, O.; Stark, S.; Denkert, A.; Porzel, A.; Preusentanz, R.; Wessjohann L.E. The multiple multicomponent approach to natural product mimics: Tubugis, N-substituted anticancer peptides with picomolar activity. *J. Am. Chem. Soc*., **2011**, *133*, 7692–7695.

[60] Dömling, A.; Beck, B.; Eichelberger, U.; Sakamuri, S.; Menon, S.; Chen, Q.Z.; Lu, Y.; Wessjohann, L.A. Total synthesis of tubulysin U and V. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.,* **2006**, *45*, 7235-7239.

[61] Dömling, A.; Beck, B.; Eichelberger, U.; Sakamuri, S.; Menon, S.; Chen, Q.-Z.; Lu, Y.; Wessjohann, L.A. Total synthesis of tubulysin U and V. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **2007**, *46*, 2347-2348.

[62] Keller, L.; Beaumont, S.; Liu, J.-M.; Thoret, S.; Bignon, J.; Wdzieczak-Bakala, J.; Dauban, P.; Dodd, R.H. New C5-alkylated indolobenzazepinones acting as inhibitors of tubulin polymerization: cytotoxic and antitumor activities *J. Med. Chem*., **2008**, *51*, 3414-3421.

[63] Beaumont, S.; Retailleau, P.; Dauban, P.; Dodd, R. H. Synthesis of indolobenzazepinones by application of an isocyanide-based multicomponent reaction. *Eur. J. Org. Chem*., **2008**, *30*, 5162-5175.

[64] Kelly, G.M.; Hartwell, L.J. The biological effects and the chemical composition of podophyllin: A review. *J. Natl. Cancer Inst.,* **1954**, *14*, 967-1010.

[65] Imbert, T.F. Discovery of podophyllotoxins. *Biochemie*, **1998**, *80*, 207-222.

[66] Gorobets, N.Y.; Yousefi, B.H.; Belaj, F.; Kappe, C.O. Rapid microwave-assisted solution phase synthesis of substituted 2-pyridone libraries. *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 8633-8644.

[67] Choudhari, B.P.; Mulwad, V.V. Synthesis of biologically active 3,8-dioxo-10-hydroxypyrano[2,3-f]quinoline and its reactions. *Indian J. Chem. Sec.t B-Org. Chem. Incl. Med. Chem*., **2003**, *42*, 2080-2085.

[68] Balasubramanian, C.; Sekar, M.; Mohan, P.S. Synthesis and biological activity of novel pyranobisbenzopyrans and benzopyranopyranoquinolines. *Indian J. Chem. Sect. B-Org. Chem. Incl. Med. Chem.,* **1996**, *35*, 1225-1227.

[69] Kemnitzer, W.; Drewe, J.; Jiang, S.; Zhang, H.; Wang, Y.; Zhao, J.; Jia, S.; Herich, J.; Labreque, D.; Storer, R.; Meerovitch, K.; Bouffard, D.; Rej, R.; Denis, R.; Blais, C.; Lamothe, S.; Attardo, G.; Gourdeau, H.; Tseng, B.; Kasibhatla, S.; Cai, S.X. Discovery of 4-aryl-4*H*-chromenes as a new series of apoptosis inducers using a cell- and caspase-based high-throughput screening assay. 1. Structure-activity relationships of the 4-aryl group. *J. Med. Chem.,* **2004**, *47,* 6299-6310.

[70] Gourdeau, H.; Leblond, L.; Hamelin, B.; Desputeau, C.; Dong, K.; Kianicka, I.; Custeau, D.; Boudreau, C.; Geerts, L.; Cai, S.X.; Drewe, J.; Labrecque, D; Kasibhatla, S.; Tseng, B. Antivascular and antitumor evaluation of 2-amino-4-(3-bromo-4,5-dimethoxyphenyl)-3-cyano-4*H*-chromenes, a novel series of anticancer agents. *Mol. Cancer Ther.,* **2004**, *3*, 1375-1384.

[71] Kasibhatla, S.; Gourdeau, H.; Meerovitch, K.; Drewe, J.; Reddy, S.; Qiu, L.; Zhang, H.; Bergeron, F.; Bouffard, D.; Yang, Q.; Herich, J.; Lamothe, S.; Cai, S.X.; Tseng, B. Discovery and mechanism of action of a novel series of apoptosis inducers with potential vascular targeting activity. *Mol Cancer Ther.,* **2004**, *3*, 1365-1374.

[72] Magedov, I.V.; Manpadic, M.; Evdokimova, N.M.; Eliasc, E.M.; Rozhkovaa, E.; Ogasawarac, M.A.; Bettaled, J.D.; Przheval'skiia, N.M; Rogeljd, S.; Kornienko, A. Antiproliferative and apoptosis inducing properties of pyrano[3,2-c]pyridones accessible by a one-step multicomponent synthesis. *Bioorg. Med. Chem. Lett*., **2007**, *14*, 3872-3876.

[73] Pinney, K.G.; Bounds, A.D.; Dingeman, K.M.; Mocharla, V.P.; Pettit, G.R.; Bai, R.; Hamel, E. A new anti-tubulin agent containing the benzo[*b*]thiophene ring system. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, *9*, 1081-1086.

[74] Pinney, K.G.; Pettit, G.R.; Mocharla, V.P.; Del Pilar Majia, M.; Shirali, A. PCT Int. Appl. WO 9839323, **1998**.

[75] Mullica, D.F.; Pinney, K.G.; Mocharla, V.P.; Dingeman, K.M.; Bounds, A.D.; Sappenfield, E.L. Characterization and structural analysis of trimethoxy and triethoxybenzo[*b*]thiophene. *J. Chem. Crystallogr.*, **1998**, *28*, 289-295.

[76] Pinney, K.G.; Chen, Z.; Mocharla, V.P.; Choony, N.; Strong, T. In: *Synthesis of a benzo[b]- thiophene-based vascular targeting prodrug and related anti- tubulin ligands.* Proceedings of the 220th American Chemical Society National Meeting, Division of Organic Chemistry, Washington, DC, August 20-24, **2000**. Abstract 196.

[77] Flynn, B.L.; Verdier-Pinard, P.; Hamel, E. A novel palladium-mediated coupling approach to 2,3-disubstituted benzo[*b*]- thio-

phenes and its application to the synthesis of tubulin binding agents. *Org. Lett.*, **2001**, *3*, 651-654.

[78] Kapoor, T.M.; Mayer, T.U.; Coughlin, M.L.; Mitchison, T.J. Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. *J. Cell. Biol*., **2000**, *150*, 975-988.

[79] Maliga, Z.; Kapoor, T.M.; Mitchison, T.J. Evidence that monastrol is an allosteric inhibitor of the mitotic kinesin Eg5. *Chem. Biol*., **2002**, *9*, 989- 996.

[80] Luo, L.; Carson, J.D.; Dhanak, D.; Jackson, J.R.; Huang, P.S.; Lee, Y.; Sakowicz, R.; Copeland, R.A. Mechanism of Inhibition of Human KSP by Monastrol: Insights from Kinetic Analysis and the Effect of Ionic Strength on KSP Inhibition. *Biochemistry*, **2004**, *43*, 15258-15266.

[81] DeBonis, S.; Simorre, J.P.; Crevel, I.; Lebeau, L.; Skoufias, D.A.; Blangy, A.; Ebel, C.; Gans, P.; Cross, R.; Hackney, D.D.; Wade, R.H.; Kozielski, F. Interaction of the Mitotic Inhibitor Monastrol with Human Kinesin Eg5. *Biochemistry*, **2003**, *42*, 338-349.

[82] Cochran, J.C.; Gatial, J.E.; Kapoor, T.M.; Gilbert, S.P. Monastrol inhibition of the mitotic kinesin Eg5. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *280*, 12658- 12667.

[83] Cochran, J.C.; Gilbert, S.P. ATPase Mechanism of Eg5 in the Absence of Microtubules: Insight into Microtubule Activation and Allosteric Inhibition by Monastrol. *Biochemistry*, **2005**, *44*, 16633-16648.

[84] Tao, W.; South, V.J.; Diehl, R.E.; Davide, J.P.; Sepp-Lorenzino, L.; Fraley, M.E.; Arrington, K.L.; Lobell, R.B. An Inhibitor of the Kinesin Spindle Protein Activates the Intrinsic Apoptotic Pathway Independently of p53 and De Novo Protein Synthesis. *Mol. Cell. Biol*., **2007**, *27*, 689- 698.

[85] Gartner, M.; Sunder-Plassmann, N.; Seiler, J.; Utz, M; Vernos, I.; Surrey, T.; Giannis, T. *Chem. Bio. Chem.,* **2005**, *6*, 1173–1177.

[86] Sarli, V.; Huemmer, S.; Sunder-Plassmann, N.; Mayer, T.U.; Giannis, A.; *Chem. Bio. Chem* **2005**, *6*, 2005–2013.

[87] Klein, E.; DeBonis, S.; Thiede, B.; Skoufias, D.A.; Kozielski, F.; Lebeau, L.; *Bioorg. Med. Chem.*, **2007**, *15*, 6474–6488.

[88] Biginelli, P. Ueber Aldehyduramide des Acetessigäthers. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.,* **1891**, *24*, 1317-1319, 2962-2967.

[89] Garcia-Saez, I.; DeBonis, S.; Lopez, R.; Trucco, F.; Rousseau, B.; Thuéry, P.; Kozielski, F. Structure of Eg5 in complex with a new monastrol-based inhibitor bound in the (R) configuration, *J. Biol. Chem.,* **2007***, 282*, 9740-9747.

[90] Prokopcov, H.; Dallinger, D.; Uray, G.; Kaan, H.Y.K.; Ulaganathan, V.; Kozielski, F.; Laggner, C.; Kappe, C.O. Structure-activity relationships and molecular docking of novel dihydropyrimidine-based mitotic Eg5 inhibitors, *Chem. Med. Chem.*, **2010**, *5*, 1760-1769.

[91] Adapted from. Prokopcov, H.; Dallinger, D.; Uray, G.; Kaan, H.Y.K.; Ulaganathan, V.; Kozielski, F.; Laggner, C.; Kappe, C.O. Structure-activity relationships and molecular docking of novel dihydropyrimidine-based mitotic Eg5 inhibitors, *Chem. Med. Chem.*, **2010**, *5*, 1760-1769. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

[92] Lad, L.; Luo, L.; Carson, J.D.; Wood, K.W.; Hartman, J.J.; Copeland, R.A.; Sakowicz, R. Mechanism of inhibition of human KSP by ispinesib. *Biochemistry*, **2008**, *47*, 3576-3585.

[93] Luo, L.; Parrish, C.A.; Neysa, N.; McNulty, D.E.; Chaudhari, A.M.; Carson, J.D.; Sudakin, V.; Shaw, A.N.; Lehr, R.; Zhao, H.; Sweitzer, S.; Lad, L.; Wood, K.W.; Sakowicz, R.; Annan, R.S.; Huang, P.S.; Jackson, J.R.; Dhanak, D.; Copeland, R.A.; Auger, K.R. ATP-competitive inhibitors of the mitotic kinesin KSP that function via an allosteric mechanism. *Nat. Chem. Biol*., **2007**, *3*, 722–726.

[94] Jackson, J.R.; Auger, K.R.; Gilmartin, A.; Wai, E.K.; Luo, L.; Concha, N.; Parrish, C.A.; Sutton, D.; Diamond, M.A.; Giardiniere, M.; Zhang, S.Y.; Huang, P.S.; Wood, K.W.; Belmont, L.; Lee, Y.; Bergnes, G.; Anderson, R.; Brejc, K.; Sakowicz, R. In: *A resistance mechanism for the KSP inhibitor ispinesib implicates point mutations in the compound binding site*, Proceedings of the AAC-NCI-EORTC Molecular Targets and Cancer Therapeutics Meeting, AACR, Philadelphia, PA., US, **2005**.

[95] Adapted from Sheth, P.R.; Basso, A.; Duca, J.S.; Lesburg, C.A.; Ogas, P.; Gray, K.; Nale, L.; Mannarino, A.F.; Prongay, A.J.; Le, H.V. Thermodynamics of Nucleotide and Inhibitor Binding to Wild-Type and Ispinesib-Resistant Forms of Human Kinesin Spindle Protein. *Biochemistry,* **2009**, *48*, 11045-11055, with permission.

[96] Connolly, D.J.; Cusack, D.; O'Sullivan T.P.; Guiry, P.J. Synthesis of quinazolinones and quinazolines. *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 10153-10202.

[97] Mossetti, R.; Pirali T.; Saggiorato, D.; Tron, G.C. Imides: forgotten players in the Ugi reaction. One-pot multicomponent synthesis of quinazolinones. *Chem. Commun*., **2011**, *47*, 6966-6968.

[98] Bergnes, G.; Ha, E.; Yiannikouros, G.; Welday, K.A. Jr; Kalaritis, P.; Yonce, B.E. Syntheses of quinazolinones. WO patent 03070701, December *18*, **2003**.

[99] Sorbera, L.A.; Bolos, J.; Serradell, N.; Bayes, M. Ispinesib mesilate. *Drugs Future*, **2006**, *31*, 778-787.

[100] Giovenzana, G.B.; Tron, G.C.; Di Paola, S.; Menegotto I.; Pirali, T. A mimicry of primary amines by bis-secondary diamines as components in the Ugi four-component reaction. *Angew. Chem., Int. Ed.*, **2006**, *45*, 1099-1102.

[101] Mossetti, R.; Pirali T.; Tron, G.C. Synthesis of Passerini-Ugi hybrids by a four-component reaction using the glycolaldehyde dimer. *J. Org. Chem*., **2009**, *74*, 4890-4892.

[102] Ye, X.; Xie, C.; Pan, Y.; Han, L.; Xie, T. Copper-catalyzed synthesis of α-amino imides from tertiary amines: Ugi-type three-component assemblies involving direct functionalization of sp^3 C−Hs adjacent to nitrogen atoms. *Org. Lett.*, **2010**, *12*, 4240-4243.

[103] Schiemann, K.; Finsinger, D.; Zenke, F.; Amendt, C.; Knöchel, T.; Bruge, D.; Buchstaller, H-P.; Emde, U.; Stähle, W.; Anzali, S. The discovery and optimization of hexahydro-2H-pyrano[3,2-c]quinolines (HHPQs) as potent and selective inhibitors of the mitotic kinesin-5. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*, 1491-1495.

[104] Povarov, L.S.; Grigos, V.I.; Karakhanov, R.A.; Mikhailov, B.M. The reactions of dihydropyran and 2-methyldihydropyran with some Schiff bases. *Bu. Acad. Sci., USSR Ch+,* **1964**, *13*, 163-165.

[105] The coordinates have been deposited with RCSB Protein Data Bank under the accession code 3L9H. Avaliable from: http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3L9H (Accessed Fabruary 24, **2014**).

[106] Cox, C.D.; Breslin, M.J.; Mariano, B.J.; Coleman, P. J.; Buser, C. A.; Walsh, E. S.; Hamilton, K.; Huber, H. E.; Kohl, N. E.; Torrent, M.; Yan, Y.; Kuo, L. C.; Hartman, G. D. Kinesin spindle protein (KSP) inhibitors. Part 1: The discovery of 3,5-diaryl-4,5-dihydropyrazoles as potent and selective inhibitors of the mitotic kinesin KSP. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, *15*, 2041-2045.

[107] Reproduced from ref. [103] with permission. Schiemann, K.; Finsinger, D.; Zenke, F.; Amendt, C.; Knöchel, T.; Bruge, D.; Buchstaller, H-P.; Emde, U.; Stähle, W.; Anzali S. The discovery and optimization of hexahydro-2H-pyrano[3,2-c]quinolines (HHPQs) as potent and selective inhibitors of the mitotic kinesin-5. *Bioorg. Med. Chem. Lett*., **2010**, *20*, 1491-1495.

[108] Pinkerton, A.B.; Lee, T.T.; Hoffman, T.Z.; Wang, Y.; Kahraman, M.; Cook, T.G.; Severance, D.; Gahman, T.C.; Noble, S.A.; Shiaub A.K.; Davis R.L. Synthesis and SAR of thiophene containing kinesin spindle protein (KSP) inhibitors. *Bioorg. Medi. Chem. Lett.*, *17*, **2007**, 3562-3569.

[109] Andersen, H.S.; Olsen, O.H.; Iversen, L.F.; Sorensen, A.L.P.; Mortensen, S.B.; Christensen, M.S.; Branner, S.; Hansen, T.K.; Lau, J.F.; Jeppesen, L.; Moran, E.J.; Su, J.; Bakir, F.; Judge, L.; Shahbaz, M.; Collins, T.; Vo, T.; Newman, M.J.; Ripka, W.C.; Moller, N.P. Discovery and SAR of a novel selective and orally bioavailable nonpeptide classical competitive inhibitor class of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J. Med. Chem.,* **2002**, *45*, 4443-4459.

[110] Fraley, M.E.; Garbaccio, R.M.; Arrington, K.L.; Hoffman, W.F.; Tasber, E.S.; Coleman, P.J.; Buser, C.A.; Walsh, E.S.; Hamilton, K.; Fernandes, C.; Schaber, M.D.; Lobell, R.B.; Tao, W.; South, V.J.; Yan, Y.; Kuo, L.C.; Prueksaritanont, T.; Shu, C.; Torrent, M.; Heimbrook, D. C.; Kohl, N.E.; Huber, H.E.; Hartman, G.D. Kinesin spindle protein (KSP) inhibitors. Part 2: the design, synthesis, and characterization of 2,4-diaryl-2,5-dihydropyrrole inhibitors of the mitotic kinesin KSP. *Bioorg. Med. Chem. Lett*., **2006**, *16*, 1775-1779.

[111] Reproduced from Pinkerton, A.B.; Lee, T.T.; Hoffman, T.Z.; Wang, Y.; Kahraman, M.; Cook, T.G.; Severance, D.; Gahman, T.C.; Noble, S.A.; Shiaub, A.K.; Davis, R.L. Synthesis and SAR of thiophene containing kinesin spindle protein (KSP) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett*., **2007**, *17*, 3562-3569, with permission.

[112] Huang, S.; Lin, R.; Yu, Y.; Lu, Y.; Connolly, P.J.; Chiu, G.; Li, S.; Emanuel, S.L.; Middleton, S.A. Synthesis of 3-(1H-benzimidazol-2-yl)-5-isoquinolin-4-ylpyrazolo[1,2-b]pyridine, a potent cyclin

dependent kinase 1 (CDK1) inhibitor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.,* **2007**, *17*,1243-1245.

[113] Nikpassand, M.; Zare, L.; Shafaati, T.; Shariati, S. Regioselective Synthesis of Fused Azo-linked Pyrazolo[4,3-*e*]pyridines Using Nano-Fe3O4. *Chin. J. Chem*., **2012**, *30*, 604-608.

[114] Chen, Z.; Wu, J. Active H-Pyrazolo[5,1-a]isoquinolines via Multicomponent Reaction *Org. Lett.,* **2010**, *12*, 4856-4859.

[115] Chen, Z.; Yua X.; Wu, J.; Silver triflate and N-heterocyclic carbene co-catalyzed reaction of N-(2-alkynylbenzylidene)hydrazide, methanol with α,β-unsaturated aldehyde, *Chem. Commun.,* **2010**, *46*, 6356–6358.

[116] Friberg, S.; Mattson, S. On the growth rates of human malignant tumors: Implications for medical decision making. *J. Surgi. Oncol.,* **1997**, *65*, 284-297.

[117] Fu, R-G.; You, Q-D.; Yang, L.; Wu, W-T.; Jiang, C.; Xu, X-L. Design, synthesis and bioevaluation of dihydropyrazolo[3,4-b]pyridine and benzo[4,5]imidazo[1,2-a]pyrimidine compounds as dual KSP and Aurora-A kinase inhibitors for anti-cancer agents. *Bioorg. Med. Chem*., **2010**, *18*, 8035-8043.

[118] Reproduced from [115] with permission: Fu, R-G.; You, Q-D.; Yang, L.; Wu, W-T.; Jiang, C.; Xu, X-L. Design, synthesis and bioevaluation of dihydropyrazolo[3,4-b]pyridine and benzo[4,5]imidazo[1,2-a]pyrimidine compounds as dual KSP and Aurora-A kinase inhibitors for anti-cancer agents. *Bioorg. Med. Chem*., **2010**, *18*, 8035-8043.

[119] Kalinski, C.; Umkehrer, M.; Weber, L.; Kolb, J.; Burdack, C.; Ross, G. On the industrial applications of MCRs: molecular diversity in drug discovery and generic drug synthesis, *Mol. Divers*, **2010**, *14*, 513–522.

[120] Huang, Y.; Wolf, S.; Bista, M.; Meireles, L.; Camacho, C.; Holak, T.A.; Dömling, A. 1,4-Thienodiazepine-2,5-diones via MCR (I): Synthesis, Virtual Space and p53-Mdm2 Activity, *Chem. Biol. Drug Des.,* **2010**, *76*: 116–129.

Received: February 02, 2014 **Revised: June 15, 2014** **Accepted: July 21, 2014**

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

PUBLICACIÓN 2:

Structure-based design of new KSP-Eg5 inhibitors assisted by a targeted multicomponent reaction

Carlos Carbajales,[a] Miguel Ángel Prado,[c] Hugo Gutiérrez-de-Terán,[b] Ángel Cores,[a] Jhonny Azuaje,[a] Silvia Novio,[e] María Jesús Nuñez,[e] Belén Fernández-García,[d] Eddy Sotelo,[a, f] Xerardo García-Mera,[f] Pedro Sánchez-Lazo,[d] Manuel Freire-Garabal,[e] Alberto Coelho*[a, f]
Revista: *ChemBioChem*
Editorial: Wiley
ISSN: 1439-7633 Año de publicación: 2014 Volumen: 15 Número: 10 Páginas: 1471-1480.
DOI: 10.1002/cbic.201402089

[a] C. Carbajales, A. Cores, Dr. J. Azuaje, Prof. E. Sotelo, Prof. A. Coelho. Center for Research in Biological Chemistry and Molecular Materials. University of Santiago de Compostela. Jenaro de la Fuente s/n, Campus Vida. Santiago de Compostela 15782 (Spain). E-mail: albertojose.coelho@usc.es
[b] Dr. H. Gutiérrez-de-Terán. Department of Cell and Molecular Biology, Uppsala University. Biomedical Center, Box 596, 751 24 Uppsala (Sweden)
[c] Dr. M. Prado, Harvard Medical School, Department of Cell Biology
240 Longwood Avenue, Boston, MA 02115 (USA)
[d] Dr. B. Fernández-García, Prof. P. S nchez-Lazo, Instituto Universitario de Oncolog a del Principado de Asturias (IUOPA), Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Oviedo, Campus of "El Cristo". Santiago Gasc n Building, 33006 Oviedo (Spain).
[e] Dr. S. Novio, Prof. M. J. Nuñez, Prof. M. Freire-Garabal. Department of Pharmacology, University of Santiago de Compostela Lennart Levi Stress and Neuroimmunology Laboratory, School of Medicine, C/San Francisco, s/n. Santiago de Compostela, 15782 (Spain).
[f] Prof. E. Sotelo, Prof. X. García-Mera, Prof. A. Coelho. Department of Organic Chemistry, University of Santiago de Compostela. Avda. das Ciencias, s/n. Campus sur Santiago de Compostela, 15782 (Spain).

Contribución específica en la publicación:
Metodología e investigación: planteamiento y desarrollo de los experimentos químicos en laboratorio para la obtención de las quimiotecas. Caracterización de los compuestos. Adquisición y análisis de datos.

Índices de calidad:
Q2 (15/59) en el área de Medicinal Chemistry en 2014.
Índice de impacto: 3,0.
Artículo de investigación, correspondiente al Capítulo 2 de esta memoria.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ChemPubSoc Europe

DOI: 10.1002/cbic.201402089

Structure-Based Design of New KSP-Eg5 Inhibitors Assisted by a Targeted Multicomponent Reaction

Carlos Carbajales,[a] Miguel Ángel Prado,[c] Hugo Gutiérrez-de-Terán,[b] Ángel Cores,[a] Jhonny Azuaje,[a] Silvia Novio,[e] María Jesús Nuñez,[e] Belén Fernández-García,[d] Eddy Sotelo,[a, f] Xerardo García-Mera,[f] Pedro Sánchez-Lazo,[d] Manuel Freire-Garabal,[e] and Alberto Coelho*[a, f]

An integrated multidisciplinary approach that combined structure-based drug design, multicomponent reaction synthetic approaches and functional characterization in enzymatic and cell assays led to the discovery of new kinesin spindle protein (KSP) inhibitors with antiproliferative activity. A focused library of new benzimidazoles obtained by a Ugi + Boc removal/cyclization reaction sequence generated low-micromolar-range KSP inhibitors as promising anticancer prototypes. The design and functional studies of the new chemotypes were assessed by computational modeling and molecular biology techniques. The most active compounds—**20** (IC_{50} = 1.49 μM, EC_{50} = 3.63 μM) and **22** (IC_{50} = 1.37 μM, EC_{50} = 6.90 μM)—were synthesized with high efficiency by taking advantage of the multicomponent reactions.

Introduction

Disruption of the normal regulation of the cell cycle, and particularly mitosis acceleration, lies at the heart of the events leading to cancer. Recent progress in understanding the molecular changes that trigger cancer development offers the possibility of specifically targeting malfunctioning molecules and pathways to achieve more effective and rational cancer therapy. In this context, *targeted antimitotic therapies* block the proliferation of cancer cells by interfering with specific biomolecules required for tumor development and growth.[1–3] The mitotic kinesins, a subgroup of kinesin motor proteins that function exclusively in mitosis, have recently emerged as a druggable target class.[4] KSP (kinesin-5 motor protein, also termed Eg5), is a kinesin motor protein required to establish mitotic spindle bipolarity[5] that received increasing interest as a drug target after the identification of its selective inhibitor monastrol. This small-molecule inhibitor was isolated in an elegant phenotypic screening designed to identify antimitotic compounds that do not directly interfere with microtubule dynamics.[6] Scheme 1 depicts the chemical structure of monastrol and other KSP inhibitors. Among them, *S*-trityl-L-cysteine is an allosteric inhibitor of KSP,[7,8] albeit with limited use due to its poor pharmacokinetic properties. A quinazolinone inhibitor of KSP (CK0106023) was tested in a SKOV3 human tumor xenograft model and showed inhibition of tumor growth comparable to that achieved with Paclitaxel.[9] One of the first targeted antimitotic agents, and the first KSP inhibitor to be studied in the clinic, is ispinesib (or SB-715992 Scheme 1),[10,11] a small-molecule inhibitor of the KSP ATPase, uncompetitive with ATP and ADP. MK-0731[12] is another potent small-molecule inhibitor of the KSP ATPase activity with >20000 fold selectivity for KSP over other kinesins (Scheme 1). Clinical experience with KSP inhibitors has now led to the accumulation of patterns relating to the adverse-event profile, so the common side effects of classical tubulin-targeting drugs are rarely observed for the last three KSP inhibitors described above. However, the fact that none of these candidates has reached the market further intensifies the need to find new prototypes active on this target. A thorough analysis of the complex synthetic processes required to obtain inhibitors (Scheme 1) reveals the synthesis of exclusive molecular architectures as a main bottleneck in the search for KSP inhibitors.[13,14] In addition, a very common characteristic in these inhibitors is the presence of halogens in aro-

[a] C. Carbajales, Á. Cores, Dr. J. Azuaje, Prof. E. Sotelo, Prof. A. Coelho
Center for Research in Biological Chemistry and Molecular Materials
University of Santiago de Compostela
Jenaro de la Fuente s/n, Campus Vida
Santiago de Compostela 15782 (Spain)
E-mail: albertojose.coelho@usc.es

[b] Dr. H. Gutiérrez-de-Terán
Department of Cell and Molecular Biology, Uppsala University
Biomedical Center, Box 596, 751 24 Uppsala (Sweden)

[c] Dr. M. Á. Prado
Harvard Medical School, Department of Cell Biology
240 Longwood Avenue, Boston, MA 02115 (USA)

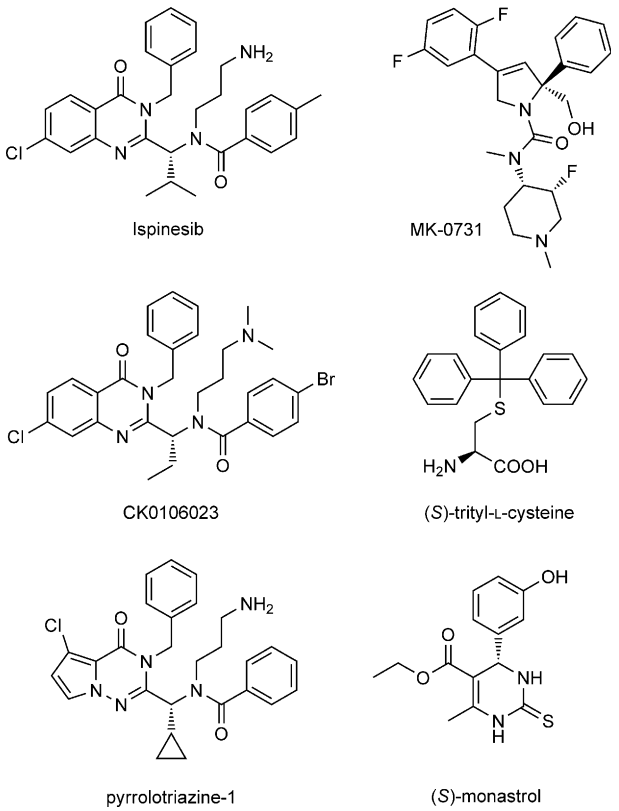
[d] Dr. B. Fernández-García, Prof. P. Sánchez-Lazo
Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA)
Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Oviedo
Campus of "El Cristo". Santiago Gascón Building, 33006 Oviedo (Spain)

[e] Dr. S. Novio, Prof. M. J. Nuñez, Prof. M. Freire-Garabal
Department of Pharmacology, University of Santiago de Compostela
Lennart Levi Stress and Neuroimmunology Laboratory, School of Medicine
C/San Francisco, s/n. Santiago de Compostela, 15782 (Spain)

[f] Prof. E. Sotelo, Prof. X. García-Mera, Prof. A. Coelho
Department of Organic Chemistry, University of Santiago de Compostela
Avda. das Ciencias, s/n. Campus sur
Santiago de Compostela, 15782 (Spain)

Supporting information for this article is available on the WWW under http://dx.doi.org/10.1002/cbic.201402089.

 © 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim



Scheme 1. Examples of KSP inhibitor drugs that act on the Eg5 allosteric site.

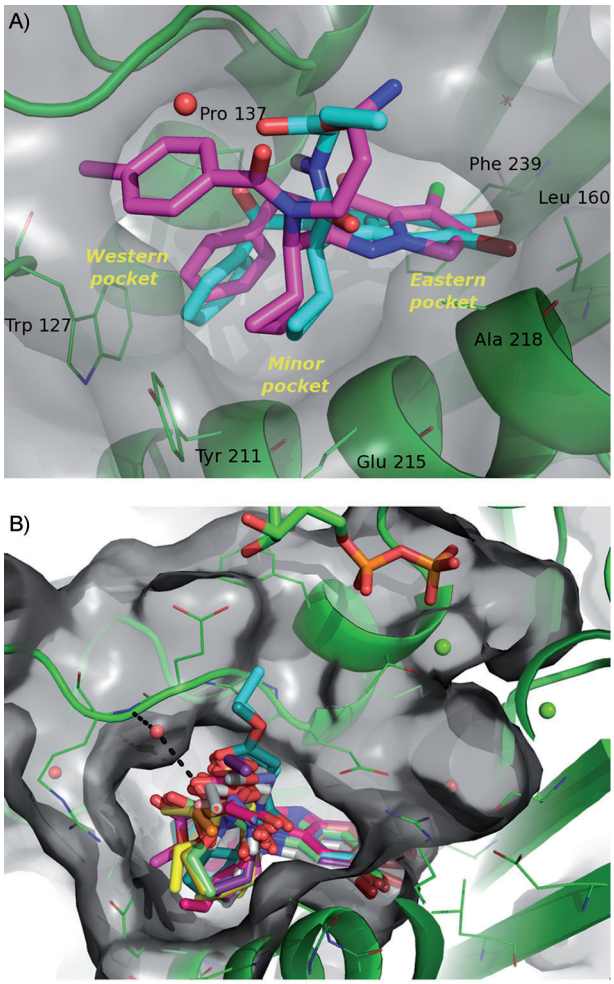


Figure 1. A) Superposition of compound **20** (cyan) and pyrrolotriazine-1 (Scheme 1, magenta, PDB ID: 2GM1), highlighting the fitting with the three pockets in the binding site of KSP. B) The selected docking pose for each compound shown in Table 1, revealing a consensus binding mode for the series. The protein backbone is shown in cartoon form, with residues defining the binding site displayed in both lines and surface. Note the location of the ADP (green sticks), Mg^{+2} ions (green spheres) and the considered crystal water molecules (red spheres).

matic rings, especially aimed at increasing hydrophobic interactions with specific target areas.

The targeted synthesis of chemical libraries by combinatorial chemistry is clearly an advantageous approach for the hit-identification and hit-to-lead processes.[15,16] Multicomponent reactions allow the building of complex molecular scaffolds in a more efficient way than by classical, two-component chemistry.[17,18] In this context, the most active research area is probably on transformations that use isonitriles as key precursors, one of the most widely used transformations being the Ugi reaction. In the KSP field, Tron and co-workers have demonstrated that the synthesis of ispinesib can be shortened from six to four steps with the aid of a variant of the Ugi reaction that uses secondary amines as one of the components.[19] Here we report the design, synthesis and biological evaluation of new and selective KSP inhibitors obtained by a variant of the Ugi reaction in an approach assisted by structure-based computational design.

Results and Discussion

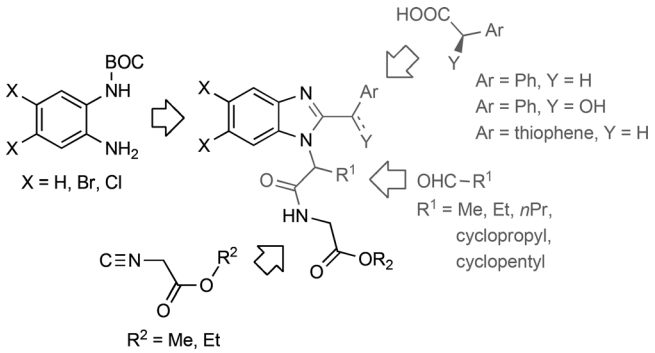
Structure-based drug design

The rational design of antimitotic agents presented here started with a careful structural analysis of the KSP allosteric binding site, including up to 24 crystal structures of KSP–allosteric inhibitor complexes available at the PDB (see the table in the Supporting Information). The allosteric binding site of the KSP is made up of three cavities (Figure 1 A): namely the "western" pocket, consisting essentially of a cavity defined by residues Trp127, Tyr211 and Pro137, the "eastern" pocket, defined as an inner crevice formed by residues Leu160, Phe239 and the backbone of Ala218 in the α-helical segment, and the so-called minor pocket, located on the deep area delimited by Tyr211 and the backbone of Glu215. Taking as a reference the crystallographic structure with PDB ID 2GM1 containing pyrrolotriazine-1[20,21] (Scheme 1 and Figure 1 A), we envisioned the design of new compounds based on a similar planar heterocycle structure as a starting point for our KSP inhibitors program.

A key aspect of a multicomponent-based molecular design process is the possibility to choose the multicomponent reaction that better fits the biological target. In our case, the reaction should enable the construction of a planar heterocycle with appropriate chemical and geometrical complementarities

USC
DE COMPOSTELA

© 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim



Scheme 2. Building blocks selected for the construction of virtual library. Selected U-4C reagents for the generation of suitably functionalized benzimidazoles.

with respect to the KSP allosteric binding site, with potential for further decoration to afford high-affinity ligands. The benzimidazole core was selected as heterocyclic scaffold because it fulfilled these two requirements whilst enabling the construction of a focused virtual chemical library that could be successfully docked to the KSP allosteric binding site (Figure 1 A), thus allowing optimal decoration to be identified through a multicomponent strategy based on the Ugi reaction (Scheme 3, below).

The choice of the appropriate substituents to decorate the benzimidazole scaffold was based on a combination of two criteria: 1) commercial availability of the reactants, and 2) complementarity of the designed compounds with the three cavities that form the binding site of KSP. Thus, a collection of suitable reagents (Scheme 2) commonly used in the Ugi reaction was selected to generate a small virtual library of 90 compounds. Thereafter we conducted a docking exploration of all prospect structures and evaluated their potential fitting into the KSP allosteric site.

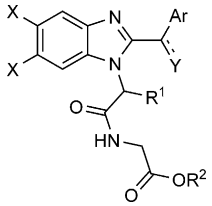
As a result, a small set consisting of the 18 compounds depicted in Table 1 was selected for synthesis and biological evaluation. Figure 1 B shows the proposed common binding mode identified for all 18 compounds, which was found in all cases within the top 10% of scored poses as offered by GOLD. Figure 1 B consistently shows the *S* isomer at the alkylamide chiral center, but no significant differences in the common binding pose were observed in separate docking runs performed with either *R* and *S* isomers (data not shown). A suitable superimposition of the benzimidazole scaffold with pyrrolotriazine-1 (Scheme 1) allows the hydrophobic substituents at Ar, R^1 and R^2 (Scheme 2) to occupy the same pockets, resulting in all cases in good shape complementary with the binding cavity. Notably, a hydrogen bond involving a crystallographic water molecule is consistently formed between the carbonyl oxygen belonging to the ester at R^2 and the backbone of Arg119 (Figure 1), whereas the alkyl chain of the same ester group (R^2) lines the binding crevice of the allosteric site and is partially solvent-exposed. By taking advantage of the presence of a secondary hydroxy group, easily susceptible to oxidation, in compounds **16**–**19**, some prototypes containing a carbonyl function at that position (compounds **20**–**23**) were designed and prepared, by simple oxidation of the alcohol. This change is also associated with a decrease in conformational freedom, which could presumably increase the affinities of the designed compounds.

Chemistry

A general pathway for the synthesis of target compounds **6**–**23** (Table 1) is outlined in Scheme 3. The benzimidazole scaffold was synthesized by means of the highly efficient and versatile Ugi four-component condensation (Ugi-4C reaction) and subsequent Boc removal/cyclization.[22]

A variety of aliphatic aldehydes **1**, halo-substituted *N*-Boc-*ortho*-phenylenediamines[23] **2**, phenylacetic or D-mandelic acid derivatives **3** and the two functionalized isocyanides **4** were employed to perform the Ugi reaction. The obtained Ugi adducts **5** were subsequently treated with TFA/DCE (1:5) to give

Table 1. General structure and yields of described compounds.

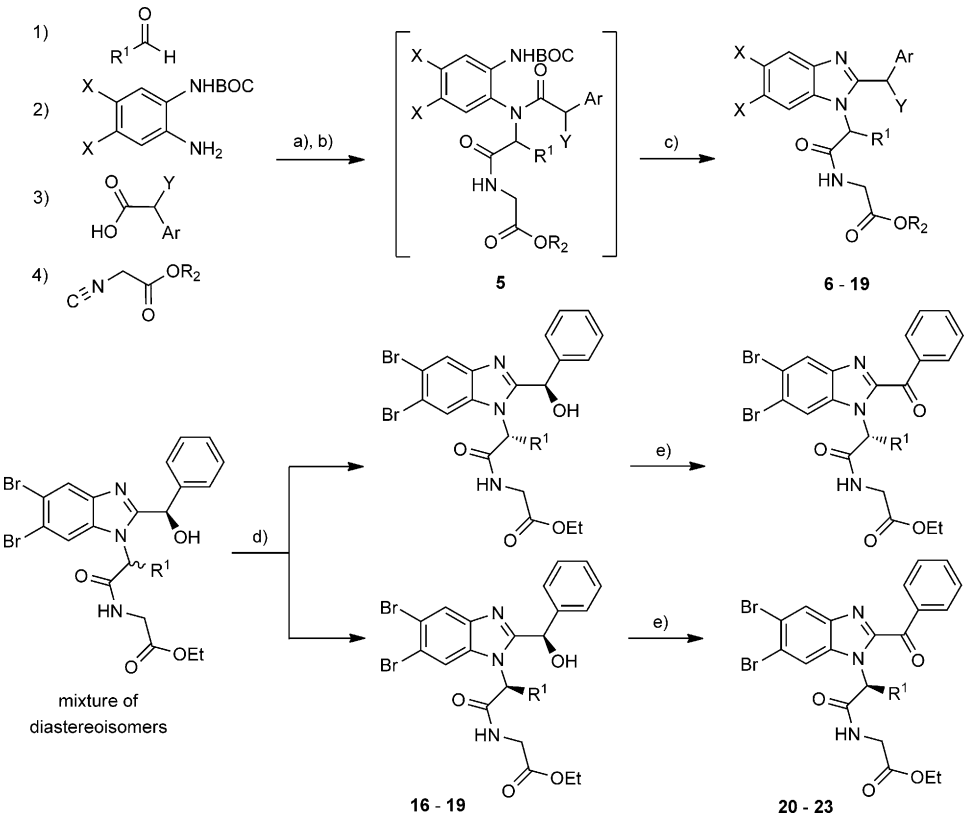


Comp.	X	Y	Ar	R^1	R^2	*t* [h][a,b]	Yield [%]
6	Cl	H	Ph	Et	Me	48[a], 8[b]	42[a,b]
7	Cl	H	Ph	Et	Et	48[a], 16[b]	49[a,b]
8	Cl	H	Ph	propyl	Me	72[a], 120[b]	66[a,b]
9	Cl	H	Ph	propyl	Et	38[a], 120[b]	53[a,b]
10	Br	H	Ph	Et	Me	72[a], 48[b]	46[a,b]
11	Br	H	Ph	Et	Et	72[a], 16[b]	43[a,b]
12	Br	H	Ph	cyclopropyl	Et	72[a], 16[b]	47[a,b]
13	Br	H	thiophen-2-yl	Et	Et	72[a], 6[b]	40[a,b]
14	Br	H	Ph	propyl	Et	72[a], 14[b]	55[a,b]
15	Br	H	Ph	cyclopentyl	Me	72[a], 24[b]	48[a,b]
16	Br	D-OH	Ph	cyclopropyl	Et	72[a], 48[b]	22[a,b]
17	Br	D-OH	Ph	cyclopropyl	Et	72[a], 48[b]	35[a,b]
18	Br	D-OH	Ph	propyl	Et	48[a], 1.5[b]	11[a,b]
19	Br	D-OH	Ph	propyl	Et	48[a], 1.5[b]	24[a,b]
20	Br	O	Ph	cyclopropyl	Et	72[a], 48[b], 1.5[c]	22[a,b], 81[c]
21	Br	O	Ph	cyclopropyl	Et	72[a], 48[b], 1.5[c]	35[a,b], 86[c]
22	Br	O	Ph	propyl	Et	48[a], 1.5[b], 1.5[c]	11[a,b], 92[c]
23	Br	O	Ph	propyl	Et	48[a], 1.5[b], 1.5[c]	24[a,b], 95[c]

[a] Ugi reaction. [b] Cyclization. [c] Oxidation step.

© 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

the targeted benzimidazoles **6**–**19**. A set of 18 substituted benzimidazoles was synthesized (Table 1) with moderate to good yields (overall global yields calculated from the U-4CR and the Boc removal/cyclization). For the synthesis of compounds **20**–**23**, D-mandelic acid was used as the acid component to give the corresponding diastereoisomers **16**–**19**, and these were chromatographically separated and subjected to oxidation with MnO_2 to give the final enantiomers **20**–**23** (Scheme 3).



Scheme 3. Synthetic strategy used to obtain compounds **6**–**23**. a) MeOH, RT, 24–72 h; b) PS-TsOH (1.5 equiv), 1 h, RT; c) TFA/DCE (1:5), 6–24 h; d) separation of diastereoisomers by column chromatography; e) MnO_2 (20 equiv), CH_2Cl_2, 4 h, RT.

Biological activity

In vitro KSP inhibition: Compounds **6**–**23** were evaluated for their in vitro inhibitory activities against KSP by use of a kinesin ATPase endpoint assay.[24] The six most potent inhibitors at 5 μM that preserved cytotoxicity and G_2/M blockage (Table 2) were selected for determination of their concentration-dependent KSP inhibition curves through a KSP kinetic assay[25] and their corresponding IC_{50} values. The results were obtained as means of triplicate assays. The IC_{50} values obtained for the positive control compounds monastrol and STLC were 6.90 and 1.95 μM, respectively, consistently with previous studies.[25,26] Compounds **9**, **12**, **20**, **21**, **22** and **23** strongly inhibited microtubule-activated KSP activity (Table 2), the most potent compounds being **20** and **22**, with IC_{50} values of 1.49 and 1.37 μM, respectively; that is, four times more potent than monastrol and slightly more effective than STLC.

Table 2. In vitro effects of the synthesized benzimidazole compounds. Compounds **6**–**23** were tested for their in vitro activities against KSP (% inhibition of KSP at 5 μM and IC_{50}) and their in-cell culture activities against HeLa cells (cytotoxicity and G_2/M blockage), with use of monastrol and STLC as positive inhibitor controls.

	Compound	KSP inhibition [%] (IC_{50} [μM])	Cytotoxicity EC_{50} [μM]	G_2/M blockage EC_{50} [μM]
1	**6**	53.5%±3	26.43±1.09	43.87±1.05
2	**7**	58.4%±5	22.50±1.18	>50
3	**8**	73.4%±1	22.69±1.12	n.a.*
4	**9**	75.7%±3 (1.60 μM)	15.18±1.11	33.33±5.91
5	**10**	61.3%±2	27.07±1.07	>50
6	**11**	73.0%±2	20.26±1.17	>50
7	**12**	52.8%±7 (2.29 μM)	13.33±1.11	20.91±1.09
8	**13**	41.6%±6	61.90±1.15	>50
9	**14**	77.4%±5	15.83±1.25	n.a.*
10	**15**	71.2%±8	10.50±1.10	n.a.*
11	**16**	49.8%±2	33.65±1.11	n.a.*
12	**17**	26.8%±3	16.65±1.10	n.a.*
13	**18**	48.8%±2	32.65±1.14	n.a.*
14	**19**	28.6%±3	46.65±1.18	n.a.*
15	**20**	91.5%±0.4 (1.49 μM)	3.63±1.25	21.02±1.11
16	**21**	63.4%±10 (2.52 μM)	23.29±1.43	n.a.*
17	**22**	90.2%±1 (1.37 μM)	6.90±1.18	13.67±1.07
18	**23**	50.6%±16 (1.72 μM)	49.8±1.20	n.a.*
19	monastrol	30.8%±5 (6.90 μM)	96.04±2.22	>50
20	STLC	92.9%±4 (1.95 μM)	1.30±1.10	2.12±1.08

n=3. Means ±SEMs. * n.a.=not analyzed.

Antiproliferative effects of benzimidazoles in cell culture: The cytotoxicities against human cancer cell line HeLa were assessed by the in vitro MTT assay. As shown in Table 2, after 72 h of treatment all of the assayed compounds showed antiproliferative effects lying between those of the reference compounds STLC (EC_{50}=1.30 μM) and monastrol (EC_{50}=96.04 μM, Figure 2a). Notably, all of the benzimidazoles reduced cell viability in a time-dependent (24 to

© 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

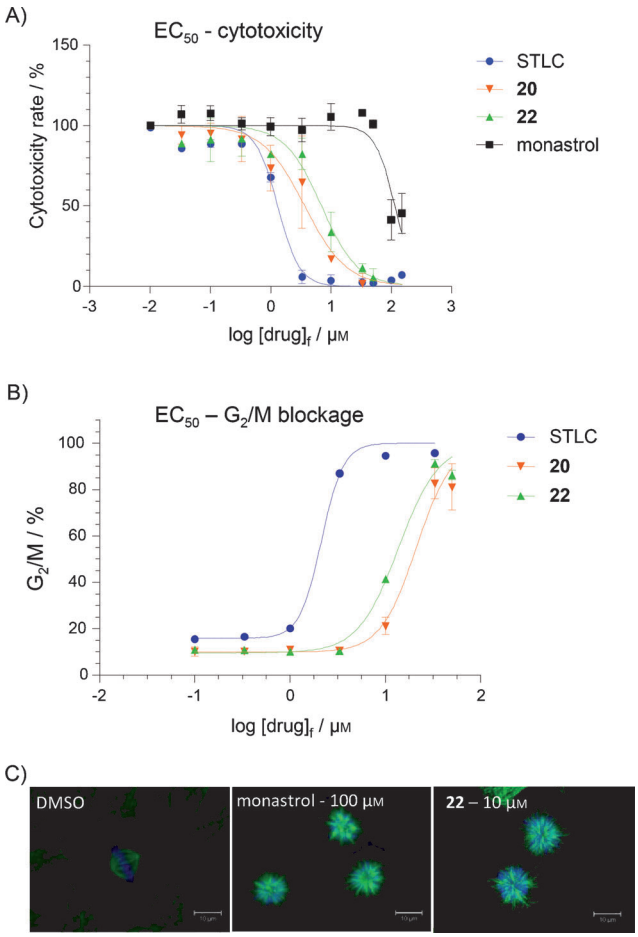


Figure 2. a) Cytotoxicity dose-dependence curves for monastrol, STLC and compounds **20** and **22**. b) G_2/M blockage dose-dependence curves for STLC and compounds **20** and **22**. c) Mitotic phenotype observed in control cells (DMSO, left), cells treated with 100 μM monastrol (middle) or cells treated with 10 μM of compound **22** (right).

72 h) and dose-dependent (1–100 μM) manner (Figure 2A).[20] Compounds **20** and **22** emerged as the most potent in the series, with cytotoxic effects 25 times greater than monastrol and only two times lower than STLC. On the other hand, compound **13** exhibited the weakest antiproliferative activity, although it was slightly more effective than monastrol (Figure 2A and Table 2).

Mitotic blockage: KSP inhibitors induce cell death after specific mitotic blockage. To quantify this effect in this new compound series, we measured G_2/M blockage by flow cytometry. Again, **20** and **22** were the compounds that showed the strongest effects, with EC_{50} values of 21.02 and 13.67 μM, respectively (Figure 2B and Table 2), still five to 10 times less effective than STLC but much better than monastrol. To confirm the specific blockage in mitosis by KSP inhibition, HeLa cells treated with **20** were analyzed by immunofluorescence staining against tubulin and DNA. As shown in Figure 2C, typical monoastral spindles were generated in mitotically blocked cells, thus demonstrating that these benzimidazoles can block the progression of mitosis by inhibition of KSP activity, and consequently cause cell death, in low-micromolar-range treatments.

Structure–activity relationships

The series of 18 compounds synthesized and tested (Tables 1 and 2) were designed to give rise to extensive van der Waals interactions with the different subpockets in KSP, as well as hydrogen bonds (Figure 1). With regard to the first set of interactions, the phenyl ring of the benzimidazole contains two halogen atoms that make contacts with the surface of the eastern pocket. Compounds without halogen atoms at positions 5 and 6 did not show valuable KSP inhibitory activity (data not shown); this thus led to the hypothesis that these halogen atoms might contribute to the inhibitory activity. It is interesting to observe the optimal shape complementarity of the two bromine atoms in the ring (X substituents) with the inner crevice defined by residues Leu160, Phe239 and the backbone of Ala218 in the α-helical segment. The importance of these interactions is demonstrated well by the better inhibitory effects observed for bromine-bearing versus chlorine-bearing compounds (e.g., **6** vs. **10** and **7** vs. **11**), which we also found to be dependent on the length of the side chain R^1 (i.e., equal activity of **9** and **14**). The alkyl substituent R^1 makes hydrophobic contacts with the minor pocket (Tyr211 and the backbone of Glu215), with an observed tolerance, both in the activity values and in the docking models, for chains of between two and five carbon atoms. When a benzyl residue attached to benzimidazole is present, as in most of the synthesized compounds, the western pocket is consistently occupied by this residue (Table 1). The bioisosteric replacement by a thiophene group, in contrast, decreases ATPase activity by half, whereas cytotoxicity decreases three times (Table 2, compounds **11** and **13**, entries 6 and 8). A significant improvement in the biological activity was achieved with the inclusion of a carbonyl group at position 2 (Table 1, substituent Y, compounds **20**–**23**). The predicted consequence for the bioactive conformations of these compounds is the presence of an intramolecular hydrogen bond between this carbonyl group and the NH moiety of the external carboxamide group; this probably explains the greater potencies of compounds **20**–**23** in terms of an increase in the conformational rigidity in these compounds.

The stereochemistry is also revealed as an important issue with regard to KSP inhibition in these series. This can be observed by direct comparison of the pairs of enantiomers **20**–**21** and **22**–**23** (Table 2). Although we were able to isolate the two stereoisomers of each structure, we could not assign the *R*,*S* configuration corresponding to each stereoisomer. A detailed view of the proposed protein–ligand interactions is provided for the pair **20** and **21** (Figure 3). Optimal packing of the benzyl ring is achieved within the hydrophobic binding pocket defined by Trp127, Tyr211 and Pro137; this might be favored by the intramolecular hydrogen bond of the carbonyl linker with the NH of the amide discussed below in the case of the *S* enantiomer. The differences in ATPase inhibitory activity are not large, although the dextrorotatory isomers consistently show slightly stronger inhibition; according to our model these would correspond with the *S* enantiomers. These differences, however, are much amplified when the cellular activities of the two pairs are compared: in terms of cytotoxicity, **20** is

© 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

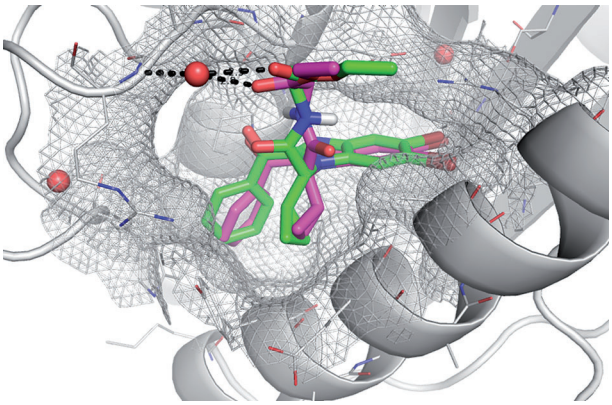


Figure 3. Detailed binding modes of *S* (magenta) and *R* (green) enantiomers corresponding to the pair of compounds **20** and **21**. Hydrogen bonds are indicated with dashed lines.

about six times more potent than its enantiomer **21**, whereas **22** is about seven times more potent than its enantiomer **23**. With regard to mitotic arrest, only **20** and **22** show G_2/M blockage (Table 2, Entries 15 and 17), whereas **21** and **23** show no such blockage (entries 16 and 18). Further assignment of enantiomeric configurations should provide more clues for the hit-to-lead process in these series.

Conclusion

In silico design was followed by the synthesis of a series of molecules devoted to inhibition of Eg5 KSP by mean of the multicomponent U-4CR reaction. The pharmacological results demonstrate the efficiency of such a multidisciplinary approach: with the synthesis of only 18 compounds, we obtained compounds with KSP-Eg5 inhibitory activities much higher than that of the reference compound monastrol and comparable with that of STLC. In particular, compounds **20** and **22** are promising hits for the development of a hit-to-lead program based on multicomponent reactions, currently being undertaken in our labs with the goal of obtaining highly potent KSP inhibitors that could be used to treat tumors that display resistance to current chemotherapeutic treatments.

Experimental Section

Computational details: Molecular dockings were performed with GOLD v5 software[28] with the following parameters, which were tested in a re-docking experiment with the inhibitor co-crystallized with KSP (PDB ID: 2GM1[21] used for docking reported here). All ligands were prepared by use of the LigPrep program in the Schrödinger suite,[29] which allows the protonation of the compounds and generation of all possible diastereoisomers and outputs a minimized 3D structure in each case. Protein preparation was performed with Hermes (GOLD graphical interface), including hydrogen addition and accepting default charge state for titratable residues. Three water molecules close to the ligand were kept and treated by default "spinning" options, in addition to the ADP molecule and the two Mg^{2+} ions (see Figure 1 A). The search space was defined as the surface within 6 Å of the co-crystallized ligand, ensuring a proper search grid in the binding site of the receptor. Twenty genetic algorithm runs were performed for each ligand, with use of ChemScore-kinase as the scoring function. Solutions were clustered with a 2 Å RMSD tolerance, and the best scored pose within a given cluster was selected as a representative solution, provided that it was at least within the three best-ranked compounds.

Chemistry

General: Commercially available starting materials and reagents were purchased and used without further purification, from freshly opened containers. Polystyrene-supported *p*-toluenesulfonic acid (PS-*p*-TsOH) was purchased from Aldrich. All solvents were purified and dried by standard methods. Organic extracts were dried with anhydrous Na_2SO_4. The reactions were monitored by TLC with Merck silica gel strips (GF 254, 2.5 mm); purified compounds each showed a single spot. Unless stated otherwise, UV light and/or iodine vapor were used for the detection of compounds. The synthesis and purification of all compounds were accomplished with equipment routinely available in organic chemistry laboratories for parallel synthesis. Most of the preparative experiments were performed in coated Kimble vials with a PLS (6×4) Organic Synthesizer and orbital stirring. Purification of isolated products was carried out by column chromatography or with an ISCO Combiflash system that employs prepacked silica gel columns. Specific optical rotations for compounds **20**, **21**, **22** and **23** were determined with a Jasco P-2000 apparatus. Compounds were routinely characterized by spectroscopy and elemental analysis. Melting points were determined with a Gallenkamp melting point apparatus and are uncorrected. The NMR spectra were recorded on AM 300 MHz (^{1}H) and XM 500 75 MHz (^{13}C) spectrometers (Bruker). Chemical shifts are given as δ values against tetramethylsilane as internal standard, and *J* values are given in Hz. Mass spectra were obtained with a Varian MAT-711 instrument. High-resolution mass spectra (HRMS) were obtained with an Autospec Micromass spectrometer.

*General procedure to obtain compounds **6**–**19***: The appropriate mono-Boc-protected *ortho*-phenylenediamine analogue **2** (0.5 mmol) in methanol (1 mL), molecular sieves (4 Å) and the appropriate aldehyde **1** (1 mmol) were placed in that order in a 7 mL Kimble vial. The mixture was allowed to stir at room temperature overnight. Then, the appropriate acidic component **3** (0.5 mmol), methanol (1 mL) and the appropriate isocyanide **4** (0.5 mmol) were added, and the mixture was left stirring at room temperature with monitoring of the reaction by thin-layer chromatography (TLC) until total consumption of the starting products (24–72 h). After the Ugi adduct formation, dichloromethane (4 mL) and PS-TsOH resin (1.5 mmol) were added to the vial, and the reaction mixture was allowed to stir for one hour at room temperature. Once that time had elapsed, the resin was filtered in a Manifold-Visiprep filtration system, with washing alternately and three times each with methanol (4 mL) and dichloromethane (8 mL). The filtrate was collected in a round-bottomed flask, and the solvent was evaporated to dryness to give the appropriate intermediate **5** as a pale colorless oil or a white solid.

This crude Ugi adduct (without any prior purification) was dissolved in 1,2-dichloroethane (DCE, 5 mL). DCE/trifluoroacetic acid (5:1, 12 equiv TFA) was then added, and the mixture was allowed to stir at room temperature for a minimum of 6 h to afford the cyclized product, with monitoring of reaction progress by TLC. After the reaction, the mixture was converted to basic pH by addition of a saturated solution of potassium carbonate. The product was extracted three times, the first fraction being obtained from

© 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

CH_2Cl_2, and the next two by washing the aqueous phase with ethyl acetate (20 mL×2). The organic phases were pooled, dried with sodium sulfate, filtered and concentrated to dryness. The final solid or oily residue was purified by column chromatography with hexane/ethyl acetate to give compounds **6**–**19**.

*General procedure to obtain compounds **20** and **21** starting from diastereoisomers **16** and **17** (the same procedure applies to compounds **22** and **23**, starting from diastereoisomers **18** and **19**)*: The diastereoisomer pairs **16**–**17** and **18**–**19** were separated by column chromatography, thus providing four diastereoisomers as pure compounds. Each stereoisomer (compounds **16** and **17**, 0.5 mmol) was dissolved in dichloromethane (8 mL), MnO_2 (10 mmol) was added, and the mixture was stirred at room temperature for 1–4 h. After the reaction, the mixture was filtered with a Visiprep filtration system and the filtrate was concentrated to dryness (rotary evaporator) to give the two final enantiomers (**16** gave **20**; **17** gave **21**). Purification by column chromatography (AcOEt/hexane 1:2) gave the final compounds.

*Characterization data for compounds **6**–**23***

*Methyl 2-[2-(2-benzyl-5,6-dichloro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)butanamido]acetate (**6**)*: M.p. 180–182 °C (AcOEt/hexane 1:1); ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 7.84 (s, 1H), 7.76 (s, 1H), 7.36–7.25 (m, 5H), 4.99 (brs, 1H), 4.67–4.60 (m, 1H), 4.48 (d, J = 16.1 Hz, 1H), 4.17 (d, J = 16.1 Hz, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.62 (brs, 2H), 2.31–2.03 (m, 2H), 0.62 ppm (t, J = 7.3 Hz, 3H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ = 169.0, 167.7, 155.5, 142.2, 135.6, 132.6, 129.4, 128.6, 127.6, 127.0, 126.9, 120.8, 113.4, 60.6, 52.3, 41.2, 35.0, 22.7, 10.3 ppm; HRMS (ESI-FIA-TOF): *m/z* calcd for $C_{21}H_{22}Cl_2N_3O_3$: 434.1033 $[M+H]^+$; found: 434.1029.

*Ethyl 2-[2-(2-benzyl-5,6-dichloro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)butanamido]acetate (**7**)*: M.p. 178–180 °C (AcOEt/hexane 1:1); ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 7.76 (s, 1H), 7.55 (s, 1H), 7.31–7.16 (m, 5H), 5.09 (brs, 1H), 4.58 (dd, J = 5.6, 4.6 Hz, 1H), 4.40 (d, J = 16.1 Hz, 1H), 4.13 (d, J = 16.1 Hz, 1H), 4.03 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 3.57 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.29–2.17 (m, 1H), 2.06–1.90 (m, 1H), 1.10 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 0.62 ppm (t, J = 7.3 Hz, 3H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ = 168.5, 167.6, 155.5, 142.2, 135.6, 132.6, 129.4, 128.6, 127.6, 127.1, 126.9, 120.8, 113.5, 61.5, 60.7, 41.3, 35.0, 22.7, 13.9, 10.3 ppm; HRMS (ESI-FIA-TOF): *m/z* calcd for $C_{22}H_{24}Cl_2N_3O_3$: 448.1189 $[M+H]^+$; found: 448.1184.

*Methyl 2-[2-(2-benzyl-5,6-dichloro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)pentanamido]acetate (**8**)*: M.p. 171–173 °C (AcOEt/hexane 1:1.5); ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 7.79 (s, 1H), 7.60 (s, 1H), 7.35–7.10 (m, 5H), 5.22 (brs, 1H), 4.58 (dd, J = 5.3, 4.7 Hz, 1H), 4.45 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 4.13 (d, J = 15.6 Hz, 1H), 3.62 (s, 3H), 3.57 (t, J = 6.0 Hz, 2H), 2.27–2.19 (m, 1H), 2.03–1.82 (m, 1H), 1.12–1.01 (m, 2H). 0.81 ppm (t, J = 5.2 Hz, 3H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ = 169.1, 167.8, 155.3, 142.1, 135.5, 132.7, 129.4, 128.5, 127.6, 127.0, 126.8, 120.7, 113.4, 59.1, 52.3, 41.2, 34.9, 31.4, 19.3, 13.5 ppm; HRMS (ESI-FIA-TOF): *m/z* calcd for $C_{22}H_{24}Cl_2N_3O_3$: 448.1189 $[M+H]^+$; found: 448.1196.

*Ethyl 2-[2-(2-benzyl-5,6-dichloro-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)pentanamido]acetate* (**9**): M.p. 161–163 °C (AcOEt/hexane 1:1.5); ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 7.83 (s, 1H), 7.62 (s, 1H), 7.35–7.30 (m, 2H), 7.26–7.22 (m, 3H), 4.95 (brs, 1H), 4.71 (dd, J = 5.6 Hz, 4.3 Hz, 1H), 4.48 (dd, J = 15.8 Hz, 1H), 4.19 (d, J = 15.8 Hz, 1H), 3.63 (t, J = 5.3 Hz, 2H), 4.05 (m, 2H), 2.26–2.18 (m, 1H), 2.16–2.00 (m, 1H), 1.14 (t, J = 5.9 Hz, 3H), 1.10–0.86 (m, 2H), 0.82 ppm (t, J = 5.3 Hz, 3H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ = 168.6, 167.7, 155.3, 142.2, 135.6, 132.8, 129.4, 128.5, 127.6, 127.0, 126.8, 120.8, 113.4, 61.5, 59.2, 41.3, 35.0, 31.5, 19.3, 13.9, 13.5 ppm; HRMS (ESI-FIA-TOF): *m/z* calcd for $C_{23}H_{26}Cl_2N_3O_3$: 462.1351 $[M+H]^+$; found: 462.1349.

*Methyl 2-[2-(2-benzyl-5,6-dibromo-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)butanamido]acetate (**10**)*: M.p. 187–188 °C (AcOEt/hexane 1:1.5); ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 8.03 (s, 1H), 7.78 (s, 1H), 7.36–7.25 (m, 5H), 4.99 (brs, 1H), 4.65–4.60 (m, 1H), 4.48 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 4.18 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 3.63 (s, 3H), 3.62 (t, J = 5.8 Hz, 2H), 2.31–2.03 (m, 2H), 0.63 ppm (t, J = 7.3 Hz, 3H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ = 194.5, 186.5, 169.0, 167.7, 155.4, 143.1, 135.5, 129.4, 128.6, 127.6, 124.0, 118.4, 116.5, 60.5, 41.1, 41.0, 34.9, 22.7, 10.3 ppm; HRMS (ESI-FIA-TOF): *m/z* calcd for $C_{21}H_{22}Br_2N_3O_3$: 522.0022 $[M+H]^+$; found: 522.0016.

*Ethyl 2-[2-(2-benzyl-5,6-dibromo-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)butanamido]acetate (**11**)*: M.p. 193–194 °C (AcOEt/hexane 1:1.5); ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 7.99 (s, 1H), 7.79 (s, 1H), 7.35–7.22 (m, 5H), 5.26 (brs, 1H), 4.67–4.62 (m, 1H), 4.43 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 4.18 (d, J = 16.4 Hz, 1H), 3.62 (q, J = 7.3 Hz, 2H), 3.67–3.62 (m, 2H), 2.28–2.05 (m, 2H), 1.17 (t, J = 7.4 Hz, 3H), 0.59 ppm (t, J = 7.3 Hz, 3H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ = 168.6, 167.7, 155.4, 143.2, 135.5, 133.6, 129.4, 128.6, 127.6, 124.1, 118.4, 118.1, 116.5, 61.5, 60.7, 41.3, 34.9, 22.7, 14.0, 10.3 ppm; HRMS (ESI-FIA-TOF): *m/z* calcd for $C_{22}H_{24}Br_2N_3O_3$: 536.0179 $[M+H]^+$; found: 536.0164.

*Ethyl 2-[2-(2-benzyl-5,6-dibromo-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)-2-cyclopropylacetamido]acetate (**12**)*: M.p. 160–163 °C (AcOEt/hexane 1:1.5); ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 8.07 (s, 1H), 7.82 (s, 1H), 7.34–7.19 (m, 5H), 6.05 (brs, 1H), 4.31 (d, J = 4.0 Hz, 1H), 4.22–4.15 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 4.03 (d, J = 10.2 Hz, 1H), 3.98–3.46 (m, 3H), 1.74–1.68 (m, 1H), 1.26 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 0.93–0.87 (m, 1H), 0.41–0.39 ppm (m, 2H), −0.59 to −0.50 (m, 1H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ = 168.5, 167.2, 154.8, 140.9, 135.0, 133.8, 129.3, 128.5, 127.7, 123.2, 118.9, 118.6, 116.7, 64.2, 61.7, 41.5, 34.1, 14.0, 11.9, 6.7, 3.4 ppm; HRMS (ESI-FIA-TOF): *m/z* calcd for $C_{23}H_{24}Br_2N_3O_3$: 548.0179 $[M+H]^+$; found: 548.0174.

*Ethyl 2-{2-[5,6-dibromo-2-(thiophen-2-ylmethyl)-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl]butanamido}acetate* (**13**): M.p. 185–187 °C (AcOEt/hexane 1:1); ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 8.04 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.21 (t, J = 3.1 Hz, 1H), 7.21 (dd, J = 3.1, 1.4 Hz, 2H), 5.40 (brs, 1H), 4.77 (q J = 16.5 Hz, 1H), 4.60 (d J = 16.5 Hz, 1H), 4.43 (q, J = 16.5 Hz, 1H), 4.13 (q, J = 7.3 Hz, 1H), 3.76 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 2.40–2.16 (m, 1H), 2.13–2.04 (m, 2H), 1.19 (t, J = 7.3 Hz, 3H), 0.68 ppm (t, J = 7.3 Hz, 3H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ = 168.7, 167.7, 154.6, 142.8, 137.5, 133.5, 127.5, 126.7, 125.6, 124.2, 118.7, 118.4, 116.6, 61.6, 60.7, 41.5, 29.3, 22.9, 14.0, 10.3 ppm; HRMS (ESI-FIA-TOF): *m/z* calcd for $C_{20}H_{22}Br_2N_3O_3S$: 541.9743 $[M+H]^+$; found: 541.9730.

*Ethyl 2-[2-(2-benzyl-5,6-dibromo-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)pentanamido]acetate (**14**)*: M.p. 182–184 °C (AcOEt/hexane 1:1); ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 8.02 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.36–7.24 (m, 5H), 4.98 (brs, 1H), 4.72 (dd, J = 5.5, 4.4 Hz, 1H), 4.58 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 4.16 (d, J = 16.0 Hz, 1H), 4.09 (q, J = 7.1 Hz, 2H), 3.61 (dd, J = 5.5, 4.4 Hz, 2H), 2.27–2.17 (m, 1H), 2.06–1.93 (m, 1H), 1.17 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 1.25–1.02 (m, 1H), 0.99–0.80 (m, 1H), 0.78 ppm (t, J = 7.1 Hz, 3H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ = 168.6, 167.7, 155.2, 143.2, 135.5, 133.7, 129.4, 128.5, 127.6, 124.1, 118.4, 118.1, 116.5, 61.5, 59.2, 41.3, 35.0, 31.5, 19.3, 14.0, 13.5 ppm; HRMS (ESI-FIA-TOF): *m/z* calcd for $C_{23}H_{26}Br_2N_3O_3$: 550.0335 $[M+H]^+$; found: 550.0333.

*Methyl 2-[2-(2-benzyl-5,6-dibromo-1*H*-benzo[*d*]imidazol-1-yl)-2-cyclopentylacetamimido]acetate (**15**)*: M.p. 172–174 °C (AcOEt/hexane 1:1); ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ = 8.02 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.36–7.24 (m, 5H), 5.08 (brs, 1H), 4.70 (dd, J = 5.5, 4.4 Hz, 1H), 4.46 (d,

© 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

J=15.5 Hz, 1H), 4.16 (d, J=15.5 Hz, 1H), 4.09 (q, J=7.1 Hz, 2H), 3.63 (s, 3H), 2.29–2.20 (m, 1H), 2.05–1.97 (m, 1H), 1.26–1.15 (m, 3H), 1.12–0.96 (m, 1H), 0.83–0.74 ppm (m, 3H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ=168.7, 167.9, 155.3, 143.1, 135.4, 133.6, 129.3, 128.5, 127.5, 123.9, 118.4, 118.1, 116.5, 61.5, 59.4, 41.3, 34.8, 29.2, 28.1, 22.1, 14.0, 13.7 ppm; HRMS (ESI-FIA-TOF): m/z calcd for $C_{24}H_{28}Br_2N_3O_3$: 564.0492 $[M+H]^+$; found: 564.0477.

*Ethyl 2-(2-cyclopropyl-2-{5,6-dibromo-2-[(R)-hydroxy(phenyl)methyl]-1H-benzo[d]imidazol-1-yl}acetamido)acetate—first diastereoisomer (**16**)*: M.p. 179–182 °C (AcOEt/hexane 1:1.5); ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ=7.94 (s, 1H), 7.83 (s, 1H), 7.40–7.35 (m, 5H), 6.28 (s, 1H), 6.08 (brs, 1H), 6.02 (brs, 1H), 4.32 (d, J=10.4 Hz, 1H), 4.12 (q, J=7.1 Hz, 2H), 3.94–3.80 (m, 2H), 1.90–1.75 (m, 1H), 1.32–1.26 (m, 1H), 1.22 (t, J=7.1 Hz, 3H), 0.90–0.80 (m, 1H), 0.78–0.60 (m, 1H), 0.45–0.25 ppm (m, 1H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ=169.7, 167.8, 155.9, 142.0, 139.2, 134.5, 128.8, 128.2, 126.1, 124.9, 123.8, 118.9, 118.0, 117.6, 70.0, 63.3, 61.7, 41.5, 14.0, 10.4, 6.3, 2.1 ppm; HRMS (ESI-FIA-TOF): m/z calcd for $C_{23}H_{24}Br_2N_3O_4$: 564.0128 $[M+H]^+$; found: 564.0114.

*Ethyl 2-(2-cyclopropyl-2-{5,6-dibromo-2-[(R)-hydroxy(phenyl)methyl]-1H-benzo[d]imidazol-1-yl}acetamido)acetate—second diastereoisomer (**17**)*: M.p. 86–88 °C (AcOEt/hexane 1:1.5); ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ=7.91 (s, 1H), 7.88 (s, 1H), 7.45–7.39 (m, 5H), 6.18 (s, 1H), 5.86 (brs, 1H), 5.10 (brs, 1H), 4.24 (d, J=9.9 Hz, 1H), 4.15 (q, J=7.1 Hz, 2H), 3.87 (dd, J=5.5 Hz, J=12.6 Hz, 1H), 3.64 (dd, J=4.4 Hz, J=13.7 Hz, 1H), 1.78–1.72 (m, 1H), 1.34–1.28 (m, 1H), 1.22 (t, J=7.1 Hz, 3H), 0.90–0.81 (m, 1H), 0.45–0.32 ppm (m, 2H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ=169.4, 167.6, 156.4, 141.8, 139.4, 134.7, 129.0, 128.4, 126.3, 123.7, 118.9, 118.0, 117.3, 69.8, 63.8, 61.6, 41.3, 14.0, 12.0, 6.6, 3.2 ppm; HRMS (ESI-FIA-TOF): m/z calcd for $C_{23}H_{24}Br_2N_3O_4$: 564.0128 $[M+H]^+$; found: 564.0114.

*Ethyl 2-(2-{5,6-dibromo-2-[(R)-hydroxy(phenyl)methyl]-1H-benzo[d]-imidazol-1-yl}pentanamido)acetate—first diastereoisomer (**18**)*: M.p. 151–153 °C (AcOEt/hexane 1:1); ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ=7.94 (s, 1H), 7.77 (s, 1H), 7.37–7.20 (m, 6H), 6.34 (s, 1H), 6.24 (brs, 1H), 4.94 (q, J=2.7 Hz, 1H), 4.07 (q, J=7.1 Hz, 2H), 3.93–3.75 (m, 2H), 2.26–2.14 (m, 1H), 1.32–1.26 (m, 1H), 1.16 (t, J=7.1 Hz, 3H), 0.87–0.62 (m, 1H), 0.51 (t, J=6.3 Hz, 3H), 0.47–0.43 ppm (m, 1H,); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ=169.6, 167.6, 156.2, 141.9, 138.8, 134.1, 128.8, 128.2, 126.1, 123.5, 119.0, 118.2, 117.7, 70.1, 61.6, 58.8, 41.4, 30.7, 18.9, 13.9, 13.3 ppm; HRMS (EI): m/z calcd for $C_{23}H_{25}Br_2N_3O_4$: 565.0012 $[M]^+$; found: 565.0204.

*Ethyl 2-(2-{5,6-dibromo-2-[(R)-hydroxy(phenyl)methyl]-1H-benzo[d]-imidazol-1-yl}pentanamido)acetate—second diastereoisomer (**19**)*: Oil (AcOEt/hexane 1:1.5); ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ=7.87 (s, 1H), 7.66 (s, 1H), 7.42–7.28 (m, 6H), 6.36 (s, 1H), 5.94–5.88 (brs, 1H), 5.01 (t, J=7.4 Hz, 1H), 4.07 (q, J=7.2 Hz, 2H), 3.93–3.83 (m, 1H), 3.57–3.49 (m, 2H), 2.22–2.15 (m, 1H), 1.75–1.76 (m, 1H), 1.28–1.20 (m, 1H), 1.18 (t, J=7.2 Hz, 3H), 0.73 ppm (t, J=3.9 Hz, 3H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ=169.5, 167.9, 156.8, 141.7, 139.3, 134.0, 128.4, 128.1, 126.4, 123.3, 119.0, 118.3, 117.4, 69.9, 61.6, 58.9, 41.2, 32.0, 19.3, 14.0, 13.5 ppm; HRMS (EI): m/z calcd for $C_{23}H_{25}Br_2N_3O_4$: 569.0171 $[M]^+$; found: 565.0191.

*(+)-Ethyl 2-[2-(2-benzoyl-5,6-dibromo-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)-2 cyclopropylacetamido]acetate (**20**)*: Oil (AcOEt/hexane 1:1.5); $[\alpha]_D^{25}$= 15.00 (c=0.30, $CHCl_3$); ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ=8.24 (d, J=8.8 Hz, 2H), 8.18 (s, 1H), 8.08 (s, 1H), 7.68 (t, J=7.6 Hz, 1H), 7.53 (t, J=7.6 Hz, 2H), 7.35 (brs, 1H), 4.78 (d, J=9.9 Hz, 1H), 4.18 (q, J=7.0 Hz, 2H), 4.18 (m, 2H), 1.23 (d, J=7.0 Hz, 3H), 1.21–0.96 (m, 1H), 0.94–0.85 (m, 2H), 0.67–0.52 (m, 1H), 0.31–0.30 ppm (m, 1H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ=186.9, 173.8, 169.2, 167.5, 135.9, 134.6, 134.5, 131.4, 128.6, 126.2, 121.7, 119.5, 117.4, 114.7, 108.2, 65.0, 61.7, 41.7, 14.0, 12.0, 6.6, 3.6 ppm; HRMS (ESI-FIA-TOF): m/z calcd for $C_{23}H_{22}Br_2N_3O_4$: 561.9972 $[M+H]^+$; found: 561.9950; elemental analysis calcd (%): C 49.05, H 3.76, Br 28.37, N 7.46, O 11.36; found: C 49.04, H 3.75, Br 28.35, N 7.49, O 11.37.

*(−)-Ethyl 2-[2-(2-benzoyl-5,6-dibromo-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)-2 cyclopropylacetamido]acetate (**21**)*: M.p. 82–84 °C (AcOEt/hexane 1:1); $[\alpha]_D^{25}$=−22.28 (c=0.14, $CHCl_3$); ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ=8.27–8.24 (m, 2H), 8.19 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 7.71–7.66 (m, 1H), 7.54 (t, J=7.3 Hz, 2H), 7.34 (brs, 1H), 4.78 (d J=9.9 Hz, 1H), 4.23–4.01 (m, 4H), 1.24 (t, J=7.1 Hz, 3H), 0.99–0.85 (m, 2H), 0.67–0.55 (m, 2H), 0.32–0.29 ppm (m, 1H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ=186.9, 169.2, 167.5, 148.1, 142.2, 135.9, 135.0, 134.4, 131.4, 128.6, 126.2, 121.7, 119.5, 117.4, 65.0, 61.7, 41.7, 14.0, 11.99, 6.6, 3.6 ppm; HRMS (EI): m/z calcd for $C_{23}H_{21}Br_2N_3O_4$ $[M]^+$: 560.9899; found: 560.9908; elemental analysis calcd (%): C 49.05, H 3.76, Br 28.37, N 7.46, O 11.36; found: C 49.02, H 3.76, Br 28.34, N 7.50, O 11.40.

*(+)-Ethyl 2-[2-(2-benzoyl-5,6-dibromo-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)pentanamido]acetate (**22**)*: M.p. 69–73 °C (AcOEt/hexane 1:1); $[\alpha]_D^{25}$= 65.19 (c=0.17, $CHCl_3$); ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ=8.27–8.22 (m, 2H), 8.15 (d, J=1.1 Hz, 1H), 8.09 (d, J=2.2 Hz, 1H), 7.72–7.67 (m, 1H), 7.58–7.52 (m, 2H), 7.46–7.42 (t, J=5.5 Hz, 1H), 5.56 (dd, J=7.0 Hz, J=1.6 Hz, 1H), 4.16 (q, J=7.1 Hz, 2H), 4.04–3.93 (m, 2H), 2.22–2.17 (m, 2H), 1.19 (t, J=7.1 Hz, 3H), 1.15–0.90 (m, 2H), 0.78 ppm (t, J=7.1 Hz, 3H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ=186.7, 169.0, 167.9, 148.7, 142.2, 135.6, 134.7, 134.1, 131.4, 128.6, 126.0, 121.8, 119.9, 118.2, 61.5, 59.2, 41.6, 30.6, 19.0, 14.0, 13.3 ppm; HRMS (EI): m/z calcd for $C_{23}H_{23}Br_2N_3O_4$: 563.0055 $[M]^+$; found: 279.0067; elemental analysis calcd (%): C 48.87, H 4.10, Br 28.27, N 7.43, O 11.32; found: C 48.86, H 4.10, Br 28.28, N 7.41, O 11.34.

*(−)-Ethyl 2-[2-(2-benzoyl-5,6-dibromo-1H-benzo[d]imidazol-1-yl)pentanamido]acetate (**23**)*: M.p. 96–98 °C (AcOEt/hexane 1:1); $[\alpha]_D^{25}$= −69.65 (c=0.15, $CHCl_3$); ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 300 MHz): δ=8.27 (d, J=8.8 Hz, 2H), 8.16 (d, J=3.8 Hz, 2H), 7.74–7.68 (m, 1H), 7.59–7.54 (m, 2H), 7.41 (t, J=5.0 Hz, 1H), 5.56 (t, J=7.5 Hz, 1H), 4.14 (q, J=7.2 Hz, 2H), 4.08–3.95 (m, 2H), 2.24 (q, J=7.1 Hz, 2H), 1.20 (t, J=7.2 Hz, 3H), 1.10–0.95 (m, 2H), 0.80 ppm (t, J=7.2 Hz, 3H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 75.5 MHz): δ=186.8, 169.0, 167.8, 148.8, 142.3, 135.5, 134.8, 134.2, 131.4, 128.7, 126.2, 121.8, 119.9, 118.2, 61.5, 59.2, 41.6, 30.6, 19.0, 14.0, 13.3 ppm; HRMS (EI): m/z calcd for $C_{23}H_{23}Br_2N_3O_4$: 563.0055 $[M]^+$; found: 279.0037; elemental analysis calcd (%): C 48.87, H 4.10, Br 28.27, N 7.43, O 11.32; found: C 48.86, H 4.12, Br 28.26, N 7.42, O 11.33.

Functional evaluation

Enzyme-linked inorganic phosphate assay: The in vitro KSP inhibitory activities of the compounds at 5 μM were measured by use of a microtubule-activated ATPase end-point assay from Cytoskeleton[24] (Cat. No. BK053). The reaction was carried out in duplicate under the manufacturer's conditions. Briefly, microtubules (2 μg), KSP (EG01, cytoskeleton, 0.4 μg), and inhibitor (5 μM) were placed in wells of 96-well half-area plates (Corning). The reactions were started with the addition of ATP (Sigma, 0.3 mM), incubated for 5 min at room temperature and terminated by the addition of CytoPhos reagent (70 μL). After 10 min of additional incubation at room temperature the plates were read at 650 nm with a Power Wave XS instrument (BioTek). All synthesized compounds, STLC (Calbiochem) and monastrol (Sigma–Aldrich) were dissolved in DMSO. All activities were measured against controls of DMSO at a final concentration of 0.06%.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

© 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

For IC_{50} measurements we used a microtubule-activated ATPase kinetic assay (BK060, Cytoskeleton) with wells of a one-half-area 96-well plate, according to the manufacturer's instructions. Reactions were started by the addition of ATP and were read every 30 s at 360 nm for a total of 20 min. The assay is based on an absorbance shift (330–360 nm) that occurs when 2-amino-6-mercapto-7-methylpurine ribonucleoside (MESG) is catalytically converted into 2-amino-6-mercapto-7-methylpurine in the presence of inorganic phosphate (Pi) and purine nucleoside phosphorylase (PNP).[30] The V_{max} rate was calculated from the eight consecutive absorbance readings with the greatest slope.

Cell culture and cytotoxicity assay: HeLa cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with FBS (10%) and penicillin/streptomycin (5%) under a humidified atmosphere (5% CO_2) at 37 °C. Exponentially growing cells were seeded into 96-well microtiter plates (8000 cells per well) and precultured for 1 day. Cells were treated with different concentrations of compounds to be tested for 24 to 72 h. Medium containing DMSO (5%) was used as negative control. The cytotoxic activity was determined by the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay.[31] The absorbance at 570 nm was determined with a plate reader. Cytotoxicities were expressed as IC_{50} values ($\mu g\,mL^{-1}$), these being the concentration of each compound that reduced the number of viable cell by 50%. In every case the value represents the mean of three independent determinations.

Flow cytometry: To measure the percentages of cells in G2M, 2×10^5 HeLa cells were grown for 24 h and treated with **20**, STLC or monastrol (dissolved in DMSO) at the concentrations indicated (0.1–150 μM) for another 17 h. All compounds were dissolved in DMSO. The final DMSO concentration was 0.06%. Cells were collected by trypsinization, washed with PBS and incubated sequentially by Vindelov's technique in buffer A [Tris·HCl (pH 7.6, 0.5 mM), NP-40 (0.1%, *v/v*), trisodium citrate (3.4 mM), spermine (1.5 mM), trypsin (Sigma–Aldrich, 30 $mg\,mL^{-1}$), 300 μL] for 10 min, in buffer B [Tris·HCl (pH 7.6, 0.5 mM), NP-40 (0.1%, *v/v*), trisodium citrate (3.4 mM), spermine (1.5 mM), trypsin inhibitor (500 $mg\,mL^{-1}$), RNase A (Sigma–Aldrich, 100 $mg\,mL^{-1}$), 250 μL] for 10 min and in buffer C [Tris·HCl (pH 7.6, 0.5 mM), NP-40 (0.1%, *v/v*), trisodium citrate (3.4 mM), spermine (4.83 mM), propidium iodide (416 $mg\,mL^{-1}$), 250 μL] for 10 min. Cell cycle was analyzed with a FACscan flow cytometer (Becton Dickinson). The percentages of cells in G2M were obtained from the histograms with the aid of ModFit LT software (Verity Software House), and values were entered into GraphPad Prism (GraphPad Software) to provide EC_{50} values by a nonlinear regression [log(agonist) vs. response—variable slope].

Immunofluorescence staining: HeLa cells were grown in four wells of adherent chamber slides (Lab-Tek II–CC^2, NUNC) for 24 h and treated with the indicated compounds (dissolved in DMSO) for another 17 h under the same concentration as used for EC_{50} values obtained in G_2/M blockage experiments. After treatment, cells were fixed by the conventional paraformaldehyde/methanol method and fixed with Triton X-100 (0.5%), glycine (20 mM) and NH_4Cl (50 mM; all in PBS) for 10 min. HeLa cells were blocked by incubation in horse serum (2.5%) and Triton X-100 (0.1%) diluted in PBS for 30 min at RT. Afterwards cells were incubated O/N at 4 °C with anti-α-tubulin (Cat. No. CP06, Calbiochem) diluted 1:200 in 0.5% BSA in PBS. Next day, cells were incubated for 1 h at RT in the dark with anti-mouse-Alexa 488 diluted 1:1000 in blocking buffer. Finally, nuclei were stained for 5 min with DAPI (1 $\mu g\,mL^{-1}$) dissolved in PBS. Images were acquired with a confocal microscope (Ultra-Espectral Leica TCS-SP2-AOBS) and processed with the software ImageJ.

Acknowledgements

This work was financially supported by the "Programa Sectorial de Investigacion Aplicada e i+d" of the Galician Government (project: 10CSA234012PR). J. Azuaje thanks the Diputación de la Coruña (Spain) for a post-doctoral position. Work at the IUOPA laboratory was supported by the Spanish Ministry of Science and Technology (MICINN)—Grant SAF2009-07227—and by the Plan Regional de Ciencia y Tecnología del Principado de Asturias (PCTI)—Grant IB09-066. M.A.P. received a fellowship from the PCTI, and B.F. received a fellowship from IUOPA, supported by Obra Social Cajastur. We thank Julian Iglesias for helping with MTT and FACS experiments and Ana Salas for helping with FACS experiments.

Keywords: antitumor agents · drug design · inhibitors · kinesin spindle protein · multicomponent reactions

[1] J. R. Jackson, D. R. Patrick, M. M. Dar, P. S. Huang, *Nat. Rev. Cancer* **2007**, *7*, 107–117.
[2] N. Keen, S. Taylor, *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 927–936.
[3] K. Strebhardt, A. Ullrich, F. N. Authors, A. Ullrich, *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 321–330.
[4] K. W. Wood, W. D. Cornwell, J. R. Jackson, *Curr. Opin. Pharmacol.* **2001**, *1*, 370–377.
[5] A. Blangy, H. A. Lane, P. d'Hérin, M. Harper, M. Kress, E. A. Nigg, *Cell* **1995**, *83*, 1159–1169.
[6] T. U. Mayer, T. M. Kapoor, S. J. Haggarty, R. W. King, S. L. Schreiber, T. J. Mitchison, *Science* **1999**, *286*, 971–974.
[7] H. Y. K. Kaan, V. Ulaganathan, D. D. Hackney, F. Kozielski, *Biochem. J.* **2009**, *425*, 55–60.
[8] E. D. Kim, R. S. Buckley, S. Learman, J. Richard,, C. Parke, D. K. Worthylake, E. J. Wojcik, R. A. Walker, S. Kim, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 18650–18661.
[9] R. Sakowicz, J. T. Finer, C. Beraud, A. Crompton, E. Lewis, A. Fritsch, Y. Lee, J. Mak, R. Moody, R. Turincio, J. C. Chabala, P. Gonzales, S. Roth, S. Weitman, K. W. Wood, *Cancer Res.* **2004**, *64*, 3276–3280.
[10] http://www.cytokinetics.com/press_releases/release/pr_1183058091.
[11] H. Y. K. Kaan, J. Major, K. Tkocz, F. Kozielski, S. S. Rosenfeld, *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 18588–18598.
[12] K. Holen, R. DiPaola, G. Liu, A. R. Tan, G. Wilding, K. Hsu, N. Agrawal, C. Chen, L. Xue, E. Rosenberg, M. Stein, *Invest. New Drugs* **2012**, *30*, 1088–1095.
[13] C. D. Cox, P. J. Coleman, M. J. Breslin, D. B. Whitman, R. M. Garbaccio, M. E. Fraley, C. A. Buser, E. S. Walsh, K. Hamilton, M. D. Schaber, R. B. Lobell, W. Tao, J. P. Davide, R. E. Diehl, M. T. Abrams, V. J. South, H. E. Huber, M. Torrent, T. Prueksaritanont, C. Li, D. E. Slaughter, E. Mahan, C. Fernandez-Metzler, Y. Yan,, L. C. Kuo, N. E. Kohl, G. D. Hartman, *J. Med. Chem.* **2008**, *51*, 4239–4252.
[14] http://www.patentlens.net/patentlens/patents.html?patnums=US_2010_0210670A1&language=&.
[15] a) Z. Guo, C. Zhuang, L. Zhu, Y. Zhang, J. Yao, G. Dong, S. Wang, Y. Liu, H. Chen, C. Sheng, Z. Miao, W. Zhang, *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *56*, 10–16.
[16] D. J. Parks, L. V. Lafrance, R. R. Calvo, K. L. Milkiewicz, V. Gupta, J. Lattanze, K. Ramachandren, T. E. Carver, E. C. Petrella, M. D. Cummings, D. Maguire, B. L. Grasberger, T. Lu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 765–770.
[17] J. Zhu, H. Bienaymé, *Multicomponent Reactions*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005** and references therein.
[18] R. V. A. Orru, E. Ruijeter, *Synthesis of Heterocycles via Multicomponent Reactions I and II*, Springer, Berlin, **2010** and references therein.

© 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

[19] R. Mossetti, T. Pirali, D. Saggiorato, G. C. Tron, *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 6966 – 6968.
[20] a) K. S. Kim, S. Lu, L. A. Cornelius, L. J. Lombardo, R. M. Borzilleri, G. M. Schroeder, C. S. G. Rovnyak, D. Crews, R. J. Schmidt, D. K. Williams, R. S. Bhide, S. C. Traeger, P. A. McDonnell, L. Mueller, S. Sheriff, J. A. Newitt, A. T. Pudzianowski, Z. Yang, R. Wild, F. Y. Lee, R. Batorsky, J. S. Ryder, M. Ortega-Nanos, H. Shen, M. Gottardis, D. L. Roussell, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3937 – 3942.
[21] http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2GM1.
[22] P. Tempest, V. Ma, S. Thomas, Z. Hua, M. G. Kelly, C. Hulme, *Tetrahedron Lett.* **2001**, *42*, 4959 – 4962.
[23] F. Jahani, M. Tajbakhsh, H. Golchoubian, S. Khaksar, *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 1260 – 1264.
[24] C. Joel Funk, A. S. Davis, J. A. Hopkins, K. M. Middleton, *Anal. Biochem.* **2004**, *329*, 68 – 76.
[25] Z. Maliga, T. M. Kapoor, T. J. Mitchison, *Chem. Biol.* **2002**, *9*, 989 – 996.
[26] D. Rodriguez, C. Ramesh, L. H. Henson, L. Wilmeth, B. K. Bryant, S. Kadavakoyu, R. Hirsch, J. Montoya, P. R. Howell, J. M. George, D. Alexander, D. L. Johnson, J. B. Arterburn, C. B. Shuster, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 5446 – 5453.
[27] See the Supporting Information for detailed survival rates.
[28] M. L. Verdonk, J. C. Cole, M. J. Hartshorn, C. W. Murray, R. D. Taylor, *Proteins Struct. Funct. Gen.* **2003**, *52*, 609 – 623.
[29] L. L. C. Schrödinger, New York, NY, **2009**.
[30] M. R. Webb, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 4884 – 4887.
[31] J. M. Jin, Y. J. Zhang, C. R. Yang, *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 5 – 9.

Received: March 12, 2014
Published online on June 18, 2014

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

© 2014 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CHEMBIOCHEM

Supporting Information

© Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 69451 Weinheim, 2014

Structure-Based Design of New KSP-Eg5 Inhibitors Assisted by a Targeted Multicomponent Reaction

Carlos Carbajales,[a] Miguel Ángel Prado,[c] Hugo Gutiérrez-de-Terán,[b] Ángel Cores,[a] Jhonny Azuaje,[a] Silvia Novio,[e] María Jesús Nuñez,[e] Belén Fernández-García,[d] Eddy Sotelo,[a, f] Xerardo García-Mera,[f] Pedro Sánchez-Lazo,[d] Manuel Freire-Garabal,[e] and Alberto Coelho*[a, f]

cbic_201402089_sm_miscellaneous_information.pdf

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

SECTION 1

Structural study of all (24) PDB entries of KSP with any ligand:

PDB	LIGAND
1x88	Monastol
2gm1	2AZ
3ken	S-trityl-L-cysteine
2x2r	(very similar to 3ken)
2xae	(very similar to 3ken)
2g1q	9h
2fl2	19
3k5e	enastrol
2fme	3qc
3k3b	tetrahidro-beta-carboline
2fky	13
2q2y	1
2fl6	6
2q2z	22
1yrs	1(bis)
2ieh	R-mon97
3l9h	EMD534085
2uym	37
2uyi	33
2pg2	15
3cjo	30
2x7c	S-enastrol
2x7e	S-fluorastrol
2x7d	S-dimethylenastrol

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

SECTION 2

Antiproliferative effect of compounds 9, 12, 20,21,22,23 towards HeLa cells as determined by the MTT assay.

	SURVIVAL RATE		
CONCENTRATION (μM)	**24h**	**48h**	**72h**
Comp. 23			
25	91.3 (5.02)	86.4 (4.27)	81.54 (3.36)
50	74.72 (3.81)	51.27 (1.95)	42.63 (5.94)
60	61.29 (3.19)	41.74 (2.86)	36.3 (4.38)
75	39.51 (4.14)	20.92 (5.03)	17.29 (6.42)
100	28.65 (5.06)	10.27 (3.73)	8.02 (3.04)
Comp. 21			
20	71.03 (7.05)	62.21 (7.18)	59.45 (8.04)
22.5	60.44 (6.42)	55.77 (4.16)	48.24 (3.62)
25	50.91 (4.52)	44.82 (6.47)	38.2 (5.2)
40	19.97 (6.71)	11 (5.11)	9.21 (5.37)
50	9.33 (4.27)	7.83 (6.28)	7.01 (5.03)
Comp. 9			
5	95.05 (9.13)	92.17 (6.03)	87.26 (8.27)
10	79.19 (7.27)	73.45 (4.28)	71.2 (6.25)
12.5	67.25 (7.36)	62.23 (7.3)	60.82 (5.37)
15	51.73 (4.26)	49.64 (8.26)	45.28 (7.34)
20	18.4 (6.67)	13.91 (6.31)	11.42 (4.23)
Comp. 12			
2.5	90.11 (8.27)	86.18 (4.04)	78.21 (5.13)
5	73.19 (7.36)	68.63 (5.95)	59.38 (3.27)
10	64.28 (8.21)	54.8 (3)	47.22 (3.36)
15	52.25 (8.31)	46.87 (4.28)	39.77 (3.31)
20	41.81 (5.52)	34.19 (6.61)	31.03 (6.28)
Comp. 22			
2.5	69.98 (4.42)	61.67 (4.46)	57.16 (2.94)
5	59.32 (6.01)	51.57 (7.17)	48.01 (4.02)
10	56.4 (4.27)	48.1 (6.28)	46.93 (7.28)
15	41.04 (5.58)	36.81 (7.37)	34 (7.37)
20	30.02 (2)	24.71 (2.25)	21.42 (5.5)
Comp. 20			
1	79.98 (5.16)	76.49 (4.16)	70.92 (5.15)
2.5	69.44 (5.37)	65.01 (8.38)	58.72 (7.33)
5	44.09 (6.83)	37.28 (7.22)	31.3 (6.01)
10	24.47 (5.16)	18.66 (4.37)	15.01 (8.37)
20	6.82 (7.28)	4.61 (6.81)	2.91 (6.22)
Monastrol			
75	96.62 (4.13)	93.32 (9.15)	92.02 (7.55)
90	83.53 (9.05)	79.52 (9.27)	74.27 (8.43)
95	60.37 (7.16)	51.02 (5.26)	49.31 (4.31)
100	52.44 (7.26)	47.77 (4.57)	46.18 (4.33)
125	48.59 (6.71)	45.26 (5.67)	42.91 (5.73)
STLC			
0.5	11.02 (2.15)	19.83 (3.62)	31.55 (4.61)
1	23.87 (3.06)	36.48 (5.15)	46.14 (5.37)
2	42.13 (5.27)	49.49 (7.02)	53.23 (7.29)
3	50.73 (7.36)	54.61 (5.14)	61.08 (6.46)
4	63.03 (6.78)	68.11 (6.3)	72.47 (4.23)

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Antiproliferative effect of compounds 9, 12, 20,21,22,23 towards HeLa cells as determined by the MTT assay. Cells were treated with benzimidazoles at different concentrations and times (24, 48, and 72 h). Monastrol and STLC were used as positive controls. Growth inhibition was determined by a MTT assay and shown as cytotoxicity rates (%)=[1-(OD of the test samples/OD of the negative control)]x100%. *n*=3. Mean ± SEM.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

SECTION 3

Chemical information: Copies of ^{1}H, ^{13}C NMR, HRM spectras and Specific O.R. of the new compounds

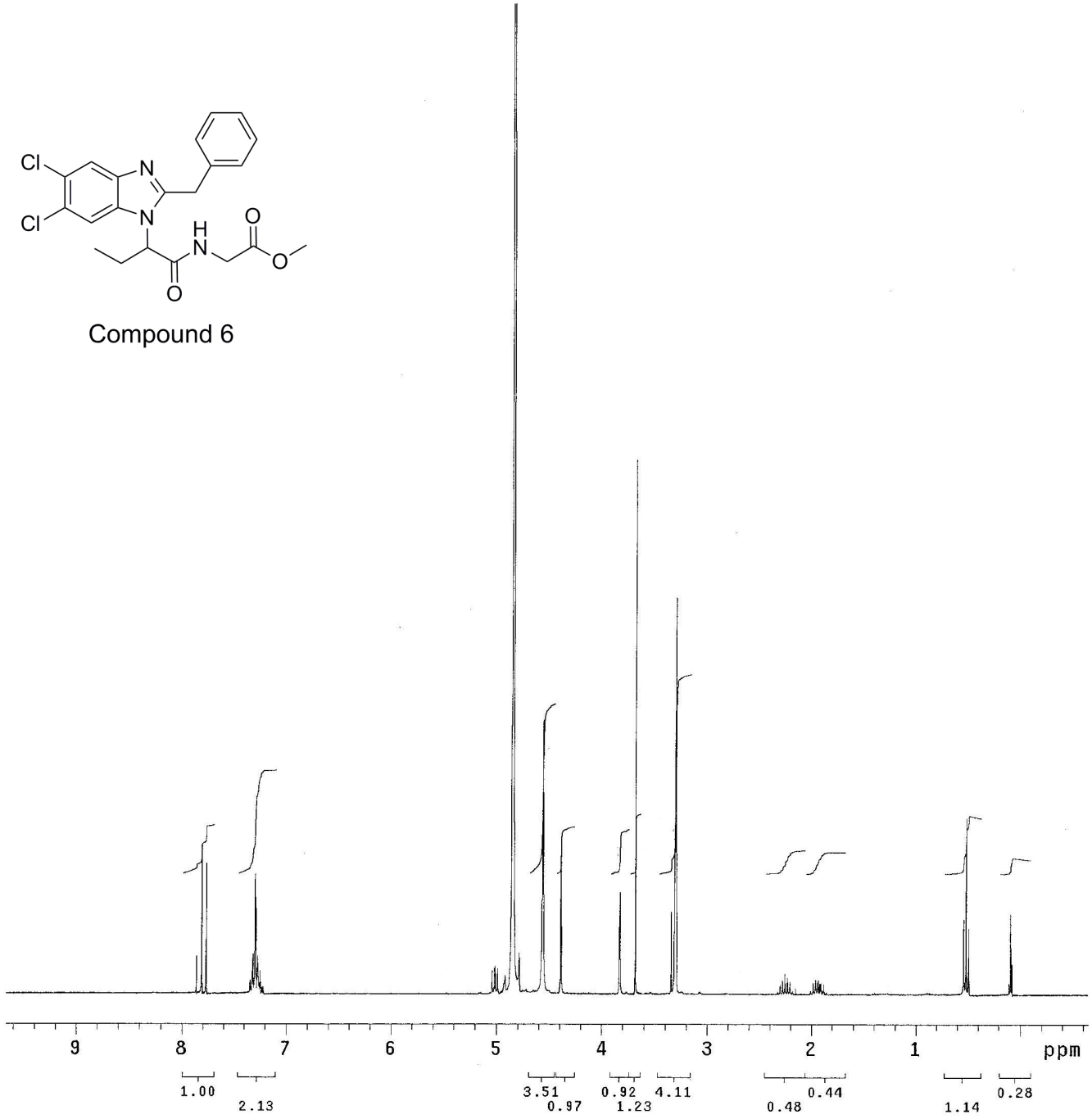
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

sy1ak022

exp1 s2pul

SAMPLE		DEC. & VT	
date	Jan 25 2012	dfrq	75.454
solvent	meod	dn	C13
file	exp	dpwr	37
ACQUISITION		dof	0
sfrq	300.049	dm	nnn
tn	H1	dmm	c
at	1.998	dmf	13900
np	21576	temp	25.0
sw	5399.6	PROCESSING	
fb	3000	wtfile	
bs	1	proc	ft
tpwr	59	fn	not used
pw	4.4		
d1	1.000	werr	
tof	659.7	wexp	
nt	128	wbs	
ct	60	wnt	
alock	n		
gain	not used		
FLAGS			
il	n		
in	n		
dp	y		
DISPLAY			
sp	-194.4		
wp	3095.9		
vs	228		
sc	0		
wc	180		
hzmm	17.20		
is	2436.08		
rfl	599.5		
rfp	0		
th	1		
ins	1.000		
ai cdc ph			

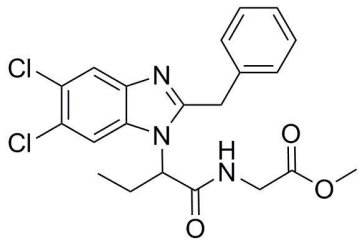
Compound 6



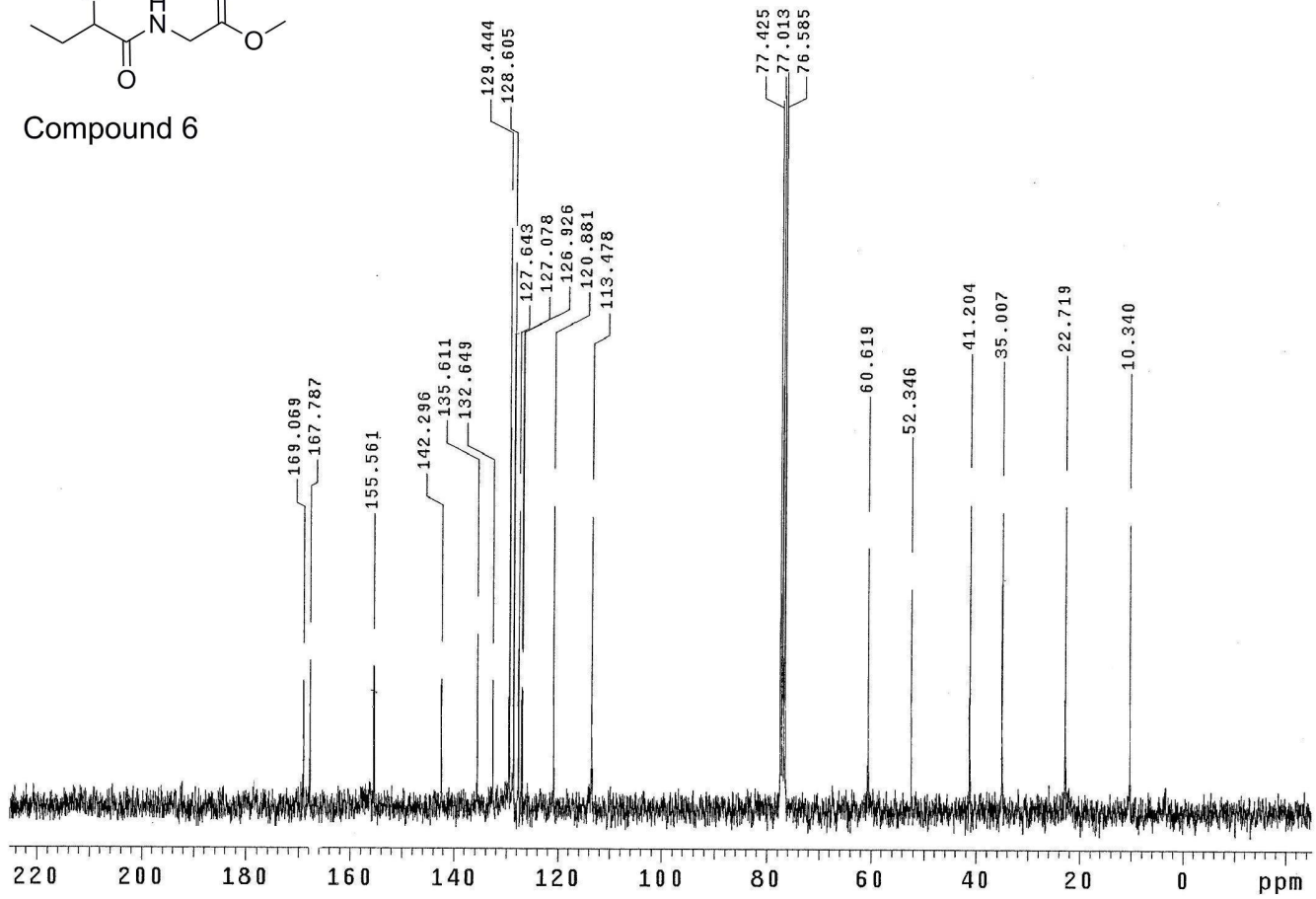
sy1ak022c

exp1 CARBON

SAMPLE		PRESATURATION	
date	May 23 2012	satmode	n
solvent	cdcl3	wet	n
file	exp	SPECIAL	
ACQUISITION		temp	25.0
sw	18867.9	gain	not used
at	0.868	spin	not used
np	32768	hst	0.008
fb	10400	pw90	7.000
bs	2	alfa	10.000
d1	1.000	FLAGS	
nt	2000	il	n
ct	948	in	n
TRANSMITTER		dp	y
tn	C13	hs	nn
sfrq	75.454	PROCESSING	
tof	409.4	lb	2.50
tpwr	57	fn	not used
pw	3.000	DISPLAY	
DECOUPLER		sp	-1888.1
dn	H1	wp	18866.8
dof	0	rfl	1889.3
dm	yyy	rfp	0
decwave	w	rp	124.1
dpwr	37	lp	-268.9
dmf	8100	PLOT	
		wc	180
		sc	0
		vs	713
		th	5
		ai	ph



Compound 6

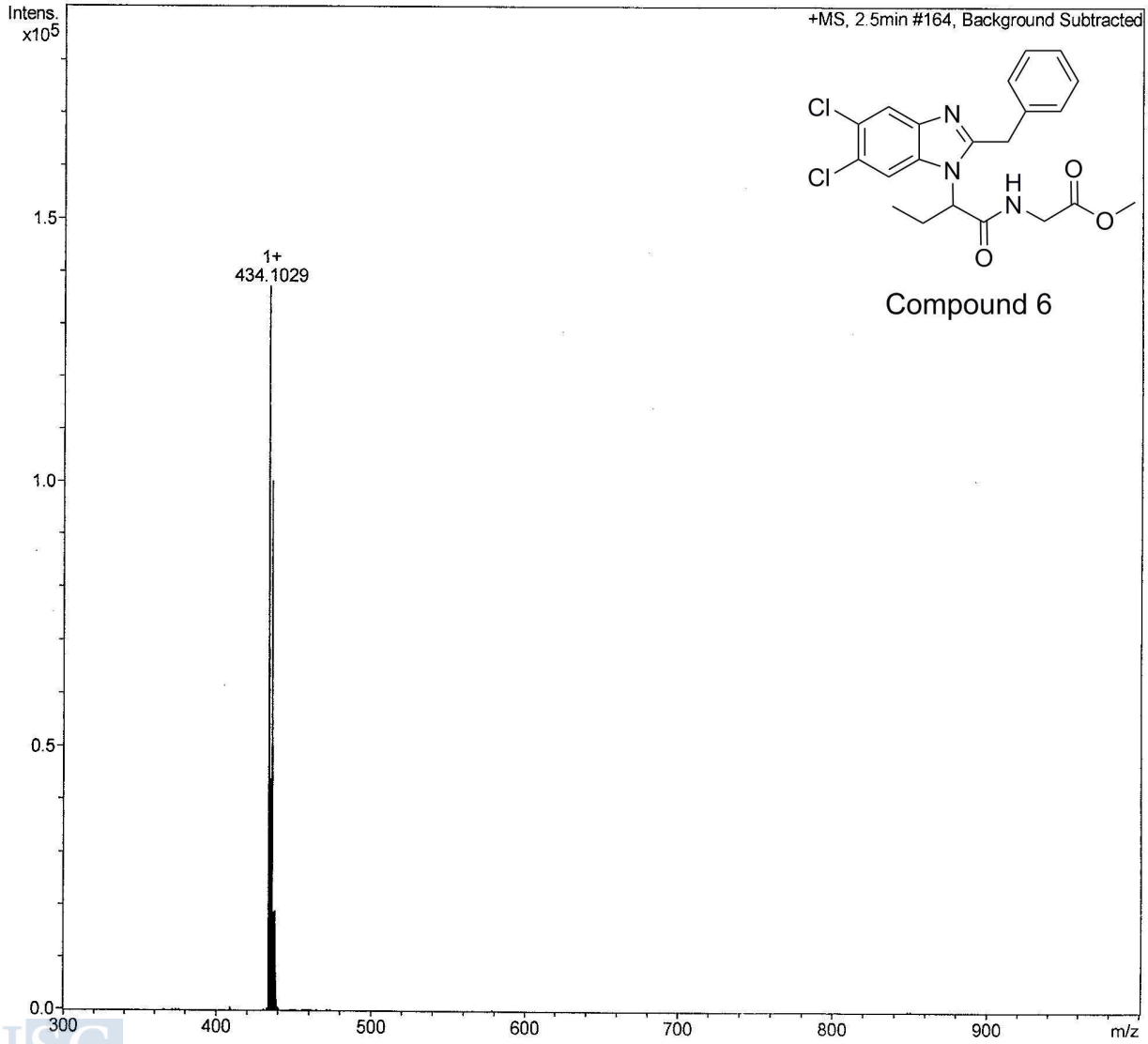


RIAIDT
UNIDADE DE ESPECTROMETRIA DE MASAS E PROTEÓMICA
Edificio CACTUS * Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (Spain)
Tel. 981 563 100. Ext. 16242 * Fax 981 528098
E-mail: sxemasas@usc.es
Web: http://www.ti.usc.es/riaidt/masas/masas.htm

ESPECTRO ESI-FIA-TOF-Medida de Masas Exactas

Analysis Info

Sample Name	AK022_434_1-D,8_01_6584.d	Acquisition Date	10/4/2012 11:07:39 AM
Method	fia_pos_medio_350-1500_egf.m	Instrument	micrOTOF



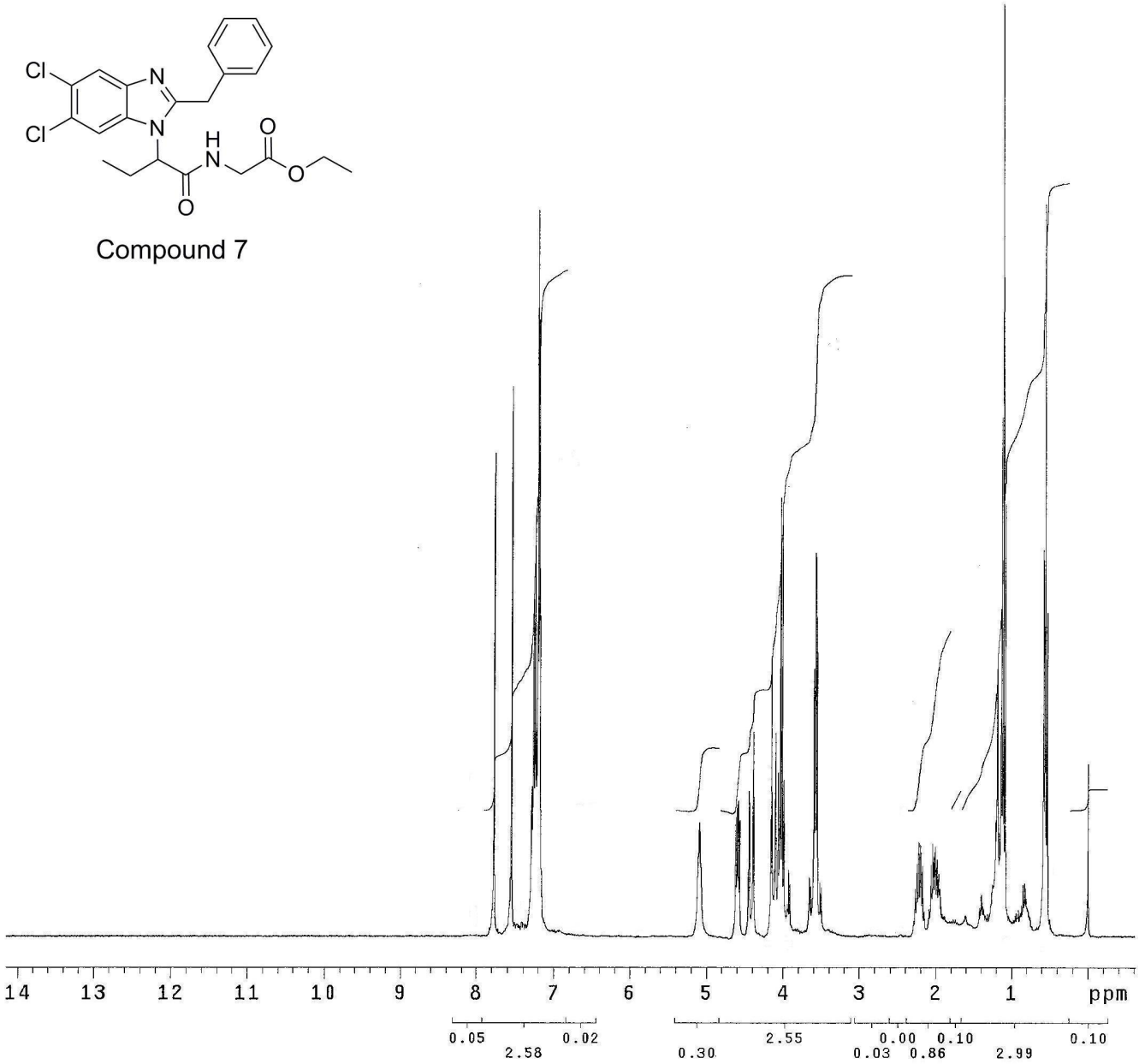
Meas. m/z	#	Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
434.1029	1	C 21 H 22 Cl 2 N 3 O 3	100.00	434.1033	0.4	0.9	42.5	11.5	even	ok

sy1ak079

exp1 s2pul

SAMPLE		DEC. & VT	
date	Oct 6 2011	dfrq	75.454
solvent	cdcl3	dn	C13
file	/home/vnmr2/s~	dpwr	37
	y1ak079/1H.fid	dof	0
ACQUISITION		dm	nnn
sfrq	300.048	dmm	c
tn	H1	dmf	13900
at	1.998	temp	25.0
np	21576	PROCESSING	
sw	5399.6	lb	0.50
fb	3000	wtfile	
bs	1	proc	ft
tpwr	59	fn	not used
pw	4.4		
d1	1.000	werr	
tof	659.7	wexp	
nt	100	wbs	
ct	14	wnt	
alock	n		
gain	not used		
FLAGS			
il	n		
in	n		
dp	y		
DISPLAY			
sp	-186.9		
wp	4433.3		
vs	270		
sc	0		
wc	180		
hzmm	24.63		
is	825.40		
rfl	619.2		
rfp	0		
th	2		
ins	1.000		
ai cdc ph			

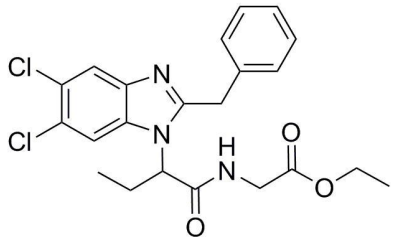
Compound 7



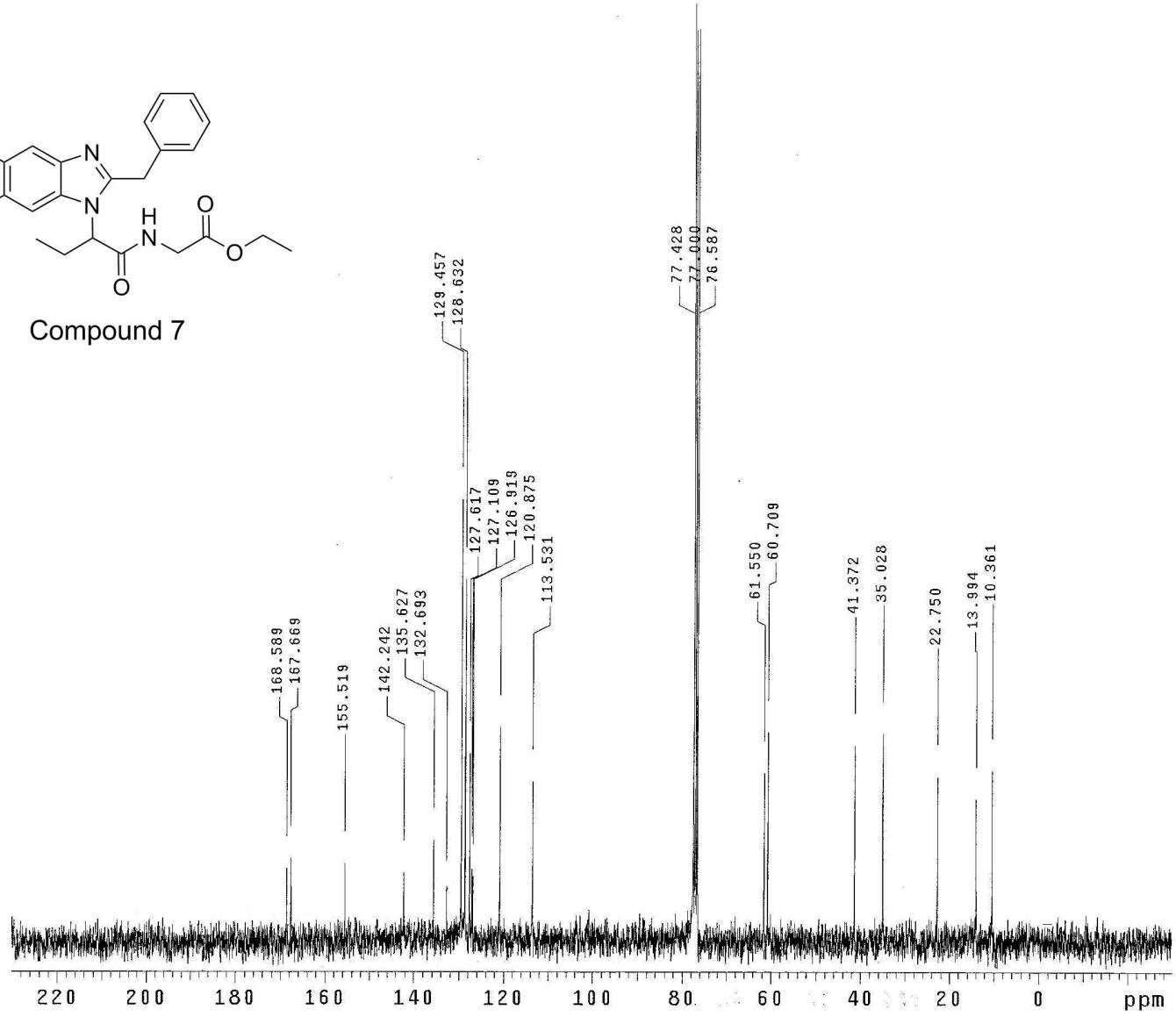
sy1AK079

exp3 CARBON

SAMPLE		PRESATURATION	
date	Nov 22 2013	satmode	n
solvent	cdcl3	wet	n
file	exp	SPECIAL	
ACQUISITION		temp	25.0
sw	19607.8	gain	36
at	0.836	spin	not used
np	32768	hst	0.008
fb	10800	pw90	11.800
bs	1	alfa	10.000
d1	1.000	FLAGS	
nt	20000	il	n
ct	955	in	n
TRANSMITTER		dp	y
tn	C13	hs	nn
sfrq	75.454	PROCESSING	
tof	409.4	lb	2.00
tpwr	52	fn	not used
pw	5.244	DISPLAY	
DECOUPLER		sp	-2258.1
dn	H1	wp	19606.6
dof	-800.0	rfl	2259.3
dm	yyy	rfp	0
decwave	w	rp	159.0
dpwr	36	lp	-333.9
dmf	9885	PLOT	
		wc	180
		sc	0
		vs	792
		th	5
		ai cdc ph	



Compound 7

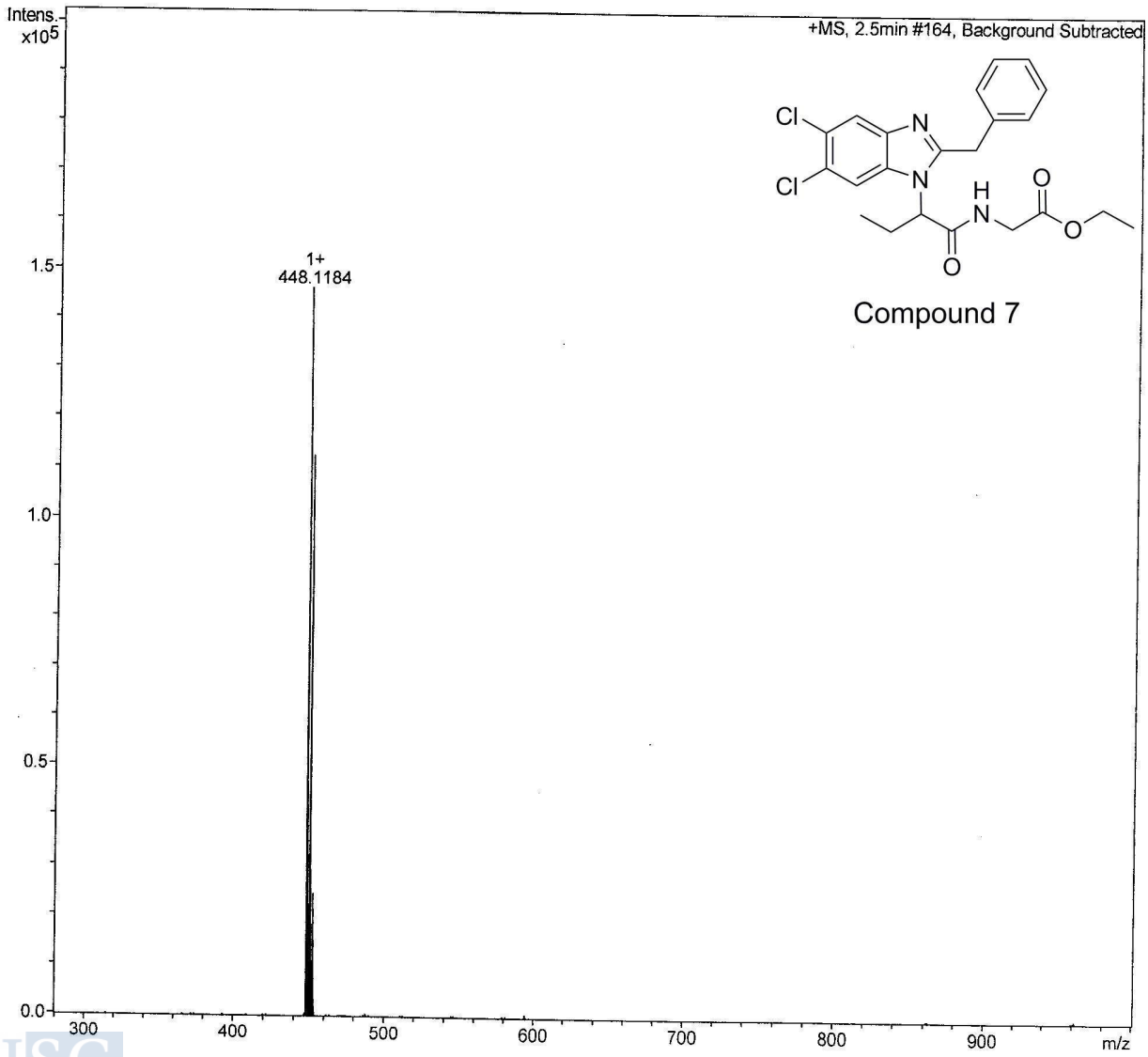


RIAIDT
UNIDADE DE ESPECTROMETRIA DE MASAS E PROTEÓMICA
Edificio CACTUS * Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (Spain)
Tel. 981 563 100. Ext. 16242 * Fax 981 528098
E-mail: sxemasas@usc.es
Web: http://www.ti.usc.es/riaidt/masas/masas.htm

ESPECTRO ESI-FIA-TOF-Medida de Masas Exactas

Analysis Info

Sample Name	AK079_448_1-D,9_01_6586.d	Acquisition Date	10/4/2012 11:26:23 AM
Method	fia_pos_medio_350-1500_egf.m	Instrument	micrOTOF



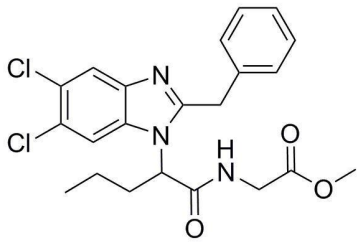
Compound 7

Meas. m/z	#	Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
448.1184	1	C 22 H 24 Cl 2 N 3 O 3	100.00	448.1189	0.5	1.2	54.6	11.5	even	ok

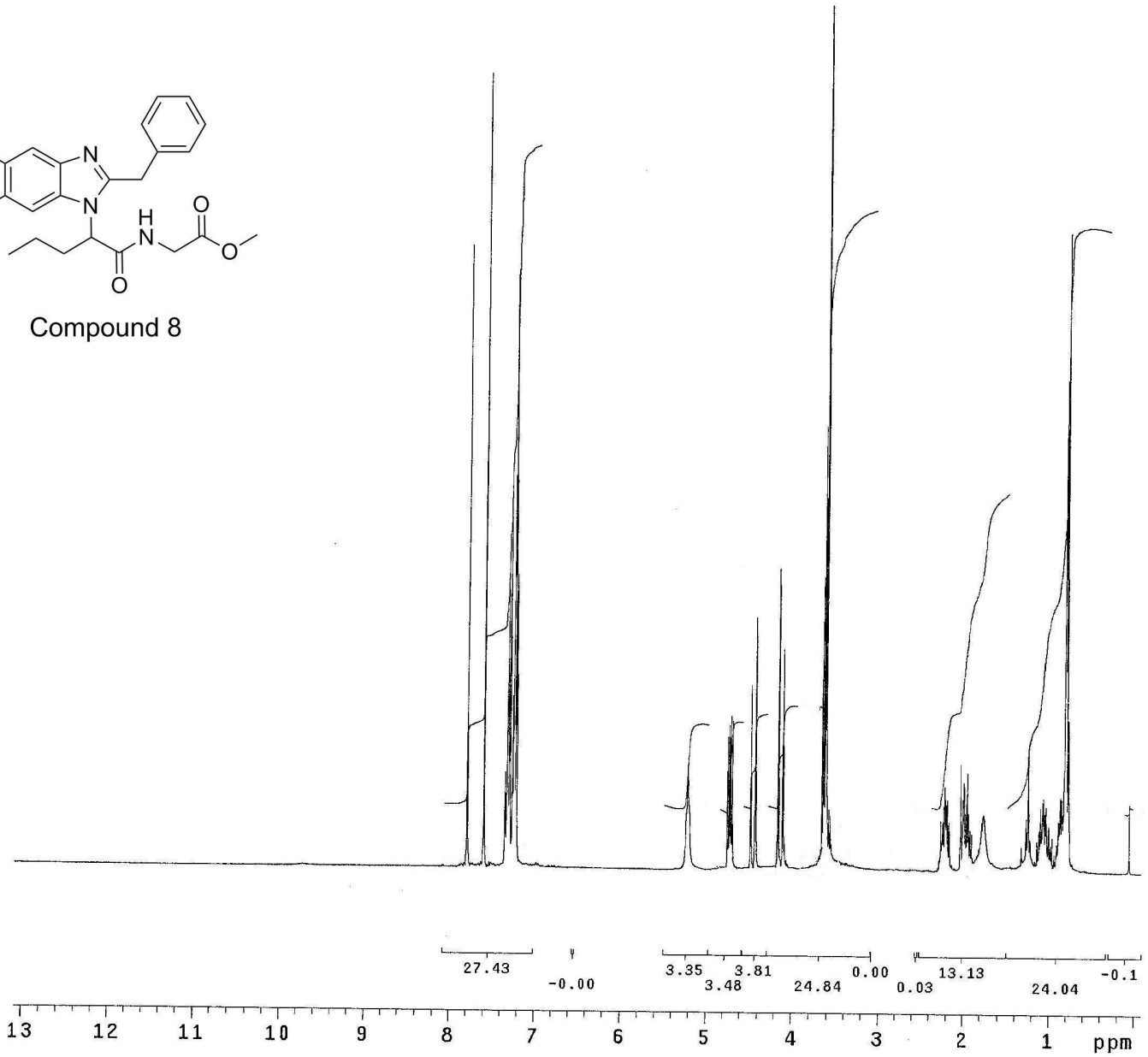
sy1ak120

exp1 PROTON

SAMPLE		PRESATURATION	
date	Jul 10 2012	satmode	n
solvent	cdcl3	wet	n
file	exp	SPECIAL	
ACQUISITION		temp	25.0
sw	4800.8	gain	not used
at	1.706	spin	20
np	16384	hst	0.008
fb	2600	pw90	9.000
bs	1	alfa	10.000
d1	1.000	FLAGS	
nt	100	il	n
ct	29	in	n
TRANSMITTER		dp	y
tn	H1	hs	nn
sfrq	300.048	PROCESSING	
tof	359.8	lb	0.25
tpwr	59	fn	not used
pw	4.500	DISPLAY	
DECOUPLER		sp	-24.0
dn	C13	wp	3946.3
dof	0	rfl	600.1
dm	nnn	rfp	0
decwave	W40_HCN5mm	rp	134.3
dpwr	36	lp	-45.6
dmf	13615	PLOT	
		wc	180
		sc	0
		vs	140
		th	3
		ai cdc ph	



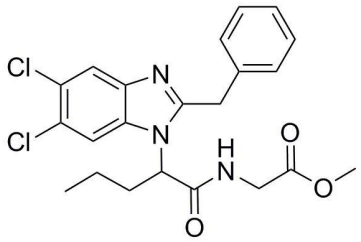
Compound 8



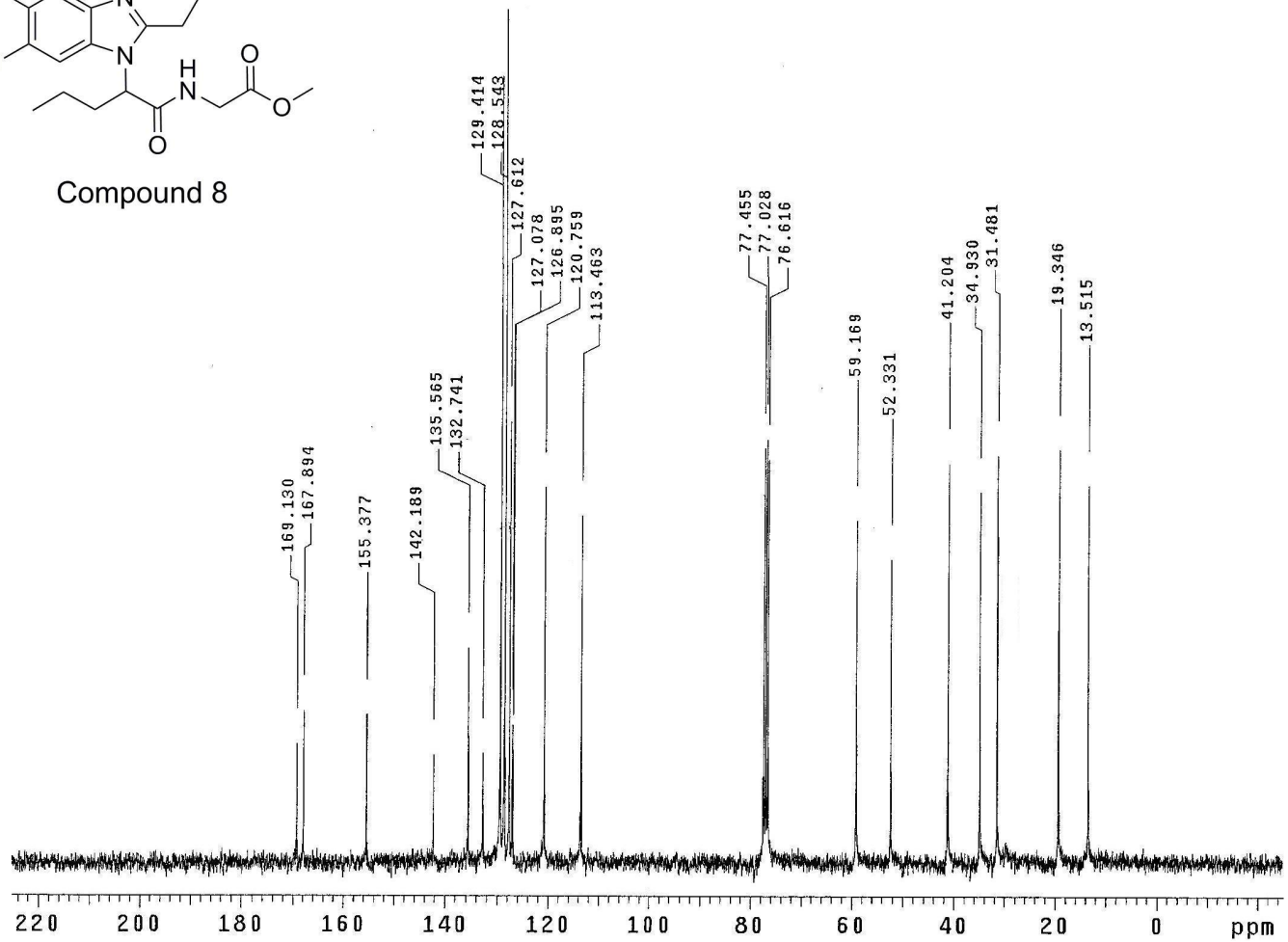
sy1ak120c

exp2 CARBON

SAMPLE		PRESATURATION	
date	Jul 20 2012	satmode	n
solvent	cdcl3	wet	n
file	exp	SPECIAL	
ACQUISITION		temp	25.0
sw	18867.9	gain	not used
at	0.800	spin	20
np	30188	hst	0.008
fb	10400	pw90	8.000
bs	1	alfa	10.000
d1	1.000	FLAGS	
nt	2000	il	n
ct	1819	in	n
TRANSMITTER		dp	y
tn	C13	hs	nn
sfrq	75.454	PROCESSING	
tof	409.4	lb	2.00
tpwr	55	fn	not used
pw	4.000	DISPLAY	
DECOUPLER		sp	-1888.1
dn	H1	wp	18866.8
dof	0	rfl	1889.3
dm	yyy	rfp	0
decwave	w	rp	109.0
dpwr	36	lp	-256.1
dmf	9885	PLOT	
		wc	180
		sc	0
		vs	529
		th	4
		ai cdc ph	



Compound 8

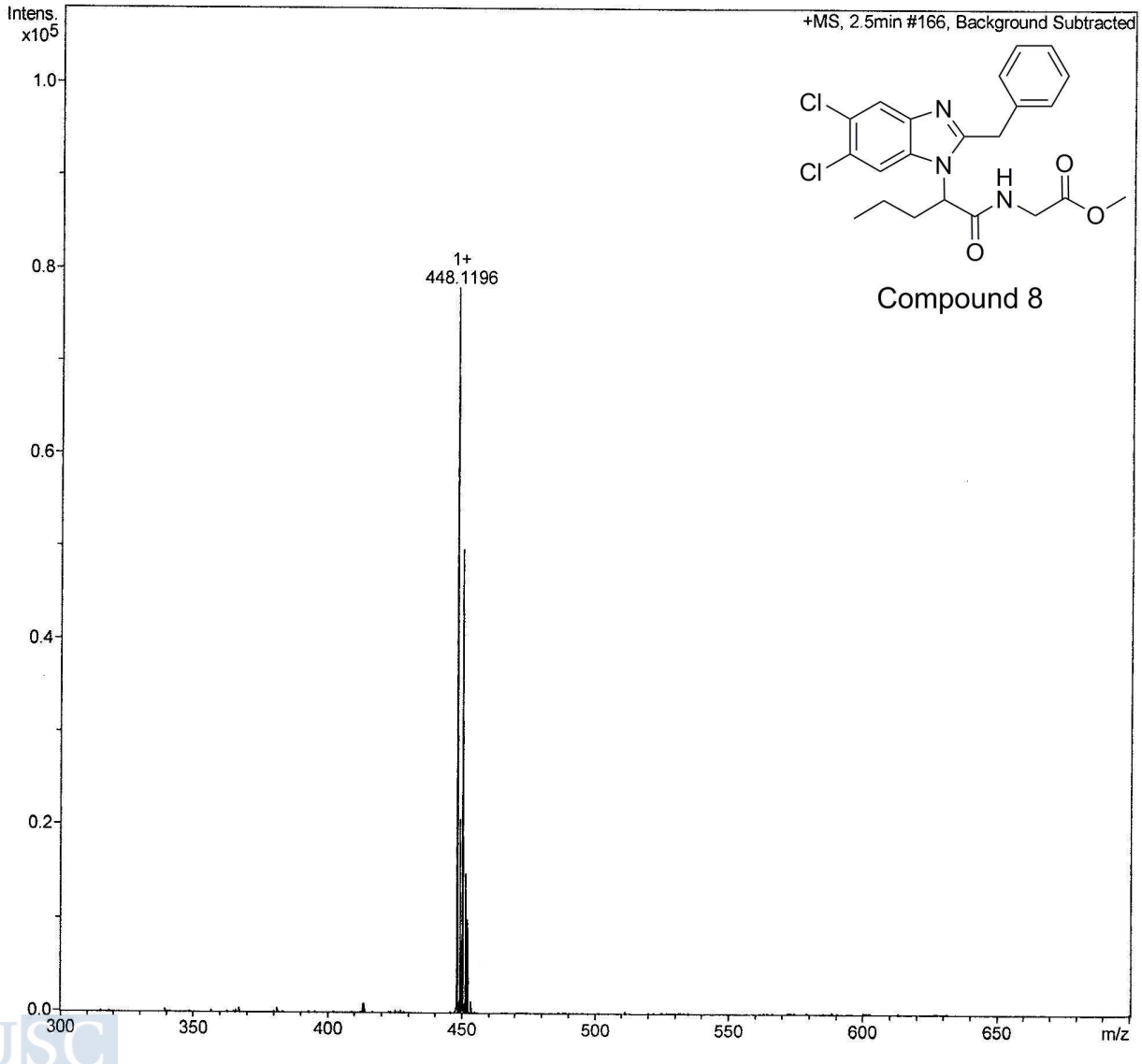


RIAIDT
UNIDADE DE ESPECTROMETRIA DE MASAS E PROTEÓMICA
Edificio CACTUS * Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (Spain)
Tel. 981 563 100. Ext. 16242 * Fax 981 528098
E-mail: sxemasas@usc.es
Web: http://www.ti.usc.es/riaidt/masas/masas.htm

ESPECTRO ESI-FIA-TOF-Medida de Masas Exactas

Analysis Info

Sample Name	AK120_448_1-F,12_01_6650.d	Acquisition Date	10/5/2012 12:24:52 PM
Method	fia_pos_medio_350-1500_egf.m	Instrument	micrOTOF



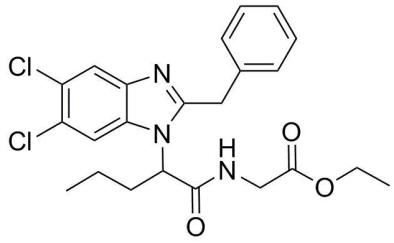
Meas. m/z	#	Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
448.1196	1	C 22 H 24 Cl 2 N 3 O 3	100.00	448.1189	-0.7	-1.6	21.6	11.5	even	ok

USC

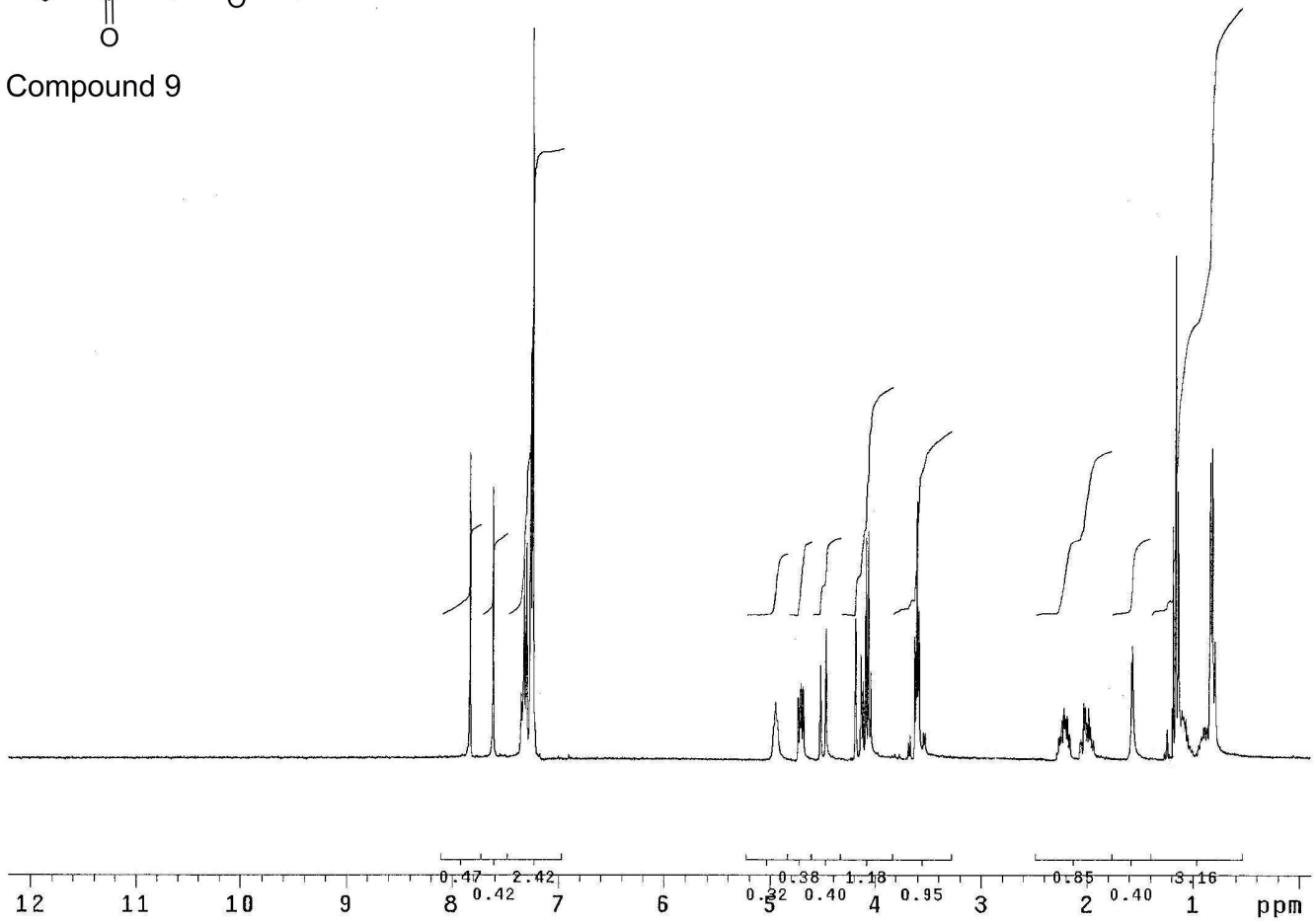
sy1ak121

exp1 s2pul

SAMPLE		DEC. & VT	
date	Feb 28 2012	dfrq	75.454
solvent	cdcl3	dn	C13
file	exp	dpwr	37
ACQUISITION		dof	0
sfrq	300.048	dm	nnn
tn	H1	dmm	c
at	1.998	dmf	13900
np	21576	temp	25.0
sw	5399.6	PROCESSING	
fb	3000	lb	0.30
bs	1	wtfile	
tpwr	59	proc	ft
pw	4.4	fn	not used
d1	1.000		
tof	659.7	werr	
nt	50	wexp	
ct	21	wbs	
alock	n	wnt	
gain	not used		
FLAGS			
il	n		
in	n		
dp	y		
DISPLAY			
sp	-32.7		
wp	3692.8		
vs	104		
sc	0		
wc	180		
hzmm	20.52		
is	656.76		
rfl	599.6		
rfp	0		
th	2		
ins	1.000		
ai	ph		



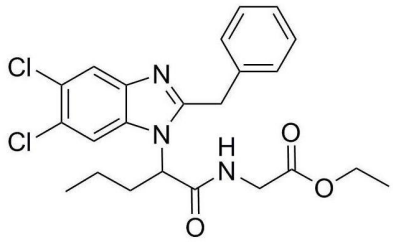
Compound 9



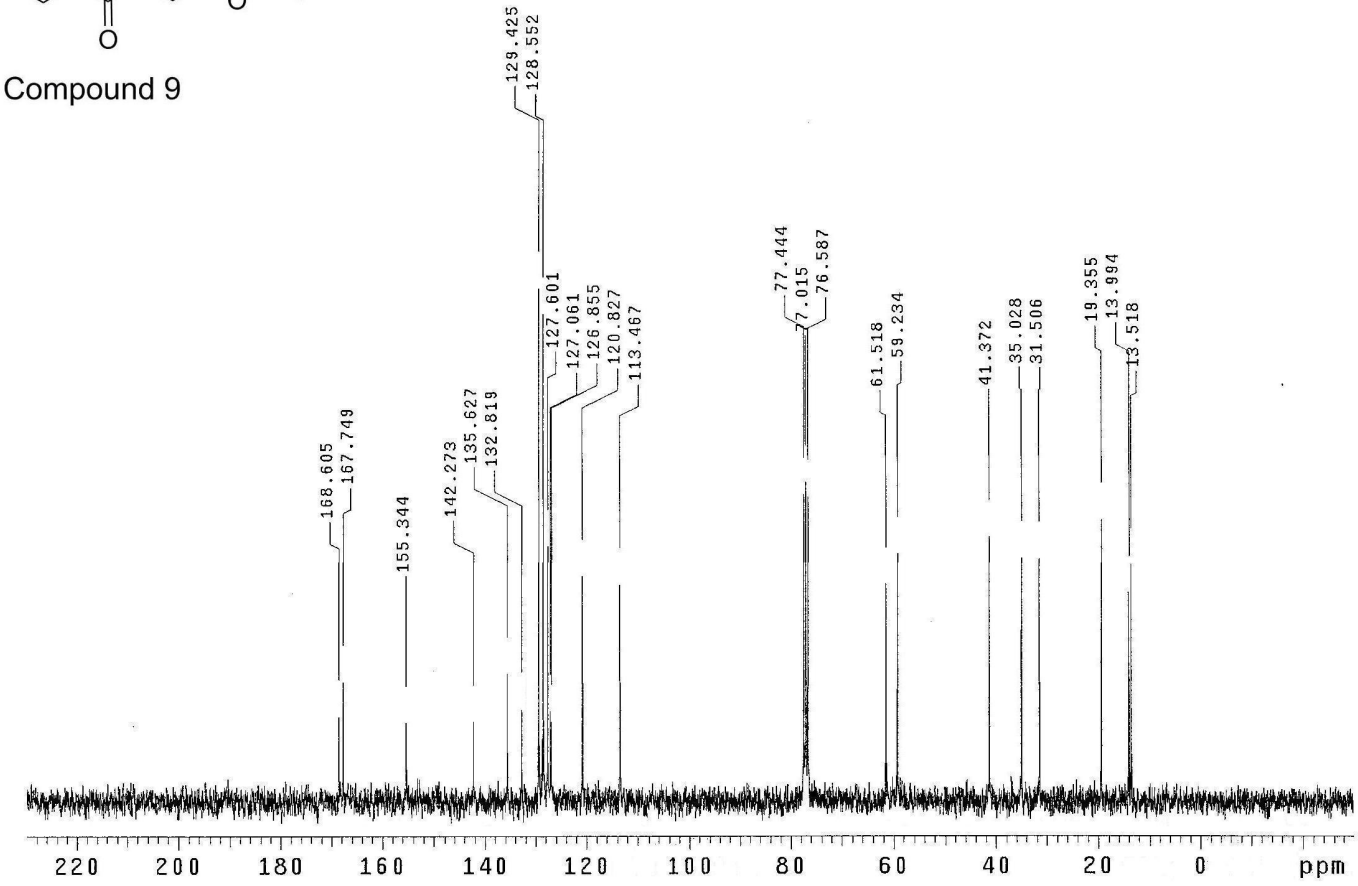
sy1AK121

exp7 CARBON

SAMPLE		PRESATURATION	
date	Nov 25 2013	satmode	n
solvent	cdcl3	wet	n
file	exp	SPECIAL	
ACQUISITION		temp	25.0
sw	19607.8	gain	36
at	0.836	spin	not used
np	32768	hst	0.008
fb	10800	pw90	11.800
bs	1	alfa	10.000
d1	1.000	FLAGS	
nt	20000	il	n
ct	458	in	n
TRANSMITTER		dp	y
tn	C13	hs	nn
sfrq	75.454	PROCESSING	
tof	409.4	lb	2.00
tpwr	52	fn	not used
pw	5.244	DISPLAY	
DECOUPLER		sp	-2258.1
dn	H1	wp	19606.6
dof	-800.0	rfl	2259.3
dm	yyy	rfp	0
decwave	w	rp	155.9
dpwr	36	lp	-357.2
dmf	9885	PLOT	
		wc	180
		sc	0
		vs	378
		th	5
		ai cdc ph	



Compound 9

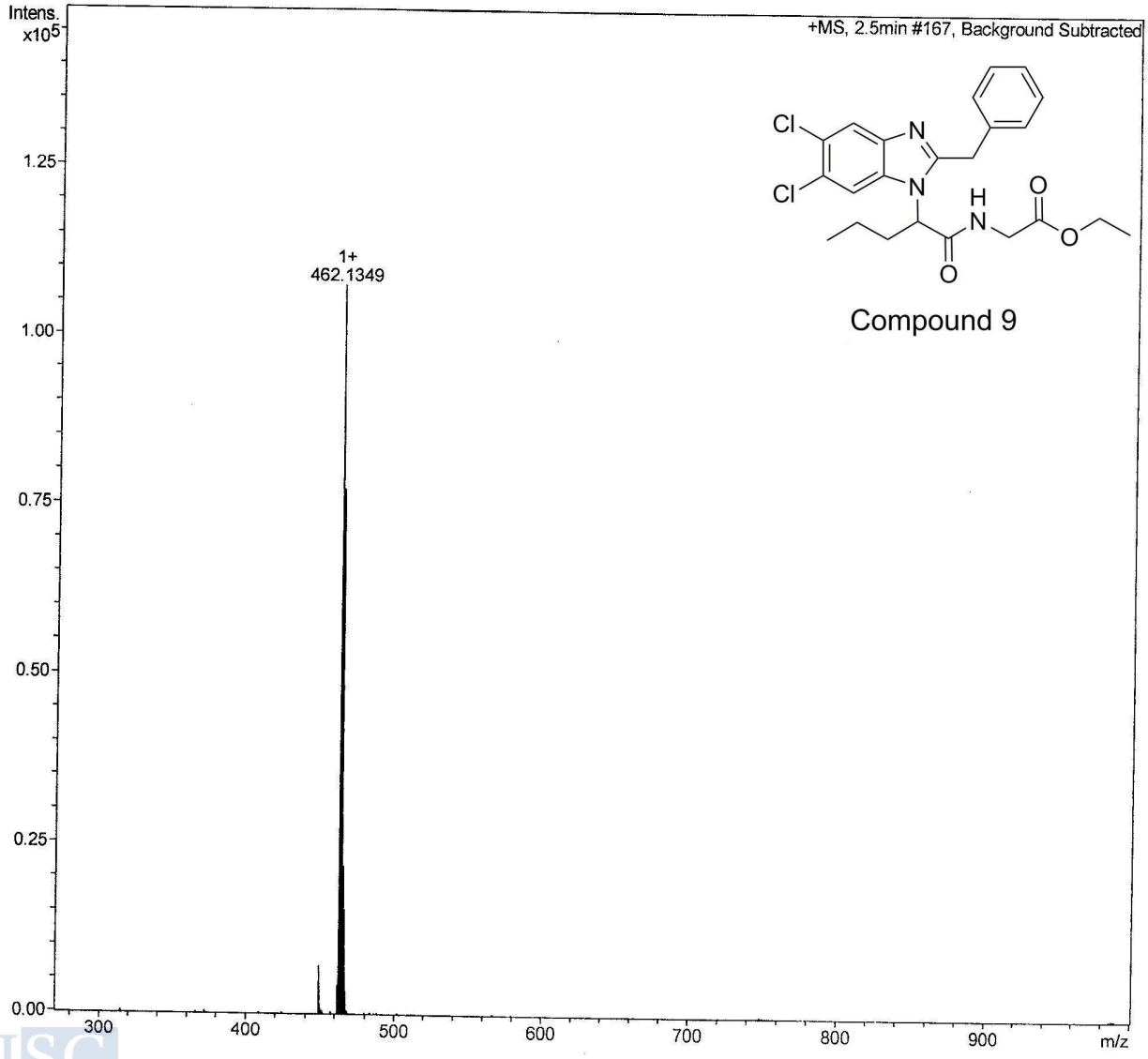


RIAIDT
UNIDADE DE ESPECTROMETRIA DE MASAS E PROTEÓMICA
Edificio CACTUS * Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (Spain)
Tel. 981 563 100. Ext. 16242 * Fax 981 528098
E-mail: sxemasas@usc.es
Web: http://www.ti.usc.es/riaidt/masas/masas.htm

ESPECTRO ESI-FIA-TOF-Medida de Masas Exactas

Analysis Info

Sample Name	AK121_462_1-D,11_01_6590.d	Acquisition Date	10/4/2012 12:03:51 PM
Method	fia_pos_medio_350-1500_egf.m	Instrument	micrOTOF



Compound 9

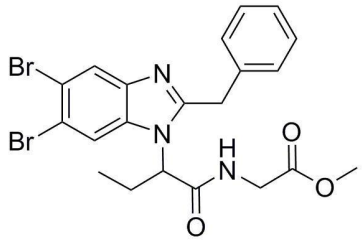
Meas. m/z	#	Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
462.1349	1	C 23 H 26 Cl 2 N 3 O 3	100.00	462.1346	-0.3	-0.7	24.2	11.5	even	ok

USC UNIVERSIDAD DE SAN FRANCISCO DE QUITO

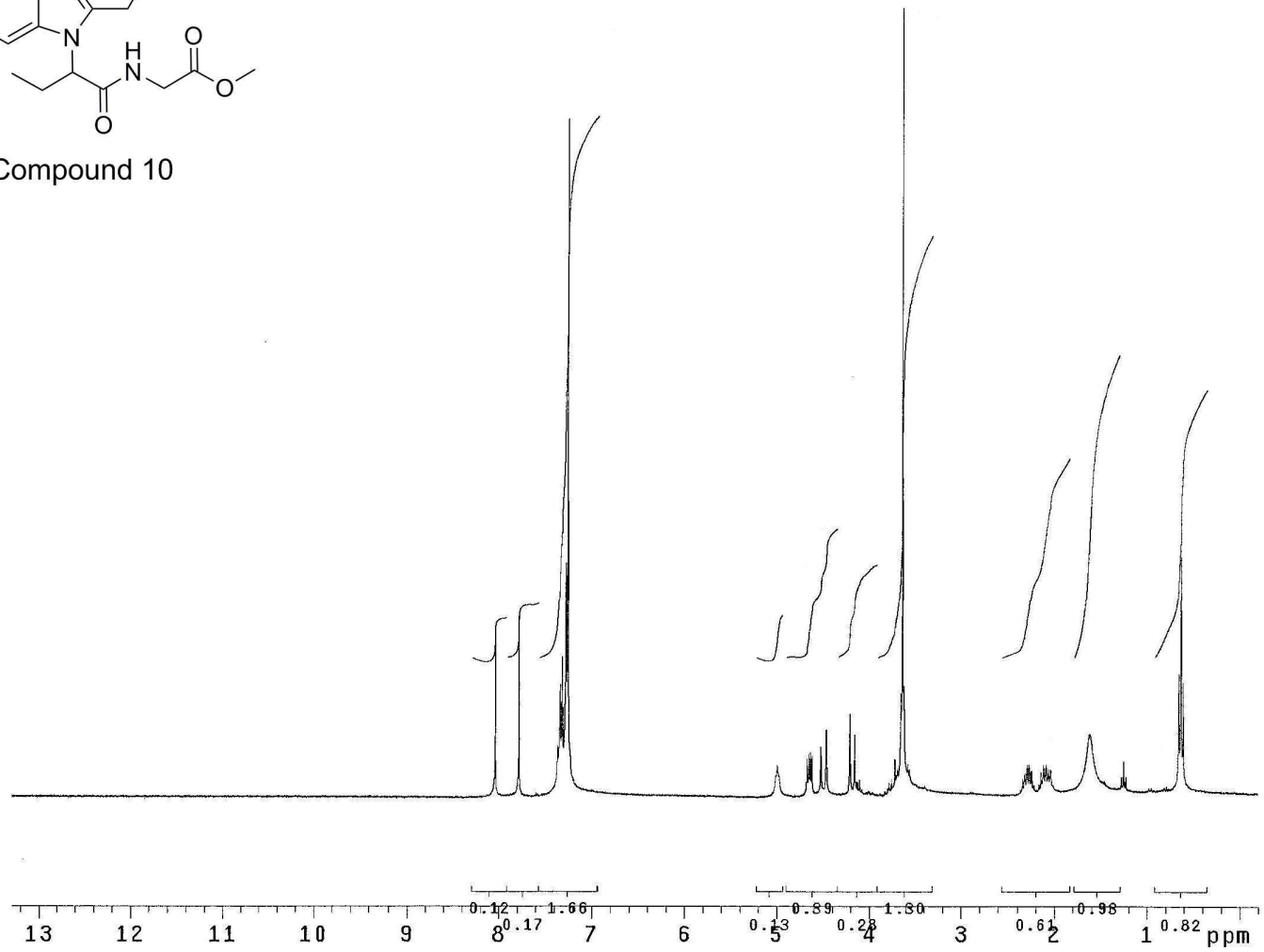
sy1ak125

exp1 s2pul

SAMPLE		DEC. & VT	
date	Mar 15 2012	dfrq	75.454
solvent	cdcl3	dn	C13
file	exp	dpwr	37
ACQUISITION		dof	0
sfrq	300.048	dm	nnn
tn	H1	dmm	c
at	1.998	dmf	13900
np	21576	temp	25.0
sw	5399.6	PROCESSING	
fb	3000	lb	0.20
bs	1	wtfile	
tpwr	59	proc	ft
pw	4.4	fn	not used
d1	1.000		
tof	659.7	werr	
nt	100	wexp	
ct	41	wbs	
alock	n	wnt	
gain	not used		
FLAGS			
il	n		
in	n		
dp	y		
DISPLAY			
sp	-60.1		
wp	4049.3		
vs	136		
sc	0		
wc	180		
hzmm	22.50		
is	1165.89		
rfl	599.6		
rfp	0		
th	2		
ins	1.000		
ai	ph		



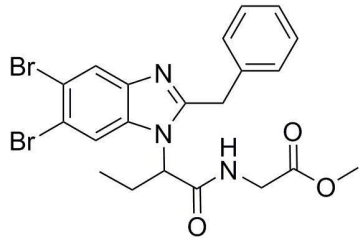
Compound 10



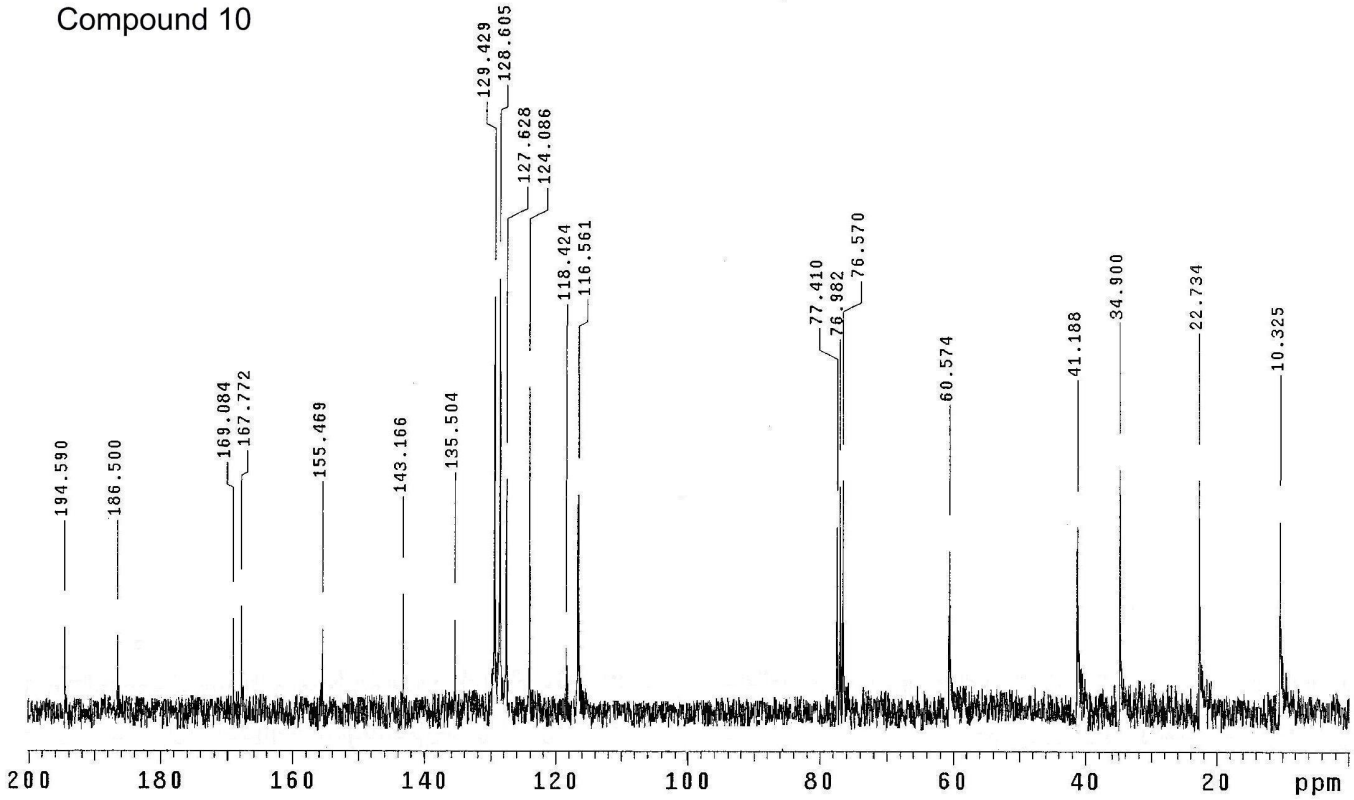
sy1ak125c13

exp2 CARBON

SAMPLE		PRESATURATION	
date	May 11 2012	satmode	n
solvent	cdcl3	wet	n
file	exp	SPECIAL	
ACQUISITION		temp	25.0
sw	18867.9	gain	not used
at	0.868	spin	not used
np	32768	hst	0.008
fb	10400	pw90	8.400
bs	2	alfa	10.000
d1	1.000	FLAGS	
nt	2000	il	n
ct	584	in	n
TRANSMITTER		dp	y
tn	C13	hs	nn
sfrq	75.454	PROCESSING	
tof	409.4	lb	2.50
tpwr	57	fn	not used
pw	8.450	DISPLAY	
DECOUPLER		sp	-15.6
dn	H1	wp	15120.6
dof	0	rfl	1889.3
dm	yyy	rfp	0
decwave	w	rp	-5.1
dpwr	33	lp	-237.7
dmf	7600	PLOT	
		wc	180
		sc	0
		vs	786
		th	6
		ai	ph



Compound 10

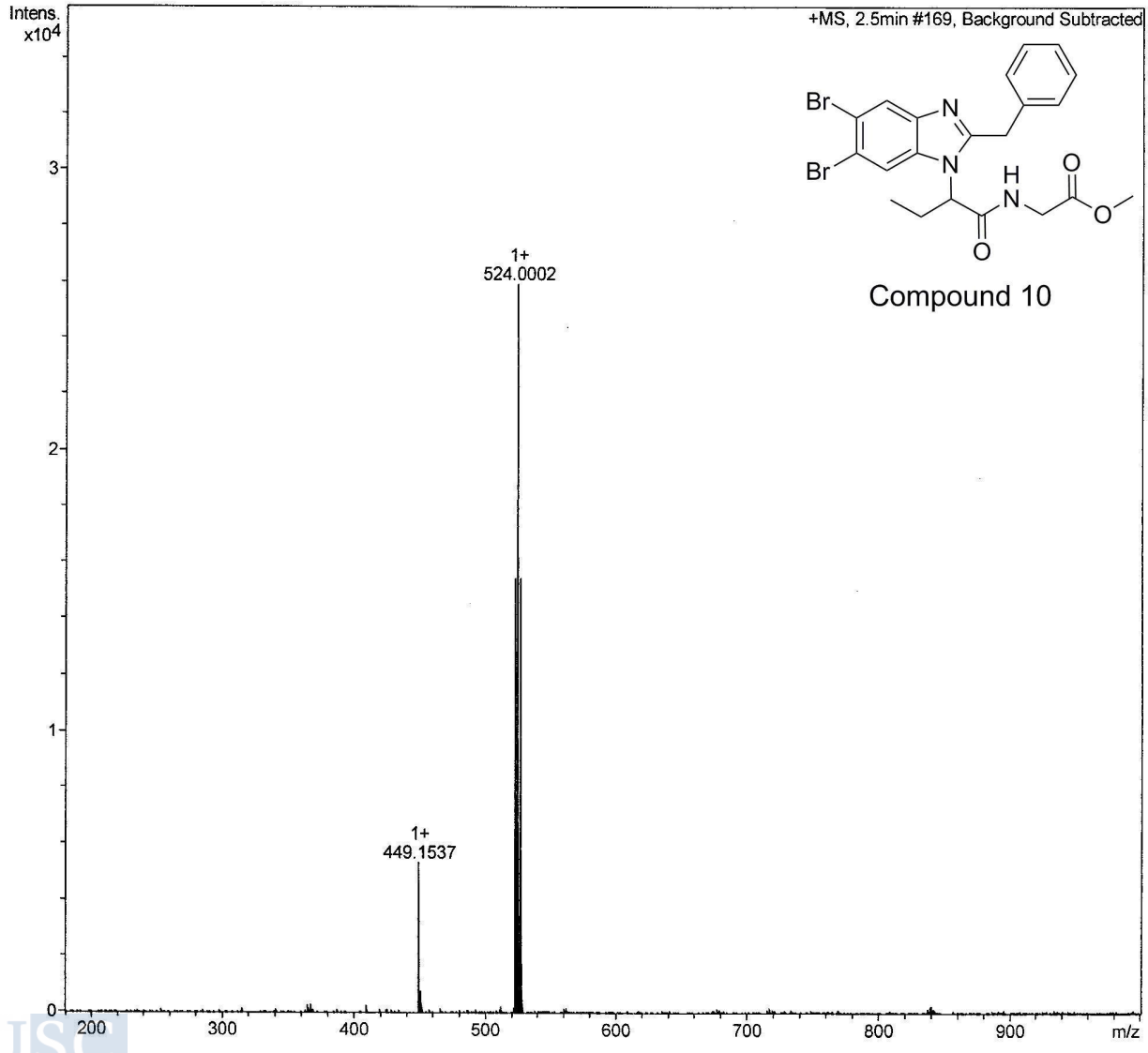


RIAIDT
UNIDADE DE ESPECTROMETRIA DE MASAS E PROTEÓMICA
Edificio CACTUS * Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (Spain)
Tel. 981 563 100. Ext. 16242 * Fax 981 528098
E-mail: sxemasas@usc.es
Web: http://www.ti.usc.es/riaidt/masas/masas.htm

ESPECTRO ESI-FIA-TOF-Medida de Masas Exactas

Analysis Info

Sample Name	AK125_523_1-D,10_01_6588.d	Acquisition Date	10/4/2012 11:45:07 AM
Method	fia_pos_medio_350-1500_egf.m	Instrument	micrOTOF



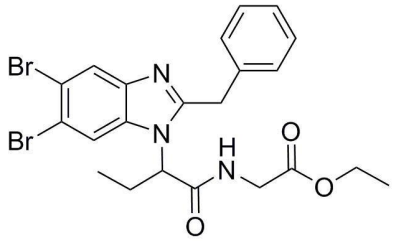
Meas. m/z	#	Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
522.0016	1	C 21 H 22 Br 2 N 3 O 3	100.00	522.0022	0.6	1.2	50.7	11.5	even	ok

USC UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

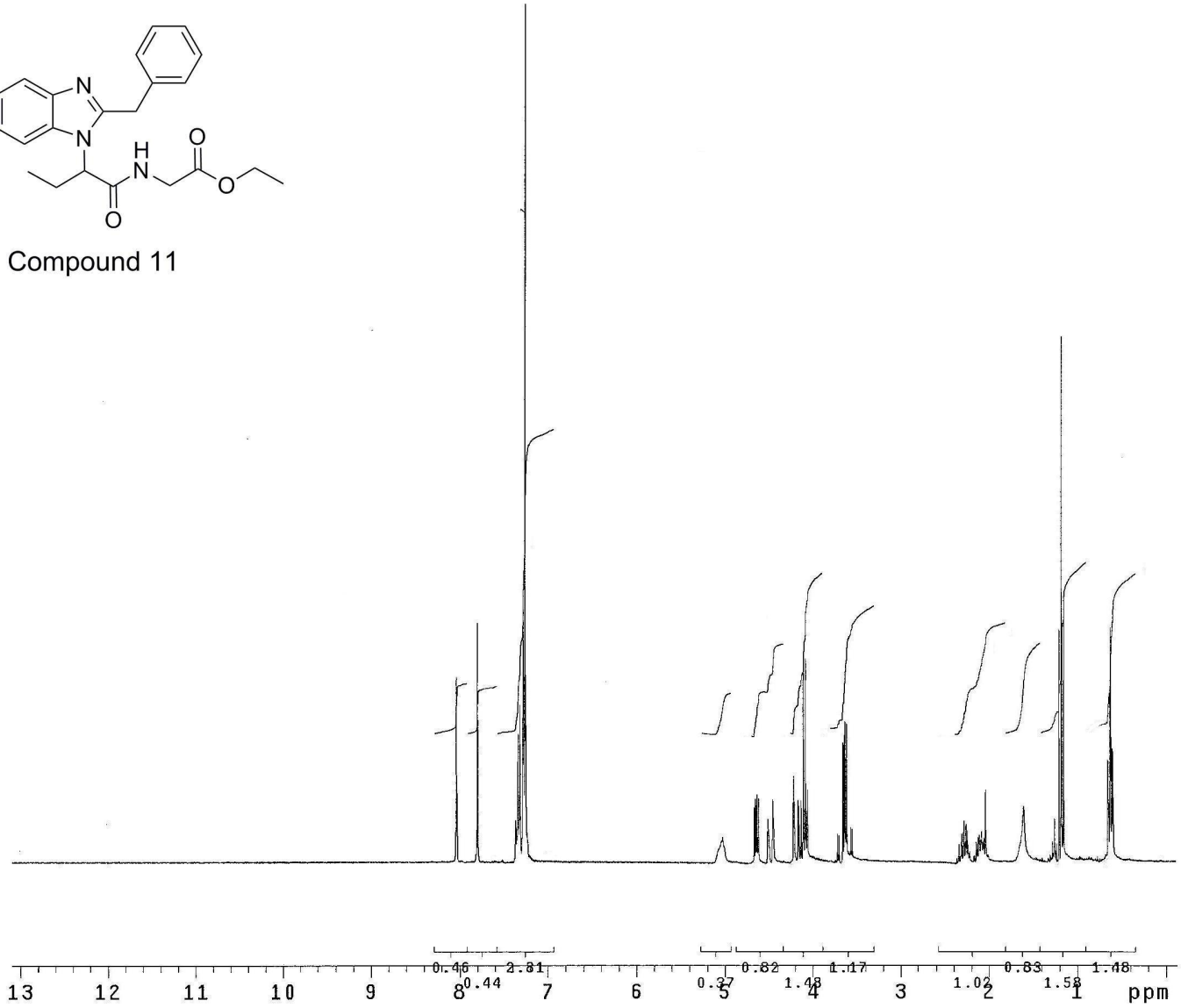
sy1ak126

exp1 s2pul

SAMPLE		DEC. & VT	
date	Mar 20 2012	dfrq	75.454
solvent	cdcl3	dn	C13
file	exp	dpwr	37
ACQUISITION		dof	0
sfrq	300.048	dm	nnn
tn	H1	dmm	c
at	1.998	dmf	13900
np	21576	temp	25.0
sw	5399.6	PROCESSING	
fb	3000	lb	0.20
bs	1	wtfile	
tpwr	59	proc	ft
pw	4.4	fn	not used
d1	1.000		
tof	659.7	werr	
nt	100	wexp	
ct	21	wbs	
alock	n	wnt	
gain	not used		
FLAGS			
il	n		
in	n		
dp	y		
DISPLAY			
sp	-34.7		
wp	3965.0		
vs	62		
sc	0		
wc	180		
hzmm	22.03		
is	414.59		
rfl	599.6		
rfp	0		
th	2		
ins	1.000		
ai	ph		



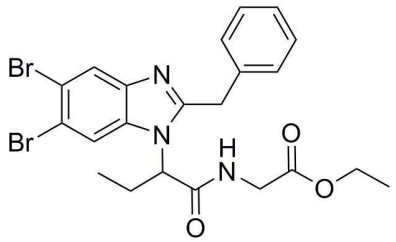
Compound 11



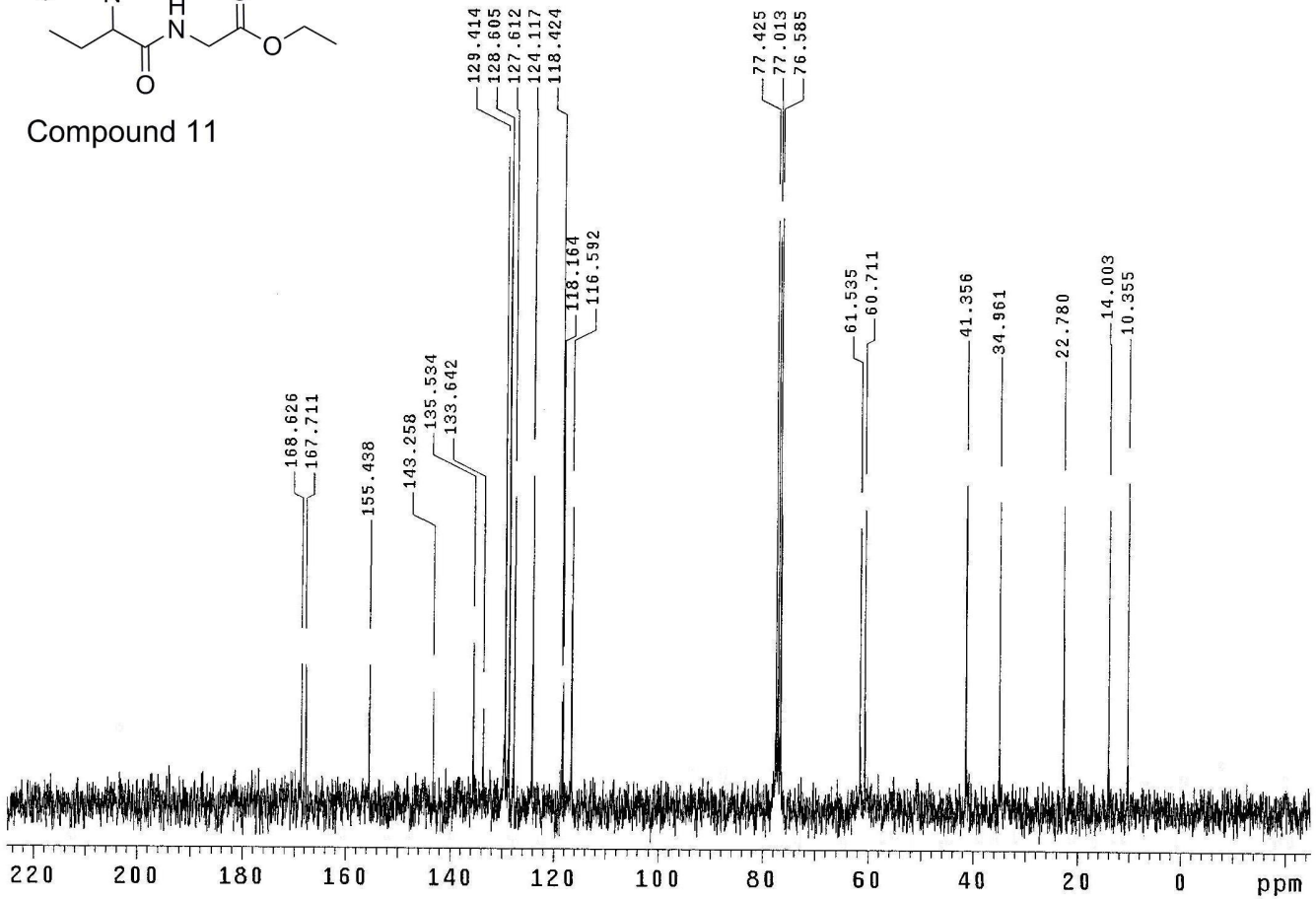
sy1ak126c

exp1 CARBON

SAMPLE		PRESATURATION	
date	May 23 2012	satmode	n
solvent	cdcl3	wet	n
file	exp	SPECIAL	
ACQUISITION		temp	25.0
sw	18867.9	gain	not used
at	0.868	spin	not used
np	32768	hst	0.008
fb	10400	pw90	7.000
bs	2	alfa	10.000
d1	1.000	FLAGS	
nt	2000	il	n
ct	876	in	n
TRANSMITTER		dp	y
tn	C13	hs	nn
sfrq	75.454	PROCESSING	
tof	409.4	lb	2.50
tpwr	57	fn	not used
pw	3.000	DISPLAY	
DECOUPLER		sp	-1888.1
dn	H1	wp	18866.8
dof	0	rfl	1889.3
dm	yyy	rfp	0
decwave	w	rp	80.8
dpwr	37	lp	-237.7
dmf	8100	PLOT	
		wc	180
		sc	0
		vs	955
		th	6
		ai	ph



Compound 11

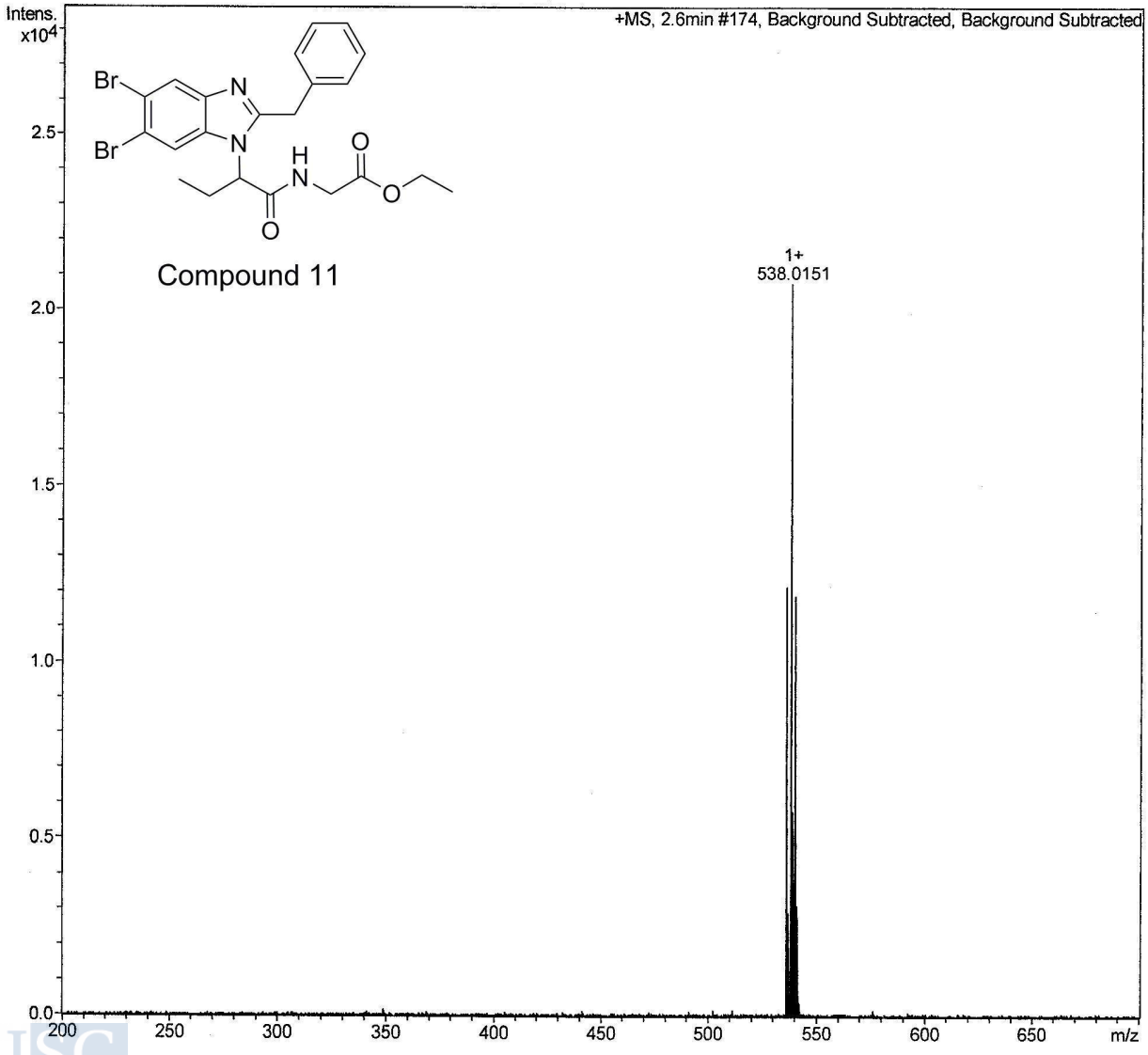


RIAIDT
UNIDADE DE ESPECTROMETRIA DE MASAS E PROTEÓMICA
Edificio CACTUS * Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (Spain)
Tel. 981 563 100. Ext. 16242 * Fax 981 528098
E-mail: sxemasas@usc.es
Web: http://www.ti.usc.es/riaidt/masas/masas.htm

ESPECTRO ESI-FIA-TOF-Medida de Masas Exactas

Analysis Info

Sample Name	AK126_535_1-F,11_01_6648.d	Acquisition Date	10/5/2012 12:06:07 PM
Method	fia_pos_medio_350-1500_egf.m	Instrument	micrOTOF



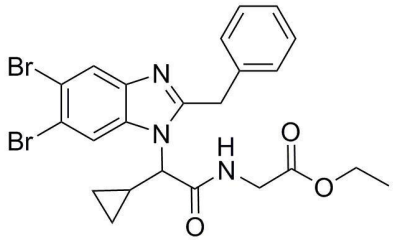
Meas. m/z	#	Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
536.0164	1	C 22 H 24 Br 2 N 3 O 3	100.00	536.0179	1.5	2.8	42.5	11.5	even	ok

USC

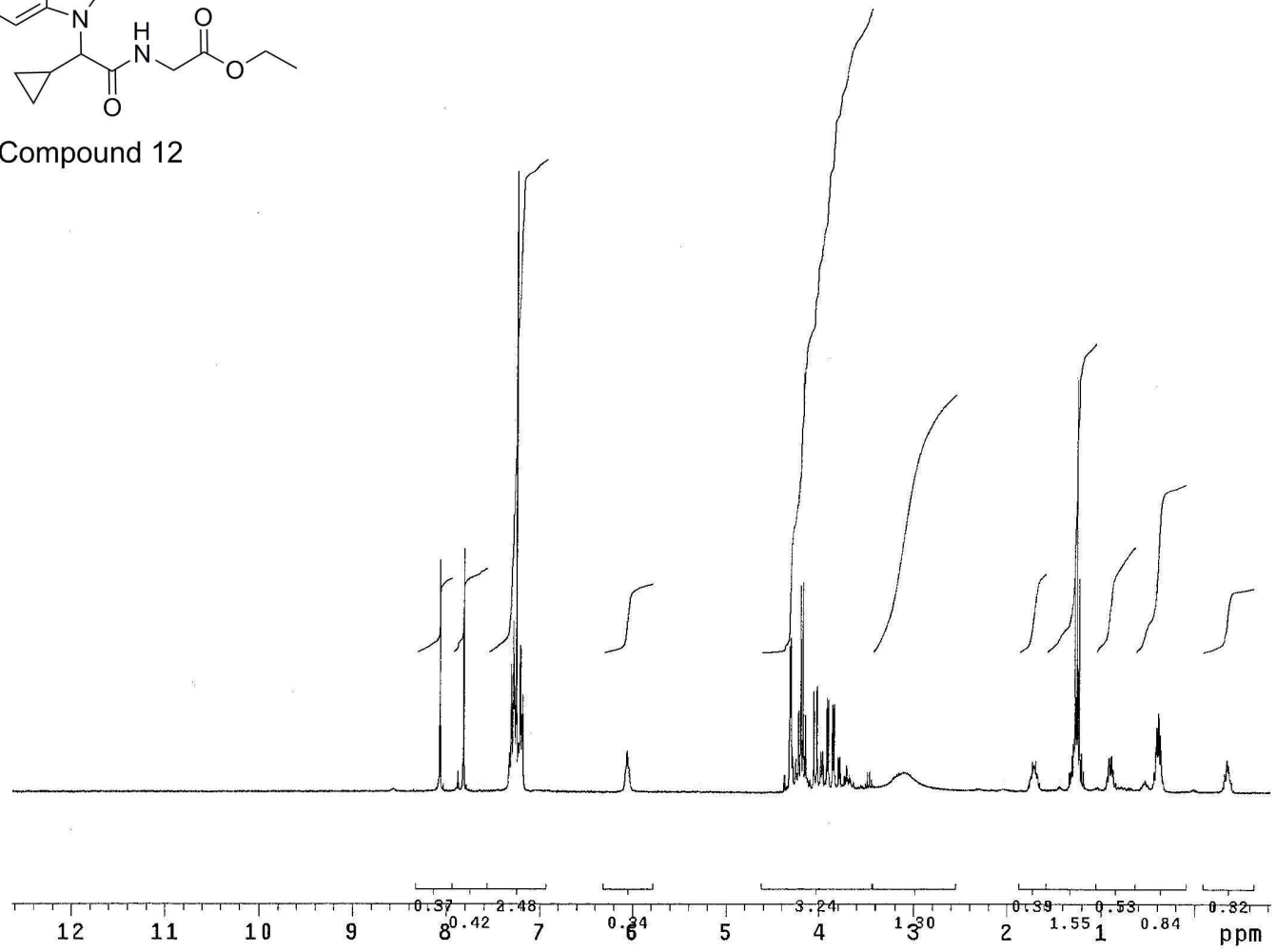
```
sy1ak127

exp1  s2pul

      SAMPLE                    DEC. & VT
date    Mar 15 2012     dfrq          75.454
solvent       cdcl3     dn               C13
file            exp     dpwr              37
   ACQUISITION          dof                0
sfrq         300.048     dm               nnn
tn                H1     dmm                c
at             1.998     dmf            13900
np             21576     temp            25.0
sw            5399.6         PROCESSING
fb             3000     lb              0.20
bs                1     wtfile
tpwr             59     proc              ft
pw              4.4     fn         not used
d1            1.000
tof           659.7     werr
nt              100     wexp
ct               20     wbs
alock             n     wnt
gain      not used
      FLAGS
il                n
in                n
dp                y
     DISPLAY
sp           -248.9
wp           4036.2
vs               76
sc                0
wc              180
hzmm          22.42
is           703.73
rfl           599.6
rfp               0
th                2
ins           1.000
ai    ph
```



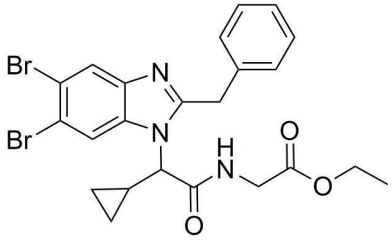
Compound 12



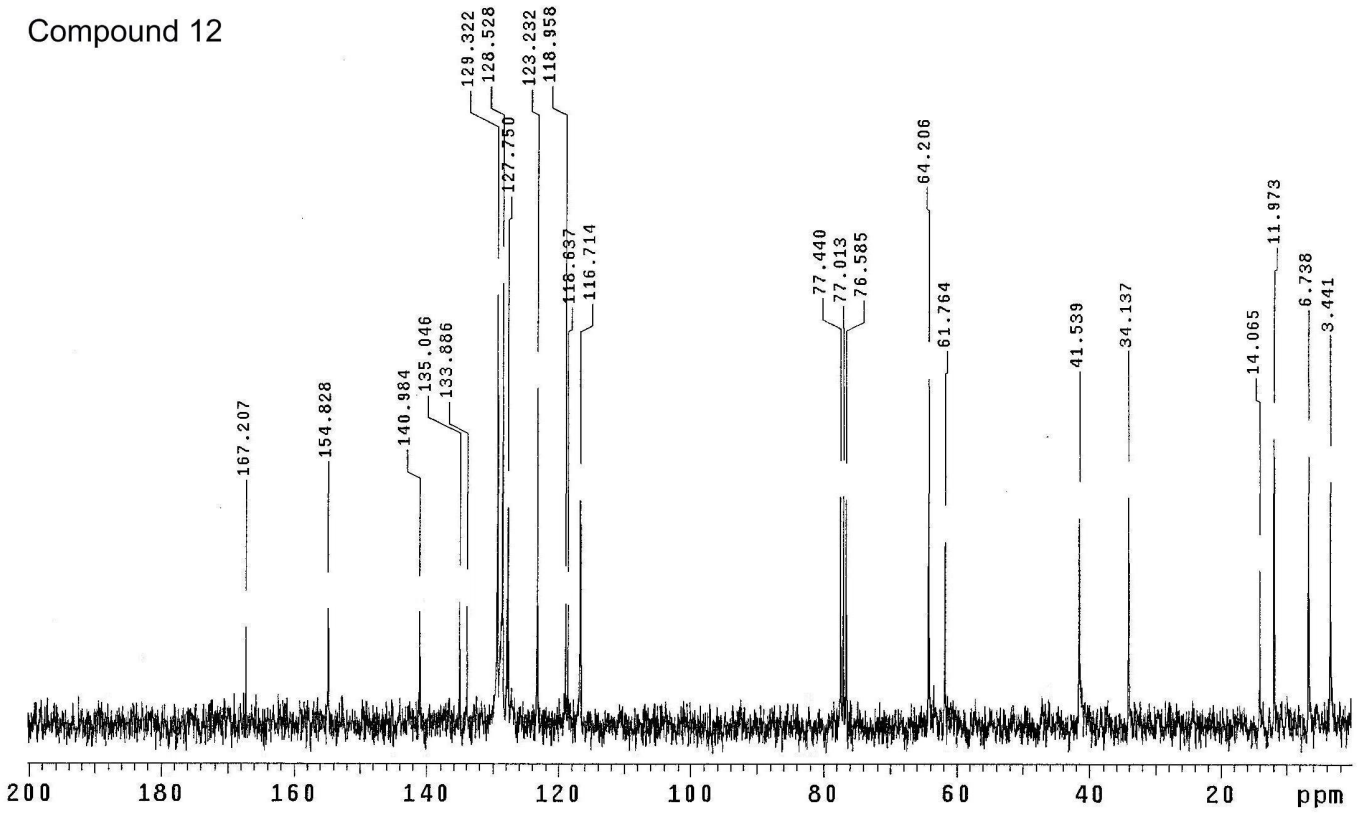
sy1ak127c13

exp2 CARBON

SAMPLE		PRESATURATION	
date	May 11 2012	satmode	n
solvent	cdcl3	wet	n
file	exp	SPECIAL	
ACQUISITION		temp	25.0
sw	18867.9	gain	not used
at	0.868	spin	not used
np	32768	hst	0.008
fb	10400	pw90	8.400
bs	2	alfa	10.000
d1	1.000	FLAGS	
nt	2000	il	n
ct	718	in	n
TRANSMITTER		dp	y
tn	C13	hs	nn
sfrq	75.454	PROCESSING	
tof	409.4	lb	2.50
tpwr	57	fn	not used
pw	8.450	DISPLAY	
DECOUPLER		sp	15.5
dn	H1	wp	15089.5
dof	0	rfl	1889.3
dm	yyy	rfp	0
decwave	w	rp	31.3
dpwr	33	lp	-275.1
dmf	7600	PLOT	
		wc	180
		sc	0
		vs	699
		th	8
		ai	ph



Compound 12

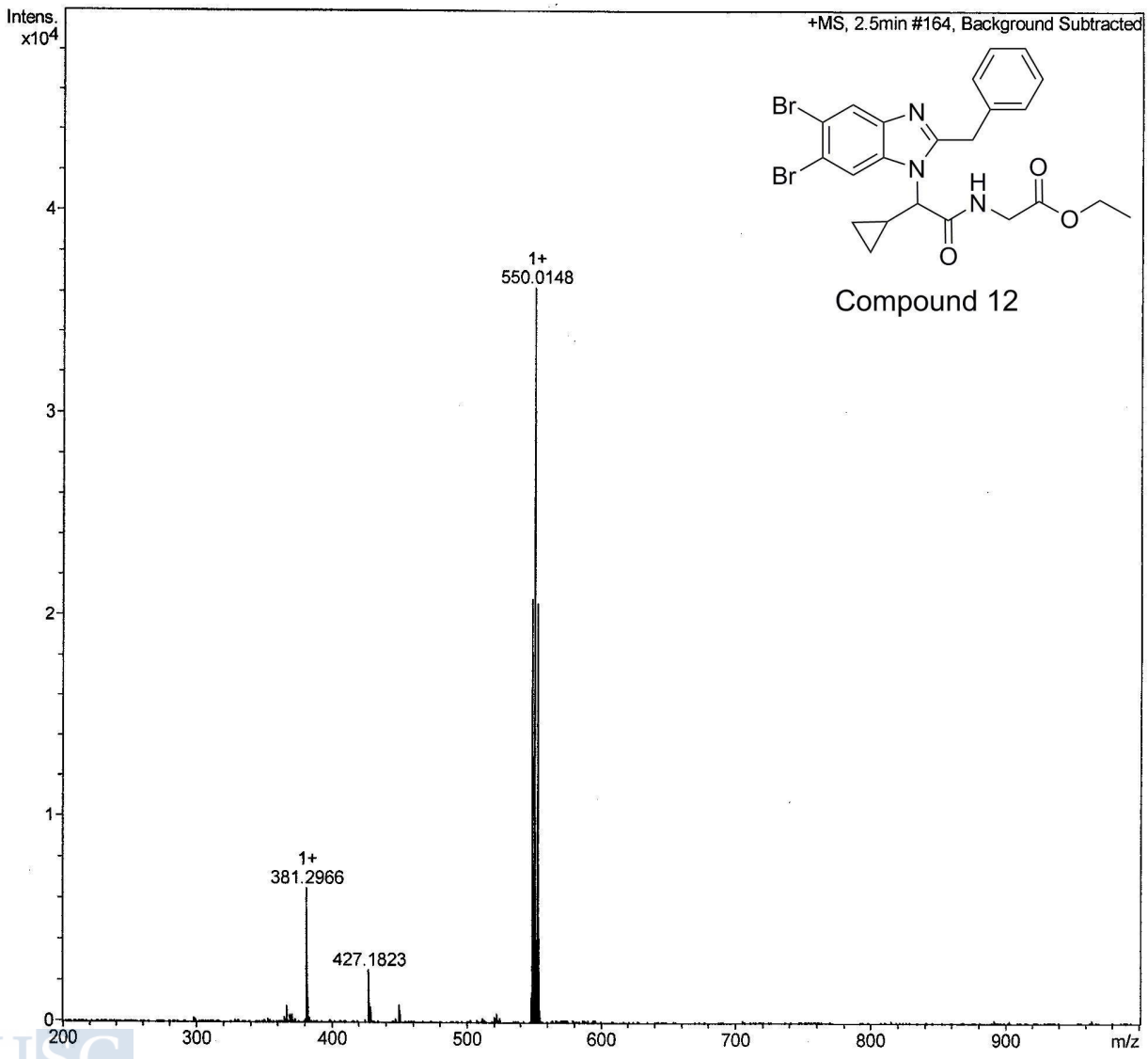


RIAIDT
UNIDADE DE ESPECTROMETRIA DE MASAS E PROTEÓMICA
Edificio CACTUS * Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (Spain)
Tel. 981 563 100. Ext. 16242 * Fax 981 528098
E-mail: sxemasas@usc.es
Web: http://www.ti.usc.es/riaidt/masas/masas.htm

ESPECTRO ESI-FIA-TOF-Medida de Masas Exactas

Analysis Info

Sample Name	AK127_549_1-E,3_01_6600.d	Acquisition Date	10/4/2012 1:46:01 PM
Method	fia_pos_medio_350-1500_egf.m	Instrument	micrOTOF



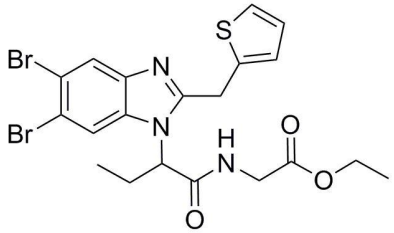
Meas. m/z	#	Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
548.0174	1	C 23 H 24 Br 2 N 3 O 3	100.00	548.0179	0.5	1.0	37.5	12.5	even	ok

Used

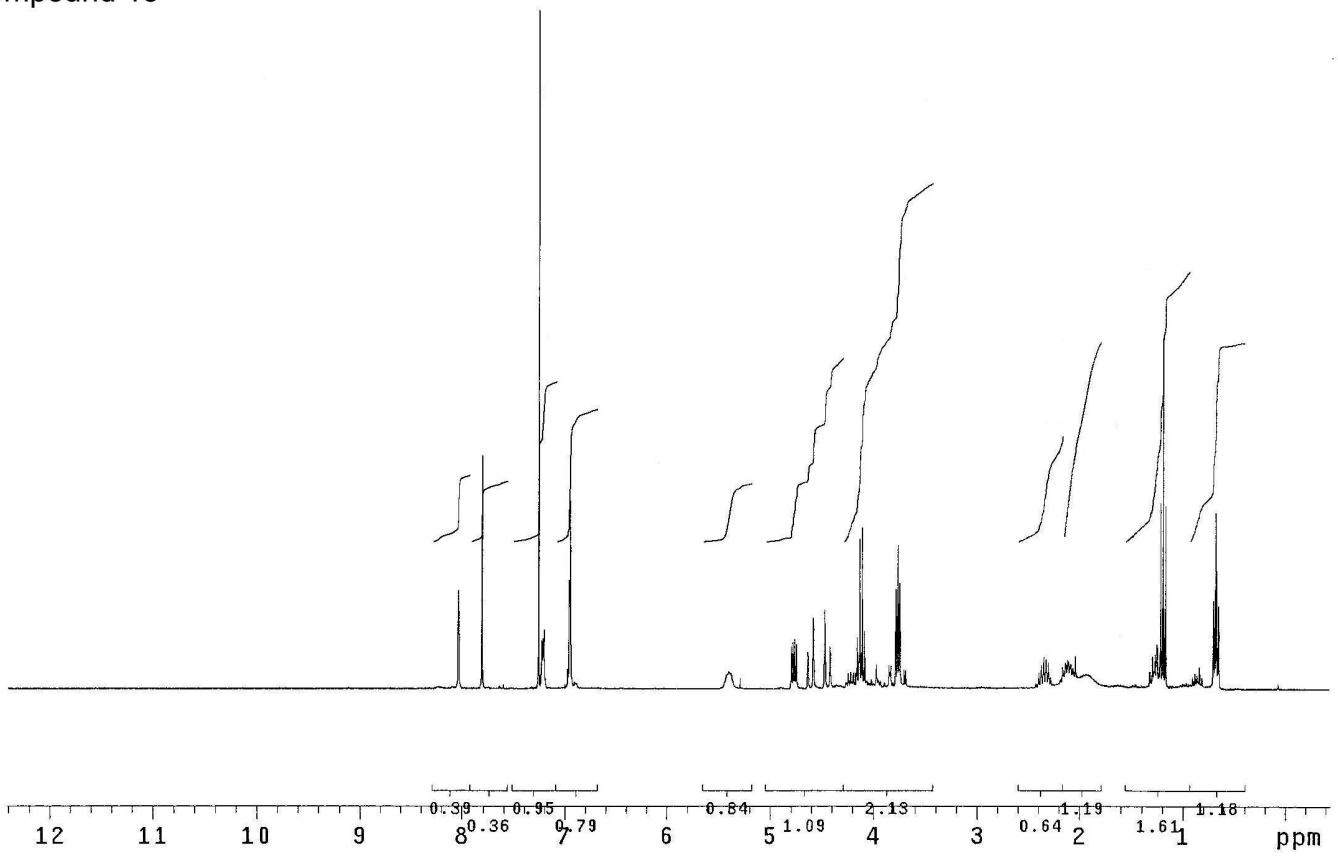
sy1ak128

exp1 s2pul

SAMPLE		DEC. & VT	
date	Mar 20 2012	dfrq	75.454
solvent	cdcl3	dn	C13
file	exp	dpwr	37
ACQUISITION		dof	0
sfrq	300.048	dm	nnn
tn	H1	dmm	c
at	1.998	dmf	13900
np	21576	temp	25.0
sw	5399.6	PROCESSING	
fb	3000	lb	0.20
bs	1	wtfile	
tpwr	59	proc	ft
pw	4.4	fn	not used
d1	1.000		
tof	659.7	werr	
nt	100	wexp	
ct	24	wbs	
alock	n	wnt	
gain	not used		
FLAGS			
il	n		
in	n		
dp	y		
DISPLAY			
sp	-132.2		
wp	3854.6		
vs	52		
sc	0		
wc	180		
hzmm	21.41		
is	567.56		
rfl	599.6		
rfp	0		
th	2		
ins	1.000		
ai	ph		



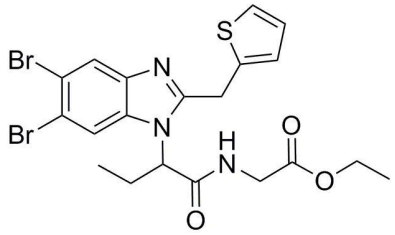
Compound 13



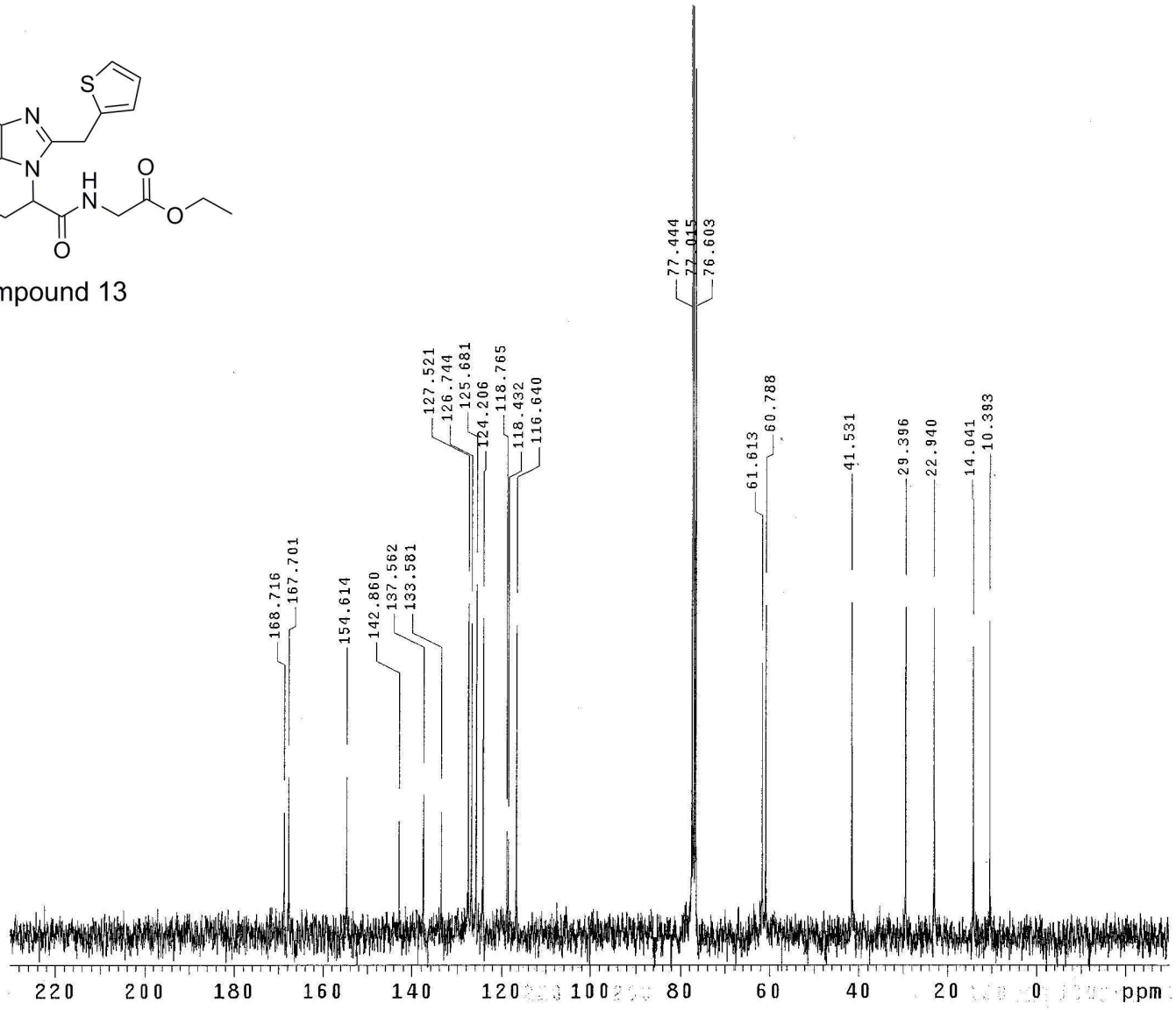
sy1AK128

exp7 CARBON

SAMPLE		PRESATURATION	
date	Nov 25 2013	satmode	n
solvent	cdcl3	wet	n
file	exp	SPECIAL	
ACQUISITION		temp	25.0
sw	19607.8	gain	36
at	0.836	spin	not used
np	32768	hst	0.008
fb	10800	pw90	11.800
bs	1	alfa	10.000
d1	1.000	FLAGS	
nt	20000	il	n
ct	711	in	n
TRANSMITTER		dp	y
tn	C13	hs	nn
sfrq	75.454	PROCESSING	
tof	409.4	lb	3.00
tpwr	52	fn	not used
pw	5.244	DISPLAY	
DECOUPLER		sp	-2258.1
dn	H1	wp	19606.6
dof	-800.0	rfl	2259.3
dm	yyy	rfp	0
decwave	w	rp	136.5
dpwr	36	lp	-285.2
dmf	9885	PLOT	
		wc	180
		sc	0
		vs	929
		th	10
		ai cdc ph	



Compound 13

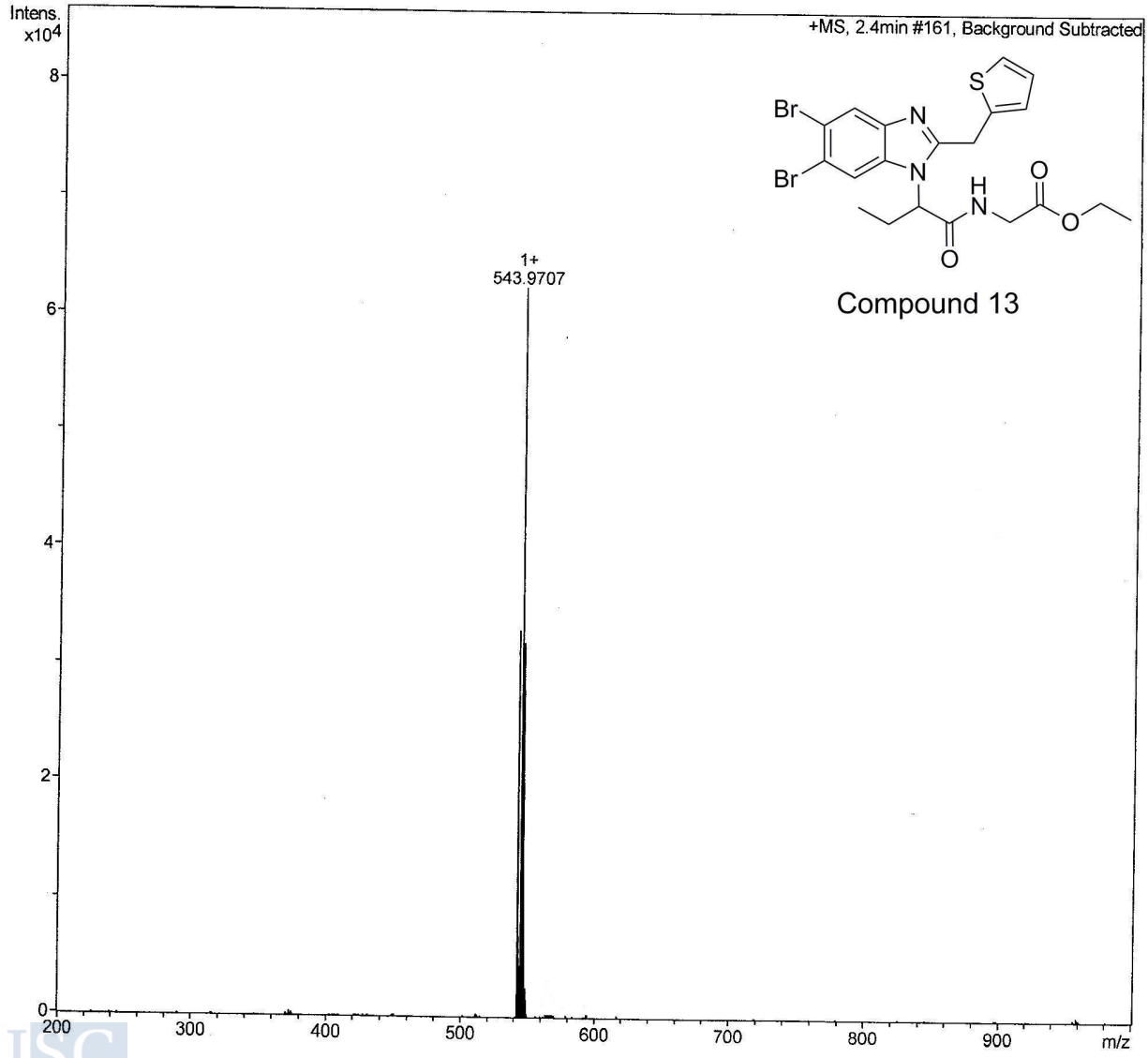


RIAIDT
UNIDADE DE ESPECTROMETRIA DE MASAS E PROTEÓMICA
Edificio CACTUS * Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (Spain)
Tel. 981 563 100. Ext. 16242 * Fax 981 528098
E-mail: sxemasas@usc.es
Web: http://www.ti.usc.es/riaidt/masas/masas.htm

ESPECTRO ESI-FIA-TOF-Medida de Masas Exactas

Analysis Info

Sample Name	AK128_543_1-E,4_01_6601.d	Acquisition Date	10/4/2012 1:55:23 PM
Method	fia_pos_medio_350-1500_egf.m	Instrument	micrOTOF



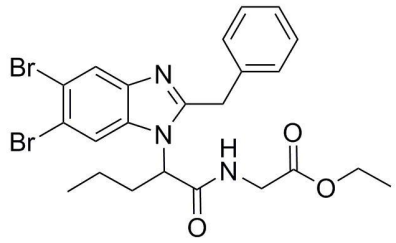
Compound 13

Meas. m/z	#	Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
541.9730	1	C 20 H 22 Br 2 N 3 O 3 S	100.00	541.9743	1.3	2.5	19.3	10.5	even	ok

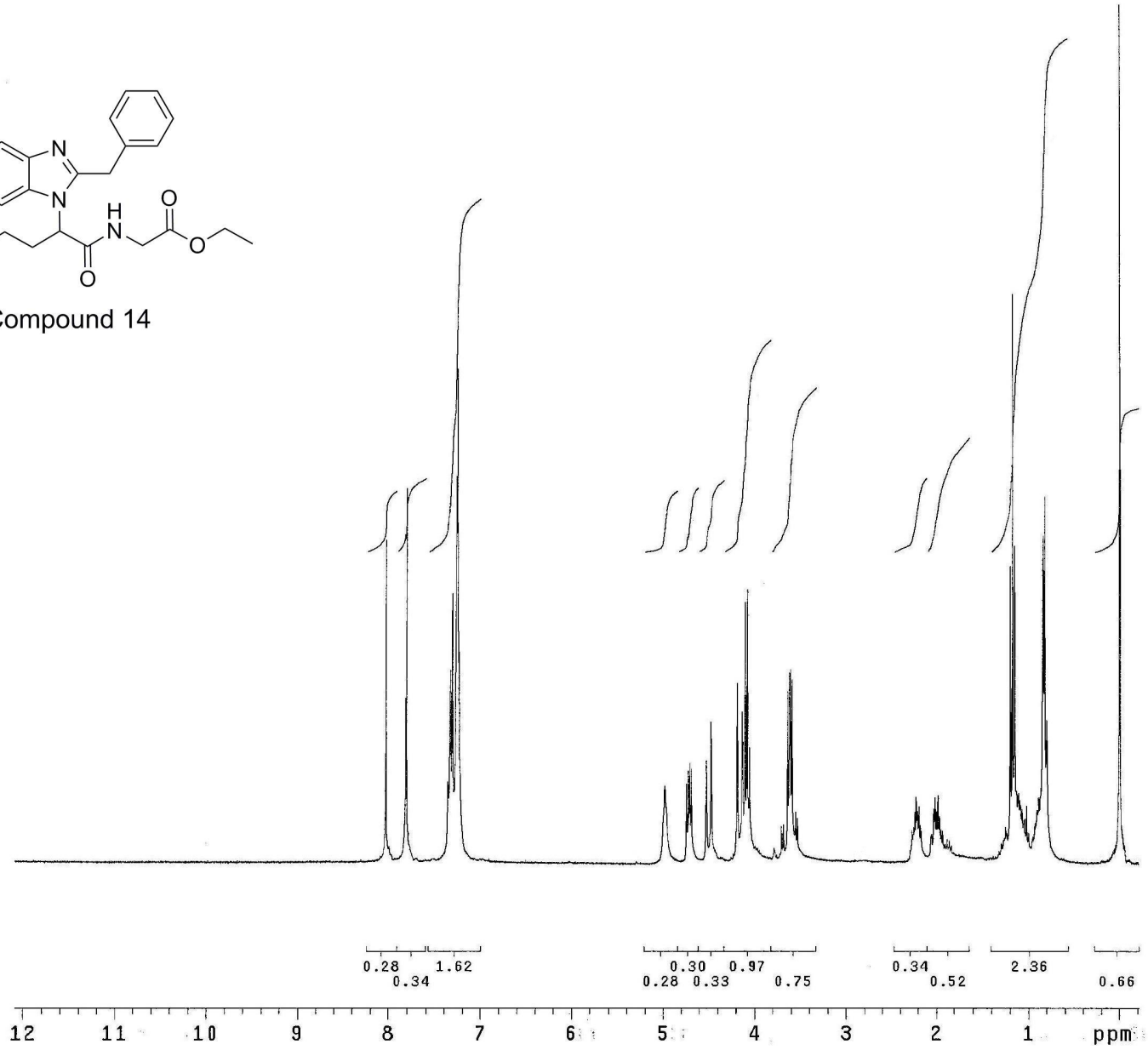
AK136

exp3 PROTON

SAMPLE		DEC. & VT	
date	Sep 9 2013	dfrq	75.454
solvent	cdcl3	dn	C13
file	exp	dpwr	37
ACQUISITION		dof	0
sfrq	300.048	dm	nnn
tn	H1	dmm	c
at	1.400	dmf	13900
np	12602	temp	25.0
sw	4500.5	PROCESSING	
fb	2600	wtfile	
bs	1	proc	ft
tpwr	57	fn	not used
pw	5.0		
d1	1.000	werr	
tof	509.8	wexp	
nt	100	wbs	
ct	67	wnt	
alock	n		
gain	not used		
FLAGS			
il	n		
in	n		
dp	y		
DISPLAY			
sp	-65.9		
wp	3692.9		
vs	294		
sc	0		
wc	180		
hzmm	20.52		
is	862.31		
rfl	299.9		
rfp	0		
th	4		
ins	1.000		
ai	ph		



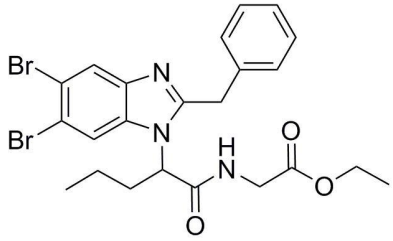
Compound 14



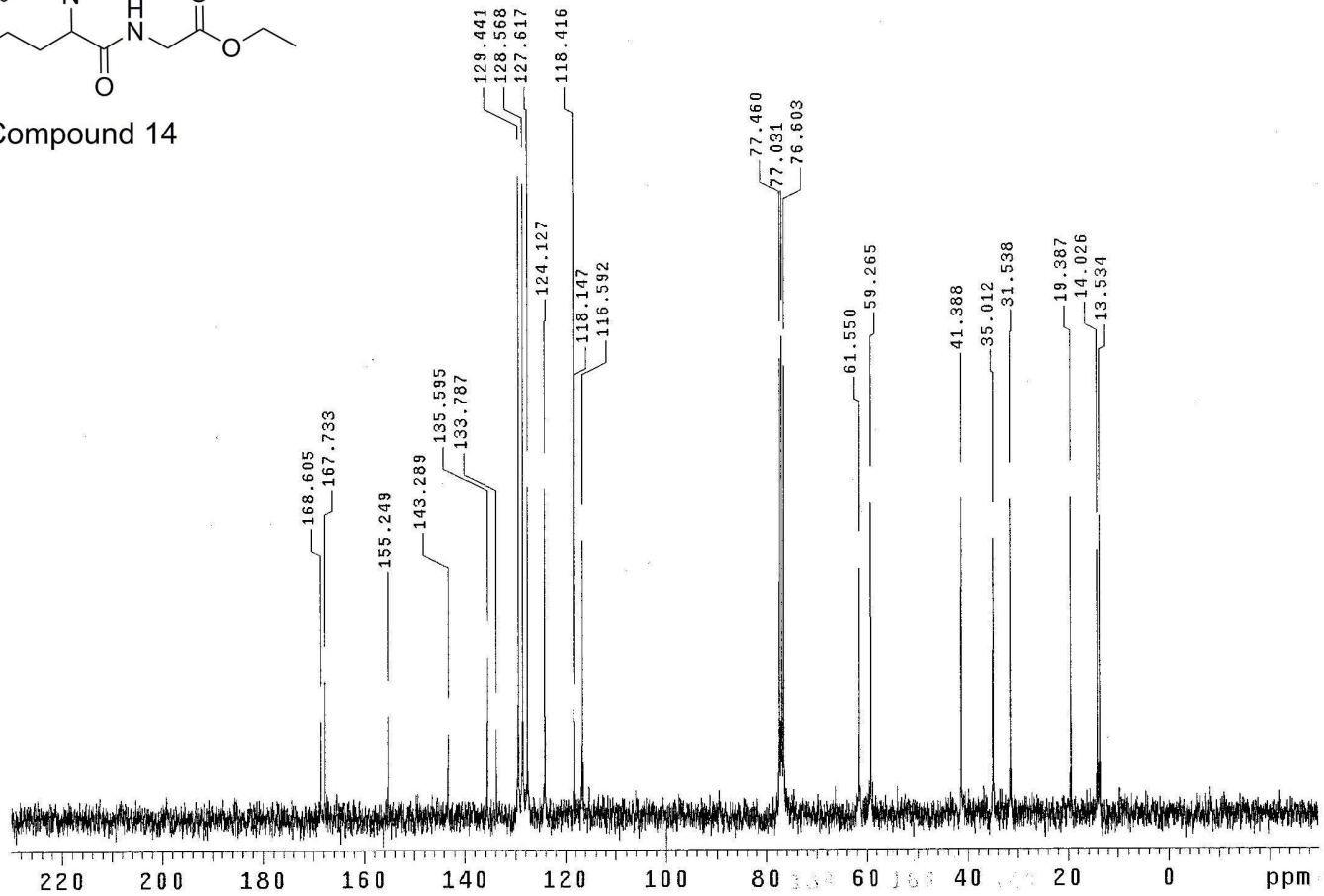
sy1AK136

exp7 CARBON

SAMPLE		PRESATURATION	
date	Nov 25 2013	satmode	n
solvent	cdcl3	wet	n
file	exp	SPECIAL	
ACQUISITION		temp	25.0
sw	19607.8	gain	36
at	0.836	spin	not used
np	32768	hst	0.008
fb	10800	pw90	11.800
bs	1	alfa	10.000
d1	1.000	FLAGS	
nt	1000	il	n
ct	813	in	n
TRANSMITTER		dp	y
tn	C13	hs	nn
sfrq	75.454	PROCESSING	
tof	409.4	lb	2.00
tpwr	52	fn	not used
pw	5.244	DISPLAY	
DECOUPLER		sp	-2258.1
dn	H1	wp	19606.6
dof	-800.0	rfl	2259.3
dm	yyy	rfp	0
decwave	w	rp	145.7
dpwr	36	lp	-342.8
dmf	9885	PLOT	
		wc	180
		sc	0
		vs	573
		th	5
		ai cdc ph	



Compound 14

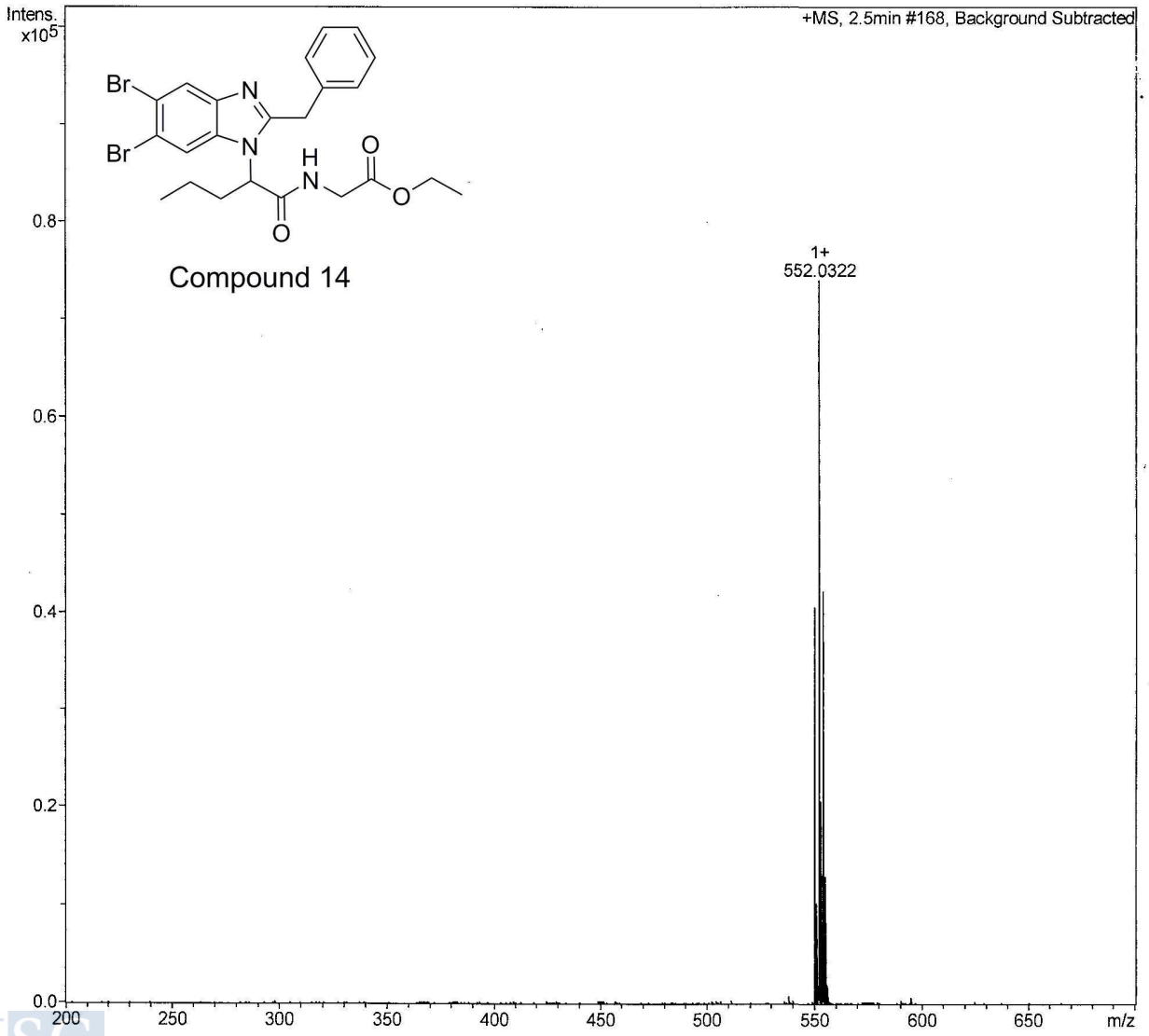


RIAIDT
UNIDADE DE ESPECTROMETRIA DE MASAS E PROTEÓMICA
Edificio CACTUS * Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (Spain
Tel. 981 563 100. Ext. 16242 * Fax 981 52809
E-mail: sxemasas@u.
Web: http://www.ti.usc.es/riaidt/masas/masas.h

ESPECTRO ESI-FIA-TOF-Medida de Masas Exactas

Analysis Info

Sample Name	AK136_551_1-F,10_01_6647.d	Acquisition Date	10/5/2012 11:56:45 AM
Method	fia_pos_medio_350-1500_egf.m	Instrument	micrOTOF



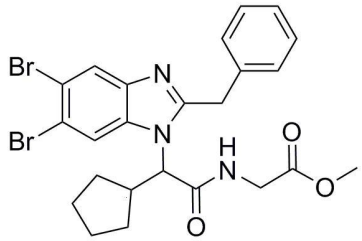
Meas. m/z	#	Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
550.0333	1	C 23 H 26 Br 2 N 3 O 3	100.00	550.0335	0.3	0.5	35.1	11.5	even	ok

USC UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

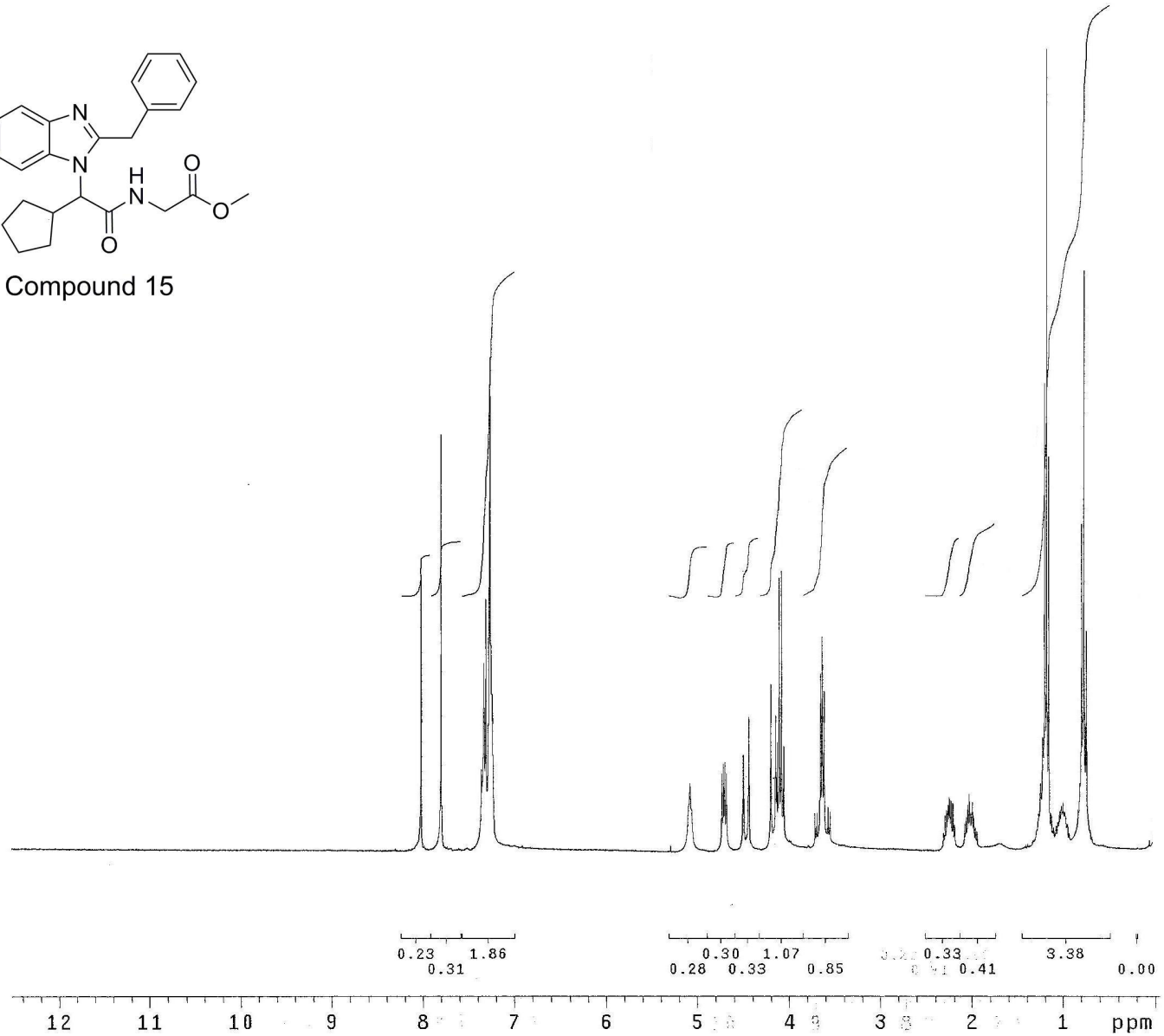
```
sy1AK137

exp1  PROTON

      SAMPLE                    DEC. & VT
date    Dec 10 2013       dfrq          75.454
solvent       cdcl3       dn               C13
file            exp       dpwr              37
   ACQUISITION            dof                0
sfrq        300.048       dm               nnn
tn               H1       dmm                c
at            1.820       dmf            13900
np            16384       temp            25.0
sw           4500.5           PROCESSING
fb             2600       wtfile
bs                1       proc              ft
tpwr             57       fn         not used
pw              5.0
d1            1.000       werr
tof           509.8       wexp
nt              100       wbs
ct               40       wnt
alock             n
gain       not used
      FLAGS
il                n
in                n
dp                y
     DISPLAY
sp            -13.7
wp           3771.4
vs              189
sc                0
wc              180
hzmm          20.95
is           678.53
rfl           299.9
rfp               0
th                5
ins           1.000
ai    ph
```



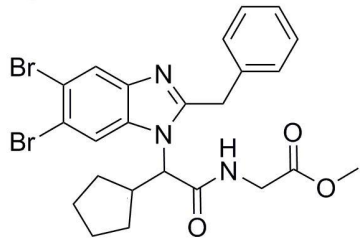
Compound 15



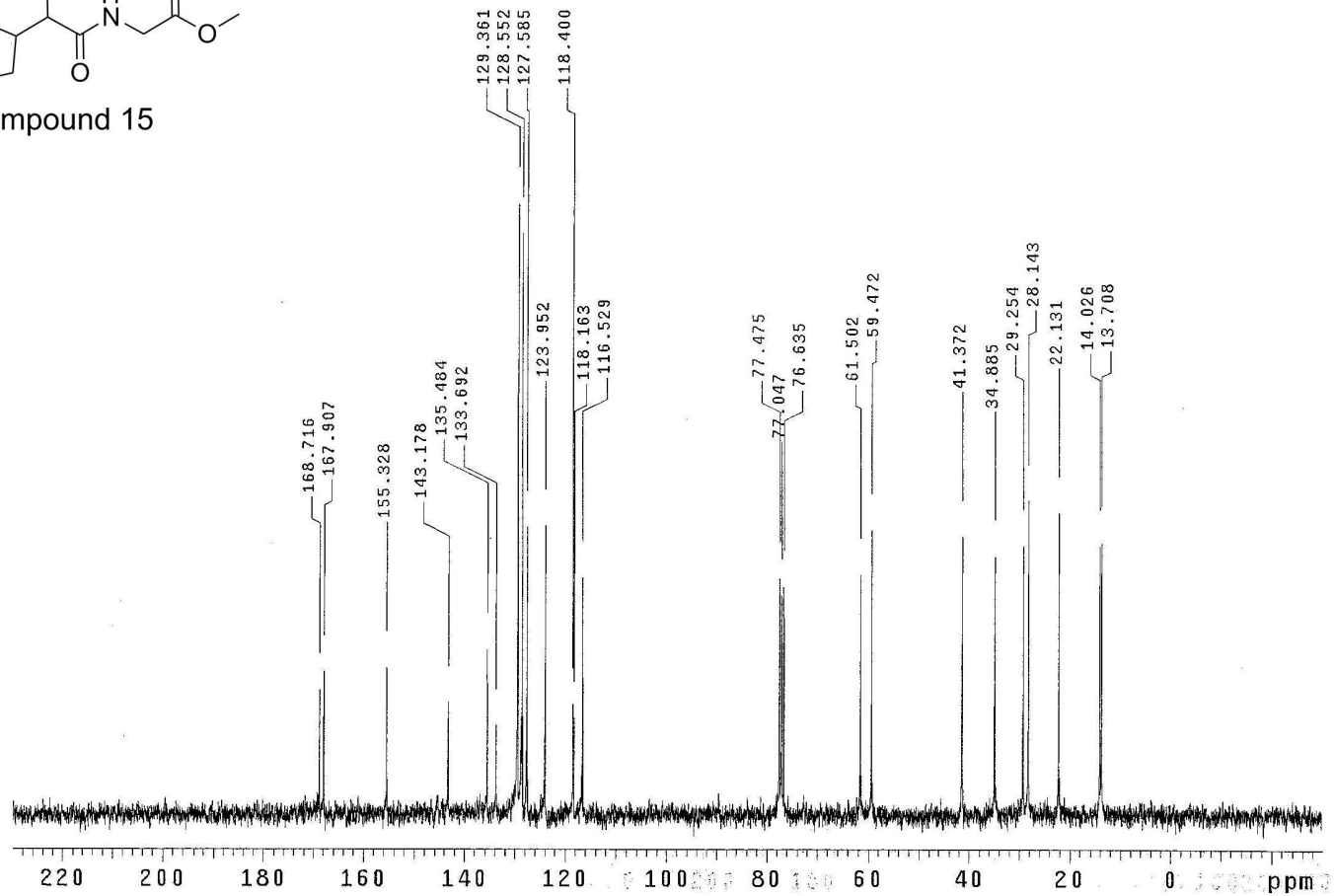
sy1AK137

exp2 CARBON

SAMPLE		PRESATURATION	
date	Nov 26 2013	satmode	n
solvent	cdcl3	wet	n
file	exp	SPECIAL	
ACQUISITION		temp	25.0
sw	19607.8	gain	36
at	0.836	spin	not used
np	32768	hst	0.008
fb	10800	pw90	11.800
bs	1	alfa	10.000
d1	1.000	FLAGS	
nt	2000	il	n
ct	409	in	n
TRANSMITTER		dp	y
tn	C13	hs	nn
sfrq	75.454	PROCESSING	
tof	409.4	lb	2.00
tpwr	52	fn	not used
pw	5.244	DISPLAY	
DECOUPLER		sp	-2258.1
dn	H1	wp	19606.6
dof	-800.0	rfl	2259.3
dm	yyy	rfp	0
decwave	w	rp	129.3
dpwr	36	lp	-284.2
dmf	9885	PLOT	
		wc	180
		sc	0
		vs	280
		th	5
		ai cdc ph	



Compound 15

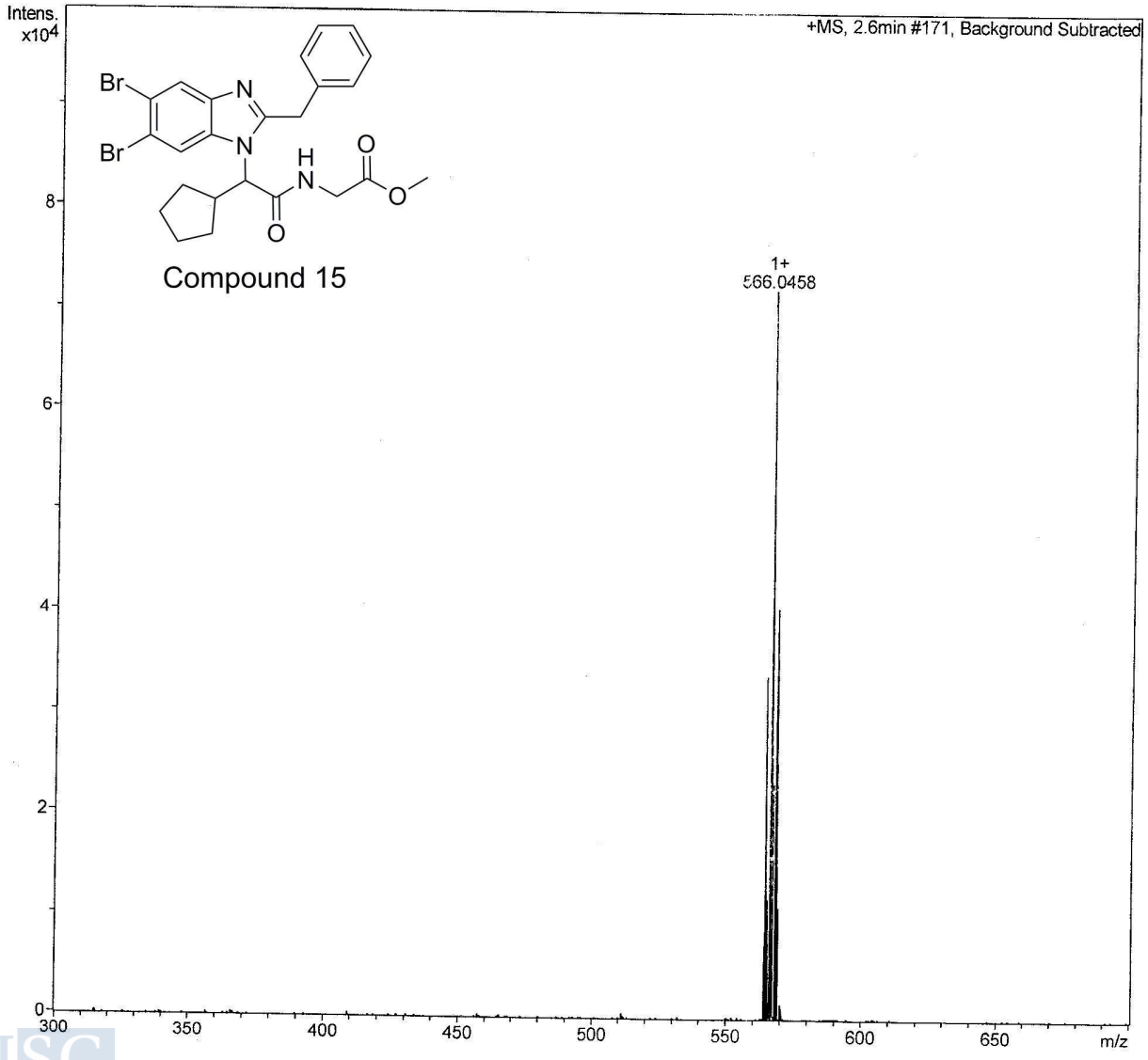


RIAIDT
UNIDADE DE ESPECTROMETRIA DE MASAS E PROTEÓMICA
Edificio CACTUS * Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (Spain)
Tel. 981 563 100. Ext. 16242 * Fax 981 528098
E-mail: sxemasas@usc.es
Web: http://www.ti.usc.es/riaidt/masas/masas.htm

ESPECTRO ESI-FIA-TOF-Medida de Masas Exactas

Analysis Info

Sample Name	AK137_563_1-F,9_01_6645.d	Acquisition Date	10/5/2012 11:38:00 AM
Method	fia_pos_medio_350-1500_egf.m	Instrument	micrOTOF



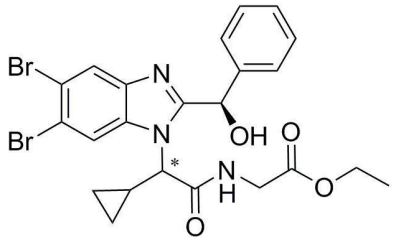
Meas. m/z	#	Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
564.0477	1	C 24 H 28 Br 2 N 3 O 3	100.00	564.0492	1.5	2.7	33.6	11.5	even	ok

USC

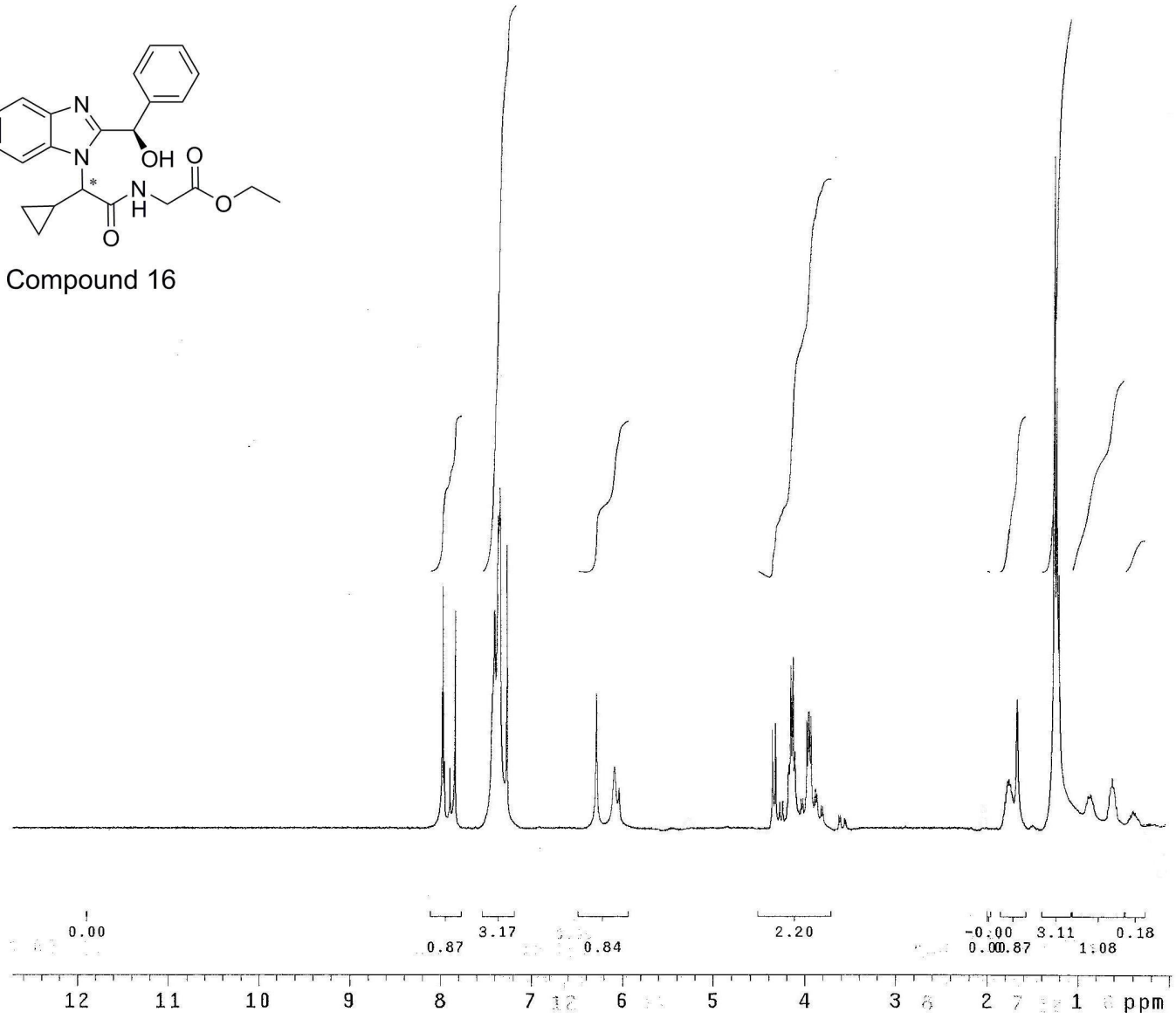
sy1AK147a

exp2 PROTON

SAMPLE		DEC. & VT	
date	Oct 8 2013	dfrq	75.454
solvent	cdcl3	dn	C13
file	/home/vnmr2/s~ y1AK147_a/1H.fid	dpwr	37
		dof	0
ACQUISITION		dm	nnn
sfrq	300.048	dmm	c
tn	H1	dmf	13900
at	1.820	temp	25.0
np	16384	PROCESSING	
sw	4500.5	wtfile	
fb	2600	proc	ft
bs	1	fn	not used
tpwr	57		
pw	5.0	werr	
d1	1.000	wexp	
tof	509.8	wbs	
nt	100	wnt	
ct	93		
alock	n		
gain	not used		
FLAGS			
il	n		
in	n		
dp	y		
DISPLAY			
sp	-8.2		
wp	3824.2		
vs	161		
sc	0		
wc	180		
hzmm	21.25		
is	686.71		
rfl	299.9		
rfp	0		
th	5		
ins	1.000		
ai	ph		



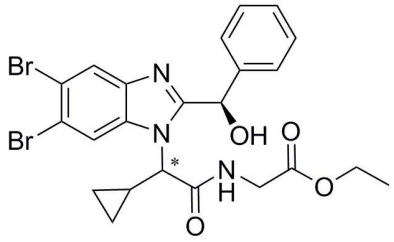
Compound 16



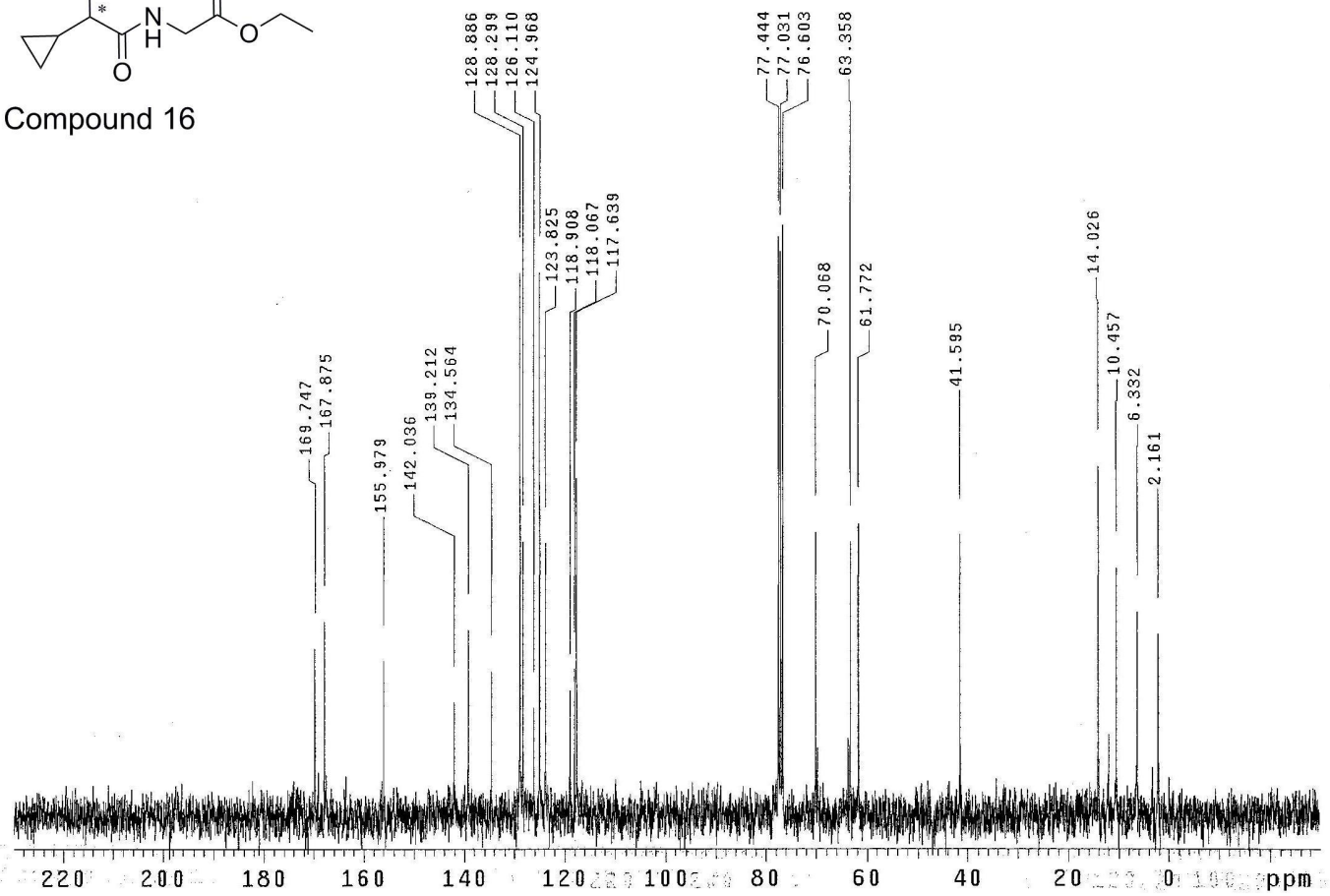
AK147a

exp2 CARBON

SAMPLE		PRESATURATION	
date	Nov 29 2013	satmode	n
solvent	cdcl3	wet	n
file	exp	SPECIAL	
ACQUISITION		temp	25.0
sw	19607.8	gain	36
at	0.836	spin	20
np	32768	hst	0.008
fb	10800	pw90	11.800
bs	1	alfa	10.000
d1	1.000	FLAGS	
nt	3000	il	n
ct	394	in	n
TRANSMITTER		dp	y
tn	C13	hs	nn
sfrq	75.454	PROCESSING	
tof	409.4	lb	2.00
tpwr	52	fn	not used
pw	5.244	DISPLAY	
DECOUPLER		sp	-2258.1
dn	H1	wp	19606.6
dof	-800.0	rfl	2259.3
dm	yyy	rfp	0
decwave	w	rp	159.5
dpwr	36	lp	-356.4
dmf	9885	PLOT	
		wc	180
		sc	0
		vs	592
		th	14
		ai cdc ph	



Compound 16

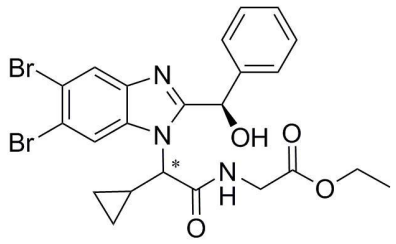


USC UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

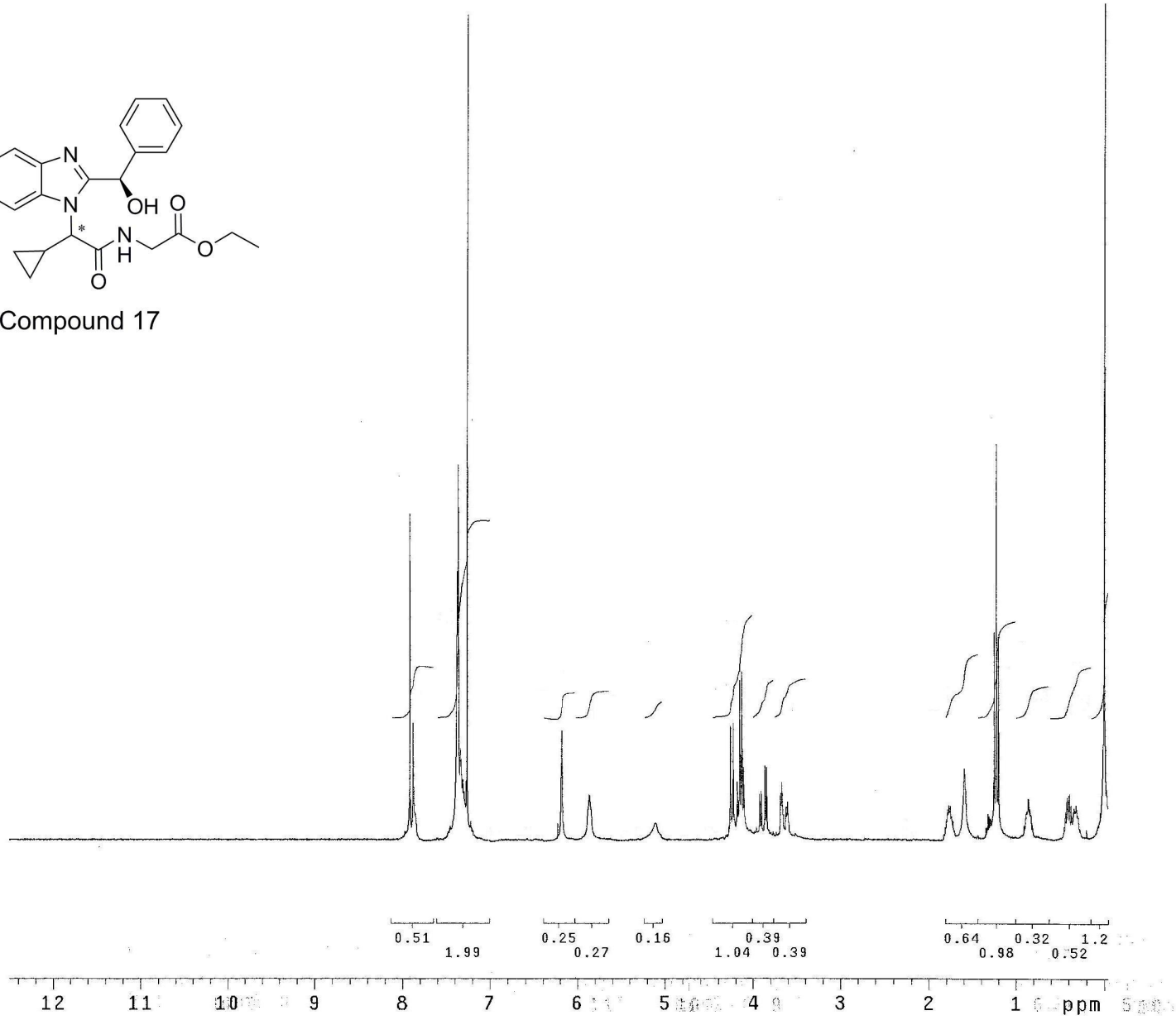
sy1AK147b

exp2 PROTON

SAMPLE		DEC. & VT	
date	Oct 8 2013	dfrq	75.454
solvent	cdcl3	dn	C13
file	/home/vnmr2/s~ y1AK147_b/1H.fid	dpwr	37
		dof	0
ACQUISITION		dm	nnn
sfrq	300.048	dmm	c
tn	H1	dmf	13900
at	1.820	temp	25.0
np	16384	PROCESSING	
sw	4500.5	wtfile	
fb	2600	proc	ft
bs	1	fn	not used
tpwr	57		
pw	5.0	werr	
d1	1.000	wexp	
tof	509.8	wbs	
nt	100	wnt	
ct	100		
alock	n		
gain	not used		
FLAGS			
il	n		
in	n		
dp	y		
DISPLAY			
sp	-13.2		
wp	3764.8		
vs	161		
sc	0		
wc	180		
hzmm	20.92		
is	403.16		
rfl	299.9		
rfp	0		
th	5		
ins	1.000		
ai	ph		



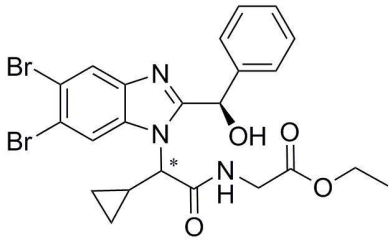
Compound 17



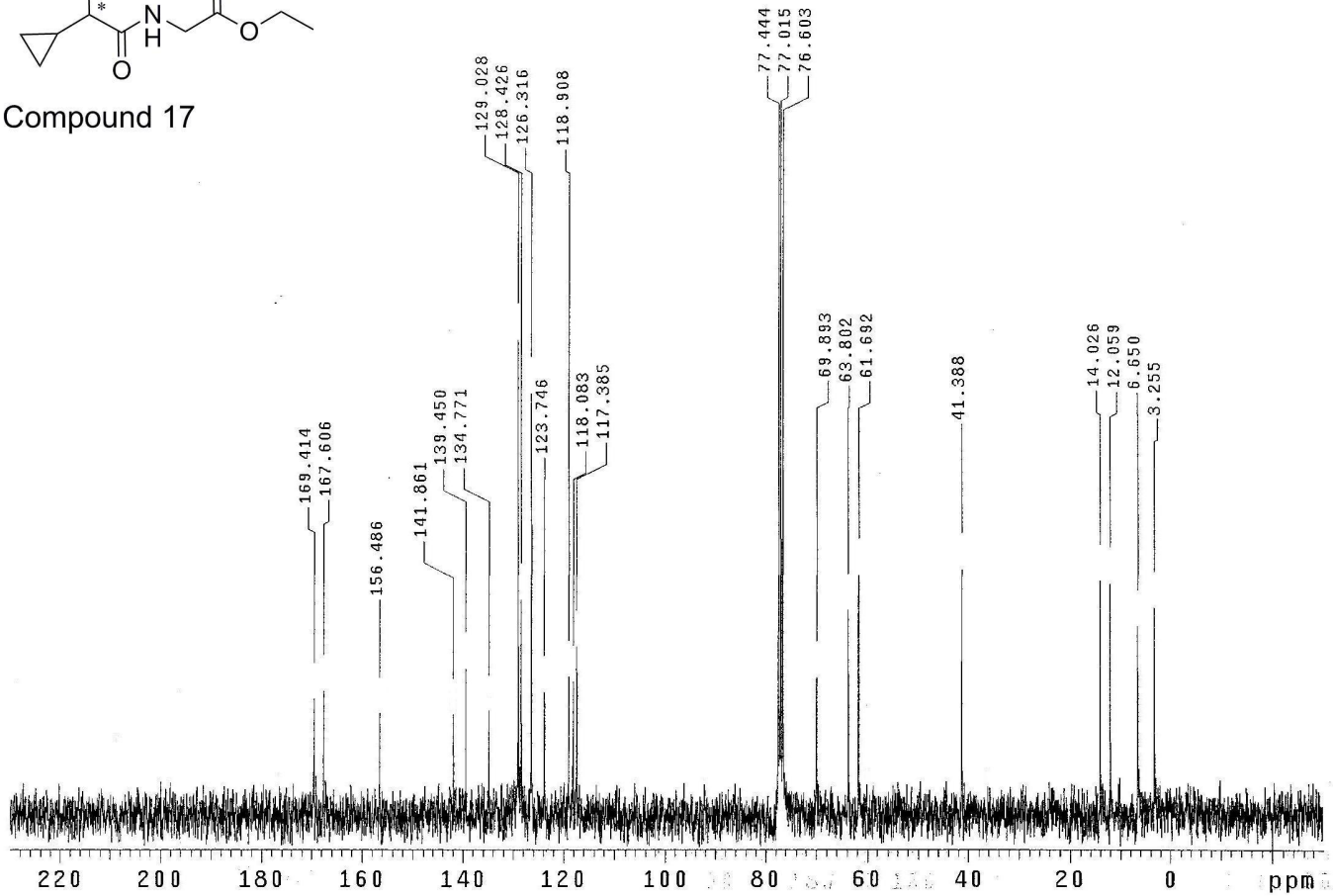
AK147b

exp2 CARBON

SAMPLE		PRESATURATION	
date	Nov 29 2013	satmode	n
solvent	cdcl3	wet	n
file	exp	SPECIAL	
ACQUISITION		temp	25.0
sw	19607.8	gain	36
at	0.836	spin	20
np	32768	hst	0.008
fb	10800	pw90	11.800
bs	1	alfa	10.000
d1	1.000	FLAGS	
nt	2000	il	n
ct	513	in	n
TRANSMITTER		dp	y
tn	C13	hs	nn
sfrq	75.454	PROCESSING	
tof	409.4	lb	2.00
tpwr	52	fn	not used
pw	5.244	DISPLAY	
DECOUPLER		sp	-2258.1
dn	H1	wp	19606.6
dof	-800.0	rfl	2259.3
dm	yyy	rfp	0
decwave	w	rp	98.4
dpwr	36	lp	-247.1
dmf	9885	PLOT	
		wc	180
		sc	0
		vs	713
		th	9
		ai cdc ph	



Compound 17

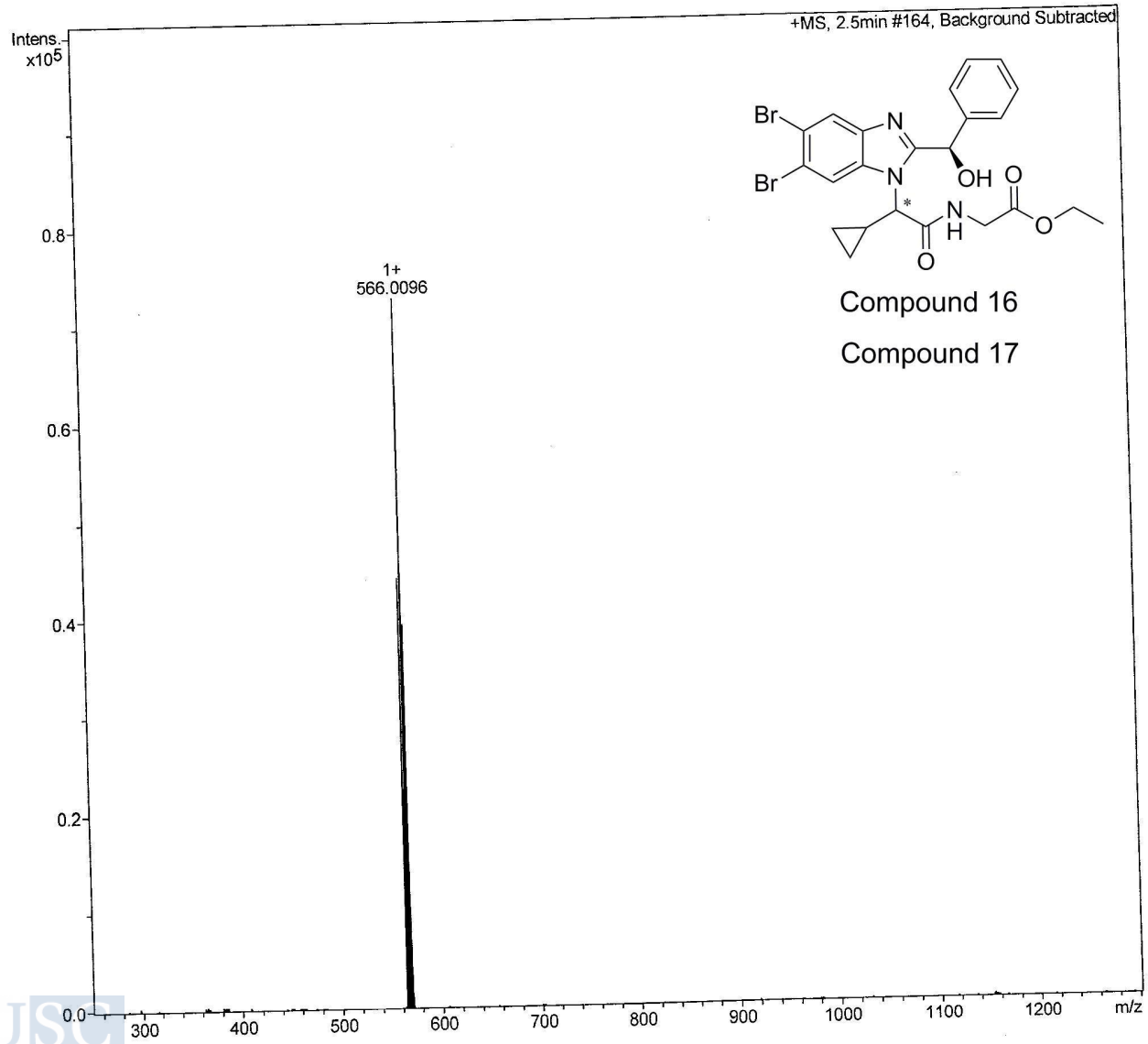


RIAIDT
UNIDADE DE ESPECTROMETRIA DE MASAS E PROTEÓMICA
Edificio CACTUS * Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (Spain)
Tel. 981 563 100. Ext. 16242 * Fax 981 528098
E-mail: sxemasas@usc.es
Web: http://www.ti.usc.es/riaidt/masas/masas.htm

ESPECTRO ESI-FIA-TOF-Medida de Masas Exactas

Analysis Info

Sample Name	AK147_565_1-G,11_01_6667.d	Acquisition Date	10/5/2012 4:46:59 PM
Method	fia_pos_medio_350-1500_egf.m	Instrument	micrOTOF

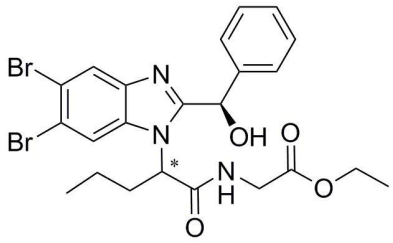


Meas. m/z	#	Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
564.0114	1	C 23 H 24 Br 2 N 3 O 4	100.00	564.0128	1.4	2.4	46.6	12.5	even	ok

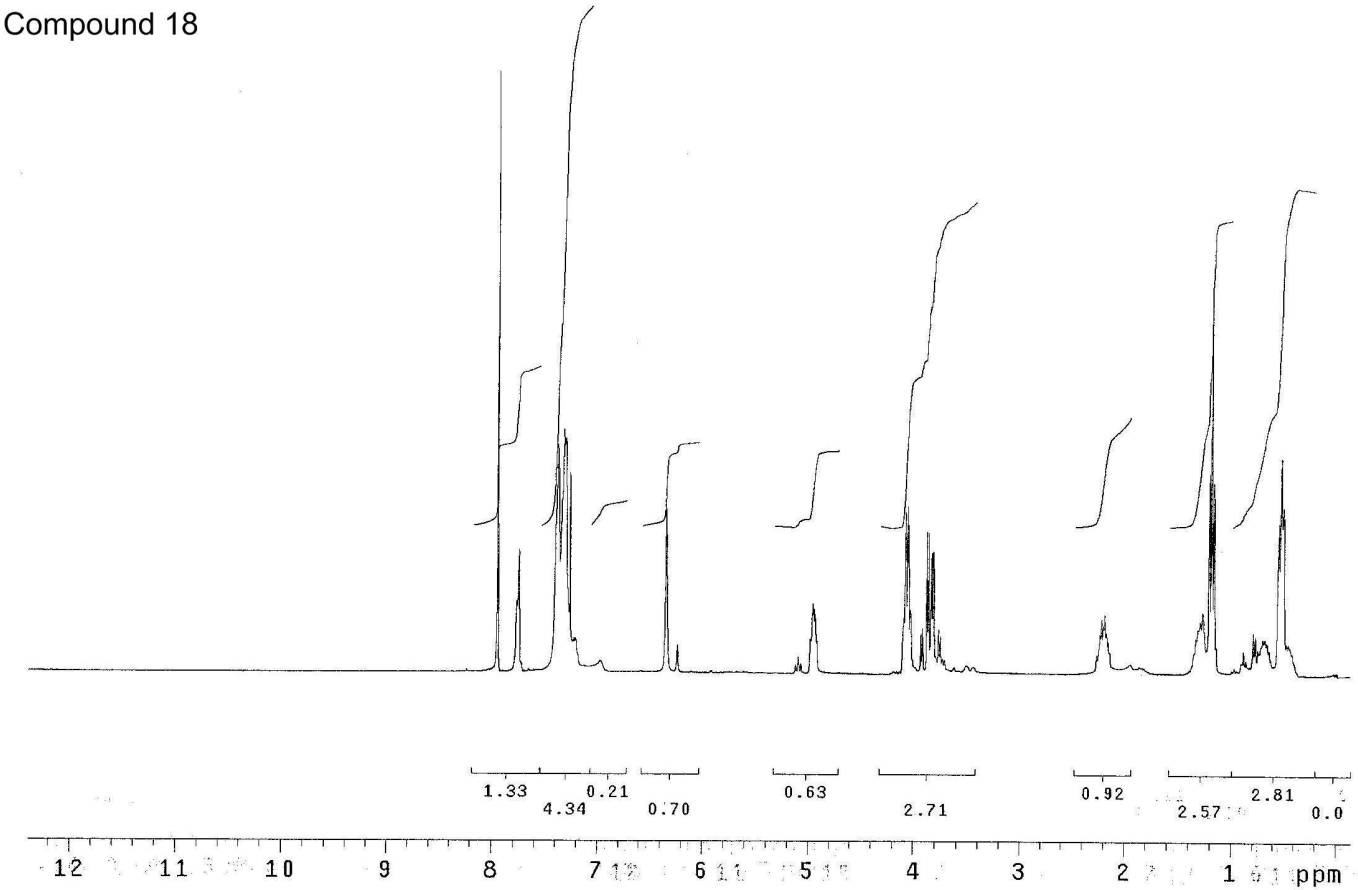
sy1AK174a

exp3 PROTON

SAMPLE		DEC. & VT	
date	Nov 22 2013	dfrq	75.454
solvent	cdcl3	dn	C13
file	exp	dpwr	37
ACQUISITION		dof	0
sfrq	300.048	dm	nnn
tn	H1	dmm	c
at	1.820	dmf	13900
np	16384	temp	25.0
sw	4500.5	PROCESSING	
fb	2600	wtfile	
bs	1	proc	ft
tpwr	57	fn	not used
pw	5.0		
d1	1.000	werr	
tof	509.8	wexp	
nt	100	wbs	
ct	71	wnt	
alock	n		
gain	not used		
FLAGS			
il	n		
in	n		
dp	y		
DISPLAY			
sp	-43.9		
wp	3759.9		
vs	95		
sc	0		
wc	180		
hzmm	20.89		
is	403.16		
rfl	299.9		
rfp	0		
th	2		
ins	1.000		
ai	ph		



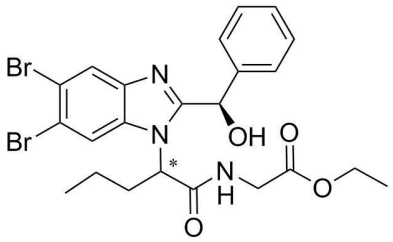
Compound 18



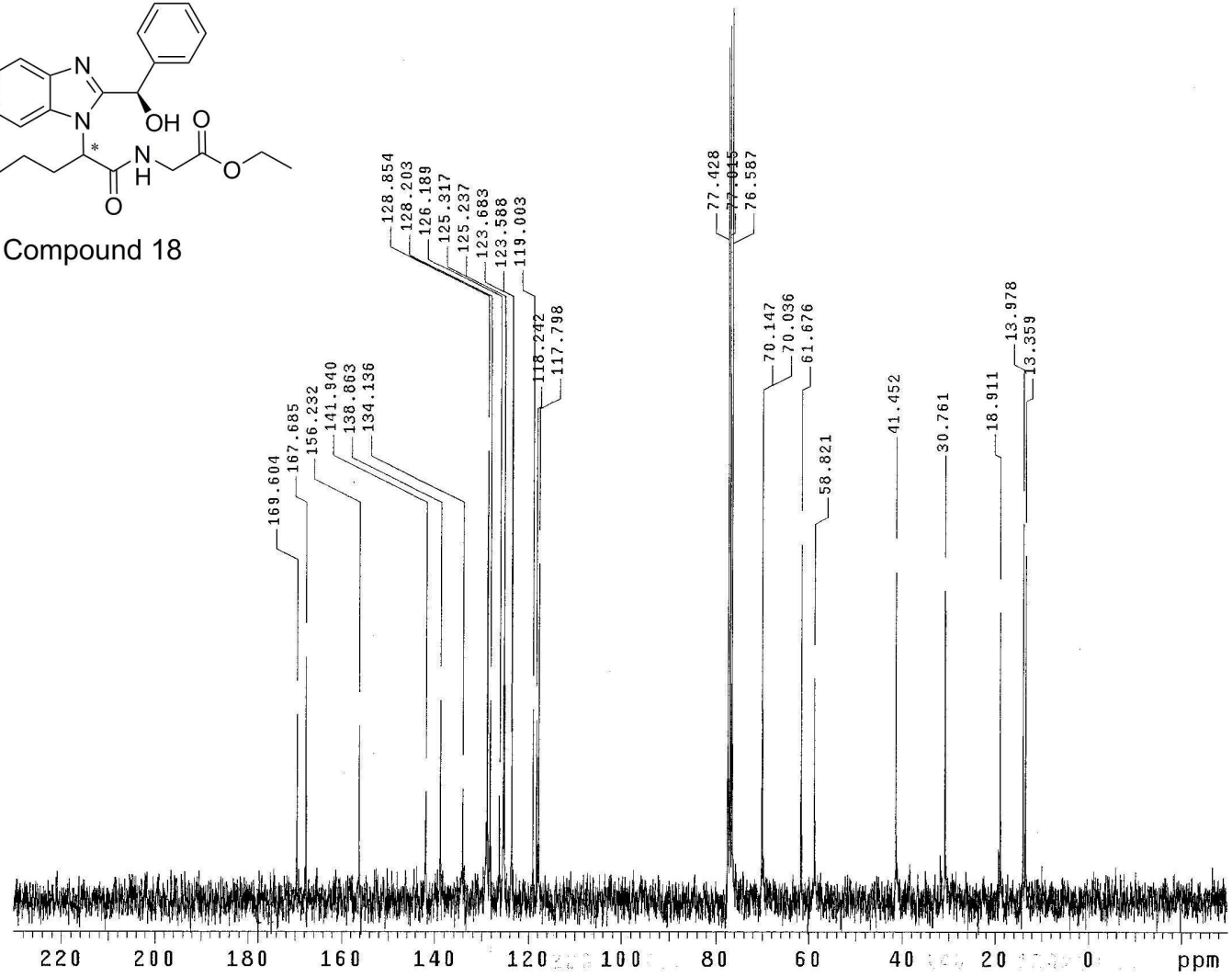
sy1AK174a

exp3 CARBON

SAMPLE		PRESATURATION	
date	Nov 22 2013	satmode	n
solvent	cdcl3	wet	n
file	exp	SPECIAL	
ACQUISITION		temp	25.0
sw	19607.8	gain	36
at	0.836	spin	not used
np	32768	hst	0.008
fb	10800	pw90	11.800
bs	1	alfa	10.000
d1	1.000	FLAGS	
nt	3000	il	n
ct	1027	in	n
TRANSMITTER		dp	y
tn	C13	hs	nn
sfrq	75.454	PROCESSING	
tof	409.4	lb	2.00
tpwr	52	fn	not used
pw	5.244	DISPLAY	
DECOUPLER		sp	-2258.1
dn	H1	wp	19606.6
dof	-800.0	rfl	2259.3
dm	yyy	rfp	0
decwave	w	rp	-611.0
dpwr	36	lp	-281.2
dmf	9885	PLOT	
		wc	180
		sc	0
		vs	913
		th	13
		ai cdc ph	



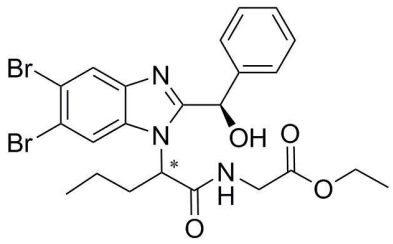
Compound 18



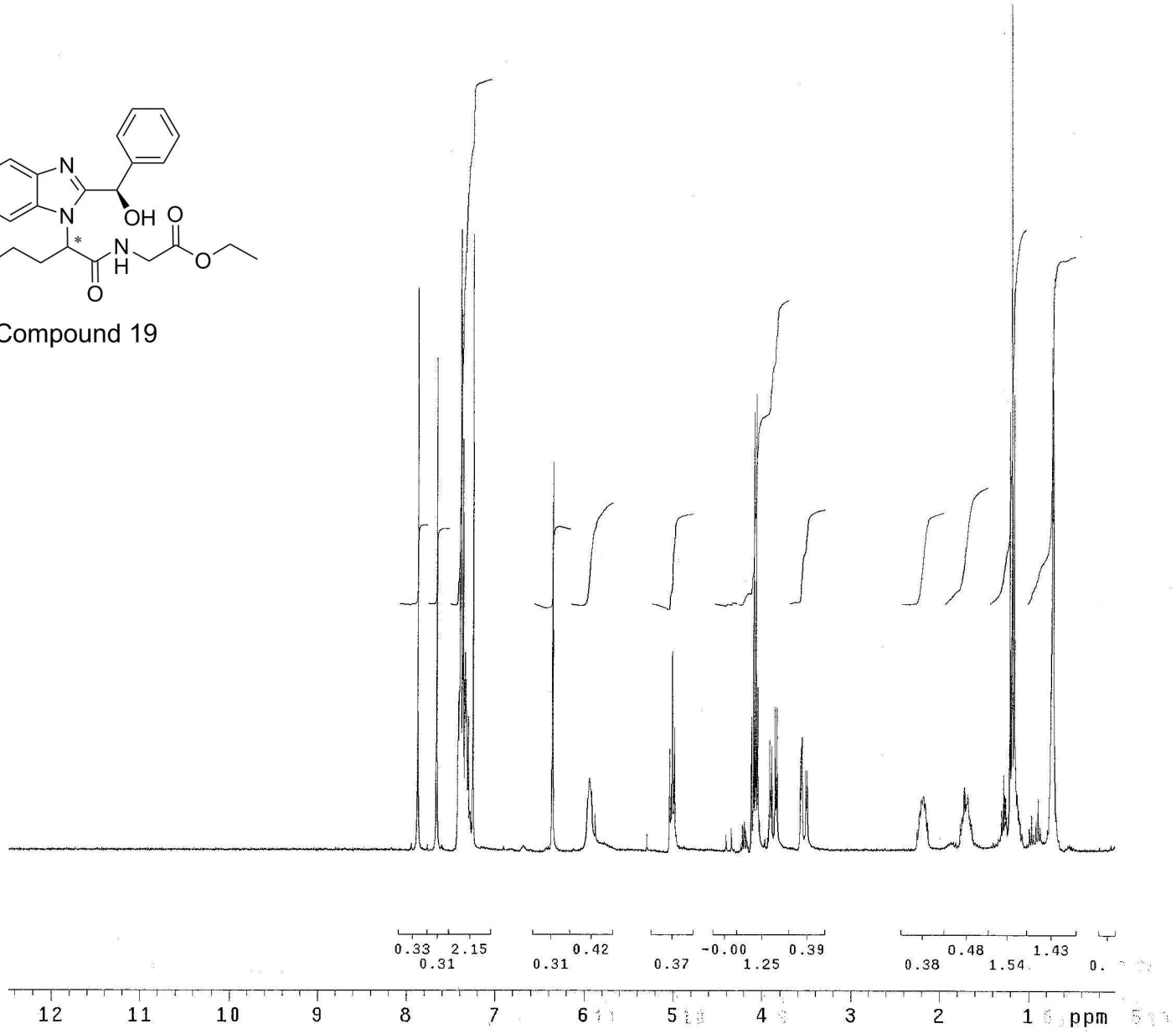
sy1AK174b

exp2 PROTON

SAMPLE		DEC. & VT	
date	Nov 26 2013	dfrq	75.454
solvent	cdcl3	dn	C13
file	exp	dpwr	37
ACQUISITION		dof	0
sfrq	300.048	dm	nnn
tn	H1	dmm	c
at	1.820	dmf	13900
np	16384	temp	25.0
sw	4500.5	PROCESSING	
fb	2600	wtfile	
bs	1	proc	ft
tpwr	57	fn	not used
pw	5.0		
d1	1.000	werr	
tof	509.8	wexp	
nt	100	wbs	
ct	35	wnt	
alock	n		
gain	not used		
FLAGS			
il	n		
in	n		
dp	y		
DISPLAY			
sp	5.5		
wp	3736.8		
vs	229		
sc	0		
wc	180		
hzmm	20.76		
is	979.05		
rfl	299.9		
rfp	0		
th	5		
ins	1.000		
ai	ph		



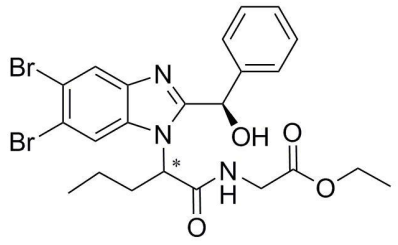
Compound 19



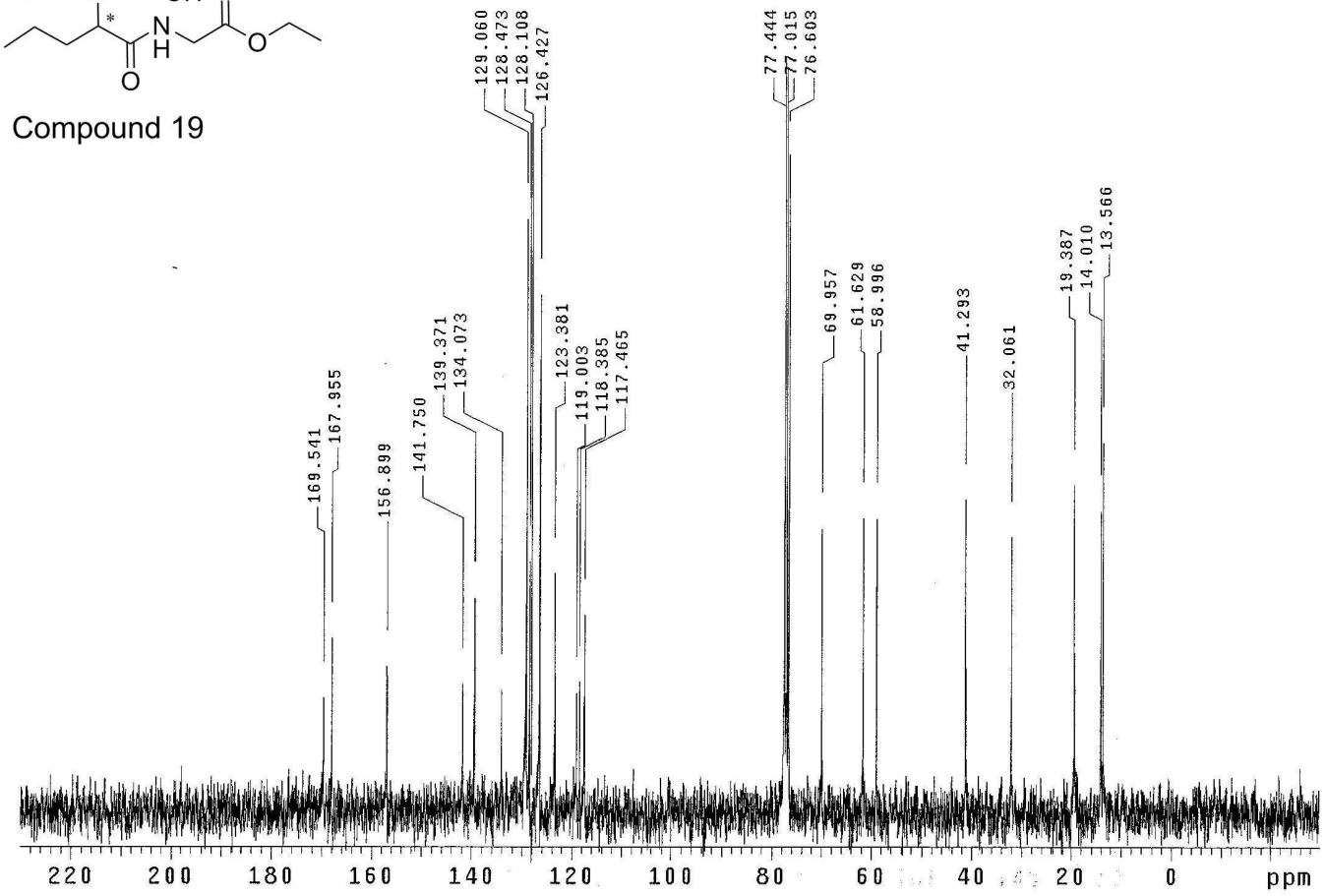
sy1AK174b

exp3 CARBON

SAMPLE		PRESATURATION	
date	Nov 22 2013	satmode	n
solvent	cdcl3	wet	n
file	exp	SPECIAL	
ACQUISITION		temp	25.0
sw	19607.8	gain	36
at	0.836	spin	not used
np	32768	hst	0.008
fb	10800	pw90	11.800
bs	1	alfa	10.000
d1	1.000	FLAGS	
nt	20000	il	n
ct	660	in	n
TRANSMITTER		dp	y
tn	C13	hs	nn
sfrq	75.454	PROCESSING	
tof	409.4	lb	2.00
tpwr	52	fn	not used
pw	5.244	DISPLAY	
DECOUPLER		sp	-2258.1
dn	H1	wp	19606.6
dof	-800.0	rfl	2259.3
dm	yyy	rfp	0
decwave	w	rp	102.7
dpwr	36	lp	-237.3
dmf	9885	PLOT	
		wc	180
		sc	0
		vs	879
		th	7
		ai cdc ph	



Compound 19

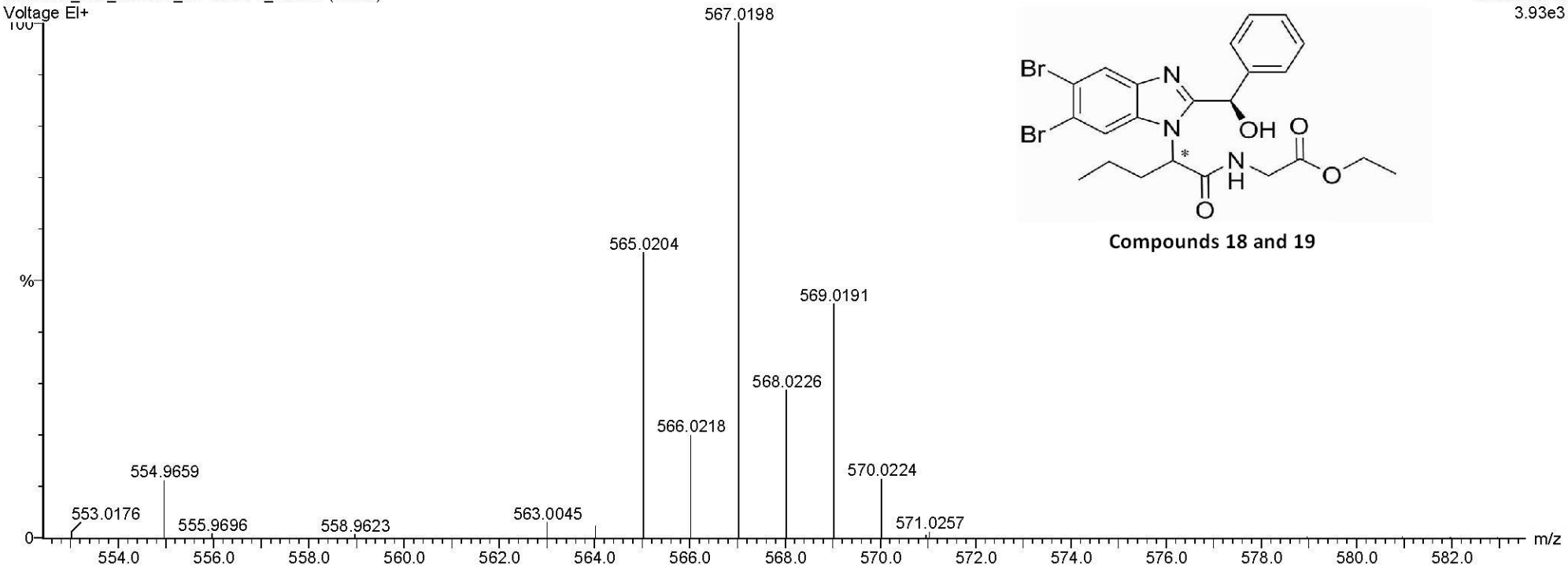


Multiple Mass Analysis: 18 mass(es) processed - displaying only valid results
Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 100.0
Selected filters: None

Monoisotopic Mass, Odd and Even Electron Ions
12534 formula(e) evaluated with 7 results within limits (up to 50 closest results for each mass)
Elements Used:
12C: 0-23 13C: 0-3 H: 25-25 N: 3-3 O: 4-4 79Br: 0-2 81Br: 0-2

SOTELO_IEA_CARBA_SY1AK174_566
SOTELO_IEA_CARBA_SY1AK174_566 16 (1.388)
Voltage EI+

UNIDADE DE MASAS E PROTEÓMICA_USC
18-Dec-2013
3.93e3



Compounds 18 and 19

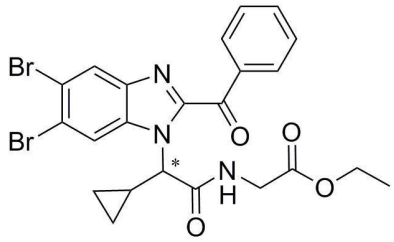
Minimum:	0.01				-1.5		
Maximum:	100.00		5.0	5.0	100.0		
Mass	RA	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
565.0204	55.30	565.0212	-0.8	-1.4	12.0	36.7	12C23 H25 N3 O4 79Br2
566.0218	19.83	566.0245	-2.7	-4.8	12.0	34.6	12C22 13C H25 N3 O4 79Br2
567.0198	100.00	567.0191	0.7	1.2	12.0	16.7	12C23 H25 N3 O4 79Br 81Br
568.0226	28.54	568.0225	0.1	0.2	12.0	14.6	12C22 13C H25 N3 O4 79Br 81Br
569.0191	45.34	569.0171	2.0	3.5	12.0	15.1	12C23 H25 N3 O4 81Br2
570.0224	11.28	570.0204	2.0	3.5	12.0	2773041.0	12C22 13C H25 N3 O4 81Br2
571.0257	0.96	571.0238	1.9	3.3	12.0	2773016.5	12C21 13C2 H25 N3 O4 81Br2

USC

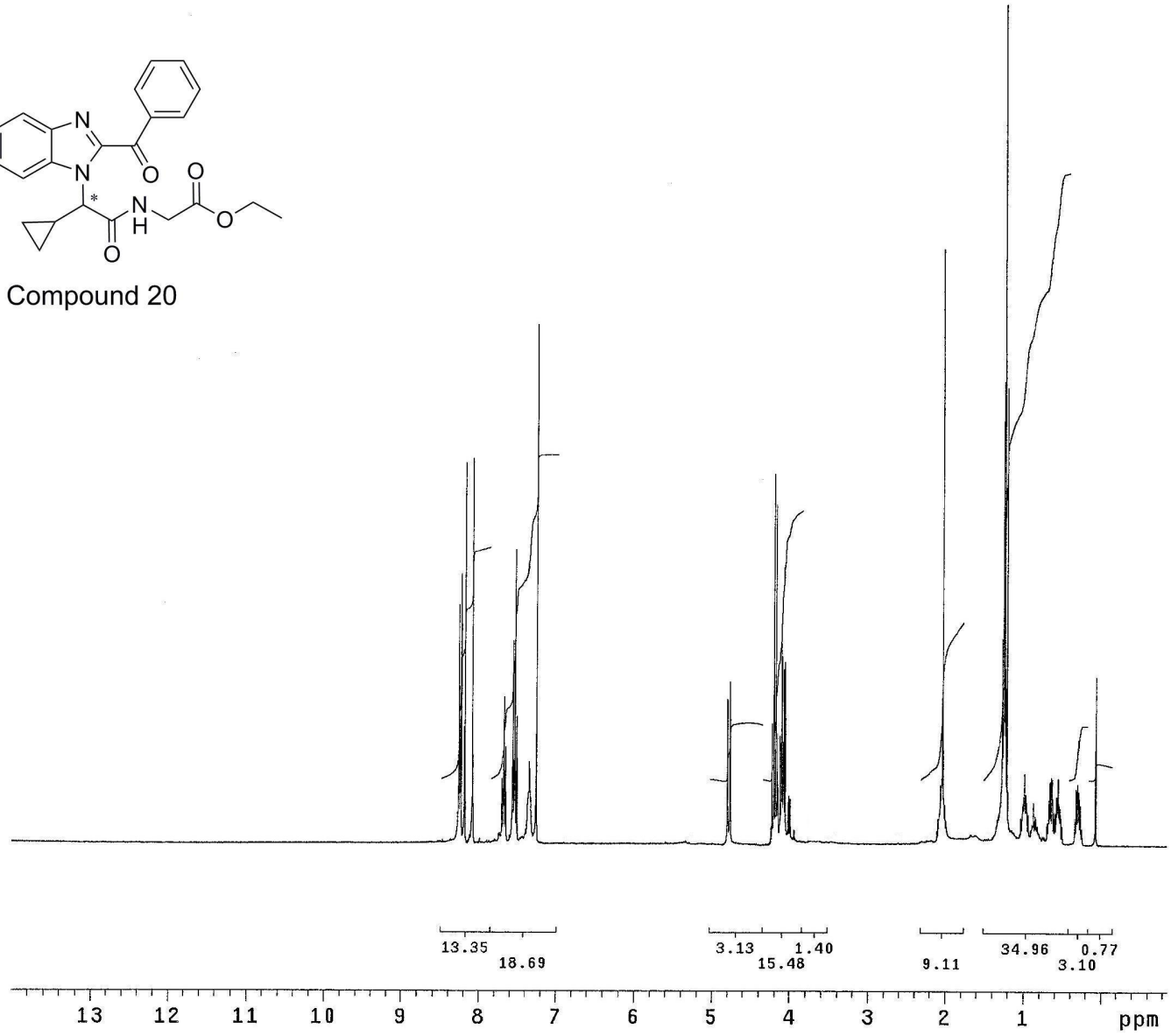
```
sy1ak163

exp1  PROTON

        SAMPLE                    PRESATURATION
date    Aug 30 2012       satmode            n
solvent       cdcl3       wet                n
file            exp             SPECIAL
    ACQUISITION           temp            25.0
sw             4800.8     gain         not used
at             1.706      spin               20
np             16384      hst             0.008
fb             2600       pw90            9.000
bs             1          alfa           10.000
d1             1.000           FLAGS
nt             100        il                 n
ct             35         in                 n
    TRANSMITTER           dp                 y
tn             H1         hs                nn
sfrq         300.048           PROCESSING
tof            359.8      fn           not used
tpwr           59              DISPLAY
pw             4.500      sp             -258.4
     DECOUPLER            wp             4458.5
dn             C13        rfl             600.1
dof            0          rfp               0
dm             nnn        rp              127.5
decwave W40_HCN5mm        lp              -38.7
dpwr           36              PLOT
dmf            13615      wc               180
                          sc                 0
                          vs               125
                          th                 2
                          ai  cdc  ph
```



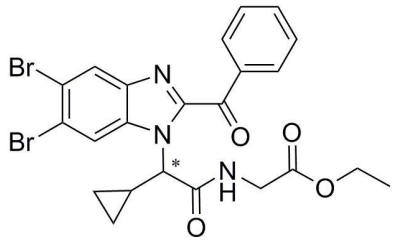
Compound 20



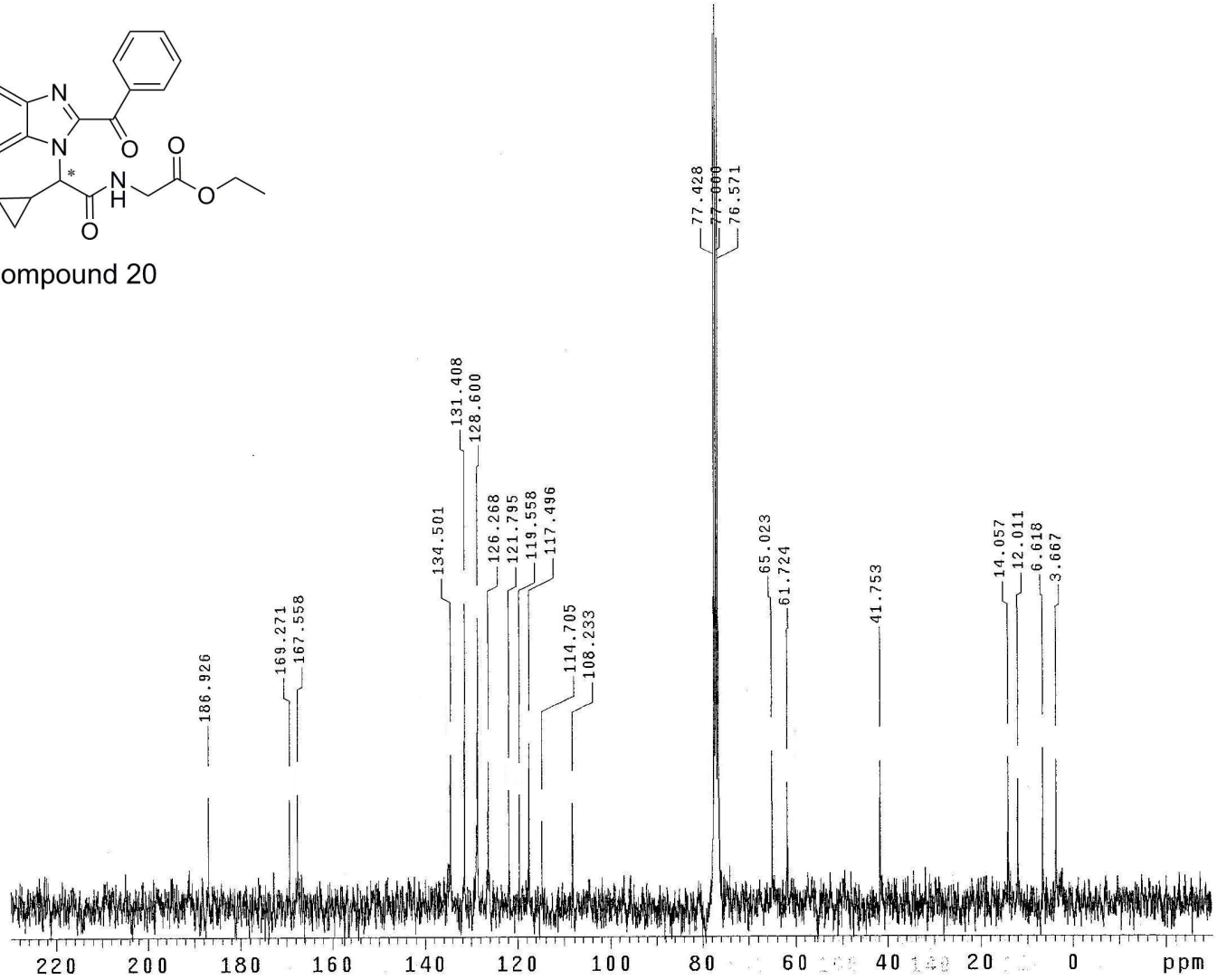
sy1AK163

exp1 CARBON

SAMPLE		PRESATURATION	
date	Nov 27 2013	satmode	n
solvent	cdcl3	wet	n
file	exp	SPECIAL	
ACQUISITION		temp	25.0
sw	19607.8	gain	36
at	0.836	spin	20
np	32768	hst	0.008
fb	10800	pw90	11.800
bs	1	alfa	10.000
d1	1.000	FLAGS	
nt	20000	il	n
ct	1043	in	n
TRANSMITTER		dp	y
tn	C13	hs	nn
sfrq	75.454	PROCESSING	
tof	409.4	lb	4.00
tpwr	52	fn	not used
pw	5.244	DISPLAY	
DECOUPLER		sp	-2258.1
dn	H1	wp	19606.6
dof	-800.0	rfl	2259.3
dm	yyy	rfp	0
decwave	w	rp	105.0
dpwr	36	lp	-247.1
dmf	9885	PLOT	
		wc	180
		sc	0
		vs	1546
		th	6
		ai cdc ph	



Compound 20

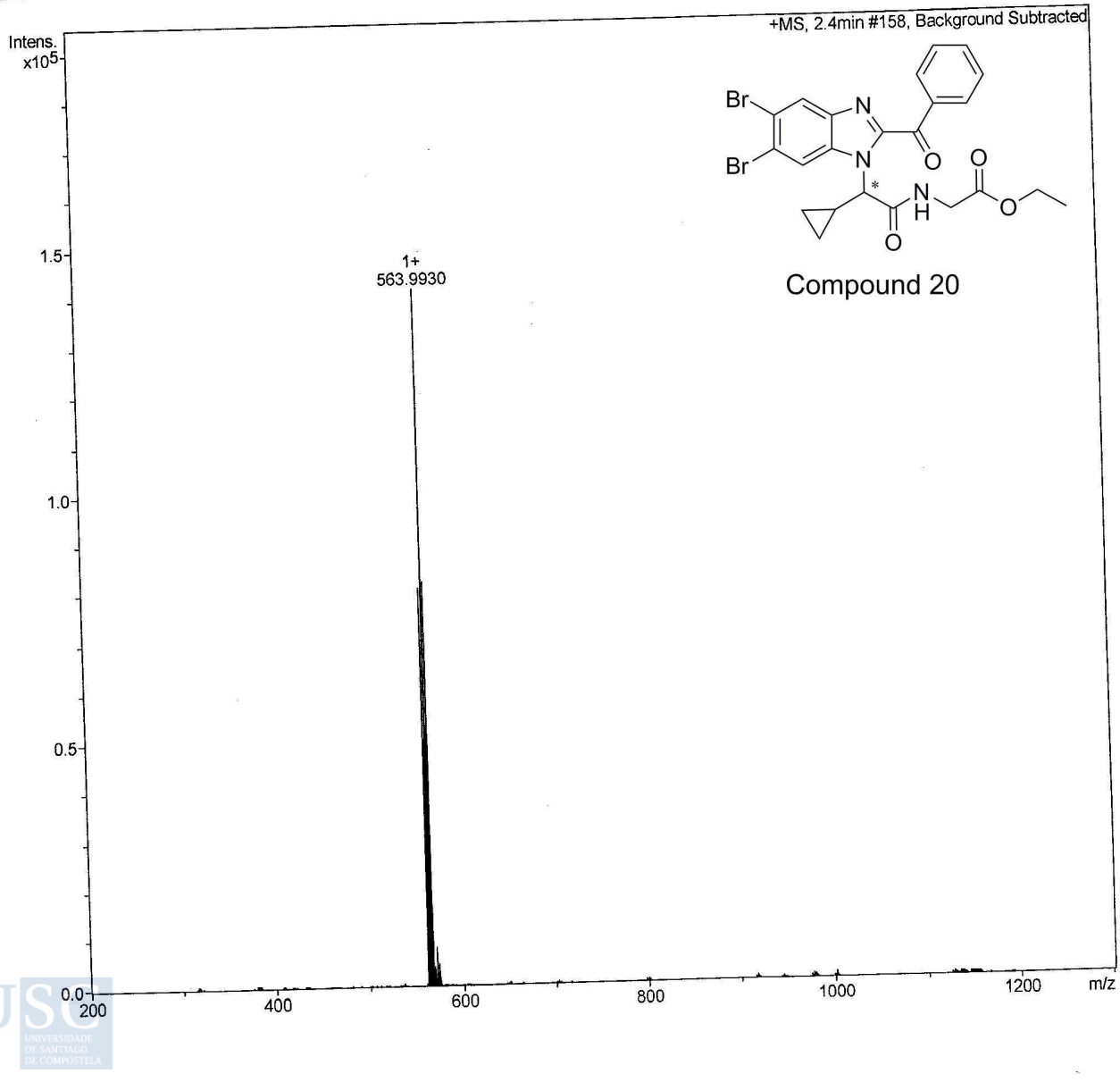


RIAIDT
UNIDADE DE ESPECTROMETRIA DE MASAS E PROTEÓMICA
Edificio CACTUS * Campus Vida
15782 Santiago de Compostela (Spain)
Tel. 981 563 100. Ext. 16242 * Fax 981 528098
E-mail: sxemasas@usc.es
Web: http://www.ti.usc.es/riaidt/masas/masas.htm

ESPECTRO ESI-FIA-TOF-Medida de Masas Exactas

Analysis Info

Sample Name	AK163_563_1-G,9_01_6664.d	Acquisition Date	10/5/2012 4:18:53 PM
Method	fia_pos_medio_350-1500_egf.m	Instrument	micrOTOF

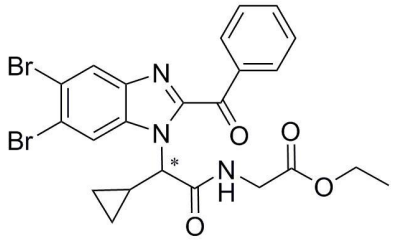


Meas. m/z	#	Formula	Score	m/z	err [mDa]	err [ppm]	mSigma	rdb	e⁻ Conf	N-Rule
561.9950	1	C 23 H 22 Br 2 N 3 O 4	100.00	561.9972	2.1	3.8	38.0	13.5	even	ok

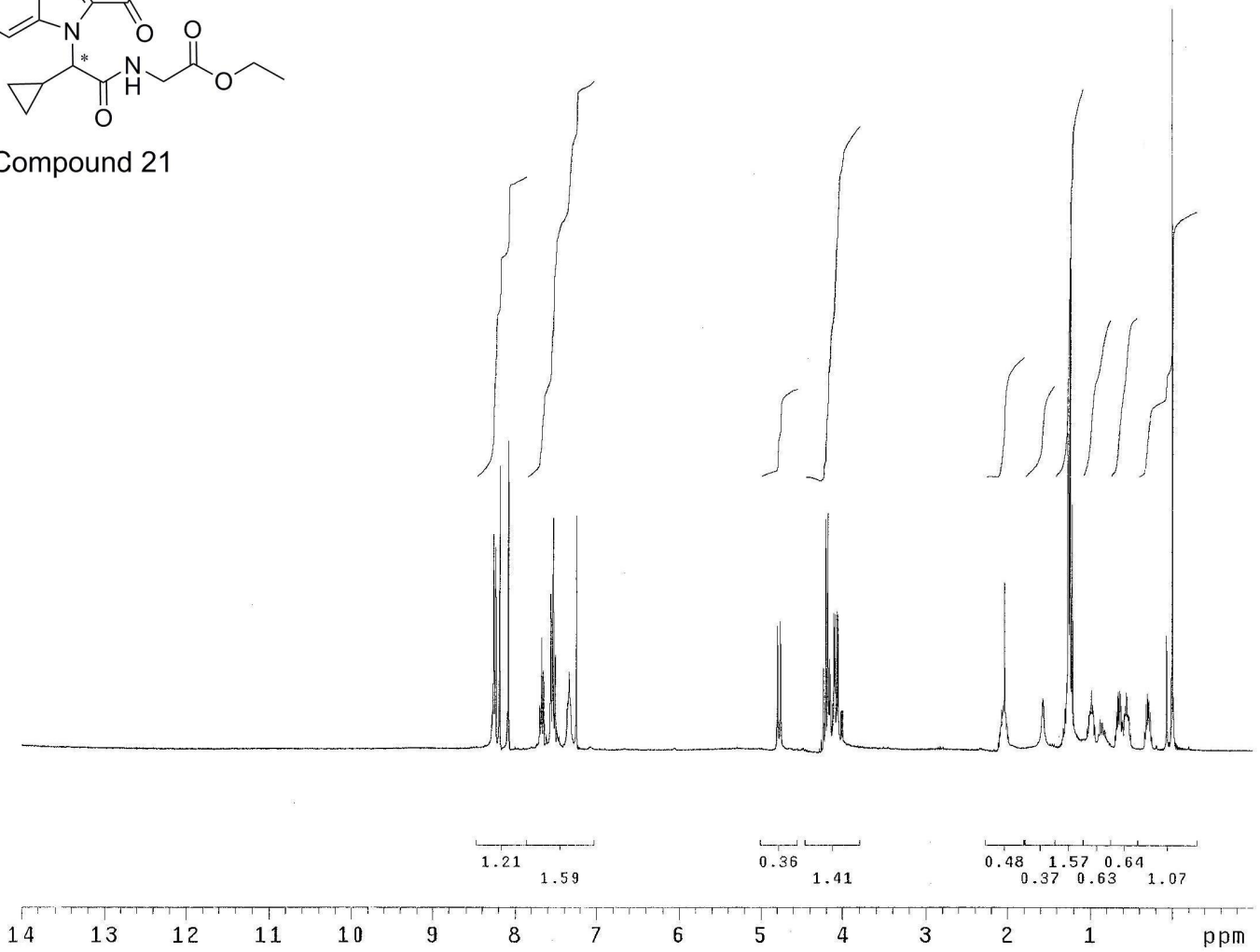
SY1AK175

exp1 PROTON

SAMPLE		DEC. & VT	
date	Jun 20 2013	dfrq	75.454
solvent	cdcl3	dn	C13
~~file~~	~~exp~~	~~dpwr~~	37
ACQUISITION		dof	0
sfrq	300.048	dm	nnn
tn	H1	dmm	c
at	1.400	dmf	13900
np	12602	temp	25.0
sw	4500.5	PROCESSING	
fb	2600	wtfile	
bs	1	proc	ft
tpwr	57	fn	not used
pw	5.0		
d1	1.000	werr	
tof	509.8	wexp	
nt	100	wbs	
ct	64	wnt	
alock	n		
gain	not used		
FLAGS			
il	n		
in	n		
dp	y		
DISPLAY			
sp	-299.4		
wp	4499.9		
vs	159		
sc	0		
wc	180		
hzmm	25.00		
is	898.41		
rfl	299.9		
rfp	0		
th	41		
ins	1.000		
ai	ph		



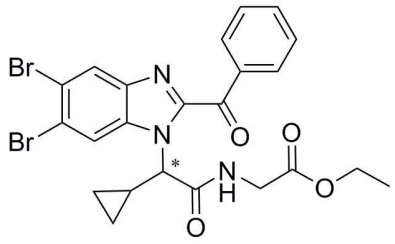
Compound 21



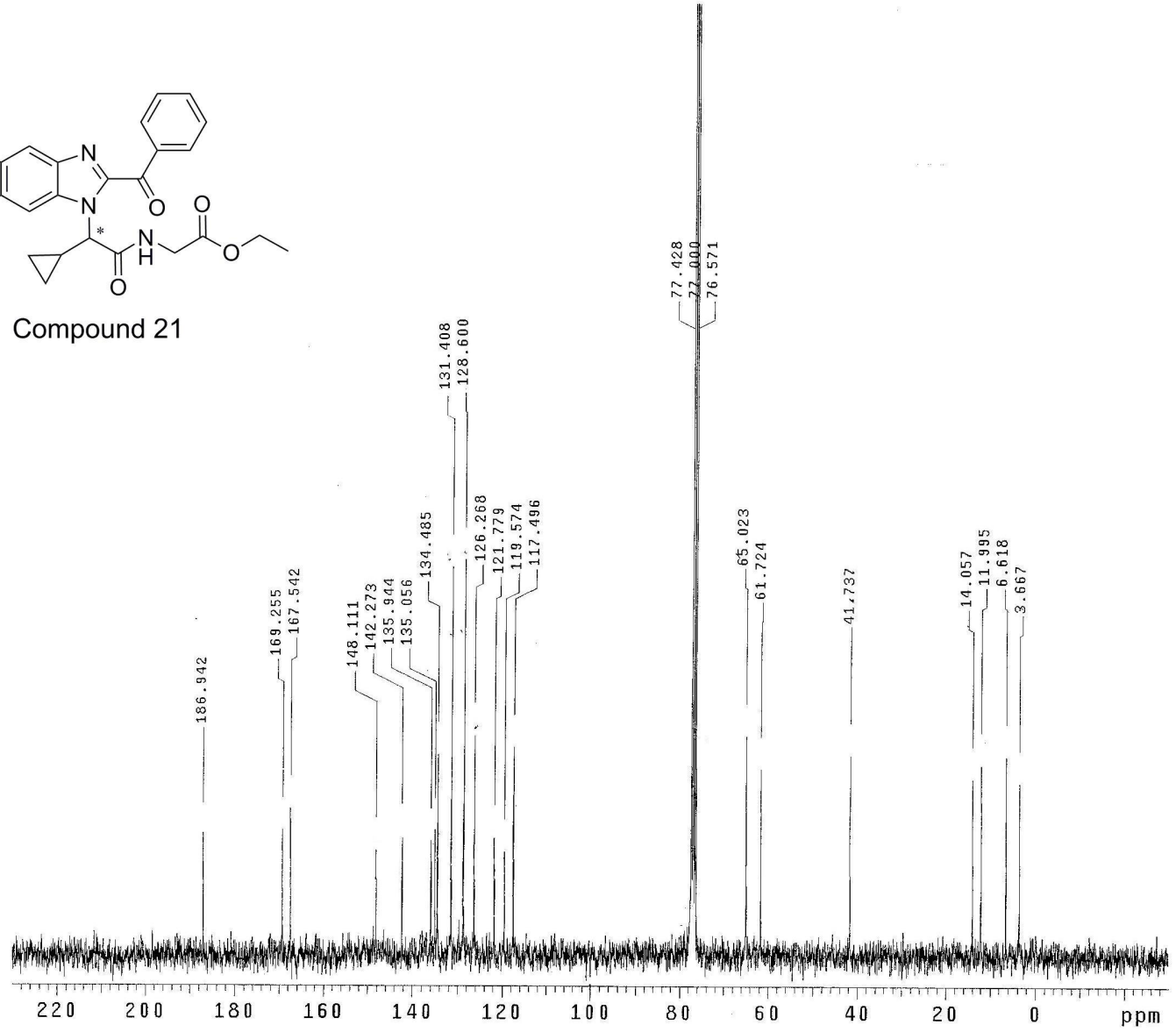
SY1AK175

exp1 CARBON

SAMPLE		PRESATURATION	
date	Jun 20 2013	satmode	n
solvent	cdcl3	wet	n
file	exp	SPECIAL	
ACQUISITION		temp	25.0
sw	19607.8	gain	36
at	0.836	spin	not used
np	32768	hst	0.008
fb	10800	pw90	10.400
bs	1	alfa	10.000
d1	0.880	FLAGS	
nt	2000	il	n
ct	2000	in	n
TRANSMITTER		dp	y
tn	C13	hs	nn
sfrq	75.454	PROCESSING	
tof	409.4	lb	2.50
tpwr	52	fn	not used
pw	4.600	DISPLAY	
DECOUPLER		sp	-2258.1
dn	H1	wp	19606.6
dof	-800.0	rfl	2259.3
dm	yyy	rfp	0
decwave	w	rp	171.6
dpwr	36	lp	-289.2
dmf	9885	PLOT	
		wc	180
		sc	0
		vs	895
		th	5
		ai cdc ph	



Compound 21



Elemental Composition Report

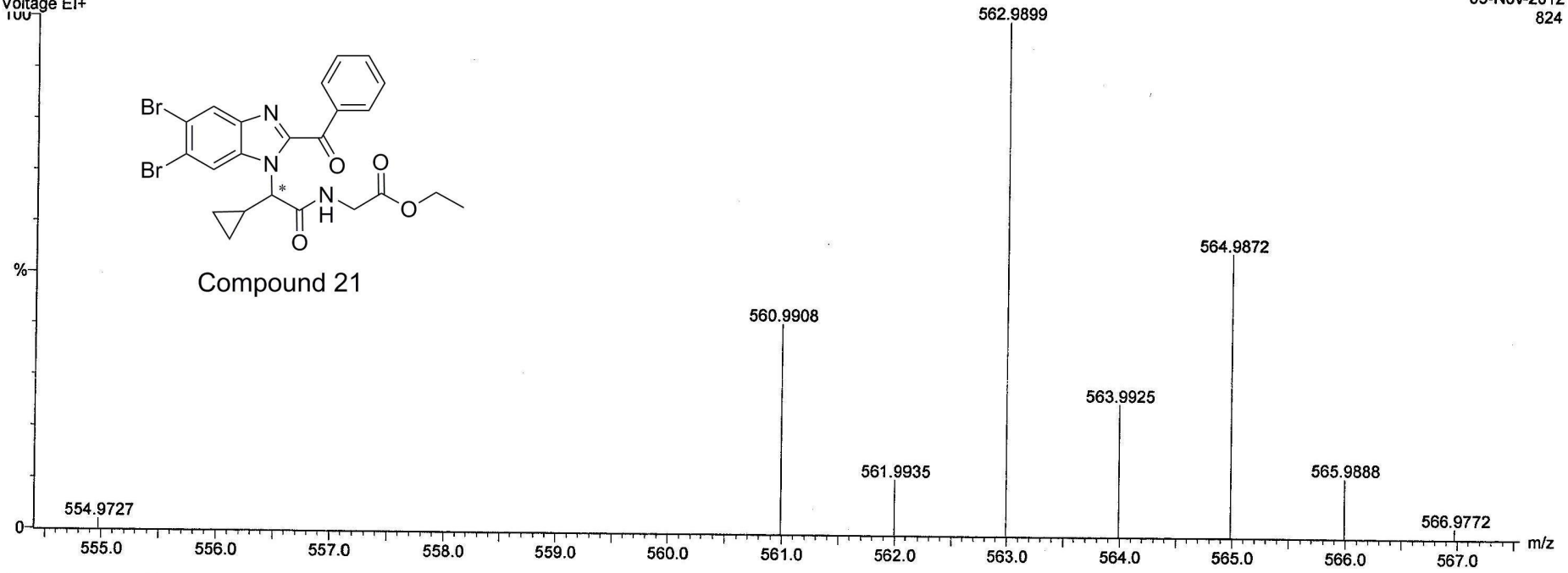
Multiple Mass Analysis: 8 mass(es) processed - displaying only valid results
Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 100.0
Selected filters: None

Monoisotopic Mass, Odd and Even Electron Ions
1 formula(e) evaluated with 1 results within limits (up to 50 best isotopic matches for each mass)
Elements Used:
C: 23-23 H: 21-21 N: 3-3 O: 4-4 Br: 2-2

SOTELO_IEA_CARLOS_SY1AK175_563
SOTELO_IEA_CARLOS_SY1AK175_563 14 (1.214) Cm (11:14)
Voltage EI+

UNIDADE DE MASAS E PROTEÓMICA_USC
09-Nov-2012
824

Compound 21



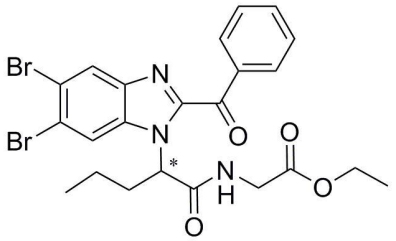
Minimum:	1.00				-1.5		
Maximum:	100.00		5.0	5.0	100.0		
Mass	RA	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
560.9908	40.66	560.9899	0.9	1.6	14.0	7.4	C23 H21 N3 O4 Br2

USC

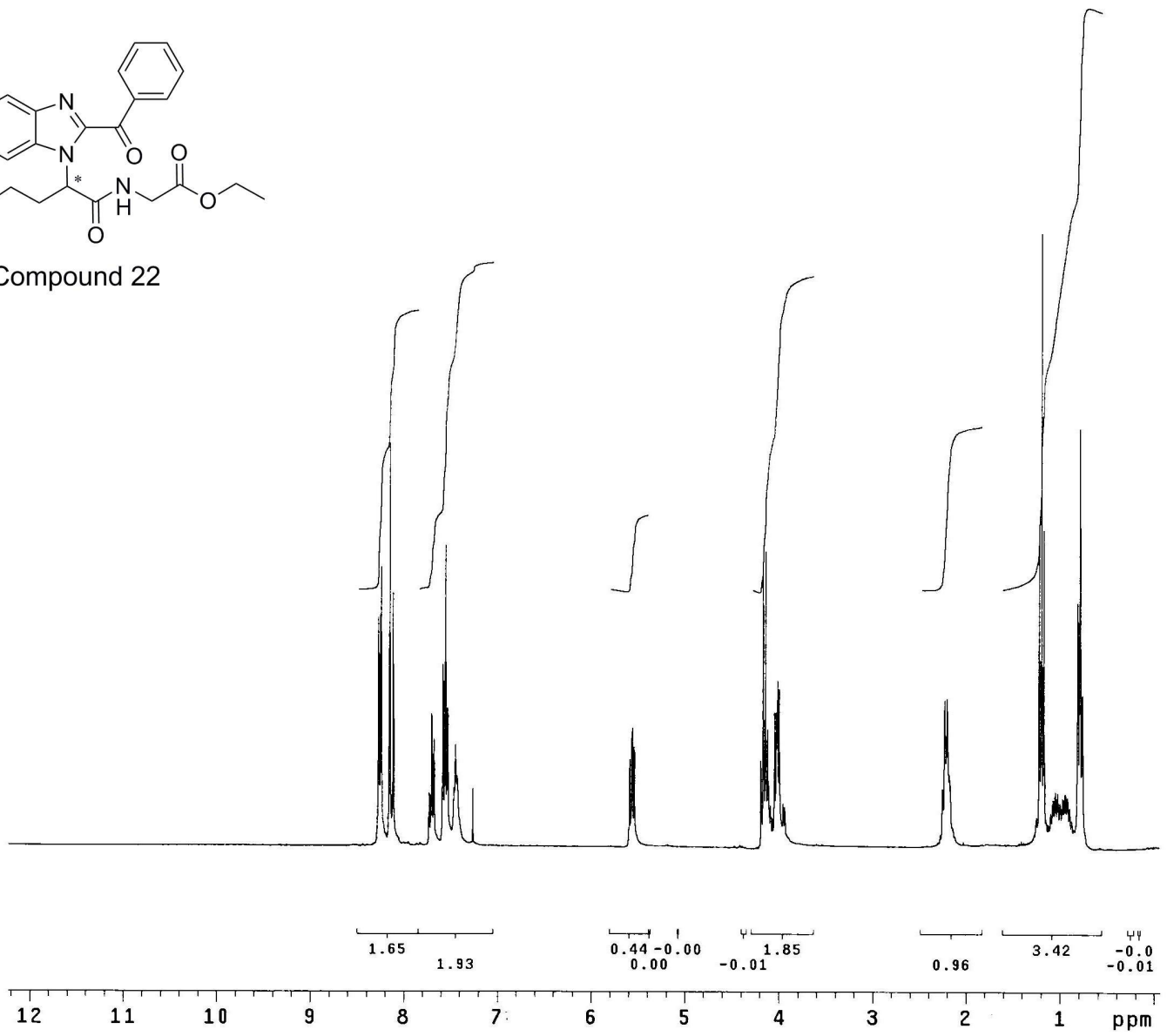
```
sy1AK176

exp2  PROTON

        SAMPLE                    DEC. & VT
date    Sep  9 2013       dfrq          75.454
solvent      cdcl3        dn               C13
file           exp        dpwr              37
   ACQUISITION             dof                0
sfrq        300.048        dm               nnn
tn               H1        dmm                c
at            1.400        dmf            13900
np           12602        temp            25.0
sw          4500.5           PROCESSING
fb            2600        wtfile
bs               1        proc               ft
tpwr            57        fn          not used
pw             5.0
d1           1.000        werr
tof          509.8        wexp
nt             100        wbs
ct              74        wnt
alock            n
gain       not used
      FLAGS
il               n
in               n
dp               y
      DISPLAY
sp           -18.6
wp         3687.9
vs             159
sc               0
wc             180
hzmm         20.49
is         651.25
rfl          299.9
rfp              0
th               5
ins          1.000
ai     ph
```



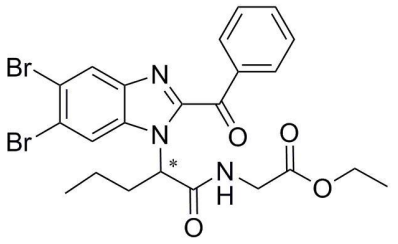
Compound 22



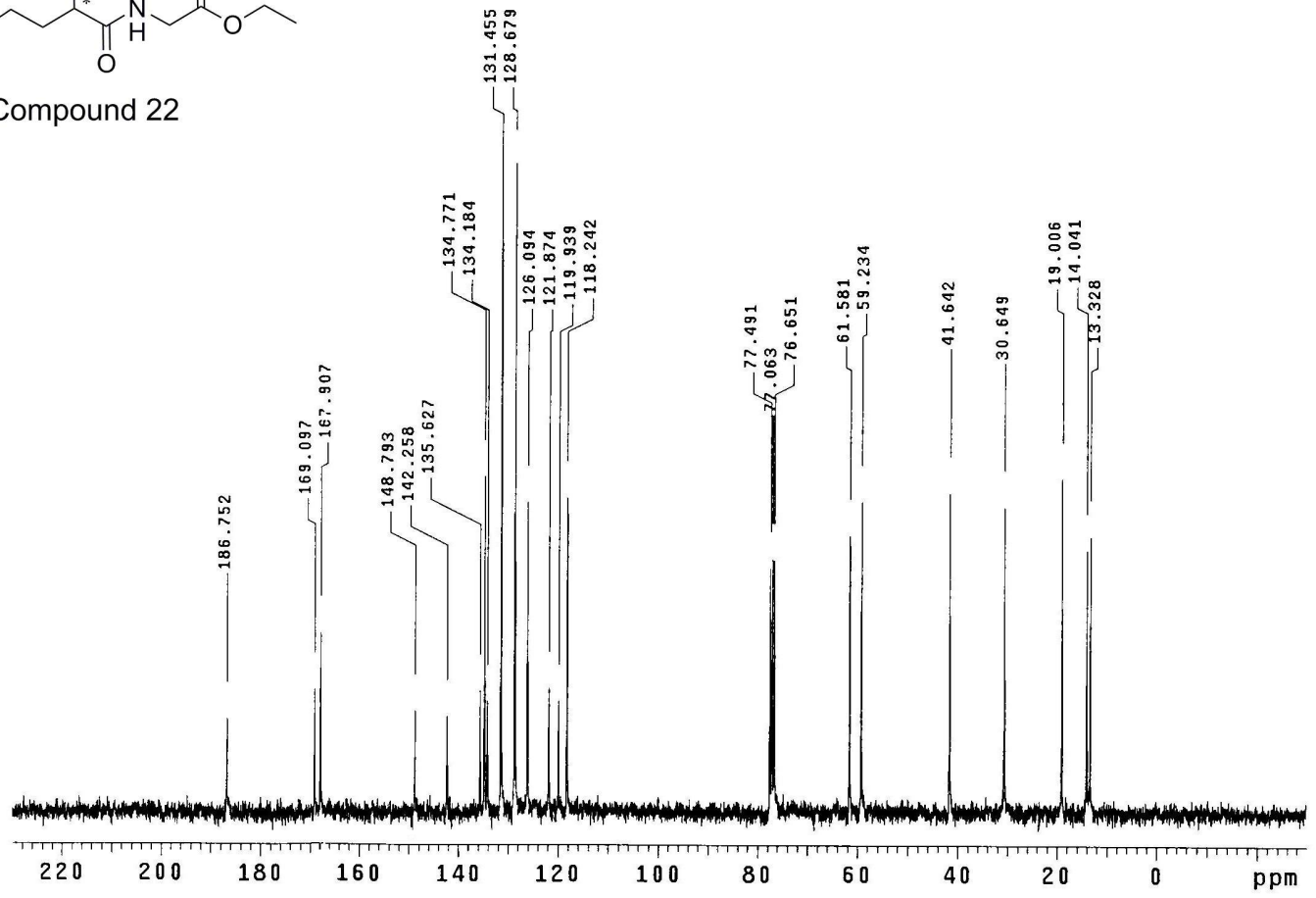
SY1AK176

exp1 CARBON

SAMPLE		PRESATURATION	
date	Sep 9 2013	satmode	n
solvent	cdcl3	wet	n
file	exp	SPECIAL	
ACQUISITION		temp	25.0
sw	19607.8	gain	36
at	0.836	spin	not used
np	32768	hst	0.008
fb	10800	pw90	11.800
bs	1	alfa	10.000
d1	1.000	FLAGS	
nt	8000	il	n
ct	564	in	n
TRANSMITTER		dp	y
tn	C13	hs	nn
sfrq	75.454	PROCESSING	
tof	409.4	lb	2.00
tpwr	52	fn	not used
pw	5.244	DISPLAY	
DECOUPLER		sp	-2258.1
dn	H1	wp	19606.6
dof	-800.0	rfl	2259.3
dm	yyy	rfp	0
decwave	w	rp	155.1
dpwr	36	lp	-336.5
dmf	9885	PLOT	
		wc	180
		sc	0
		vs	282
		th	5
		ai cdc ph	



Compound 22



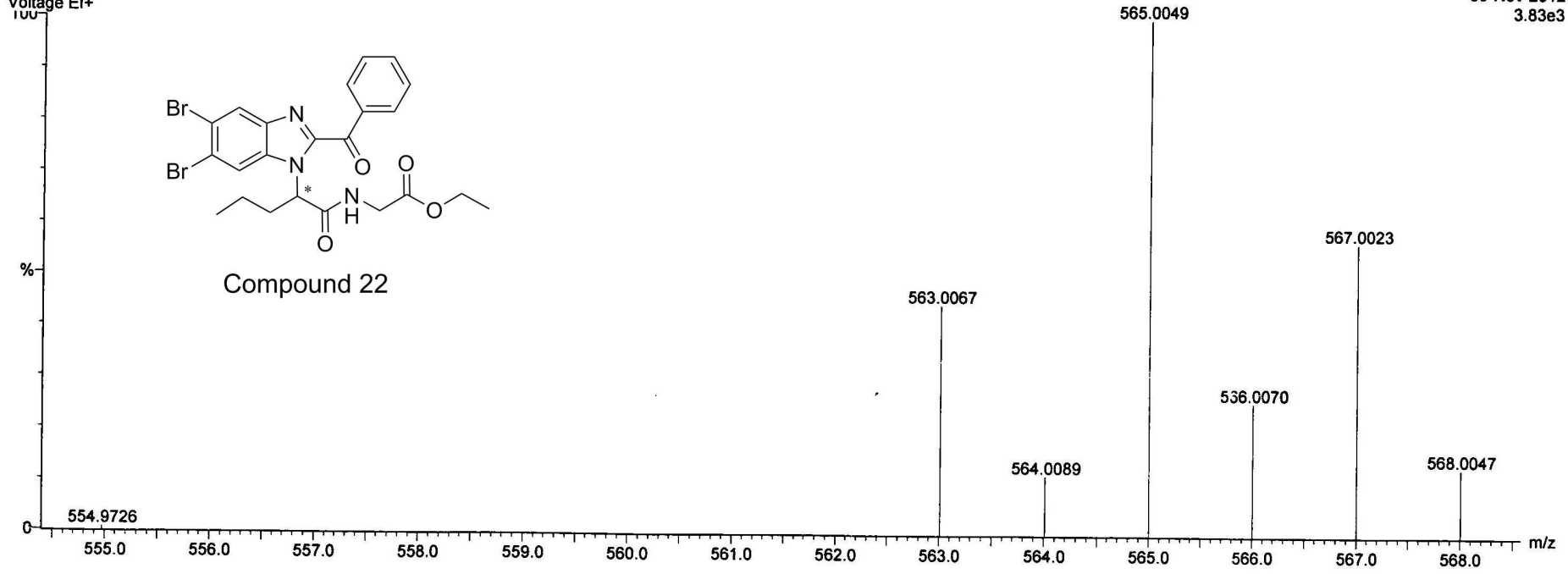
Elemental Composition Report

Multiple Mass Analysis: 6 mass(es) processed - displaying only valid results
Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 100.0
Selected filters: None

Monoisotopic Mass, Odd and Even Electron Ions
1 formula(e) evaluated with 1 results within limits (up to 50 best isotopic matches for each mass)
Elements Used:
C: 23-23 H: 23-23 N: 3-3 O: 4-4 Br: 2-2

SOTELO_IEA_CARLOS_SY1AK176_565
SOTELO_IEA_CARLOS_SY1AK176_565 21 (1.821) Cm (20:21)
Voltage EI+

UNIDADE DE MASAS E PROTEÓMICA_USC
09-Nov-2012
3.83e3



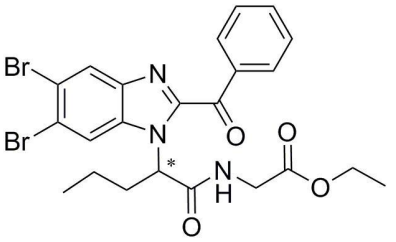
Minimum:	1.00				-1.5		
Maximum:	100.00		5.0	5.0	100.0		
Mass	RA	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
563.0067	44.34	563.0055	1.2	2.1	13.0	14.0	C23 H23 N3 O4 Br2

USC

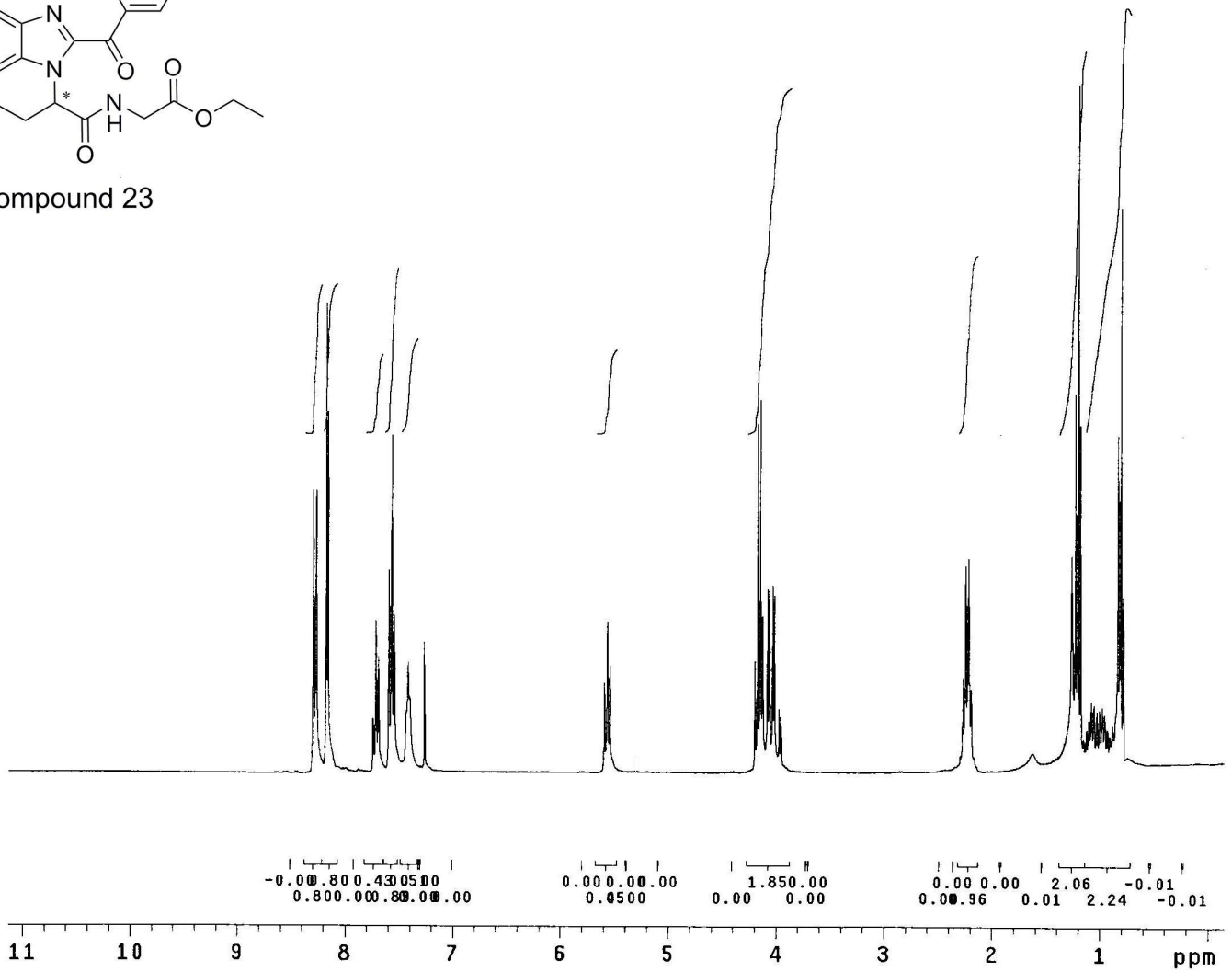
sy1AK177

exp1 PROTON

SAMPLE		DEC. & VT	
date	Sep 9 2013	dfrq	75.454
solvent	cdcl3	dn	C13
file	exp	dpwr	37
ACQUISITION		dof	0
sfrq	300.048	dm	nnn
tn	H1	dmm	c
at	1.400	dmf	13900
np	12602	temp	25.0
sw	4500.5	PROCESSING	
fb	2600	wtfile	
bs	1	proc	ft
tpwr	57	fn	not used
pw	5.0		
d1	1.000	werr	
tof	509.8	wexp	
nt	100	wbs	
ct	100	wnt	
alock	n		
gain	not used		
FLAGS			
il	n		
in	n		
dp	y		
DISPLAY			
sp	-45.0		
wp	3385.2		
vs	161		
sc	0		
wc	180		
hzmm	18.81		
is	681.09		
rfl	299.9		
rfp	0		
th	8		
ins	1.000		
ai	ph		



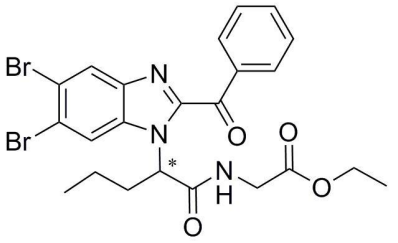
Compound 23



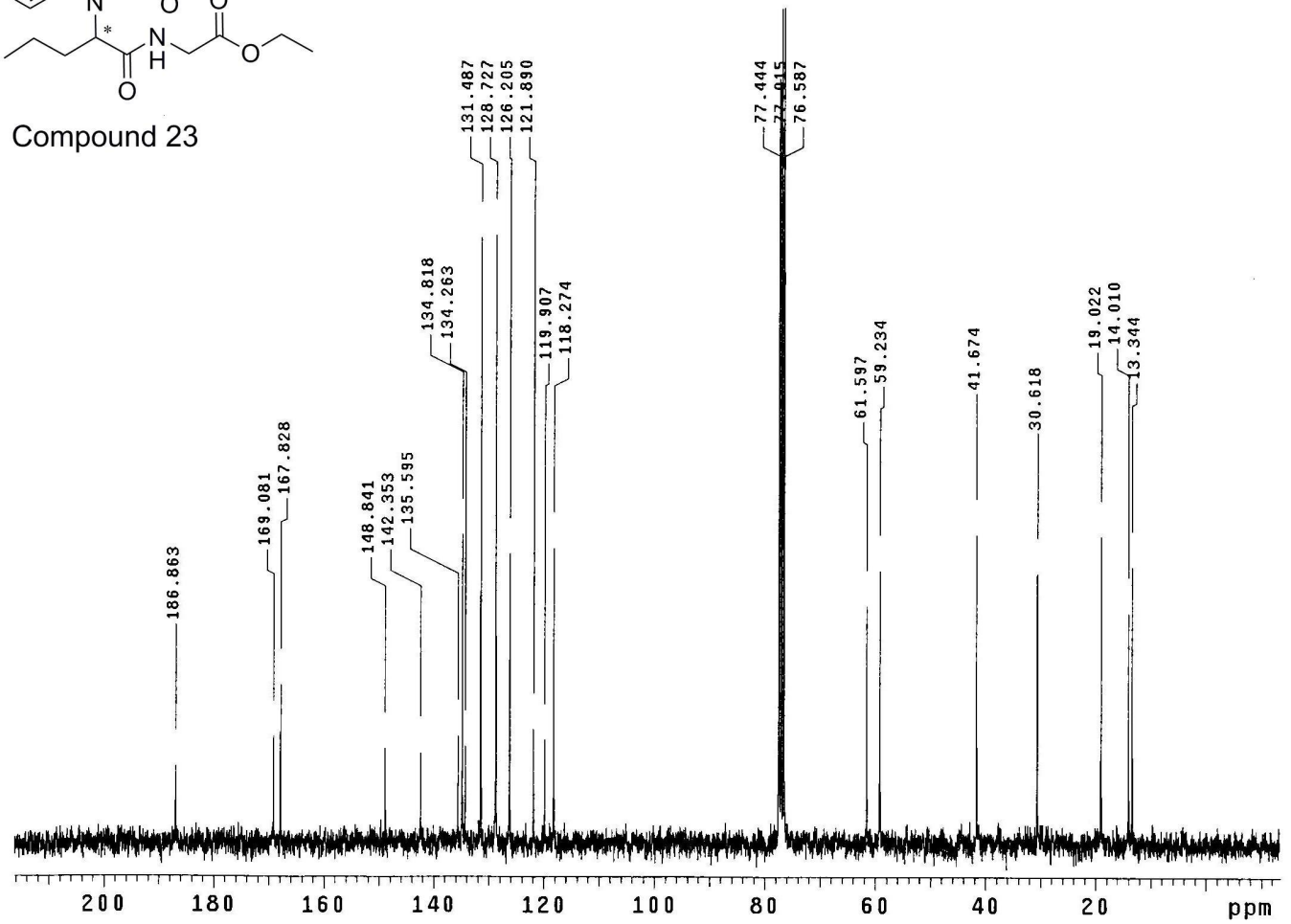
sy1AK177

exp2 CARBON

SAMPLE		PRESATURATION	
date	Sep 9 2013	satmode	n
solvent	cdcl3	wet	n
file	exp	SPECIAL	
ACQUISITION		temp	25.0
sw	19607.8	gain	36
at	0.836	spin	not used
np	32768	hst	0.008
fb	10800	pw90	11.800
bs	1	alfa	10.000
d1	1.000	FLAGS	
nt	8000	il	n
ct	1401	in	n
TRANSMITTER		dp	y
tn	C13	hs	nn
sfrq	75.454	PROCESSING	
tof	409.4	lb	2.00
tpwr	52	fn	not used
pw	5.244	DISPLAY	
DECOUPLER		sp	-1017.0
dn	H1	wp	17326.8
dof	-800.0	rfl	2259.3
dm	yyy	rfp	0
decwave	w	rp	152.9
dpwr	36	lp	-310.0
dmf	9885	PLOT	
		wc	180
		sc	0
		vs	626
		th	8
		ai cdc ph	



Compound 23



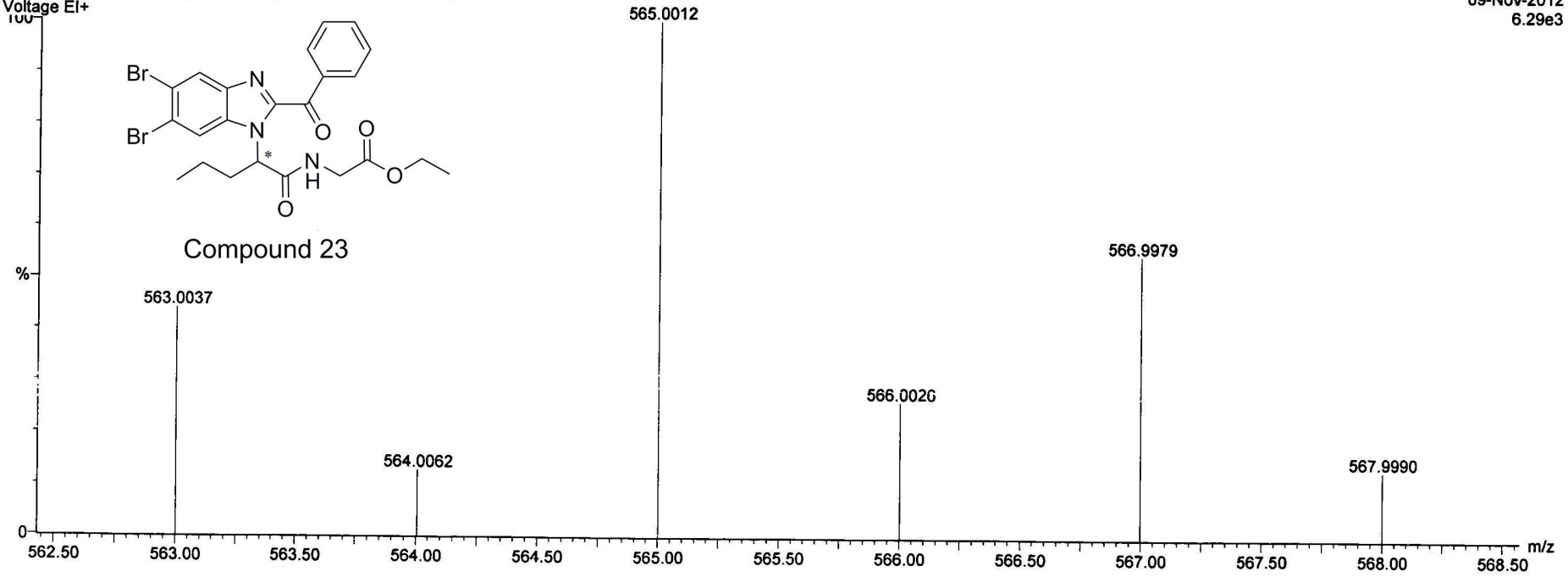
Elemental Composition Report

Multiple Mass Analysis: 6 mass(es) processed - displaying only valid results
Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 100.0
Selected filters: None

Monoisotopic Mass, Odd and Even Electron Ions
1 formula(e) evaluated with 1 results within limits (up to 50 best isotopic matches for each mass)
Elements Used:
C: 23-23 H: 23-23 N: 3-3 O: 4-4 Br: 2-2

SOTELO_IEA_CARLOS_SY1AK177_565
SOTELO_IEA_CARLOS_SY1AK177_565 16 (1.388) Cm (16)
Voltage EI+

UNIDADE DE MASAS E PROTEÓMICA_USC
09-Nov-2012
6.29e3



Compound 23

Minimum:	1.00				-1.5		
Maximum:	100.00		5.0	5.0	100.0		
Mass	RA	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	Formula
563.0037	43.94	563.0055	-1.8	-3.2	13.0	19.1	C23 H23 N3 O4 Br2

SPECIFIC OPTICAL ROTATION FOR FINAL COMPOUNDS

COMPOUND 20

Light Source	Monitor wavelength	D.I.T.	No. of cycle	Cycle interval	Temp. Monitor		Temp. Corr. Factor	Aperture(S)	Aperture(L)
Na	589 nm	5 sec	5	0 sec	Holder	None	8.0mm	Auto		

No.	Sample No.	Mode	Calc. Data	Meas. Data[deg]	O.R. Data[deg]	Measurement	Date	PMT Voltage[V]		Temperature(C)
	Blank Value	S.D.	C.V.	Path Length[mm]	Concentration[w/v%]		Specific O.R.	Sugar Scale Factor		Specific O.R. of
STD	Brix Conc.	Factor	Temp. Corr. Factor	Comment						
1	sy1AK163	Specific O.R.	15.0000	0.0046	0.0089			0.0043	0.9944	6.6295
	10.00	0.3067	0.1000	17.3130	66.4500	0.1000	1.0000	0.00000		
2	sy1AK163-1		14.4782	0.0044	0.0087	10/12/2013 13:04		240	20.45	0.0043
3	sy1AK163-2		15.7826	0.0048	0.0091	10/12/2013 13:04		240	20.45	0.0043
4	sy1AK163-3		15.7826	0.0048	0.0091	10/12/2013 13:04		239	20.46	0.0043
5	sy1AK163-4		15.4565	0.0047	0.0090	10/12/2013 13:04		240	20.46	0.0043
6	sy1AK163-5		13.5000	0.0041	0.0084	10/12/2013 13:05		240	20.47	0.0043

COMPOUND 21

Light Source	Monitor wavelength	D.I.T.	No. of cycle	Cycle interval	Temp. Monitor		Temp. Corr. Factor	Aperture(S)	Aperture(L)
Na	589 nm	5 sec	5	0 sec	Holder	None	8.0mm	Auto		

No.	Sample No.	Mode	Calc. Data	Meas. Data[deg]	O.R. Data[deg]	Measurement	Date	PMT Voltage[V]		Temperature(C)
	Blank Value	S.D.	C.V.	Path Length[mm]	Concentration[w/v%]		Specific O.R.	Sugar Scale Factor		Specific O.R. of
STD	Brix Conc.	Factor	Temp. Corr. Factor	Comment						
1	sy1AK175	Specific O.R.	-22.2857	-0.0031	0.0011			0.0043	1.2976	5.8224
	10.00	0.1400	0.1000	17.3130	66.4500	0.1000	1.0000	0.00000		
2	sy1AK175-1		-22.5714	-0.0032	0.0011	10/12/2013 13:10		241	20.78	0.0043
3	sy1AK175-2		-22.5714	-0.0032	0.0011	10/12/2013 13:10		241	20.78	0.0043
4	sy1AK175-3		-24.0000	-0.0034	0.0009	10/12/2013 13:10		241	20.79	0.0043
5	sy1AK175-4		-20.4286	-0.0029	0.0014	10/12/2013 13:10		241	20.79	0.0043
6	sy1AK175-5		-21.8571	-0.0031	0.0012	10/12/2013 13:10		241	20.80	0.0043

COMPOUND 22

Light Source	Monitor wavelength	D.I.T.	No. of cycle	Cycle interval	Temp. Monitor		Temp. Corr. Factor	Aperture(S)	Aperture(L)
Na	589 nm	5 sec	5	0 sec	Holder	None	8.0mm	Auto		

No.	Sample No.	Mode	Calc. Data	Meas. Data[deg]	O.R. Data[deg]	Measurement	Date	PMT Voltage[V]		Temperature(C)
	Blank Value	S.D.	C.V.	Path Length[mm]	Concentration[w/v%]		Specific O.R.	Sugar Scale Factor		Specific O.R. of
STD	Brix Conc.	Factor	Temp. Corr. Factor	Comment						
1	sy1AK176	Specific O.R.	65.1924	0.0113	0.0091			-0.0022	1.6318	2.5030
	10.00	0.1733	0.1000	17.3130	66.4500	0.1000	1.0000	0.00000		
2	sy1AK176-1		64.6155	0.0112	0.0090	10/12/2013 13:23		240	21.46	-0.0022
3	sy1AK176-2		68.0771	0.0118	0.0096	10/12/2013 13:23		240	21.46	-0.0022
4	sy1AK176-3		64.6155	0.0112	0.0090	10/12/2013 13:24		240	21.46	-0.0022
5	sy1AK176-4		64.6155	0.0112	0.0090	10/12/2013 13:24		241	21.47	-0.0022
6	sy1AK176-5		64.0386	0.0111	0.0089	10/12/2013 13:24		240	21.47	-0.0022

COMPOUND 23

Light Source	Monitor wavelength	D.I.T.	No. of cycle	Cycle interval	Temp. Monitor		Temp. Corr. Factor	Aperture(S)	Aperture(L)
Na	589 nm	5 sec	5	0 sec	Holder	None	8.0mm	Auto		

No.	Sample No.	Mode	Calc. Data	Meas. Data[deg]	O.R. Data[deg]	Measurement	Date	PMT Voltage[V]		Temperature(C)
	Blank Value	S.D.	C.V.	Path Length[mm]	Concentration[w/v%]		Specific O.R.	Sugar Scale Factor		Specific O.R. of
STD	Brix Conc.	Factor	Temp. Corr. Factor	Comment						
1	sy1AK177	Specific O.R.	-69.6523	-0.0107	-0.0129			-0.0022	1.4139	2.0299
	10.00	0.1533	0.1000	17.3130	66.4500	0.1000	1.0000	0.00000		
2	sy1AK177-1		-69.1306	-0.0106	-0.0128	10/12/2013 13:30		241	21.72	-0.0022
3	sy1AK177-2		-67.8262	-0.0104	-0.0126	10/12/2013 13:30		240	21.72	-0.0022
4	sy1AK177-3		-71.7393	-0.0110	-0.0132	10/12/2013 13:30		240	21.73	-0.0022
5	sy1AK177-4		-69.7828	-0.0107	-0.0129	10/12/2013 13:30		240	21.73	-0.0022
6	sy1AK177-5		-69.7828	-0.0107	-0.0129	10/12/2013 13:30		240	21.74	-0.0022

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PUBLICACIÓN 3:

Multicomponent Assembly of the Kinesin Spindle Protein Inhibitor CPUYJ039 and Analogues as Antimitotic Agents

Carlos Carbajales,[†] Junichi Sawada,[‡] Giovanni Marzaro,[§] Eddy Sotelo,[†,∥] Luz Escalante,[†], Antonio Sánchez-Díaz Marta,[†] Xerardo García-Mera,[∥] Akira Asai,[‡] and Alberto Coelho*[,†,∥]
Revista: *ACS Combinatorial Science*
Editorial: American Chemical Society
ISSN: 2156-8944 Año de publicación: 2017 Volumen: 19 Número: 3 Páginas: 153-160
DOI: https://doi.org/10.1021/acscombsci.6b00166

[†]Center for Research in Biological Chemistry and Molecular Materials, University of Santiago de Compostela, Jenaro de la Fuente s/n, Campus Vida, Santiago de Compostela 15782, Spain
[‡]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan
[§]Department of Pharmaceutical and Pharmacological Sciences, University of Padova, Via Marzolo 5, 35131 Padova, Italy
[∥]Department of Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Santiago de Compostela, Avenida das Ciencias, s/n, Campus sur, Santiago de Compostela 15782, Spain.

Contribución específica en la publicación:
Metodología e investigación: planteamiento y desarrollo de los experimentos químicos. Caracterización de los compuestos. Adquisición y análisis de datos.

Índices de calidad:
Q1 en Chemistry Applied 16/72 en ese año de publicación.
Índice de impacto: 3,5.
Artículo de investigación, correspondiente al Capítulo 3 de esta memoria.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ACS Combinatorial Science

Research Article

pubs.acs.org/acscombsci

Multicomponent Assembly of the Kinesin Spindle Protein Inhibitor CPUYJ039 and Analogues as Antimitotic Agents

Carlos Carbajales,[†] Jun-ichi Sawada,[‡] Giovanni Marzaro,[§] Eddy Sotelo,[†,∥] Luz Escalante,[†] Antonio Sánchez-Díaz Marta,[†] Xerardo García-Mera,[∥] Akira Asai,[‡] and Alberto Coelho*[,†,∥]

[†]Center for Research in Biological Chemistry and Molecular Materials, University of Santiago de Compostela, Jenaro de la Fuente s/n, Campus Vida, Santiago de Compostela 15782, Spain

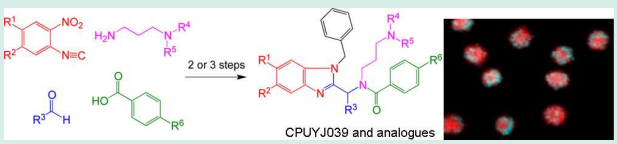
[‡]Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan

[§]Department of Pharmaceutical and Pharmacological Sciences, University of Padova, Via Marzolo 5, 35131 Padova, Italy

[∥]Department of Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Santiago de Compostela, Avenida das Ciencias, s/n, Campus sur, Santiago de Compostela 15782, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: The potent kinesin spindle protein inhibitor CPUYJ039 and a set of analogues were prepared by a target-oriented approach based on a Ugi reaction that uses 2-nitrophenyl isocyanides as key building blocks. The herein documented strategy provides straightforward and atom economical access to potent benzimidazole-based antimitotic agents by exploring the versatility and exploratory power of the Ugi reaction. The results of docking studies and biological activity evaluations of the benzimidazole compounds are also reported.



KEYWORDS: *kinesin spindle protein inhibitor, CPUYJ039, antimitotic agent, Ugi reaction*

INTRODUCTION

Mitosis is a highly regulated and orchestrated process in which various proteins are responsible for the accurate inheritance of genetic materials, cytoplasmic organelles, and cell membrane into two daughter cells. Among the proteins, kinases[1] and kinesins[2] have emerged as valuable targets for cancer therapeutics in the past decade because they play key roles in mitosis and tumor development. Kinesin Spindle Protein (KSP, also known as Eg5)[3] is a plus-end-directed motor protein of the kinesin-5 subfamily, and it is essential for the proper separation of spindle poles during mitosis.[4] The KSP-targeting agents selectively act on cells undergoing cell division, which means that they are mitosis-specific inhibitors. These proteins have attracted great interest due to a number of advantages, e.g., they have fewer side effects (such as no neurotoxicity) than tubulin-binding agents that inhibit overall microtubule-based processes.[3] *S*-Monastrol and *S*-trityl-L-cysteine (STLC), which are shown in Figure 1A, are the first small-molecule inhibitors of KSP, and they bind to an induced allosteric binding site close to the site of ATP hydrolysis, called the L5/α2/α3 pocket in the motor domain.[5] These compounds are frequently used as model ligands for the evaluation of anti-KSP activity.[3] However, the most advanced clinical trials (phase I and phase II clinical trials, either as monotherapies or in combination with other drugs) have been carried out using the prototypes that contain a central planar heterocycle attached to an exocyclic 2-(1-(*N*-(3-aminopropyl)benzamido)alkylic framework (Figure 1B), such as Ispinesib,[6] SB-743921,[7] pyrrolotrizine-1 (BMS-24),[8] AZD4877,[9] CK0106023,[10] and CPUYJ039,[11] all of which target the L5/α2/α3 pocket of KSP.[12] The presence of a basic amino or dimethylamino group at the end of the aminopropyl-type chain in these molecules often increases the specificity in targeting KSP. Another important element in these series is the benzoyl moiety attached to the exocyclic tertiary nitrogen, which improves the affinity for KSP through a better interaction in the so-called "cooperative pocket".[12] This interaction causes a significant increase in the antimitotic activity, and it is not present in the other KSP inhibitors such as *S*-Monastrol and STLC.

All of the compounds represented in Figure 1B, because of their complex chemical structures, require tedious linear synthetic routes in which the chemical diversity is introduced step by step. For instance, the linear syntheses of Ispinesib,[6c] SB-743921,[7c] and Pyrrolotrizine[8] require eight steps, and the preparation of AZDD4877 involves 13 transformations.[9] CPUYJ039 is a potent KSP inhibitor, and it contains benzimidazole as a central core.[11] Despite the high in vitro activity of this molecule (IC_{50} = 40 nM, KSP-ATPase test),[11] its cytotoxicity in HTC116 cells is low (EC_{50} = 2.30 μM).[11] You and co-workers proposed permeability problems as the cause of this low activity,[11] but this is unclear considering the good cellular activity shown by another series of similar benzimidazoles that target KSP.[13] The only experimental procedures described for the synthesis of CPUYJ039 and the related

Received: October 30, 2016
Revised: January 16, 2017
Published: January 30, 2017

ACS Publications © 2017 American Chemical Society

DOI: 10.1021/acscombsci.6b00166
ACS Comb. Sci. 2017, 19, 153−160

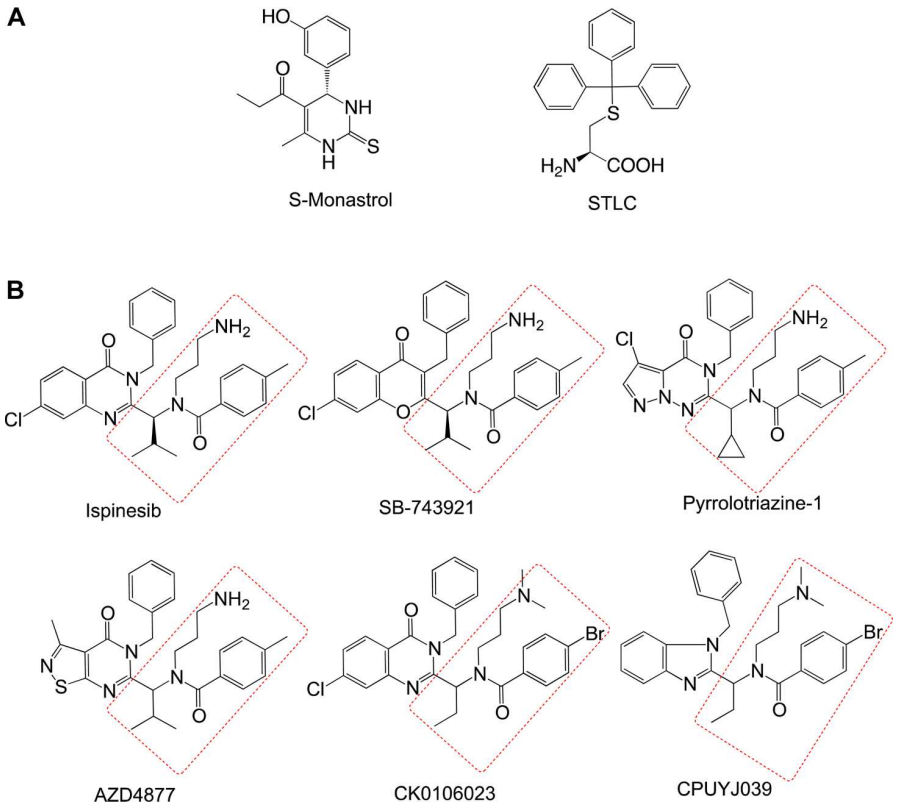


Figure 1. (A) *S*-Monastrol and STLC. (B) Some of the most important KSP inhibitors that contain the pharmacophoric *N*-(3-aminopropyl)-*N*-alkylbenzamide exocyclic fragment (highlighted in red).

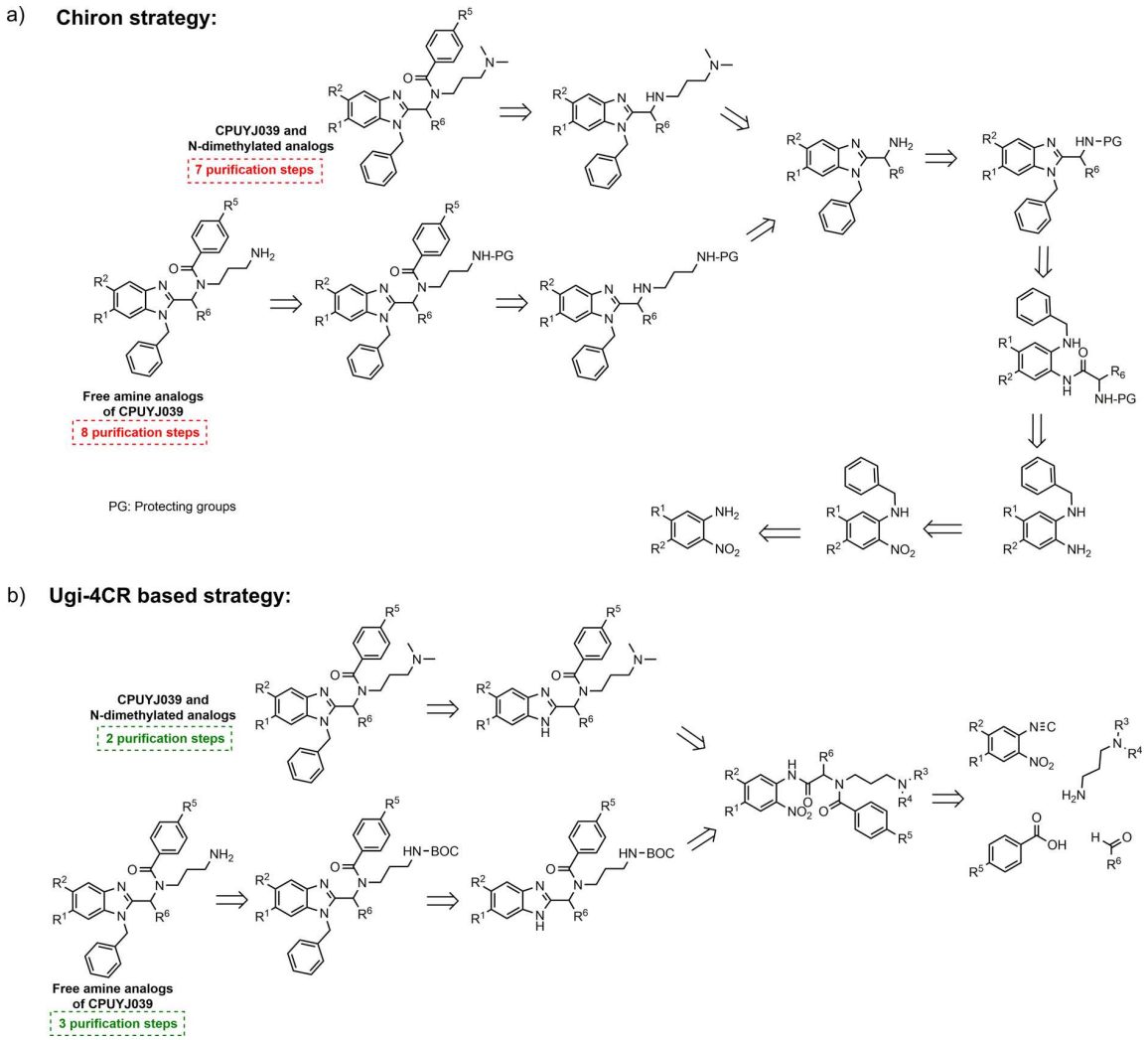
amino-free benzimidazoles are linear 7- or 8-step procedures, respectively, described by Boyce (Chiron Patent)[14] that uses 2-nitroanilines as starting materials (Scheme 1). In an effort to facilitate the development of more potent and effective KSP inhibitors of this class, we started a research program aimed at a simple and efficient synthesis route for the preparation of CPUYJ039 and its benzimidazole derivatives. It was envisaged that this would also help to clarify some structure−activity relationships within this KSP inhibitor family.

One of the key issues of the current drug development process concerns the high process cost, sustainability and viability of the synthetic routes necessary to obtain privileged structures.[15] Multicomponent reactions (MCRs)[16] offer attractive solutions for new programs based on parallel synthesis when compared to linear synthesis processes. The importance of the MCR-based transformations lies not only in the intrinsic ability to generate convergent diversity but also the possibility of different cyclization strategies to obtain new heterocycles from the adducts formed. There are several relevant examples in which antitumor drugs have been obtained through multicomponent strategies, such as the discovery of p53−MDM2 interaction inhibitors as a promising new approach for cancer treatment by an Ugi-based strategy,[17] and the application of the Biginelli-type three-component reaction to prepare a series of dihydropyrazolo[3,4-*b*]pyridines and benzo[4,5]imidazole[1,2-*a*]pyrimidines as dual KSP/Aurora-A Kinase inhibitors.[18] Isocyanide-based multicomponent reactions (IMCRs)[16] have been widely used in drug discovery.[19] The paradigmatic Ugi four-component reaction (4CR) produces α-acylaminoamides that closely resemble dipeptides, and these can be further modified to access a rich array of skeletal diversity, in particular, rigidified scaffolds.[20] In 2004, Tron synthesized a series of quinazolinones, including the racemic Ispinesib, in four steps by exploring the reactivity of secondary amines in the Ugi reaction.[21]

An alternative strategy for the construction of heterocycles by the cyclization of Ugi intermediates involves the use of suitably functionalized isocyanides as starting materials. Hulme's group used *N*-Boc-ortho-phenylisocyanides (containing a masked amine group) as building blocks to perform the Ugi reaction for the synthesis of benzimidazoles.[22] However, the synthesis of CPUYJ039-free amine analogues by this strategy would require the use of two different protecting groups (for the amine and isocyanide components, respectively) and orthogonal deprotection steps because the use of 2-(*N*-Boc-amino)-phenylisocyanides as starting materials in conjunction with *N*-Boc-protected-3-aminoalkylamines for the Ugi reaction[22] leads to the generation of byproducts. Thus, we envisioned another alternative based on the use of 2-nitrophenyl isocyanides as starting materials for Ugi-4CRs, although this strategy has not been explored to any great extent.[23] The retrosynthetic pathways developed in the Chiron patent for the synthesis of CPUYJ039 and its amine-free analogues as well as our proposed methodology are highlighted in Scheme 1. In this study, we present a new synthetic route for straightforward access to the potent benzimidazole KSP inhibitor CPUYJ039 (in 2 steps) and related benzimidazole-free amine analogues (3 steps) using a Ugi-4CR/cyclization strategy with 2-nitrophenyl isocyanides (2-nitrophenyl isocyanide or 4-methoxy-2-nitrophenyl isocyanide)[23] (Scheme 2). This approach provides a considerable reduction of the synthetic pathway described in

DOI: 10.1021/acscombsci.6b00166
ACS Comb. Sci. 2017, 19, 153−160

Scheme 1. (A) Retrosynthetic Approaches to CPUYJ039 and Free Amine Analogues by the Chiron Patent and (B) the Strategy Described Herein



the original Chiron patent (5 steps) for the preparation of such chemical structures.[14]

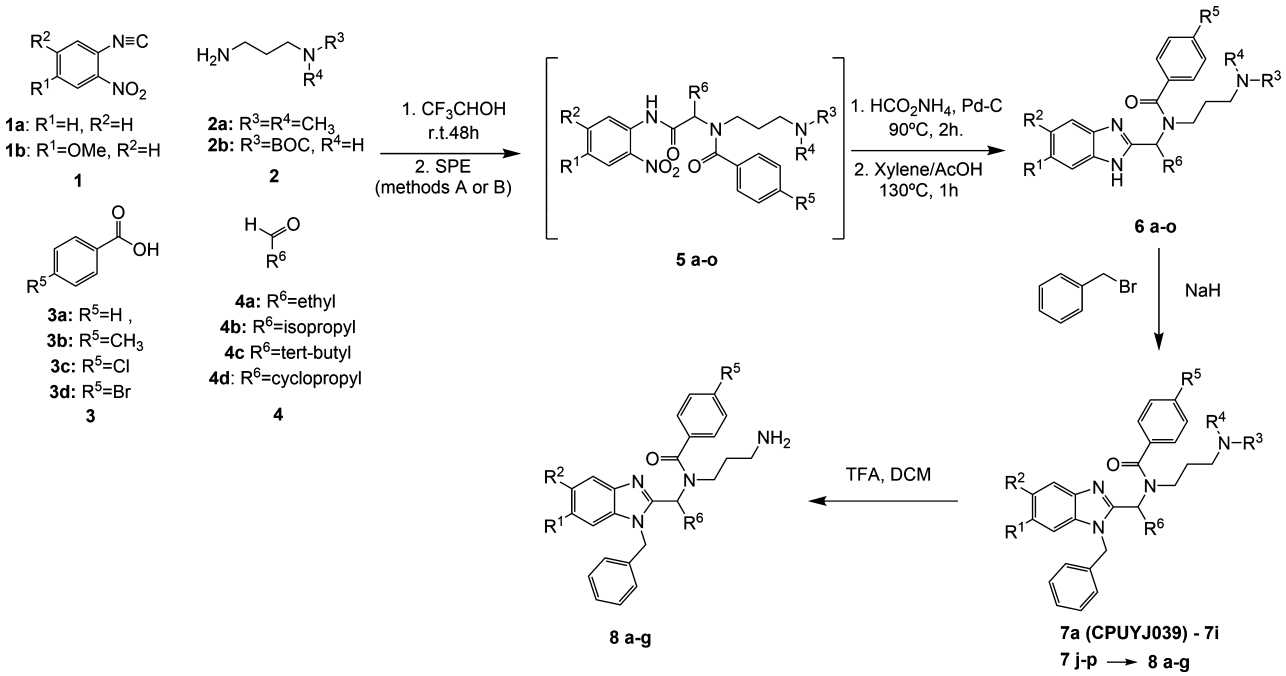
RESULTS AND DISCUSSION

To maximize the chances of obtaining compounds that were bioactive against the target kinesin KSP, we performed docking experiments using Surflex software on the L5/α2/α3 pocket of KSP and several crystallographic structures deposited in the Protein Data Bank: Ispinesib (PDB ID: 4AP0), SB-743921 (4AS7), and pyrrolotriazine-1 (2GM1) in complex with KSP. The binding poses (in 4AP0) were predicted for AZD4877, CK0106023, and CPUYJ039 (Figure S1) as well as for a small library including CPUYJ039 and 14 selected analogues (Figure 2) from 64 (2 × 2 × 4 × 4) possible combinations. The building blocks used for the starting Ugi reaction were selected to take into account the structural requirements of the assembled final benzimidazole structures for appropriate interaction with KSP, as suggested by docking studies. A basic aminopropyl moiety serves as a hydrogen bond donor for the carboxylate on Glu116. A cooperative binding pocket, mainly formed by Arg119, Ser120, Trp127, Asp130 and Ala133, accommodated the benzoyl moiety. Indeed, the functionalization with *para*-substituents (chloro, bromo and, in particular, methyl) enhanced the interaction with the target. Only small differences were predicted with respect to the alkyl side chains (ethyl, cyclopropyl, *iso*-propyl, *tert*-butyl), with a slight preference for the bulkier substituents. Finally, the pocket formed by Leu160, Leu171, Gly217, Ala218 and Arg221 (which was supposed to accommodate the benzimidazole moiety) offered a large enough space to bear the presence of substituents at position 5 or 6 (Figure 2). Further details and the predicted score for each compound are provided in the Supporting Information.

The synthetic strategy employed to obtain CPUYJ039 (**7a**) and its analogues is represented in Scheme 2. It should be noted that the proposed method enables the synthesis of N-dimethylated compounds **7a−i** as well as compounds containing a free amino group (**8a−g**). A sequence of two steps was used, and this comprised an Ugi-4CR reaction + NO_2-reduction/cyclization and *N*-benzylation sequence. For the targeted benzimidazoles with a free amino group (**8a−g**) to be obtained, an extra deprotection step was required to remove the Boc group from the aminopropyl chain in compounds **7j−p**. All of the starting materials used in this study are

DOI: 10.1021/acscombsci.6b00166
ACS Comb. Sci. 2017, 19, 153−160

Scheme 2. Synthetic Route for Obtaining CPUYJ039 and Analogues with the Synthesis of Compounds 8a−g Carried out by a Final Treatment with TFA



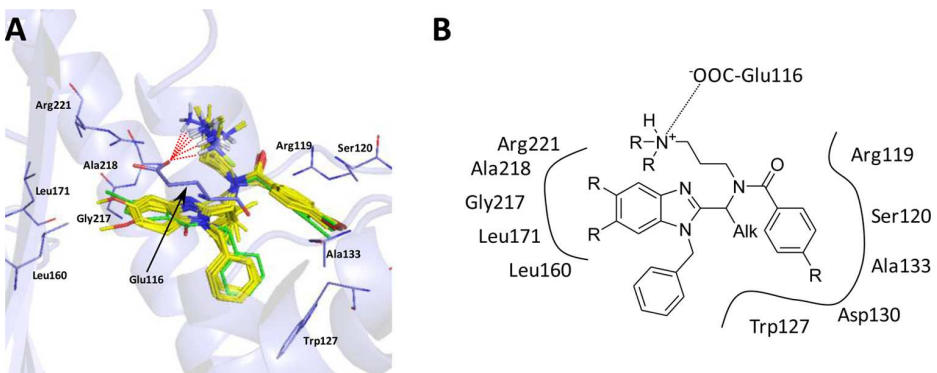


Figure 2. (A) Binding modes proposed for novel CPUYJ039 analogues in the L5/α2/α3 pocket of the KSP motor domain (see Supporting Information for further details). (B) Schematic binding mode for novel CPUYJ039 analogues.

commercially available. The use of 2-nitrophenyl isocyanides **1** as building blocks for the Ugi reaction (containing the nitro functionality as a masked internal amine group) is the key aspect of our strategy because it enables selective cyclization through the nearest carboxamido group in adducts **5**.

Compounds **5a−o** were prepared by Ugi-4CR using equimolar amounts of the corresponding amine, aldehyde, acid, and 2-nitrophenyl isocyanide at room temperature (Scheme 2). Optimization of the process revealed that the solvent is a key factor for a successful reaction outcome. The Ugi reaction conducted in methanol did not proceed. However, the use of trifluoroethanol as a solvent allowed the reaction to proceed satisfactorily in a period of 24−48 h in most cases (Figure 3). Another important aspect is the preformation of the intermediate imine at low temperature (−20 °C) prior to addition of the remaining components (acid and isocyanide) of the reaction. The Ugi condensations proceeded well (only as a main reaction product; representative yields: 80% **5a** and 78% **5b**), and the standardization of the reaction conditions was successful for all of the combinations of building blocks used, although when 4-bromobenzoic acid was used as a reagent, the use of methanol as a cosolvent was needed and a longer reaction time (72 h) was required to complete the transformation. Two workup protocols were performed for Ugi adducts: A "catch and release" strategy [by using PS-TsOH as a scavenger for the Ugi intermediates (**5a−i**) that reacts through the basic dimethylamino group present in these compounds (catch) and subsequent treatment with DIPEA (release)] was performed to give pure Ugi compounds **5a−i** (Method A). The workup of compounds containing an *N*-Boc-aminopropyl chain (**5j−o**) was carried out by combining the use of two supported reagents (PS-TsOH and PS-carbonate) to carry out the workup after the Ugi reaction, acting as scavengers for the eventual excess of amine and isocyanide (PS-TsOH) as well as acid (PS-carbonate) at room temperature (Method B). Hydrogenation/cyclization required the catalytic hydrogenation of the Ugi

DOI: 10.1021/acscombsci.6b00166
ACS Comb. Sci. 2017, 19, 153−160

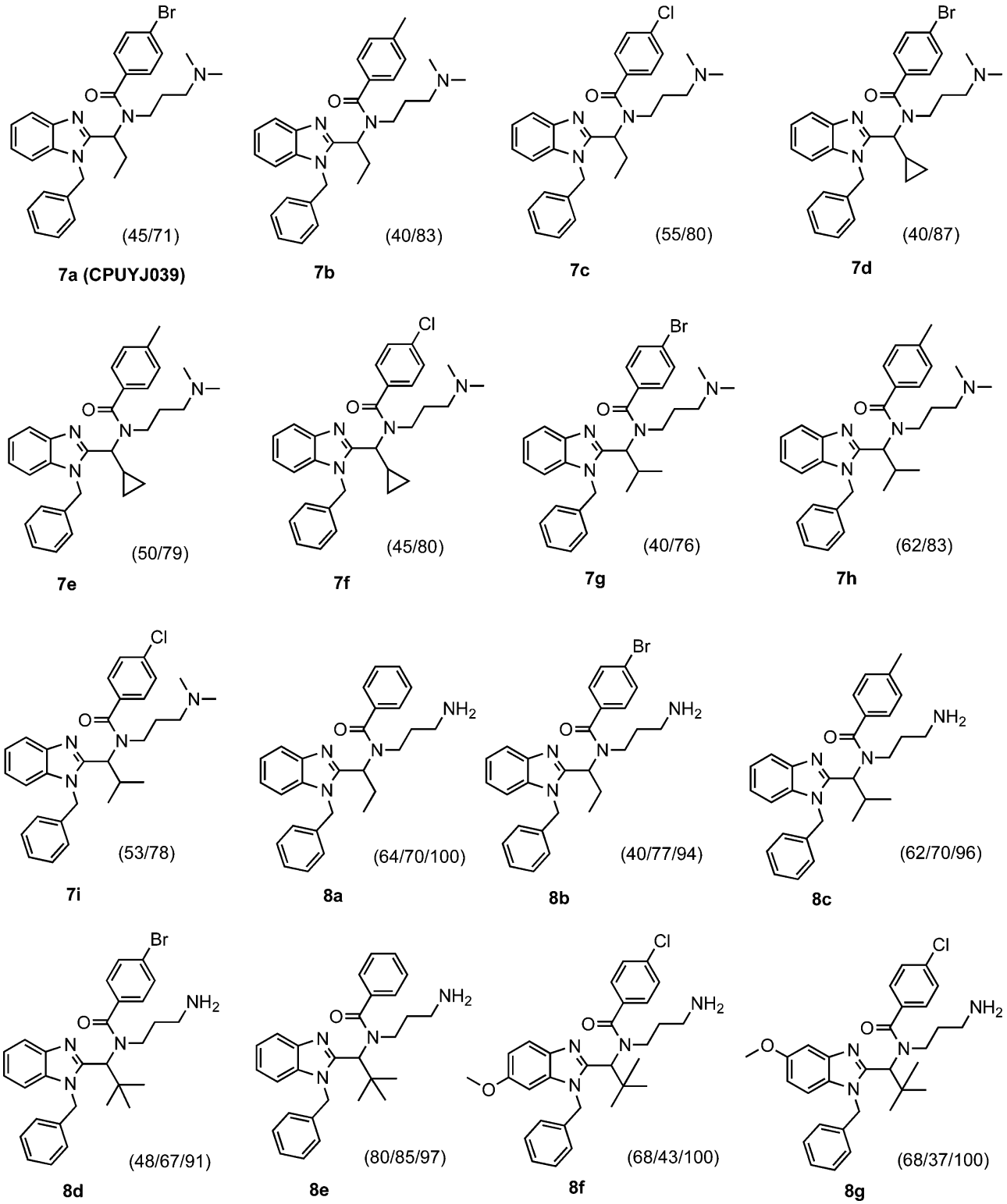


Figure 3. A set of final synthesized compounds (yield of the first step (Ugi + cyclization)/yield of the second step (benzylation)/yield of the third step (deprotection of the Boc group)).

adducts by using ammonium formate and Pd/C at 90 °C for 2 h to reduce the nitro group. The obtained amine was heated at 130 °C under microwave heating in a xylene/acetic acid mixture for 1 h to provide quick access to cyclic compounds **6a−o** in moderate yields (30−50%). This cyclization and subsequent benzylation strategy not only provides N-dimethylated benzimidazoles **7a−i** by a short and simple methodology but also gives the final free amine compounds

DOI: 10.1021/acscombsci.6b00166
ACS Comb. Sci. 2017, 19, 153−160

8a−g through smooth ring closure. Benzylation of compounds **6a−o** using NaH as base and benzyl bromide at 0 °C provided the dimethylated aminopropyl benzimidazoles **7a−i** as well as the *N*-Boc analogues **7j−p** in almost quantitative yields. In the case of the substituted 6-methoxybenzimidazole **6o**, two benzylated regioisomers **7o−p** were formed in similar proportions (54% **7o**/45% **7p**) and unequivocally identified through NMR (see Figure S2). The final step in the synthesis of amine-free CPUYJ039 analogues was the deprotection of the BOC group on the aminopropyl chain in compounds **7j−p**. This step was performed using a TFA/DCM (10%) solution at room temperature to give the benzimidazoles with a free amino group (**8a−g**) in almost quantitative yields. The structures of the obtained benzimidazoles and the partial yields for each of the stages of this focused chemical library synthesis of benzimidazoles are represented in Figure 3.

The CPUYJ039 analogues synthesized by the new method described here were evaluated for cellular activity[24] using two human cancer cell lines, HCT116 and HeLa cells, which are summarized in Tables 1 and 2. The analogues having an N-

Table 1. IC_{50} Values (μM) of the CPUYJ039 Analogues and the References CPUYJ039 and STLC in Cell Proliferation Inhibition[a]

	HCT116		HeLa	
compound	IC_{50} (μM)	inhibition (%) at 20 μM	IC_{50} (μM)	inhibition (%) at 20 μM
7b	>20	<5	>20	6.7
7c	>20	<5	>20	<5
7d	>20	<5	>20	<5
7e	>20	<5	>20	<5
7i	>20	<5	>20	<5
7g	>20	<5	>20	<5
7h	>20	<5	>20	<5
7i	>20	<5	>20	<5
8a	>20	<5	>20	<5
8b	18 (0.71)	82	19 (0.79)	69
8c	3.1 (0.17)	92	5.3 (0.61)	>95
8d	1.7 (0.20)	94	2.4 (0.34)	>95
8e	1.9 (0.30)	94	2.4 (0.66)	>95
8f	3.6 (0.54)	>95	6.5 (0.52)	94
8g	1.0 (0.069)	>95	1.3 (0.34)	94
CPUYJ039[b]	2.3[b]		N.T.[b,c]	
STLC	0.49[d]	>95	0.91[d]	>95

[a]The values (μM) are the means of three independent experiments with standard deviations shown in parentheses. [b]Values previously reported by Jiang and co-workers.[11] The length of chemical treatment with cells in their experiments was 48 h, which is different from ours. [c]N.T.: not tested. [d]The values are consistent with previous studies.[25]

dimethylated group, excluding CPUYJ039 (**7a**), exhibited no significant inhibition of cell proliferation even at 20 μM (Table 1). The N-dimethylated analogues generally produced less favorable profiles in cell proliferation inhibition than the analogues having a basic amine group. Analogues **8c−8g** exhibited concentration-dependent anti-cell proliferation effects on both cell lines at concentrations above 1 μM (Figure S3). The three most potent analogues, **8d**, **8e**, and **8g**, having a tertiary butyl substituent at the R^6 position as well as a free amine group at the end of the aminopropyl chain in common, showed more potent anti-cell proliferation activities than those of CPUYJ039 and were also found to have higher antimitotic

Table 2. IC_{50} Values (μM) of 8d, 8e, and 8g and References CPUYJ039 and STLC in Mitotic Arrest and KSP ATPase[a]

	mitotic arrest		KSP ATPase	
compound	IC_{50} (μM)	inhibition (%)	IC_{50} (μM)	inhibition (%) at 200 μM
8d	3.5 (0.68)	87 (8 μM)	9.4 (5.0)	82
8e	4.3 (0.20)	83 (8 μM)	10 (4.0)	86
8g	2.3 (0.11)	90 (5 μM)	1.8 (0.44)	92
CPUYJ039[b]	N.D.[b,c]	40 (16 μM)[b]	0.04[b]	
STLC	1.3[d]	93 (5 μM)	1.5[d]	92

[a]The values (μM) are the means of three independent experiments with standard deviations shown in parentheses. [b]Values previously reported by Jiang and co-workers.[11] Their results indicate CPUYJ039 with a mitotic arrest IC_{50} value of >16 μM in the treatment of HCT116 cells with CPUYJ039 for 24 h. Their enzyme assay conditions were different from ours in the concentrations of KSP protein, microtubules, and ATP. [c]N.D.: not determined. [d]The values are consistent with previous studies.[25]

activity in the cell cycle analysis (Table 2). For example, treatment of HeLa cells with **8g** for 20 h, corresponding to approximately one cell cycle, efficiently increased the population of mitotic cells, which began at 1 μM and reached a maximum level of 90% at 5 μM (Figure S3). Immunofluorescence microscopic observation of HeLa cells revealed that **8d**, **8e**, and **8g** induced monoastral spindles as their phenotypes, similar to the typical phenotype by KSP inhibitors such as STLC (Figure 4). The cellular activities of these compounds appear to be in agreement with their inhibitory abilities for the KSP ATPase (Table 2). Even in the initial library of CPUYJ039 analogues, **8d**, **8e**, and **8g** were found to be more potent antimitotic agents relative to CPUYJ039 and are comparable to STLC in terms of the inhibitory activities for KSP ATPase, cell proliferation, and the cell cycle.

CONCLUSIONS

A concise and efficient MCR-based approach has been optimized for the synthesis of benzimidazole-type KSP inhibitors as antimitotic agents. This procedure is based on an initial Ugi-4CR employing 2-nitrophenyl isocyanides, and it allows rapid access to the potent KSP inhibitor (CPUYJ039) and dimethylated analogues as well as its derivatives containing a free amino group as compared with the current linear synthesis procedures reported previously. The discovery of more optimized CPUYJ039 analogues indicates the power of our new MCR-based method that efficiently provides potential mitotic inhibitors targeting the KSP motor domain.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

General Procedure for the Synthesis of Products 6a−i.

Ugi Reaction. In a prerefrigerated Kimble vial (−20 °C), the corresponding aldehyde **4** (1 mmol) was added to N^1,N^1-dimethylpropane-1,3-diamine **2a** (1 mmol) in trifluoroethanol (4 mL), and the mixture was stirred at room temperature for 10 min. Acid **3** (1 mmol) and 2-nitrophenyl isocyanide **1a** (1 mmol) were added separately. The mixture was stirred continuously at room temperature for 48 h, except those containing acid **3d** as a building block (72 h). The reaction was monitored by TLC, and when the 2-nitro-phenyl-isocyanide had been consumed, the solvent was removed under reduced pressure. The residue was dissolved in 40 mL of a DCM/MeOH (3:1) solution and treated with 3 mmol of PS-TsOH

DOI: 10.1021/acscombsci.6b00166
ACS Comb. Sci. 2017, 19, 153−160

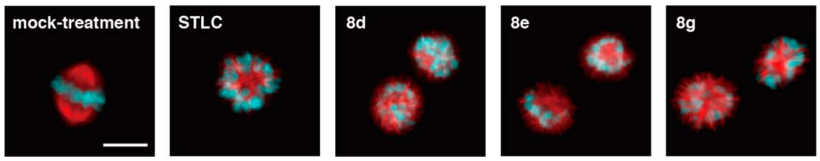


Figure 4. Immunofluorescence microscopic images of the phenotypes induced by **8d**, **8e**, and **8g**. HeLa cells were cultured in the presence of 6 μM **8d**, 6 μM **8e**, or 5 μM **8g**. The representative phenotype of each compound is presented. In addition to the normal mitotic spindle in mock-treated cells, the STLC-induced monoastral spindle is also presented. Microtubules (red) and chromosomes (cyan) were stained with anti-α-tubulin antibody and DAPI, respectively. Scale bar, 10 μm.

(0.8 mmol/g loading) (catch) and stirred for 1 h. The polymer was filtered off and washed with 50 mL of 5:1 DCM/MeOH and then treated with 10 mL of DIPEA (release) in 20 mL of DCM. The polymer was again filtered off and the filtrate was collected and evaporated to give adduct **5**.

Reduction and Cyclization. To a solution of Ugi adduct **5** (1 mmol) in dry degassed MeOH (5 mL) were added ammonium formate (5 mmol) and 100 mg of Pd/C, and the mixture was heated under reflux (90 °C) for 2 h in a sealed tube. After the starting material had been consumed (TLC control), the mixture was filtered through Celite and washed with dichloromethane, and the filtrate was evaporated under reduced pressure. The residue obtained in the previous step was placed in a microwave vial (Anton Paar) and treated with xylene/acetic acid (2,8 mL, 13:1) until the starting material had been consumed (1 h). The microwave vial was cooled to room temperature, and the mixture was diluted with EtOAc (15 mL) and washed (3×) with saturated Na_2CO_3 (15 mL). The organic layer was dried over anhydrous Na_2SO_4 and concentrated. The residue was purified in a Teledyne Isco CombiFlash Rf apparatus (hexane/EtOAc or EtOAc/MeOH) to afford the targeted benzimidazoles **6a−i**.

Biological Evaluations. The cell proliferation assays using cultured cells, the immunostaining assays for the antimitotic activity and phenotypes, and the in vitro ATPase assays using the KSP motor domain with microtubules are described in the Supporting Information.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acscombsci.6b00166.

NMR spectra of all compounds, supplementary data regarding the biological activities of **8d, 8e**, and **8g**, and experimental procedures for biological evaluations (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Fax.: +34 881815704, Tel.: +34 88115739, e-mail: albertojose.coelho@usc.es.

ORCID

Eddy Sotelo: 0000-0001-5571-2812
Alberto Coelho: 0000-0001-6514-3967

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by the "Programa Sectorial de Investigacion Aplicada e i+d" to A.C. (Project: 10CSA234012PR) as well as " Programa de Consolidación de Unidades de Investigación" (PS09/63-GPC2014/003) and Centro Singular de Investigación de Galicia Accreditation 2016-2019 (ED431G/09) all from Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria, and the European Regional Development Fund (ERDF). The work was also supported by the Drug Discovery Program of the Pharma Valley Center to A.A.

■ REFERENCES

(1) (a) Linardopoulos, S.; Blagg, J. Aurora Kinase Inhibition: A New Light in the Sky? *J. Med. Chem.* **2015**, *58*, 5186. (b) Dipke, C. N.; Vyas, R. Drug design efforts toward Aurora kinase inhibitors. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* **2014**, *5*, 714. (c) Hilton, J. F.; Shapiro, G. I. Aurora Kinase Inhibition as an Anticancer Strategy. *J. Clin. Oncol.* **2014**, *32*, 57. (d) Dar, A. A.; Goff, L. W.; Majid, S.; Berlin, J.; El-Rifai, W. Aurora kinase inhibitors–rising stars in cancer therapeutics? *Mol. Cancer Ther.* **2010**, *9*, 268. (e) Palmisiano, N. D.; Kasner, M. T. Polo-like kinase and its inhibitors: Ready for the match to start? *Am. J. Hematol.* **2015**, *90*, 1071. (f) Craig, S. N.; Wyatt, M. D.; McInnes, C. Current assessment of polo-like kinases as antitumor drug targets. *Expert Opin. Drug Discovery* **2014**, *9*, 773.

(2) (a) Myers, S. M.; Collins, I. Recent findings and future directions for interpolar mitotic kinesin inhibitors in cancer therapy *Fut. Future Med. Chem.* **2016**, *8*, 463. (b) Rath, O.; Kozielski, F. Kinesins and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2012**, *12*, 527. (c) Schmidt, M.; Bastians, H. Mitotic drug targets and the development of novel anti-mitotic anticancer drugs. *Drug Resist. Updates* **2007**, *10*, 162.

(3) Perez-Melero, C. KSP Inhibitors as Antimitotic Agents. *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, *14*, 2286.

(4) (a) Huszar, D.; Theoclitou, M.; Skolnik, J.; Herbst, R. Kinesin motor proteins as targets for cancer therapy. *Cancer Metastasis Rev.* **2009**, *28*, 197. (b) Compton, D. A. Spindle assembly in animal cells. *Annu. Rev. Biochem.* **2000**, *69*, 95.

(5) (a) Mayer, T. U.; Kapoor, T. M.; Haggarty, S. J.; King, R. W.; Schreiber, S. L.; Mitchison, T. J. Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science* **1999**, *286*, 971. (b) DeBonis, S.; Skoufias, D. A.; Lebeau, L.; Lopez, R.; Robin, G.; Margolis, R. L.; Wade, R. H.; Kozielski, F. In vitro screening for inhibitors of the human mitotic kinesin Eg5 with antimitotic and antitumor activities. *Mol. Cancer Ther.* **2004**, *3*, 1079. (c) Yan, Y.; Sardana, V.; Xu, B.; Homnick, C.; Halczenko, W.; Buser, C. A.; Schaber, M.; Hartman, G. D.; Huber, H. E.; Kuo, L. C. Inhibition of a mitotic motor protein: where, how, and conformational consequences. *J. Mol. Biol.* **2004**, *335*, 547. (d) Kaan, H. Y. K.; Ulaganathan, V.; Hackney, D. D.; Kozielski, F. An allosteric transition trapped in an intermediate state of a new kinesin−inhibitor complex. *Biochem. J.* **2010**, *425*, 55.

(6) (a) Johnson, R. K.; McCabe, F. L.; Cauder, E.; Innlow, L.; Whitacre, M.; Winkler, J. D.; Bergnes, G.; Feng, B.; Smith, W. W.; Morgans, D.; Wood, K. A potent and selective inhibitor of KSP mitotic kinesin, demonstrates broad-spectrum activity in advanced murine

DOI: 10.1021/acscombsci.6b00166
ACS Comb. Sci. 2017, 19, 153−160

tumors and human tumor xenografts. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* **2002**, *43*, 1335. (b) Sorbera, L. A.; Bolos, J.; Serradell, N.; Bayes, M. Ispinesib Mesilate. *Drugs Future* **2006**, *31*, 778. (c) Finer, J. T.; Bergnes, G.; Smith, W. W.; Chabala, J. C.; Feng, B. Methods and compositions utilizing quinazolinones. U.S. Pat. Appl. Publ. US8470838 B2, June 25, 2013.

(7) (a) Bongero, D.; Paoluzzi, L.; Marchi, E.; Zullo, K. M.; Neisa, R.; Mao, Y.; Escandon, R.; Wood, K.; O'Connor, O. A. The novel kinesin spindle protein (KSP) inhibitor SB-743921 exhibits marked activity in in vivo and in vitro models of aggressive large B-cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma* **2015**, *56*, 2945. (b) Holen, K. D.; Belani, C. P.; Wilding, G.; Ramalingam, S.; Volkman, J. L.; Ramanathan, R. K.; Vasist, L. S.; Bowen, C. J.; Hodge, J. P.; Dar, M. M.; Ho, P. T. C. A first in human study of SB-743921, a kinesin spindle protein inhibitor, to determine pharmacokinetics, biologic effects and establish a recommended phase II dose. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2011**, *67*, 447. (c) Mcdonald, A.; Bergnes, G.; Feng, B.; Knight, S. D.; Newlander, K. A.; Dhanak, D.; Brook, C. S.; Cytokinetics, I.; Corporation, S. B. Compounds useful for treating cellular proliferative diseases and disorders by modulating the activity of KSP are disclosed. Patent WO 2003088903 A2, October 30, 2003.

(8) Kim, K. S.; Lu, S.; Cornelius, L. A.; Lombardo, L. J.; Borzilleri, R. M.; Schroeder, G. M.; Sheng, C.; Rovnyak, G.; Crews, D.; Schmidt, R. J.; Williams, D. K.; Bhide, R. S.; Traeger, S. C.; McDonnell, P. A.; Mueller, L.; Sheriff, S.; Newitt, J. A.; Pudzianowski, A. T.; Yang, Z.; Wild, R.; Lee, F. Y.; Batorsky, R.; Ryder, J. S.; Ortega-Nanos, M.; Shen, H.; Gottardis, M.; Roussell, D. L. Synthesis and SAR of pyrrolotriazine-4-one based Eg5 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3937.

(9) (a) Theoclitou, M. E.; Aquila, B.; Block, M. H.; Brassil, P. J.; Castriotta, L.; Code, E.; Collins, M. P.; Davies, A. M.; Deegan, T.; Ezhuthachan, J. Discovery of (+)-*N*-(3-Aminopropyl)-*N*-[1-(5-benzyl-3-methyl-4-oxo-[1,2]thiazolo[5,4-*d*]pyrimidin-6-yl)-2-methylpropyl]-4-methylbenzamide (AZD4877), a Kinesin Spindle Protein Inhibitor and Potential Anticancer Agent. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 6734. (b) Gerecitano, J. F.; Stephenson, J. J.; Lewis, N. L.; Osmukhina, A.; Li, J.; Wu, K.; You, Z.; Huszar, D.; Skolnik, J. M.; Schwartz, G. K. A Phase I trial of the kinesin spindle protein (Eg5) inhibitor AZD4877 in patients with solid and lymphoid malignancies. *Invest. New Drugs* **2013**, *31*, 355. (c) Aquila, B.; Block, M. H.; Davies, A.; Ezhuthachan, J.; Filla, S.; Luke, R. W.; Pontz, T.; Russell, D. J.; Theoclitou, M. E.; Zheng, X. Mitotic kinesin inhibitors. U.S. Pat. Appl. Publ. US 20060063751 A1, March 26, 2006.

(10) Sakowicz, R.; Finer, J. T.; Beraud, C.; Crompton, A.; Lewis, E.; Fritsch, A.; Lee, Y.; Mak, J.; Moody, R.; Turincio, R.; Chabala, J. C.; Gonzales, P.; Roth, S.; Weitman, S.; Wood, K. W. Antitumor activity of a kinesin inhibitor. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 3276.

(11) Jiang, C.; Yang, L.; Wu, W. T.; You, Q. CPUYJ039, a newly synthesized benzimidazole-based compound, is proved to be a novel inducer of apoptosis in HCT116 cells with potent KSP inhibitory activity. *J. Pharm. Pharmacol.* **2011**, *63*, 1462.

(12) Jiang, C.; Chen, Y.; Wang, X.; You, Q. Docking studies on kinesin spindle protein inhibitors: an important cooperative 'minor binding pocket' which increases the binding affinity significantly. *J. Mol. Model.* **2007**, *13*, 987.

(13) (a) Sheth, P. R.; Shipps, G. W.; Seghezzi, W.; Smith, C. K.; Chuang, C.-C.; Sanden, D.; Basso, A. D.; Vilenchik, L.; Gray, K.; Annis, D. A.; Nickbarg, E.; Ma, Y.; Lahue, B.; Herbst, R.; Le, H. V. Novel benzimidazole inhibitors bind to a unique site in the kinesin spindle protein motor domain. *Biochemistry* **2010**, *49*, 8350. (b) Carbajales, C.; Prado, M. A.; Gutiérrez-de-Terán, H.; Cores, A.; Azuaje, J.; Novio, S.; Nuñez, M. J.; Fernández-García, B.; Sotelo, E.; García-Mera, X.; Sánchez-Lazo, P.; Freire-Garabal, M.; Coelho, A. Structure-Based Design of New KSP-Eg5 Inhibitors Assisted by a Targeted Multicomponent Reaction. *ChemBioChem* **2014**, *15*, 1471.

(14) Boyce, R.; Guo, H.; Mendenhall, K.; Walter, A.; Wang, W.; Xia, Y. Indole and benzimidazole derivatives. US 20060084687 A1, 20 Apr 2006.

(15) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, *40*, 2004.

(16) Dömling, A.; Ugi, I. Multicomponent Reactions with Isocyanides. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, *39*, 3168.

(17) Huang, Y.; Wolf, S.; Beck, B.; Köhler, L.-M.; Khoury, K.; Popowicz, G. M.; Goda, S. K.; Subklewe, M.; Twarda, A.; Holak, T. A.; Dömling, A. Discovery of highly potent p53-MDM2 antagonists and structural basis for anti-acute myeloid leukemia activities. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 802.

(18) Fu, R.; You, Q.; Yang, L.; Wu, W.; Jiang, C.; Xu, X. Design, synthesis and bioevaluation of dihydropyrazolo[3,4-b]pyridine and benzo[4,5]imidazo[1,2-a]pyrimidine compounds as dual KSP and Aurora-A kinase inhibitors for anti-cancer agents. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 8035.

(19) Dolle, R. E.; Le Bourdonnec, B.; Worm, K.; Morales, G. A.; Thomas, C. J.; Zhang, W. Comprehensive Survey of Chemical Libraries for Drug Discovery and Chemical Biology: 2009. *J. Comb. Chem.* **2010**, *12*, 765.

(20) (a) Hulme, C.; Lee, Y. S. Emerging approaches for the syntheses of bicyclic imidazo[1,2-x]-heterocycles. *Mol. Diversity* **2008**, *12*, 1. (b) Ivachtchenko, A. V.; Ivanenkov, Y. A.; Kysil, V. M.; Krasavin, M. Y.; Ilyin, A. P. Multicomponent reactions of isocyanides in the synthesis of heterocycles. *Russ. Chem. Rev.* **2010**, *79*, 787. (c) Ilyin, A. P.; Trifilenkov, A. S.; Kurashvili, I. D.; Krasavin, M.; Ivachtchenko, A. V. One-step construction of peptidomimetic 5-carbamoyl-4-sulfonyl-2-piperazinones. *J. Comb. Chem.* **2005**, *7*, 360. (d) Ilyn, A. P.; Loseva, M. V.; Vvedensky, V. Y.; Putsykina, E. B.; Tkachenko, S. E.; Kravchenko, D. V.; Khvat, A. V.; Krasavin, M. Y.; Ivachtchenko, A. V. One-Step Assembly of Carbamoyl-Substituted Heteroannelated [1,4] Thiazepines. *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 2811.

(21) Mossetti, R.; Pirali, T.; Saggiorato, D.; Tron, G. C. Imides: forgotten players in the Ugi reaction. One-pot multicomponent synthesis of quinazolinones. *Chem. Commun.* **2011**, *47*, 6966.

(22) Xu, Z.; Shaw, A.; Dietrich, J.; Cappelli, A.; Nichol, G.; Hulme, C. Facile, novel two-step syntheses of benzimidazoles, *bis*-benzimidazoles, and *bis*-benzimidazole-dihydroquinoxalines. *Mol. Diversity* **2012**, *16*, 73.

(23) (a) Gilley, C.; Kobayashi, Y. 2-nitrophenyl isocyanide as a versatile convertible isocyanide: rapid access to a fused gamma-lactam beta-lactone bicycle. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 4198. (b) Baldoli, C.; Maiorana, S.; Licandro, E.; Zinzalla, G.; Perdicchia, D. Synthesis of chiral chromium tricarbonyl labeled thymine PNA monomers via the Ugi reaction. *Org. Lett.* **2002**, *4*, 4341. (c) Chinigo, G. M.; Breder, A.; Carreira, E. M. Ugi-4-component reaction enabling rapid access to the core fragment of massadine. *Org. Lett.* **2011**, *13*, 78. (d) Zarganes-Tzitzikas, T.; Patil, P.; Khoury, K.; Herdtweck, E.; Dömling, A. Concise Synthesis of Tetrazole-keto-piperazines by Two Consecutive Ugi Reactions. *Eur. J. Org. Chem.* **2015**, *1*, 51.

(24) (a) Takeuchi, T.; Oishi, S.; Watanabe, T.; Ohno, H.; Sawada, J.; Matsuno, K.; Asai, A.; Asada, N.; Kitaura, K.; Fujii, N. Structure-activity relationships of carboline and carbazole derivatives as a novel class of ATP-competitive kinesin spindle protein inhibitors. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4839. (b) Yokoyama, H.; Sawada, J.; Katoh, S.; Matsuno, K.; Ogo, N.; Ishikawa, Y.; Hashimoto, H.; Fujii, S.; Asai, A. Structural basis of new allosteric inhibition in Kinesin spindle protein Eg5. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 1128.

(25) (a) Ogo, N.; Oishi, S.; Matsuno, K.; Sawada, J.; Fujii, N.; Asai, A. Synthesis and biological evaluation of L-cysteine derivatives as mitotic kinesin Eg5 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3921. (b) Ogo, N.; Ishikawa, Y.; Sawada, J.; Matsuno, K.; Hashimoto, A.; Asai, A. Structure-Guided Design of Novel l-Cysteine Derivatives as Potent KSP Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 1004.

DOI: 10.1021/acscombsci.6b00166
ACS Comb. Sci. 2017, 19, 153−160

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Supporting Information for:

Multicomponent assembly of the Kinesin Spindle Protein (KSP) inhibitor CPUYJ039 and analogs as antimitotic agents

Carlos Carbajales,[†] Jun-ichi Sawada,[‡] Giovanni Marzaro,[§] Eddy Sotelo,[†,‖] Luz Escalante,[†] Antonio Sánchez-Díaz Marta,[†] Xerardo García-Mera,[‖] Akira Asai,[‡] and Alberto Coelho*[,†,‖]

[†]*Center for Research in Biological Chemistry and Molecular Materials, University of Santiago de Compostela, Jenaro de la Fuente s/n, Campus Vida, Santiago de Compostela 15782, Spain.*

[‡]*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka, Suruga-ku, Shizuoka 422-8526, Japan.*

[§]*Department of Pharmaceutical and Pharmacological Sciences, University of Padova, Via Marzolo 5, 35131 Padova, Italy.*

[‖]*Department of Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Santiago de Compostela, Avda. das Ciencias, s/n. Campus sur, Santiago de Compostela, 15782, Spain.*

Contents:

I Experimental part. General aspects and detailed spectroscopic data……..…2-19

II NMR Spectra ……20-59

III. Computational methodologies. Figures S1 and S2…….……...…60-63

IV. Figure S3. The biological activities of **8d**, **8e** and **8g**…….……64

V. Experimental procedures for biological evaluations…….....64-67

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

I. Experimental part. General aspects and detailed spectroscopic data

General: Commercially available starting materials and reagents were purchased and used without further purification from freshly opened containers. Commercial isocyanides were purchased from Akos Building blocks (Germany) for 4-methoxy-2-nitrophenyl isocyanide and SpeedChemical Product List (China) for 2-nitrophenyl isocyanide. Polystyrene-supported *p*-toluenesulfonic acid (PS-TsOH) and Polystyrene-supported potassium carbonate (PS-CO_3) were purchased from Aldrich. All solvents were purified and dried by standard methods. Organic extracts were dried with anhydrous Na_2SO_4. The reactions were monitored by TLC with Merck silica gel strips (GF 254, 2.5 mm); purified compounds each showed a single spot. Unless stated otherwise, UV light and/or iodine vapor were used for the detection of compounds. The synthesis and purification of all compounds were accomplished with equipment routinely available in organic chemistry laboratories for parallel synthesis. Most of the preparative experiments were performed in coated Kimble vials with a PLS (6 × 4) Organic Synthesizer and orbital stirring. Cyclizations were performed in an Anton Paar 300 Microwave Synthesizer. Purification of isolated products was carried out by column chromatography or with an ISCO Combiflash system that employs prepacked silica gel columns. Compounds were routinely characterized by spectroscopy and mass spectrometry. Melting points were determined with a Gallenkamp melting point apparatus and are uncorrected. The NMR spectra were recorded on AM 300 MHz (^{1}H) and XM 500 75 MHz (^{13}C) spectrometers (Bruker). Chemical shifts are given as □ values against

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

tetramethylsilane as internal standard, and J values are given in Hz. High-resolution mass spectra (HRMS) were obtained on an Autospec Micromass spectrometer.

N-(1-(1H-benzo[d]imidazol-2-yl)propyl)-4-bromo-N-(3-(dimethylamino)propyl)benzamide (***6a***). Slightly brown foam, (45%, 200 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 10.82 (bs, 1H), 7.86 – 7.09 (m, 8H), 5.11 (t, 1H), 3.71 (bs, 1H), 3.36 (bs, 1H), 3.14 (bs, 1H), 2.43 (bs, 5H), 1.89 (bs, 5H), 1.46 (bs, 1H), 1.00 (bs, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.9, 152.1, 132.0, 130.9, 129.2, 128.8, 124.6, 122.7, 115.6, 68.1, 60.1, 56.2, 38.7, 23.7, 22.9, 10.9. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{22}H_{28}BrN_4O$ $[M+H]^+$ 443.1446, found 443.1444.

N-(1-(1H-benzo[d]imidazol-2-yl)propyl)-N-(3-(dimethylamino)propyl)-4-methylbenzamide (***6b***). Light brown foam, (40%, 151 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 12.62 (bs, 1H), 7.73 – 6.92 (m, 8H), 5.30 – 5.04 (m, 1H), 3.66 (bs, 2H), 2.83 – 2.21 (m, 9H), 2.21 – 1.77 (m, 4H), 1.33 – 0.52 (m, 5H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.7, 153.1, 131.3, 129.6, 129.0, 128.0, 124.0, 123.1, 118.8, 67.3, 56.0, 53.9, 37.1, 28.3, 23.1, 21.7, 10.6. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{23}H_{31}N_4O$ $[M+H]^+$ 379.2498, found 379.2497.

N-(1-(1H-benzo[d]imidazol-2-yl)propyl)-4-chloro-N-(3-(dimethylamino)propyl)benzamide (***6c***). Colorless foam, (55%, 219 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 12.69 (bs, 1H), 8.07 – 7.61 (m, 3H), 7.54 – 7.03 (m, 5H), 5.11 (s, 1H), 4.01 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 3.54 – 3.31 (m, 3H), 2.72 (d, J = 8.9 Hz, 6H), 2.23 – 1.83 (m, 2H), 1.76 – 1.50 (m, 1H), 1.50 – 1.31 (m, 1H), 0.83 (t, J = 6.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.3, 152.0, 132.4, 130.1, 129.6, 126.1, 124.1,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

122.3, 114.9, 67.7, 61.7, 57.9, 38.0, 23.5, 19.8, 10.8. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{22}H_{28}ClN_4O$ $[M+H]^+$ 399.1952, found 399.1956.

*N-((1H-benzo[d]imidazol-2-yl)(cyclopropyl)methyl)-4-bromo-N-(3-(dimethylamino)propyl)-benzamide (**6d**).* Light yellow foam, (40%, 182 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 10.63 (bs, 1H), 7.86 – 7.41 (m, 3H), 7.41 – 7.08 (m, 5H), 4.40 (d, *J* = 9.6 Hz, 1H), 2.43 (bs, 2H), 2.14 (bs, 2H), 1.91 (bs, 6H), 1.58 (bs, 3H), 1.03 – 0.69 (m, 2H), 0.52 (bs, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.8, 151.2, 132.3, 130.4, 129.9, 128.6, 127.8, 126.6, 125.2, 67.2, 64.7, 61.5, 29.2, 21.2, 13.5, 6.0, 4.6. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{23}H_{28}BrN_4O$ $[M+H]^+$ 455.1446, found 455.1448.

*N-((1H-benzo[d]imidazol-2-yl)(cyclopropyl)methyl)-N-(3-(dimethylamino)propyl)-4-methylbenzamide (**6e**).* Colorless foam, (50%, 195 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 10.93 (bs, 1H), 7.76 (bs, 1H), 7.56 – 7.04 (m, 7H), 4.66 – 4.36 (m, 1H), 3.49 (bs, 2H), 2.37 (bs, 4H), 2.16 (bs, 2H), 1.92 (bs, 6H), 1.57 (bs, 2H), 1.03 – 0.69 (m, 2H), 0.52 (bs, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 171.5, 149.7, 131.5, 129.5, 129.2, 128.4, 126.9, 122.3, 121.1, 67.5, 61.7, 58.6, 29.0, 26.1, 21.9, 13.0, 4.6, 3.5. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{24}H_{31}N_4O$ $[M+H]^+$ 391.2498 , found 391.2500.

*N-((1H-benzo[d]imidazol-2-yl)(cyclopropyl)methyl)-4-chloro-N-(3-(dimethylamino)propyl)benzamide (**6f**).* Yellow foam, (45%, 185 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 10.53 (bs, 1H), 7.77 – 7.15 (m, 8H), 4.45 (bs, 1H), 3.67 (t, *J* = 15.9 Hz, 2H), 2.50 (bs, *J* = 55.7 Hz, 6H), 2.14 –

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

1.90 (m, 2H), 1.80 (d, *J* = 6.6 Hz, 1H), 1.27 (bs, 2H), 1.03 – 0.65 (m, *J* = 35.2 Hz, 3H), 0.45 – 0.21 (m, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.9, 151.7, 131.3, 129.2, 128.5, 128.1, 126.2, 123.2, 122.0, 67.1, 65.1, 58.5, 30.1, 24.4, 14.6, 5.7, 4.1. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{23}H_{28}ClN_4O$ $[M+H]^+$ 411.1952, found 411.1950.

*N-(1-(1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2-methylpropyl)-4-bromo-N-(3-(dimethylamino)propyl)benzamide (**6g**).* Pale yellow foam, (40%, 183 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 10.84 (s, 1H), 7.74 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 7.62 – 7.51 (m, 2H), 7.47 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 7.37 – 7.15 (m, 4H), 4.39 (s, 1H), 3.53 – 3.36 (m, 1H), 3.35 – 3.11 (m, 2H), 2.52 – 2.09 (m, 2H), 2.09 – 1.83 (m, 6H), 1.79 – 1.41 (m, 2H), 1.18 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H), 0.89 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.6, 152.9, 140.9, 135.4, 131.9, 131.7, 128.2, 124.3, 122.6, 115.4, 56.3, 45.0, 29.7, 28.6, 26.9, 20.3, 19.9.HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{23}H_{30}BrN_4O$ $[M+H]^+$ 457.1603, found 457.1601.

*N-(1-(1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2-methylpropyl)-N-(3-(dimethylamino)propyl)-4-methyl benzamide (**6h**).* Slightly yellow foam, (62%, 243 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 11.12 (bs, 1H), 8.02 – 6.90 (m, 8H), 4.45 (bs, *J* = 4.8 Hz, 1H), 3.60 – 3.23 (m, 2H), 3.23 – 3.07 (m, 1H), 2.36 (bs, 3H), 1.91 (bs, 6H), 1.73 – 1.33 (m, 4H), 1.17 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 0.89 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, 173.8, 153.2, 141.1, 140.1, 133.7, 129.4, 126.5, 122.4, 115.5, 61.5, 56.4, 44.9, 28.6, 26.9, 21.3, 20.4, 19.9. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{24}H_{33}N_4O$ $[M+H]^+$ 393.2654, found 393.2654.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

*N-(1-(1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2-methylpropyl)-4-chloro-N-(3-(dimethylamino)propyl)benzamide (**6i**).* Light brown foam, (53%, 219 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9.23 (bs, 1H), 7.53 – 7.33 (m, 5H), 7.03 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.80 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H), 4.11 (d, *J* = 11.3 Hz, 1H), 3.41 (t, *J* = 8.0 Hz, 2H), 2.90 – 2.67 (m, 1H), 2.11 – 1.81 (m, 7H), 1.81 – 1.65 (m, 1H), 1.65 – 1.44 (m, 1H), 1.14 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 1.07 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H), 0.93 – 0.76 (m, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 173.3, 156.7, 136.7, 133.8, 129.2, 128.4, 126.8, 124.6, 117.4, 55.3, 46.5, 43.3, 26.4, 25.0, 19.9, 19.1. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{23}H_{30}ClN_4O$ $[M+H]^+$ 413.2108, found 413.2111.

General procedure for the synthesis of products 6j–o:

Ugi reaction: The Ugi reaction was carried out according to the same protocol as for the synthesis of compounds **6a**–**i**, but using *tert*-butyl-(3-aminopropyl)carbamate **2b** as the amino component. The reaction was monitored by TLC and when the reaction was complete, the traces of isocyanide were removed by addition of PS-TsOH (1.5 mmol) and stirring for 2 h. In the case of the synthesis of compounds **6k** and **6m**, the slight excess of bromobenzoic acid present at the end of the reaction was removed by addition of PS-carbonate (1.5 mmol) and stirring again at room temperature for 30 min. The polymer was filtered off and the solvent was removed under reduced pressure to give crude adducts **5**. The cyclization process was conducted the same way as described above.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

*tert-butyl (3-(N-(1-(1H-benzo[d]imidazol-2-yl)propyl)benzamido)propyl)carbamate (**6j**).* Yellow foam, (64%, 279 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 11.42 (bs, 1H), 7.86 – 6.89 (m, 9H), 5.38 (bs, 1H), 4.46 (bs, 1H), 3.57 – 3.16 (m, 2H), 2.68 (bs, 2H), 2.38 (bs, 2H), 1.39 – 1.28 (m, 9H), 1.03 (bs, 9H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 173.7, 155.8, 136.2, 130.0, 128.8, 126.5, 122.9, 121.9, 119.4, 111.3, 79.03, 56.4, 46.1, 37.6, 29.8, 28.3, 23.9, 11.1. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{25}H_{33}N_4O_3$ $[M+H]^+$ 437.2553, found 437.2552.

*tert-butyl (3-(N-(1-(1H-benzo[d]imidazol-2-yl)propyl)-4-bromobenzamido)propyl)carbamate (**6k**).* Colorless foam, (40%, 206 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 10.95 (bs, 1H), 7.74 (bs, 1H), 7.42 (bs, 5H), 7.23 (bs, 2H), 5.14 (bs, 1H), 4.28 (bs, 1H), 3.63 – 3.10 (m, 2H), 2.73 (bs, 1H), 2.52 – 2.25 (m, 1H), 1.56 (bs, 1H), 1.42 (bs, 1H), 1.35 (s, 9H), 1.18 – 0.70 (m, 5H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 173.9, 155.8, 136.2, 130.1, 128.8, 126.5, 123.1, 122.0, 119.4, 111.3, 79.1, 57.2, 46.7, 37.5, 29.7, 28.3, 23.9, 11.2. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{25}H_{32}BrN_4O_3$ $[M+H]^+$ 515.1658, found 515.1655.

*tert-butyl (3-(N-(1-(1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2-methylpropyl)-4-methylbenzamido)propyl)carbamate (**6l**).* White solid, Mp. 98-101 ºC (62%, 288 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 11.01 (bs, 1H), 7.86 – 7.66 (m, 1H), 7.55 – 7.39 (m, 1H), 7.36 – 7.13 (m, 6H), 4.41 (bs, 1H), 3.62 – 3.42 (m, 1H), 3.40 – 3.04 (m, 2H), 2.92 – 2.64 (m, 2H), 2.38 (s, 3H), 1.73 (bs, 3H), 1.36 (s, 9H), 1.17 (d, J = 6.5 Hz, 3H), 0.87 (d, J = 6.5 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.5, 155.9, 139.4, 133.8, 128.8, 126.7, 123.3, 122.4, 120.0, 110.3, 78.9, 77.4, 77.0, 76.6, 54.4,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

46.8, 42.3, 37.8, 29.4, 28.42, 21.4, 20.0, 18.8. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{27}H_{37}N_4O_3$ $[M+H]^+$ 465.2866, found 465.2868.

*tert-butyl (3-(N-(1-(1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2,2-dimethylpropyl)-4-bromobenzamido)propyl) carbamate (**6m**).* Colorless foam, (48%, 261 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 12.27 (bs, 1H), 8.04 – 6.82 (m, 7H), 6.44 (bs, 1H), 5.56 (bs, 1H), 4.42 (bs, 2H), 3.66 (bs, 1H), 2.65 (bs, 2H), 1.67 – 1.31 (m, 9H), 1.31 – 1.11 (m, 10H), 0.57 (bs, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 173.2, 155.9, 136.7, 129.7, 128.5, 127.2, 123.4, 122.3, 120.2, 110.1, 78.9, 54.1, 46.9, 38.0, 37.3, 29.5, 28.5, 27.6. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{27}H_{36}BrN_4O_3$ $[M+H]^+$ 543.1971, found 543.1972.

*tert-butyl (3-(N-(1-(1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2,2-dimethylpropyl)benzamido)propyl)carbamate (**6n**).* Pale yellow foam, (80%, 372 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 11.31 (bs, 1H), 7.66 – 6.53 (m, 8H), 6.04 (bs, 1H), 4.38 – 3.65 (m, 2H), 3.32 (bs, 1H), 2.36 (bs, 2H), 1.45 (bs, 1H), 1.31 – 0.98 (m, 9H), 0.87 (s, 9H), 0.80 – 0.43 (m, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 173.8, 156.1, 137.0, 130.0, 128.8, 126.4, 122.8, 121.8, 119.4, 111.3, 78.9, 57.7, 50.5, 38.1, 37.7, 29.2, 28.5, 27.9. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{27}H_{37}N_4O_3$ $[M+H]^+$ 465.2866, found 465.2868.

*tert-butyl (3-(4-chloro-N-(1-(6-methoxy-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2,2-dimethylpropyl)benza-mido) propyl)carbamate (**6o**).* Light brown foam, (68%, 360 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 11.54 (bs,1H), 7.76 – 6.76 (m, 6H), 6.33 (bs, 1H), 5.31 (bs, 1H), 4.41 (bs, 1H), 3.97 – 3.65 (m, 5H), 2.70 (bs, 2H), 1.90 (bs, 2H), 1.66 – 1.30 (m, 9H), 1.21 (s, 9H). ^{13}C NMR (75 MHz

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

$CDCl_3$) δ (ppm): 173.2, 158.9, 155.9, 142.2, 136.1, 134.8, 129.0, 128.7, 128.2, 126.7, 126.4, 117.0, 103.0, 79.1, 77.5, 77.0, 76.6, 60.4, 55.5, 55.3, 37.6, 36.6, 30.3, 28.3, 28.2. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{28}H_{38}ClN_4O_4$ $[M+H]^+$ 529.2582, found 529.2585.

General procedure for the synthesis of products 7a–p: NaH (60% in mineral oil, 2.8 mmol) was slowly added in small portions at 0 ºC to a solution of benzimidazole **6** (0.4 mmol) in dry DMF (10 mL). The mixture was stirred for 15 min and 0.4 mmol of benzyl bromide were added. The mixture was stirred for a further 1 h at rt, after which the starting material had been consumed. The solvent was evaporated under reduced pressure and the residue was purified by column chromatography (EtOAc / Hex) to give compounds **7a**–**p**.

*N-(1-(1-benzyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)propyl)-4-bromo-N-(3-(dimethylamino)propyl)benza-mide (**7a**)*. Yellow foam, (71%, 151 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.89 – 7.79 (m, 1H), 7.42 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.35 – 7.26 (m, 6H), 7.16 – 7.03 (m, 2H), 6.81 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 6.19 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 5.55 (s, 2H), 3.26 – 3.12 (m, 2H), 2.51 – 2.33 (m, 1H), 2.31 – 2.14 (m, 1H),1.79 (s, 6H), 1.75 – 1.62 (m, 3H), 1.33 – 1.12 (m, 2H), 0.98 (t, *J* = 7.3 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 166.3, 153.4, 148.8, 145.8, 140.3, 134.7, 134.1, 132.7, 131.9, 131.1, 129.4, 126.3, 124.2, 121.9, 116.1, 109.5, 68.2, 62.4, 59.1, 48.84, 38.6, 24.3, 21.4, 10.7. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{29}H_{34}BrN_4O$ $[M+H]^+$ 533.1916, found 533.1919.

N-(1-(1-benzyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)propyl)-N-(3-(dimethylamino)propyl)-4-methylben-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

*zamide (**7b**).* White foam, (83%, 155 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.83 – 7.05 (m, 14H), 6.35 (t, *J* = 5.2 Hz, 1H), 5.65 (s, 2H), 3.61 – 3.16 (m, 2H), 3.07 (s, 3H), 2.92 – 2.63 (m, 1H), 2.58 – 2.15 (m, 1H), 1.77 – 1.31 (m, 7H), 1.33 – 1.07 (m, 2H), 0.87 (t, *J* = 7.5 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 168.4, 154.2, 148.6, 143.1, 139.9, 133.4, 132.9, 130.8, 129.6, 129.4, 129.3, 127.7, 123.9, 123.0, 119.7, 110.9, 67.4, 59.8, 54.8, 49.7, 37.5, 28.4, 24.2, 21.4, 10.7. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{30}H_{37}N_4O$ $[M+H]^+$ 469.2967, found 469.2966.

*N-(1-(1-benzyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)propyl)-4-chloro-N-(3-(dimethylamino)propyl)ben-zamide (**7c**).* Pale yellow foam, (80%, 156 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.81 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 7.45 – 6.98 (m, 10H), 6.81 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.19 (d, *J* = 6.1 Hz, 1H), 5.53 (s, 2H), 3.34 – 3.02 (m, 2H), 2.51 – 2.34 (m, 1H), 2.32 – 2.17 (m, 1H), 1.81 (s, 6H), 1.76 – 1.60 (m, 2H), 1.33 – 1.13 (m, 2H), 0.98 (d, *J* = 5.5 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 166.1, 153.2, 148.7, 145.7, 140.3, 134.5, 134.3, 132.6, 131.8, 130.4, 129.4, 125.9, 123.9, 121.7, 116.0, 109.7, 67.9, 62.1, 59.0, 48.5, 38.3, 23.9, 19.3, 10.5. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{29}H_{34}ClN_4O$ $[M+H]^+$ 489.2421, found 489.2423.

*N-((1-benzyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)(cyclopropyl)methyl)-4-bromo-N-(3-(dimethylamino) propyl) benzamide (**7d**).* Light brown foam, (87%, 189 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.88 (s, 1H), 7.59 – 6.99 (m, 12H), 5.86 (d, *J* = 4.1 Hz, 1H), 5.29 (s, 2H), 3.64 – 3.38 (m, 2H), 2.75 (d, *J* = 5.7 Hz, 6H), 2.18 – 1.97 (m, 1H), 1.95 – 1.73 (m, 1H), 1.76 – 1.60 (m, 2H), 0.96 – 0.71 (m, 1H), 0.68 – 0.55 (m, 2H), 0.22 – 0.08 (m, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm):

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

171.1, 152.4, 147.1, 144.1, 140.5, 137.7, 134.6, 132.8, 132.1, 131.9, 130.9, 129.3, 129.0, 126.5, 124.3, 106.7, 68.0, 65.0, 62.2, 49.2, 29.2, 21.6, 13.0, 5.7, 4.6. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{30}H_{34}BrN_4O$ $[M+H]^+$ 545.1916, found 545.1919.

*N-((1-benzyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)(cyclopropyl)methyl)-N-(3-(dimethylamino)propyl)-4-methylbenzamide (**7e**).* Colorless foam, (79%, 152 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.77 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 7.63 – 7.00 (m, 12H), 6.22 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H), 5.49 (s, 2H), 3.62 – 3.22 (m, 5H), 2.73 (s, 6H), 2.52 – 2.28 (m, 1H), 2.21 – 2.00 (m, 1H), 1.83 – 1.60 (m, 2H), 1.02 – 0.74 (m, 1H), 0.74 – 0.48 (m, 2H), 0.35 – 0.03 (m, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 170.1, 150.2, 145.7, 142.2, 139.0, 135.4, 132.9, 132.0, 130.8, 129.6, 129.0, 128.7, 126.7, 122.6, 121.4, 103.4, 67.1, 62.8, 59.9, 49.1, 29.2, 26.2, 21.6, 12.6, 4.6, 3.8. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{31}H_{37}N_4O$ $[M+H]^+$ 481.2967, found 481.2968.

*N-((1-benzyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)(cyclopropyl)methyl)-4-chloro-N-(3-(dimethylamino) propyl)benzamide (**7f**).* Yellow pale foam, (80%, 160 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.94 – 7.70 (m, 2H), 7.59 – 7.10 (m, 11H), 6.25 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 5.52 (s, 2H), 3.58 – 3.33 (m, 2H), 2.71 (d, *J* = 15.6 Hz, 6H), 2.49 – 2.26 (m, 1H), 2.25 – 1.99 (m, 1H), 1.79 – 1.64 (m, 2H), 0.93 – 0.75 (m, 1H), 0.75 – 0.49 (m, 2H), 0.23 – 0.06 (m, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 171.9, 151.6, 147.0, 143.0, 139.9, 136.2, 133.5, 132.6, 130.9, 129.2, 129.0, 128.9, 126.4, 122.9, 122.7, 103.8, 67.8, 65.8, 59.2, 49.1, 30.6, 23.2, 14.8, 5.6, 4.1. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{30}H_{34}ClN_4O$ $[M+H]^+$ 501.2421, found 501.2419.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

*N-(1-(1-benzyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2-methylpropyl)-4-bromo-N-(3-(dimethylamino) propyl) benzamide (**7g**).* Pale yellow foam, (76%, 166 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.84 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H), 7.48 – 7.04 (m, 11H), 6.81 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.19 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 5.46 (s, 2H), 3.41 – 2.93 (m, 2H), 2.56 – 2.35 (m, 1H), 2.29 – 2.09 (m, 1H), 2.02 – 1.85 (m, 7H), 1.82 – 1.58 (m, 2H), 0.94 (s, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.1, 151.0, 147.4, 138.8, 135.4, 134.6, 132.7, 131.9, 131.0, 130.0, 129.3, 126.4, 124.3, 122.6, 118.2, 108.9, 68.0, 64.0, 62.3, 49.5, 39.2, 29.0, 21.3, 20.0, 19.3. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{30}H_{36}BrN_4O$ $[M+H]^+$ 547.2072, found 547.2075.

*N-(1-(1-benzyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2-methylpropyl)-N-(3-(dimethylamino)propyl)-4-methylbenzamide (**7h**).* Ligtht brown foam, (83%, 160 mg). ^{1}H NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.86 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 7.65 – 7.07 (m, 12H), 5.91 (d, *J* = 9.1 Hz, 1H), 5.35 (s, 2H), 3.52 (s, 3H), 3.37 – 3.07 (m, 2H), 3.00 – 2.53 (m, 2H), 2.53 – 2.30 (m, 7H), 1.42 – 1.16 (m, 2H), 0.90 (s, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 171.7, 150.8, 145.3, 137.9, 135.4, 134.6, 132.8, 131.1, 130.0, 129.5, 127.3, 126.7, 124.5, 122.2, 114.7, 106.1, 68.6, 62.1, 60.1, 49.9, 39.7, 29.3, 21.4, 20.4, 19.6, 19.4. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{31}H_{39}N_4O$ $[M+H]^+$ 483.3124, found 483.3125.

*N-(1-(1-benzyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2-methylpropyl)-4-chloro-N-(3-(dimethylamino)propyl) benzamide (**7i**).* Orange foam, (78%, 157 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.71 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.62 – 6.70 (m, 12H), 6.06 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H), 5.56 (s, 2H), 3.53 – 3.30 (m, 2H), 2.31 – 2.14 (m, 1H), 2.14 – 1.88 (m, 8H), 1.81 – 1.65 (m, 1H), 1.64 – 1.51 (m, 1H), 1.13 (s, 6H).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.5, 151.0, 141.4, 136.8, 135.9, 134.2, 132.9, 130.8, 129.2, 128.6, 127.2, 126.7, 123.9, 122.3, 118.88, 108.26, 67.67, 63.74, 60.36, 49.44, 40.13, 27.9, 21.5, 19.6, 19.2. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{30}H_{36}ClN_4O$ $[M+H]^+$ 503.2578, found 503.2575.

*tert-butyl (3-(N-(1-(1-benzyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)propyl)benzamido)propyl)carbamate (**7j**).* White solid, Mp 124-125ºC (70%, 148 mg).). 1H NMR (300 MHz, CDCl3) δ (ppm): 7.87 (d, J = 7.3 Hz, 1H), 7.49 – 7.19 (m, 9H), 7.19 – 7.05 (m, 2H), 6.99 (d, J = 6.7 Hz, 2H), 6.20 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 5.59 (q, J = 16.8 Hz, 2H), 4.30 (s, 1H), 3.39 – 2.98 (m, 2H), 2.61 (s, 2H), 2.49 – 2.08 (m, 2H), 1.51 – 1.26 (m, 11H), 0.94 (t, J = 6.7 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl3) δ (ppm): 172.1, 155.6, 152.4, 142.3, 136.4, 135.5, 130.9, 129.4, 128.9, 128.4, 127.7, 126.3, 126.0, 123.5, 122.5, 120.0, 110.4, 78.9, 50.0, 46.7, 42.3, 37.7, 30.2, 28.4, 24.8, 10.8. HRMS (CI+) m/z calc for $C_{32}H_{39}N_4O_3$ [M+H]+ 527.3022, found 527.3021.

*tert-butyl (3-(N-(1-(1-benzyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)propyl)-4-bromobenzamido)propyl) carbamate (**7k**).* Pale yellow foam, (77%, 186 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.84 (d, *J* = 5.3 Hz, 1H), 7.50 – 6.85 (m, 12H), 6.21 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 5.55 (q, *J* = 17.0 Hz, 2H), 3.78 (bs, 1H), 3.17 (bs, 2H), 2.72 (bs, 1H), 2.60 (bs, 1H), 2.41 (bs, 1H), 2.22 (bs, 1H), 1.57 – 1.10 (m, 11H), 0.98 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.3, 155.4, 152.4, 142.4, 136.5, 135.6, 128.9, 128.4, 128.3, 127.7, 127.0, 126.4, 126.1, 123.4, 122.4, 120.1, 110.4, 79.6, 50.0, 46.6, 42.8, 42.3, 33.7, 28.3, 24.6, 10.8. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{32}H_{38}BrN_4O_3$ $[M+H]^+$ 605.2127, found 605.2130.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

*tert-butyl (3-(N-(1-(1-benzyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2-methylpropyl)-4-methylbenzamido) propyl) carbamate (**7l**).* White solid, Mp. 76-77ºC, (70%, 155 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.95 – 7.82 (m, 1H), 7.41 – 7.10 (m, 10H), 7.06 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 5.87 (d, *J* = 11.0 Hz, 1H), 5.77 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H), 5.52 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H), 4.64 (s, 1H), 3.56 – 3.41 (m, 1H), 3.40 – 3.26 (m, 1H), 2.99 – 2.80 (m, 1H), 2.61 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H), 2.35 (s, 3H), 1.59 – 1.26 (m, 11H), 1.08 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H), 0.71 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz,) δ 172.3, 155.3, 152.5, 142.5, 136.6, 135.4, 133.9, 129.1, 128.8, 128.3, 127.7, 126.6, 126.1, 123.3, 122 .4, 120.0, 110.4, 79.4, 54.4, 46.6, 42.7, 42.2, 29.0, 28.2, 28.0, 21.3, 20.2, 18.8. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{34}H_{43}N_4O_3$ $[M+H]^+$ 555.3335, found 555.3337.

*tert-butyl(3-(N-(1-(1-benzyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2,2-dimethylpropyl)-4-bromobenzamido) propyl) carbamate (**7m**).* Dark yellow foam, (67%, 170 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.88 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.47 – 7.28 (m, 12H), 6.18 (s, 1H), 5.67 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 5.48 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 4.69 (s, 1H), 4.28 – 3.87 (m, 1H), 3.65 – 3.47 (m, 1H), 2.59 – 2.35 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.29 – 1.20 (m, 1H), 1.07 (s, 9H), 0.97 – 0.83 (m, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.7, 155.3, 150.6, 142.0, 136.4, 136.2, 134.2, 129.2, 128.3, 128.0, 127.4, 126.7, 126.2, 122.9, 121.9, 119.7, 109.6, 78.4, 53.6, 46.4, 44.2, 37.5, 36.8, 29.0, 28.0, 27.1. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{34}H_{42}BrN_4O_3$ $[M+H]^+$ 633.2440, found 633.2443.

tert-butyl(3-(N-(1-(1-benzyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2,2-dimethylpropyl)benzamido) pro-

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

*pyl)carbamate (**7n**)*. White solid, Mp. 116-118ºC, (85%, 189 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.88 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 7.49 – 7.21 (m, 13H), 6.18 (s, 1H), 5.67 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 5.48 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 4.41 (s, 1H), 4.16 – 3.95 (m, 1H), 3.63 – 3.41 (m, 1H), 2.59 – 2.32 (m, 2H), 1.58 – 1.19 (m, 10H), 1.07 (s, 9H), 0.98 – 0.76 (m, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 173.2, 155.9, 151.1, 142.4, 136.9, 136.6, 134.7, 129.7, 128.8, 128.5, 127.9, 127.2, 126.6, 123.4, 122.4, 120.2, 110.1, 78.9, 54.1, 46.9, 44.7, 38.0, 37.4, 29.5, 28.5, 27.6. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{34}H_{43}N_4O_3$ $[M+H]^+$ 555.3335, found 555.3337.

*tert-butyl (3-(N-(1-(1-benzyl-6-methoxy-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2,2-dimethylpropyl)-4-chlorobenzamido)propyl) carbamate (**7o**).* Slightly brown foam, (43%, 107 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.74 – 6.68 (m, 12H), 6.09 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H), 5.58 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 5.34 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 4.00 – 3.66 (m, 5H), 3.61 – 3.22 (m, 2H), 2.70 – 2.22 (m, 1H), 1.35 (bs, 9H), 1.10 (s, 9H), 0.88 (bs, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 171.9, 157.1, 155.3, 143.3, 136.6, 135.4, 129.2, 128.8, 128.3, 127.9, 127.0, 120.9, 113.6, 111.6, 110.6, 102.1, 93.5, 79.5, 77.5, 77.0, 76.6, 55.9, 55.6, 54.7, 46.6, 44.8, 37.9, 28.4, 28.2, 27.6. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{35}H_{44}ClN_4O_4$ $[M+H]^+$ 619,3051, found 619.3049.

*tert-butyl(3-(N-(1-(1-benzyl-5-methoxy-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2,2-dimethylpropyl)-4-chlorobenzamido)propyl) carbamate (**7p**).* Yellow foam, (37%, 91mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.55 – 7.13 (m, 10H), 7.08 – 6.76 (m, 2H), 6.10 (bs, 1H), 5.60 (dd, *J* = 16.5, 3.7 Hz, 1H), 5.41 (dd, *J* = 16.5, 3.7 Hz, 1H), 4.41 (bs, 1H), 4.05 (bs, 1H), 3.86 (d, *J* = 12.3 Hz, 3H),

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

3.59 – 3.34 (m, 2H), 2.72 – 2.32 (m, 1H), 1.46 (bs, 9H), 1.05 (s, 9H), 0.86 (bs, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.1, 157.2, 156.4, 143.1, 136.6, 135.3, 128.8, 128.2, 127.9, 127.1, 120.7, 113.6, 111.8, 110.6, 102.1, 93.5, 79.0, 77.4, 77.0, 76.6, 55.8, 54.3, 46.8, 44.7, 37.9, 37.4, 29.7, 28.5, 27.6. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{35}H_{44}ClN_4O_4$ $[M+H]^+$ 619,3051, found 619.3047.

General procedure for the synthesis of products 8a–g: Compounds **7j–p** (0.2 mmol) were dissolved in a mixture of dichloromethane/TFA (10%, 2 mL) at 0 ºC and the mixture was stirred for 2–6 h at rt. Once the starting material had been consumed (TLC control), the mixture was neutralized with a saturated solution of $NaHCO_3$ and the organic phase was dried with anhydrous Na_2SO_4 evaporated on a rotary evaporator. The residue was purified by column chromatography to give compounds **8a**–**g**.

*N-(3-aminopropyl)-N-(1-(1-benzyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)propyl)benzamide (**8a**).* Slightly brown foam, (100%, 85 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.80 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H), 7.55 – 6.93 (m, 13H), 6.51 – 6.26 (m, 1H), 5.70 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 5.54 (d, *J* = 16.0 Hz, 1H), 3.89 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 3.77 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 2.63 – 2.42 (m, 1H), 2.42 – 2.27 (m, 1H), 2.12 (s, 2H), 1.57 – 1.18 (m, 2H), 1.21 – 1.01 (m, 1H), 0.93 – 0.73 (m, 1H), 0.55 (t, *J* = 2.9 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): δ 172.1, 152.4, 142.3, 136.4, 135.5, 130.9, 129.4, 128.9, 128.4, 127.7, 126.3, 126.0, 123.5, 122.5, 120.0, 110.4, 50.0, 46.7, 42.3, 28.37, 24.8, 14.0, 10.8. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{27}H_{31}N_4O$ $[M+H]^+$ 427.2498, found 427.2499.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

N-(3-aminopropyl)-N-(1-(1-benzyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)propyl)-4-bromobenzamide ***(8b)***. Pale yellow foam, (94%, 95 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.81 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H), 7.44 – 6.87 (m, 12H), 6.34 – 6.09 (m, 1H), 5.63 (d, *J* = 13.9 Hz, 1H), 5.47 (d, *J* = 13.9 Hz, 1H), 4.01 – 3.76 (m, 1H), 3.42 – 3.12 (m, 1H), 2.49 – 2.32 (m, 1H), 2.32 – 2.07 (m, 1H), 1.70 (s, 2H), 1.44 – 1.14 (m, 3H), 1.06 – 0.81 (m, 4H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): δ 172.1, 155.3, 152.4, 142.4, 136.5, 136.3, 135.6, 128.9, 128.4, 128.3, 127.7, 127.0, 126.4, 126.1, 123.4, 122.4, 120.1, 110.4, 50.0, 46.6, 42.8, 28.3, 24.6, 15.3, 10.8. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{27}H_{30}BrN_4O$ $[M+H]^+$ 505.1603, found 505.1606.

N-(3-aminopropyl)-N-(1-(1-benzyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2-methylpropyl)-4-methylbenzamide ***(8c)***. Yellow foam, (96%, 87 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.72 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.51 – 6.93 (m, 12H), 5.84 (bs, 1H), 5.69 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 5.52 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 3.45 (s, 3H), 2.77 (bs, 2H), 2.48 – 2.14 (m, 3H), 1.45 – 1.17 (m, 2H), 1.04 (s, 6H), 0.97 – 0.64 (m, 2H) ; ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.5, 152.5, 142.4, 139.8, 139.2, 136.6, 135.4, 134.0, 129.0, 128.8, 128.2, 127.9, 127.7, 126.8, 126.6, 126.1, 123.2, 122.4, 119.9, 110.4, 54.5, 53.0, 46.1, 42.9, 29.8, 29.1, 21.3, 20.2, 18.8. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{29}H_{35}N_4O$ $[M+H]^+$ 455.2811, found 455.2812.

N-(3-aminopropyl)-N-(1-(1-benzyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2,2-dimethylpropyl)-4-bromobenzamide ***(8d)***. Slightly brown foam, (91%, 97 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.87 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.78 – 7.54 (m, 5H), 7.53 – 7.29 (m, 7H), 6.53 (s, 1H), 5.93 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H),

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.79 (d, *J* = 16.3 Hz, 1H), 4.03 – 3.69 (m, 2H), 2.74 – 2.16 (m, 2H), 1,75 (bs, 2H), 1.43 – 1.10 (m, 2H), 0.95 (s, 9H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): δ 173.2, 151.1, 142.4, 136.9, 136.7, 134.7, 129.7, 128.8, 128.5, 127.9, 127.2, 126.7, 123.4, 122.3, 120.2, 110.1, 103.0, 54.1, 46.9, 44.7, 38.0, 37.3, 29.5, 27.6. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{29}H_{34}BrN_4O$ $[M+H]^+$ 533.1916, found 533.1918.

N-(3-aminopropyl)-N-(1-(1-benzyl-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2,2-dimethylpropyl)benzamide ***(8e)*** Yellow solid, Mp. 116-118ºC, (97%, 88 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.71 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.46 – 7.13 (m, 13H), 6.18 (s, 1H), 5.66 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H), 5.49 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H), 4.05 – 3.91 (m, 1H), 3.63 (bs, 2H), 3.63 – 3.51 (m, 1H), 2.19 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H), 0.99 (bs, 9H), 0.88 (bs, 2H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 173.2, 151.2, 142.4, 137.0, 136.6, 134.7, 129.7, 128.8, 128.5, 127.9, 127.1, 126.7, 123.3, 122.4, 119.9, 110.2, 100.7, 54.3, 46.8, 44.6, 38.6, 37.9, 32.9, 27.6. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{29}H_{35}N_4O$ $[M+H]^+$ 455.2811, found 455.2809.

N-(3-aminopropyl)-N-(1-(1-benzyl-6-methoxy-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2,2-dimethylpropyl)-4-chlorobenzamide ***(8f)***. Yellow foam, (100%, 62 mg). ^{1}H NMR 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.74 – 7.12 (m, 9H), 7.12 – 6.77 (m, 3H), 6.10 (s, 1H), 5.57 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 5.34 (d, *J* = 16.4 Hz, 1H), 4.08 – 3.84 (m, 1H), 3.80 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H), 3.61 – 3.44 (m, 1H), 3.29 – 3.12 (m, 2H), 1.93 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 1.19 – 1.00 (m, 10H), 1.00 – 0.79 (m, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.1, 157.1, 151.1, 143.2, 136.7, 135.6, 135.5, 128.8, 128.3, 128.2, 128.0,

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

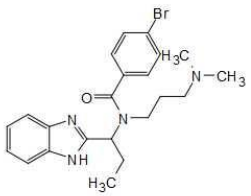
127.9, 127.8, 127.0, 120.6, 113.6, 111.7, 110.6, 101.9, 93.5, 55.8, 54.6, 52.5, 46.8, 45.4, 37.9, 29.6, 27.6. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{30}H_{36}ClN_4O_2$ $[M+H]^+$ 519.2527, found 519.2526.

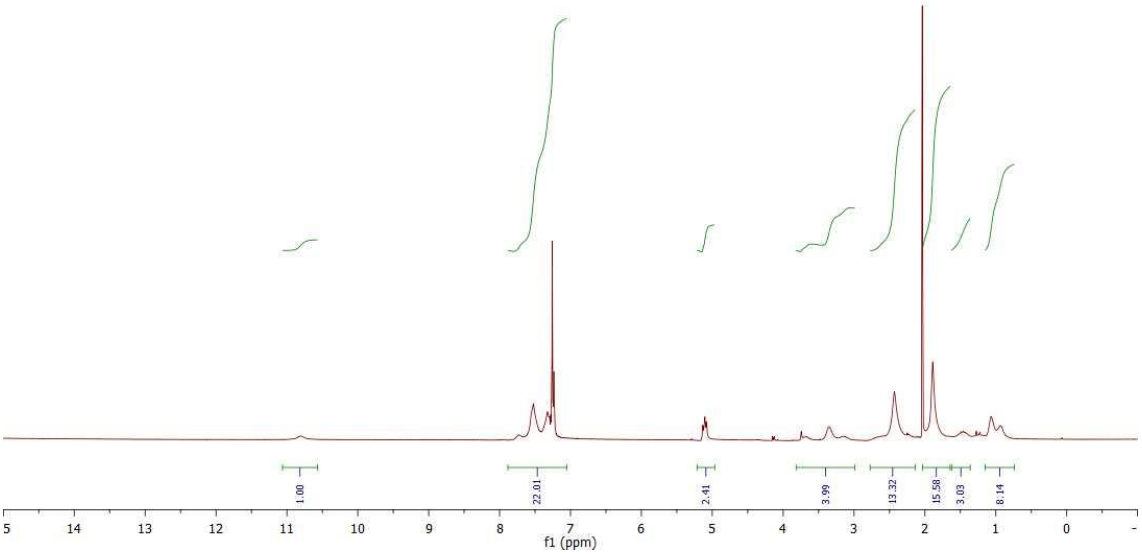
*N-(3-aminopropyl)-N-(1-(1-benzyl-5-methoxy-1H-benzo[d]imidazol-2-yl)-2,2-dimethylpropyl)-4-chlorobenzamide (**8g**).* Slightly orange foam, (100%, 62 mg). ^{1}H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7.67 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H), 7.50 – 7.14 (m, 9H), 7.04 – 6.76 (m, 2H), 6.09 (s, 1H), 5.59 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 5.38 (d, *J* = 16.5 Hz, 1H), 4.06 – 3.88 (m, 1H), 3.85 (d, *J* = 10.9 Hz, 3H), 3.58 – 3.42 (m, 1H), 2.03 (d, *J* = 5.1 Hz, 2H), 1.78 (s, 2H), 1.15 – 0.94 (m, 10H), 0.95 – 0.74 (m, 1H); ^{13}C NMR (75 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 172.1, 156.3, 150.0, 143.1, 136.6, 135.6, 135.5, 128.8, 128.2, 127.9, 127.0, 120.5, 113.6, 111.7, 110.6, 101.8, 93.6, 55.8, 54.6, 46.9, 44.9, 38.8, 37.9, 33.4, 27.6. HRMS (CI+) *m/z* calc for $C_{30}H_{36}ClN_4O_2$ $[M+H]^+$ 519.2527, found 519.2525.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

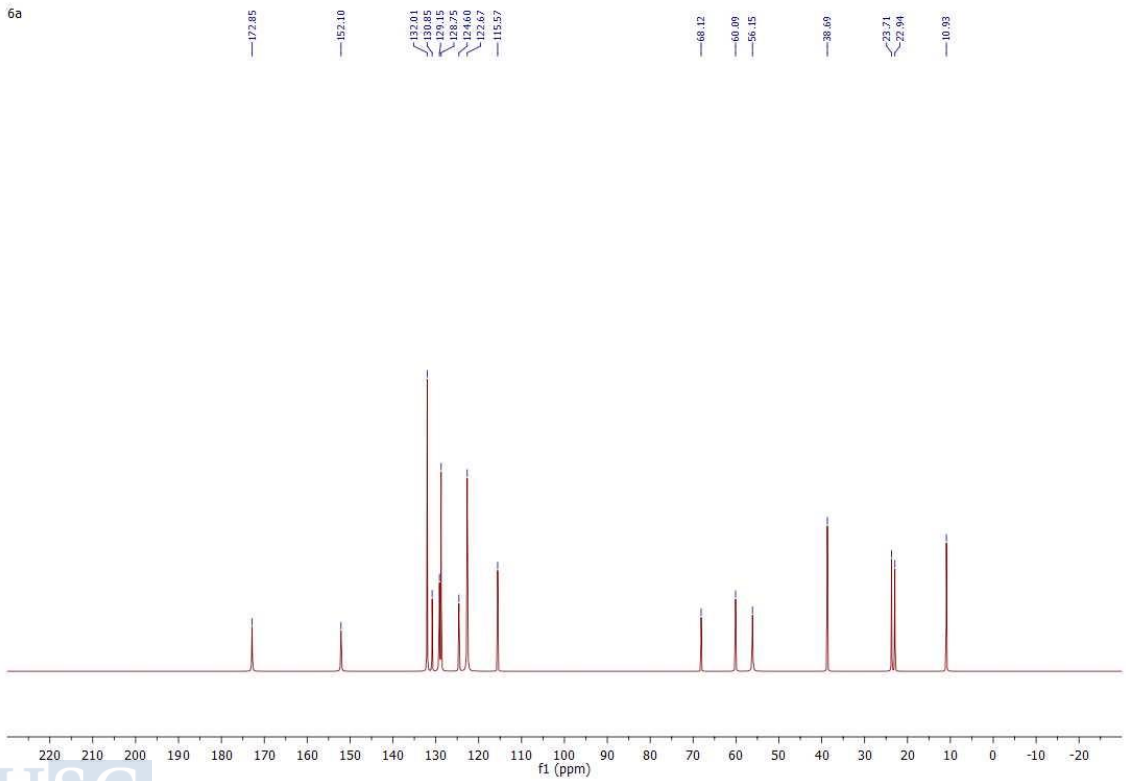
II. NMR Spectra

6a



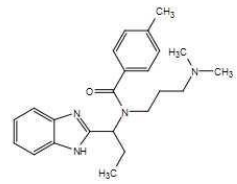


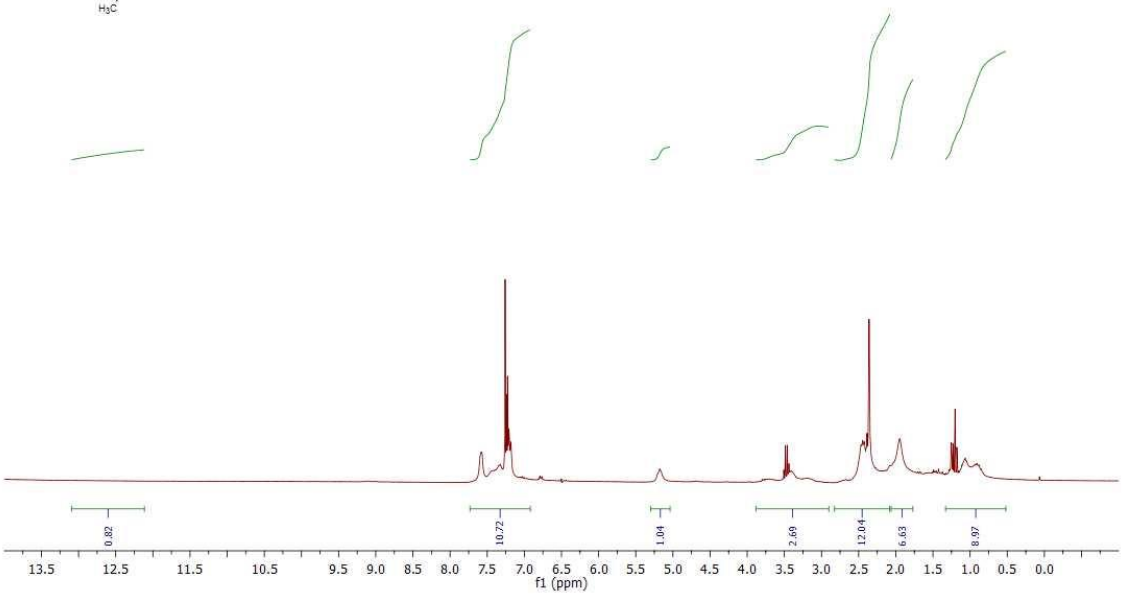
6a



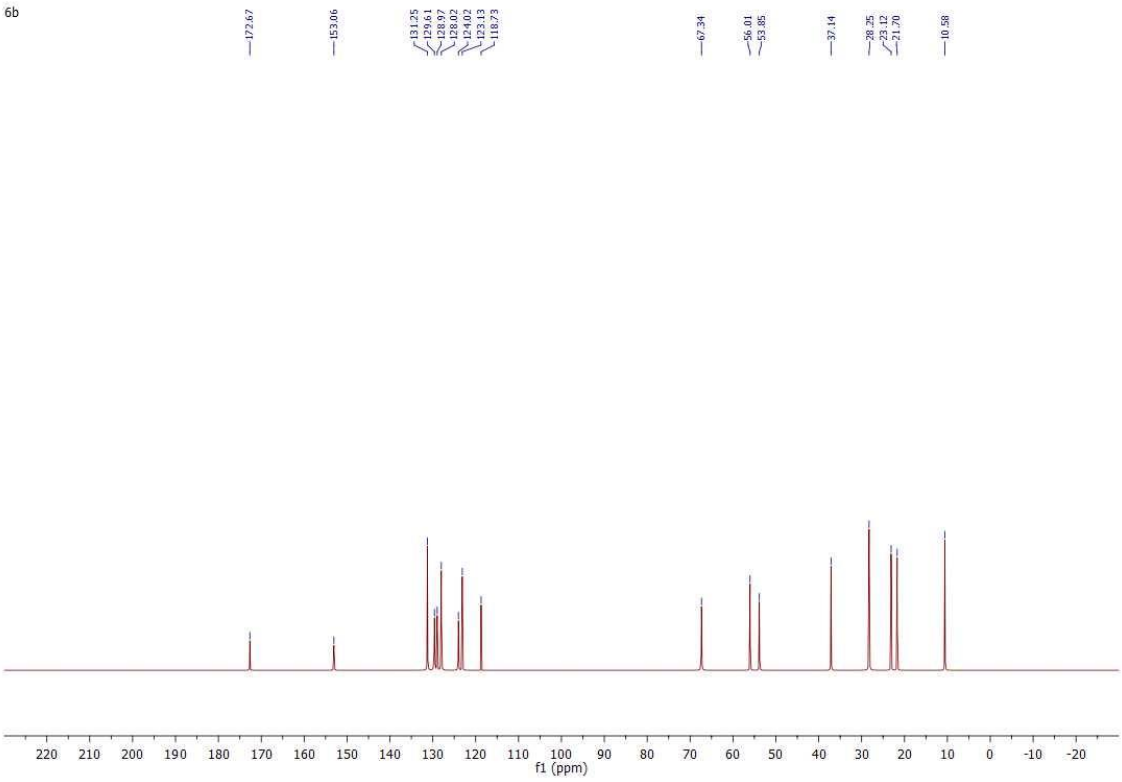
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6b



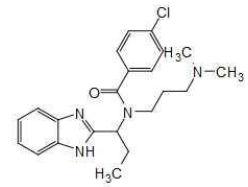


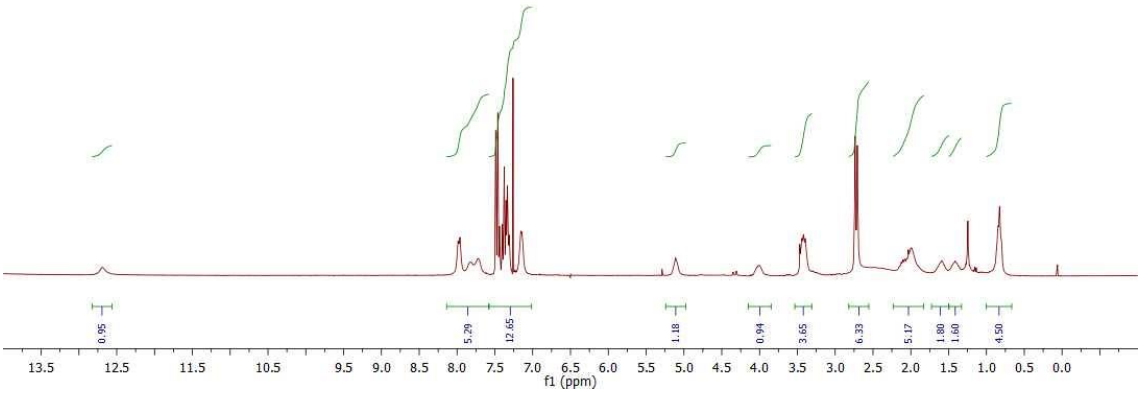
6b



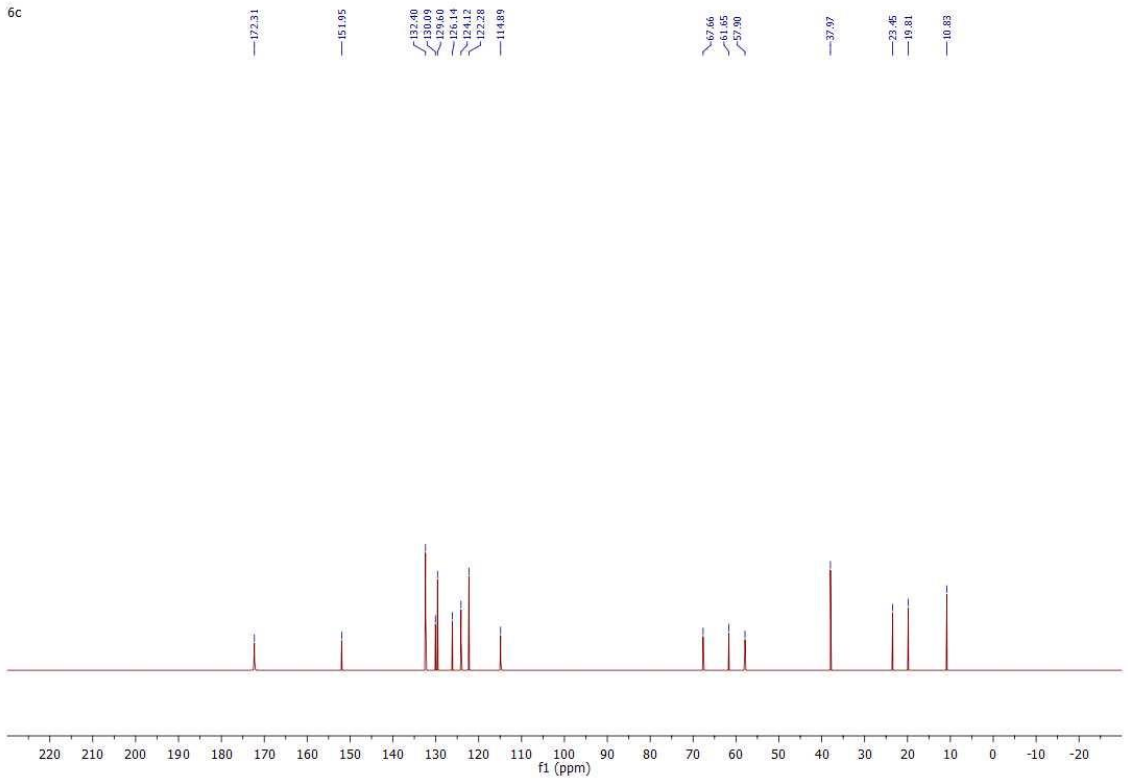
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6c



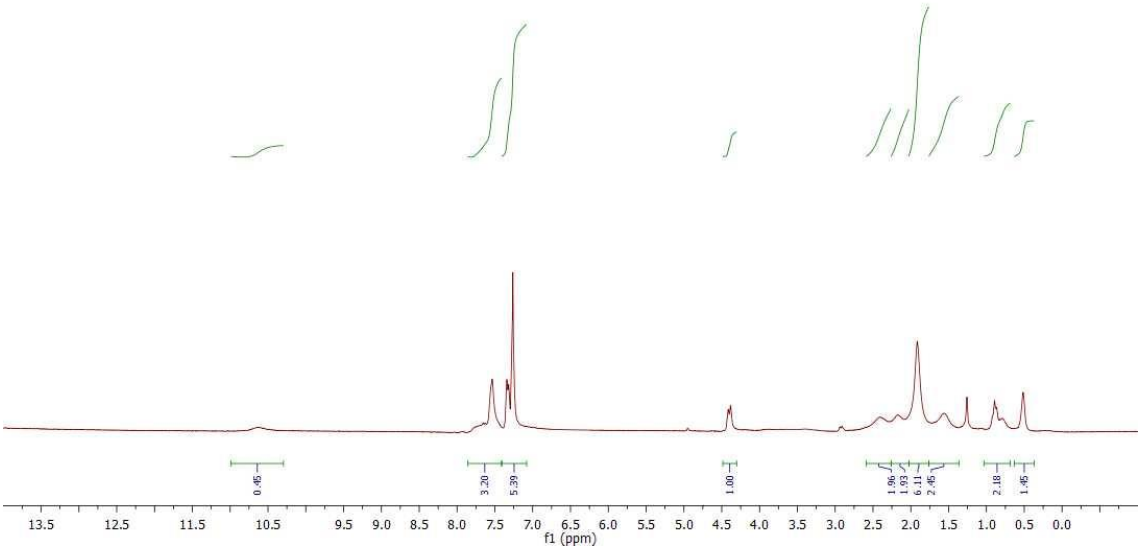


6c

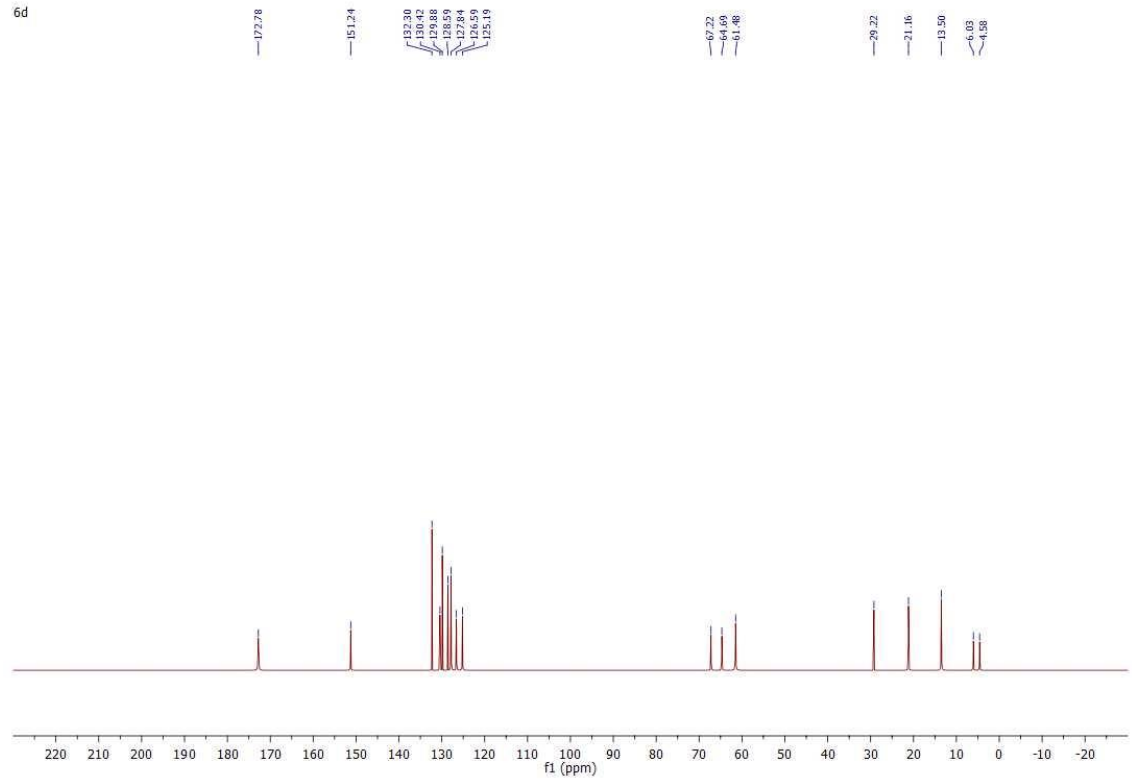


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6d

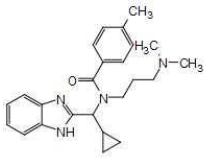


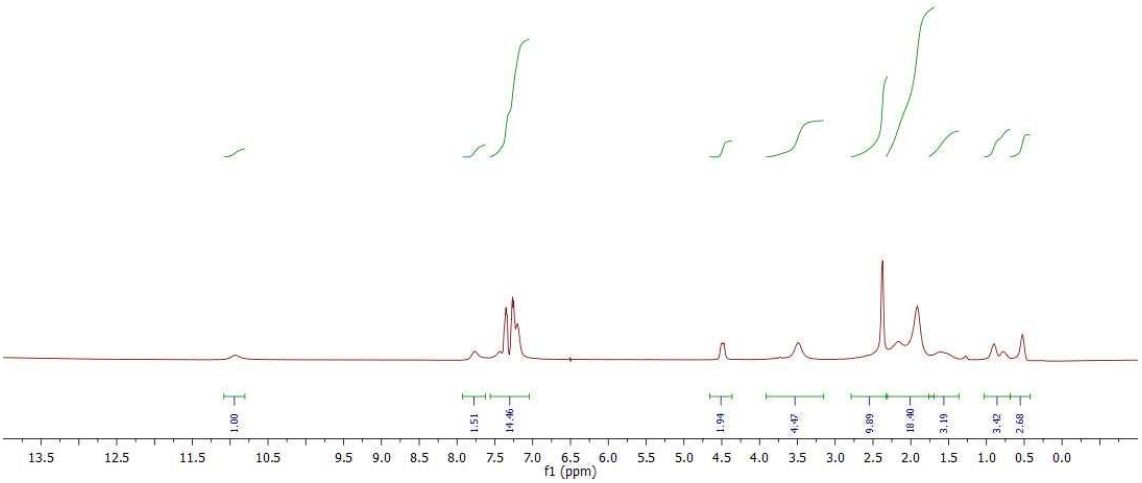
6d



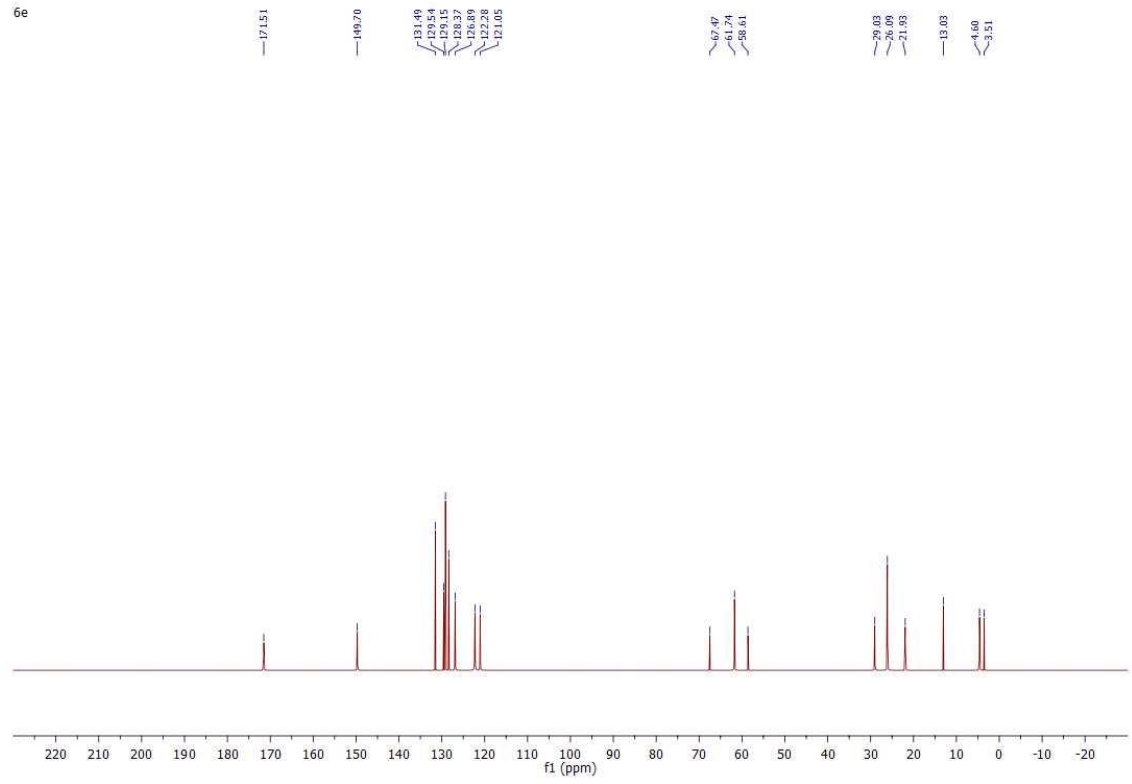
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6e



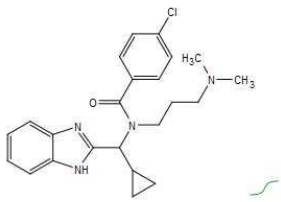


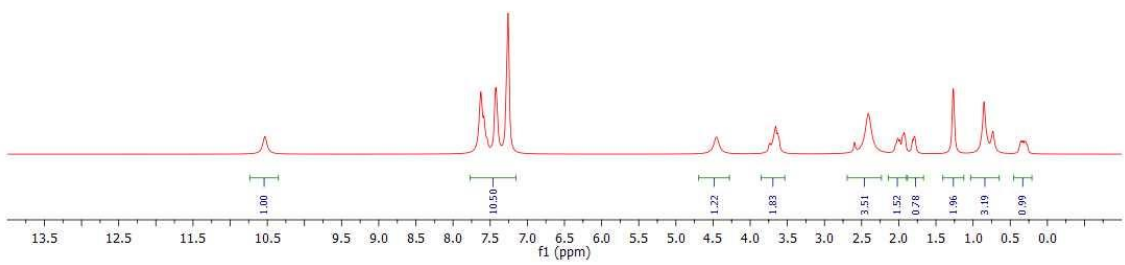
6e



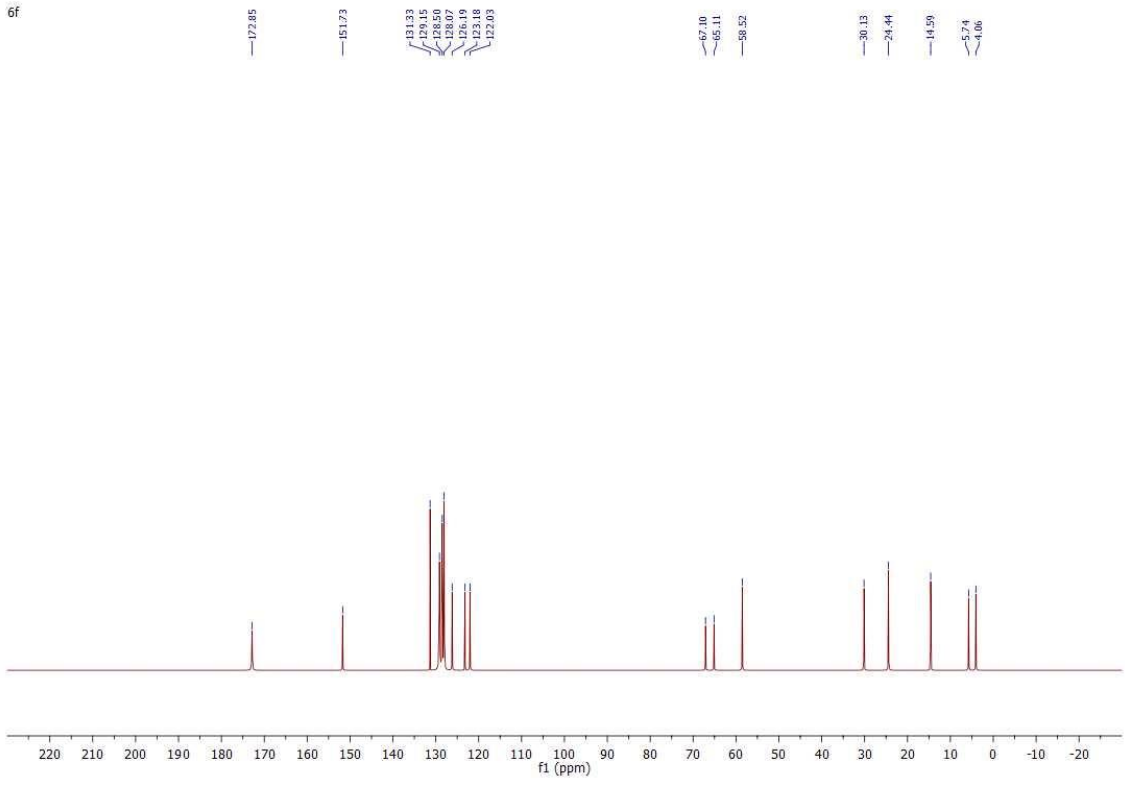
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6f



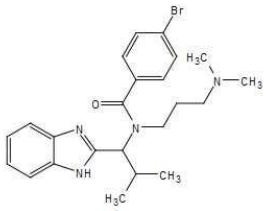


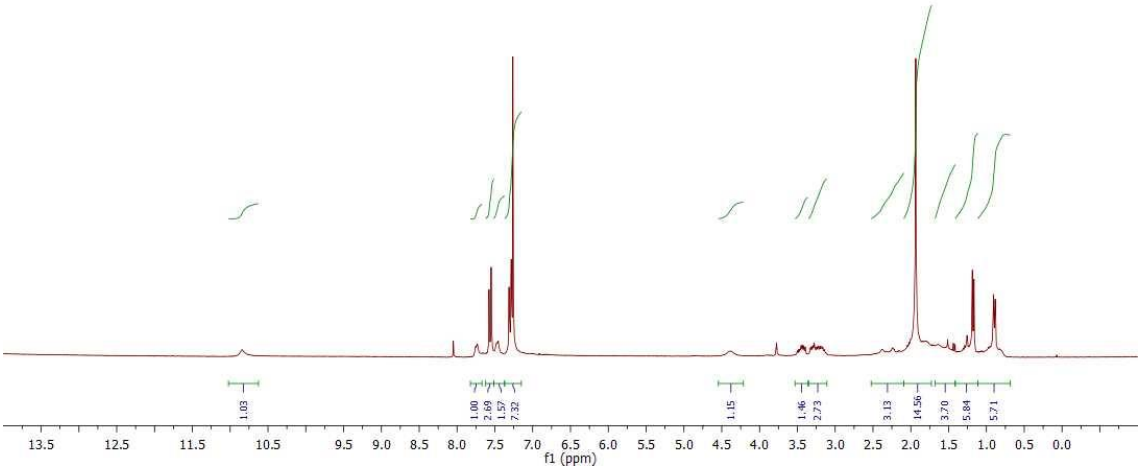
6f



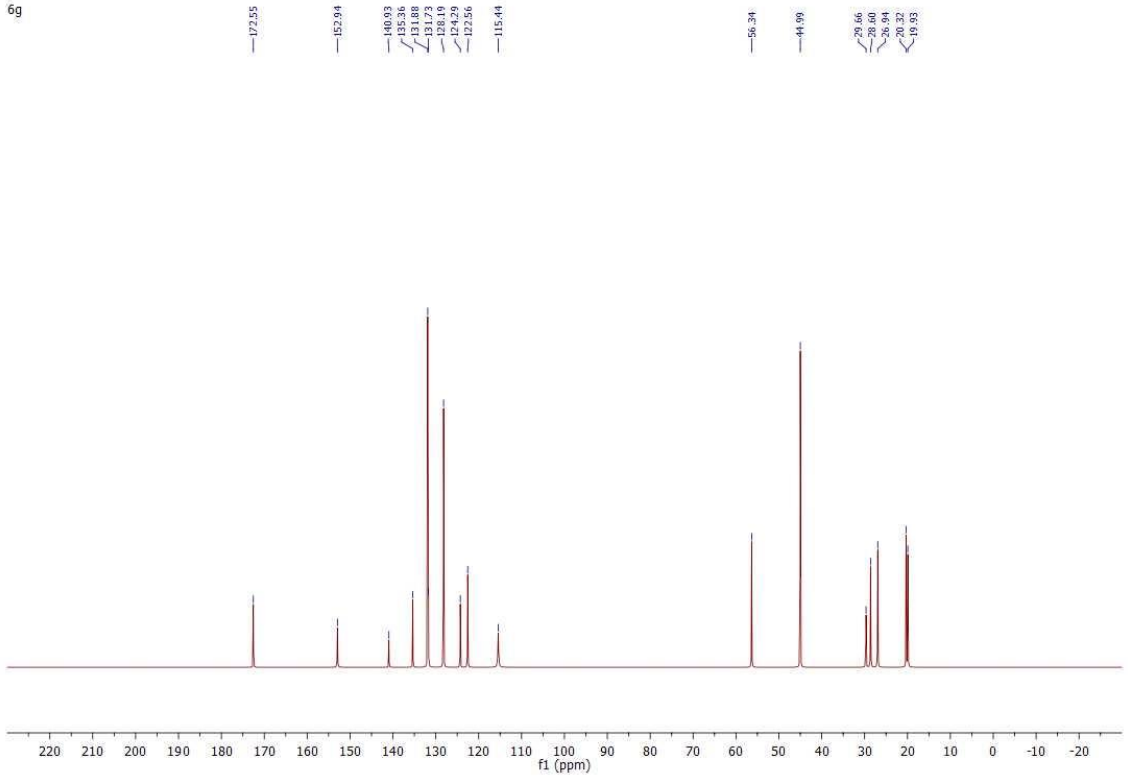
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6g



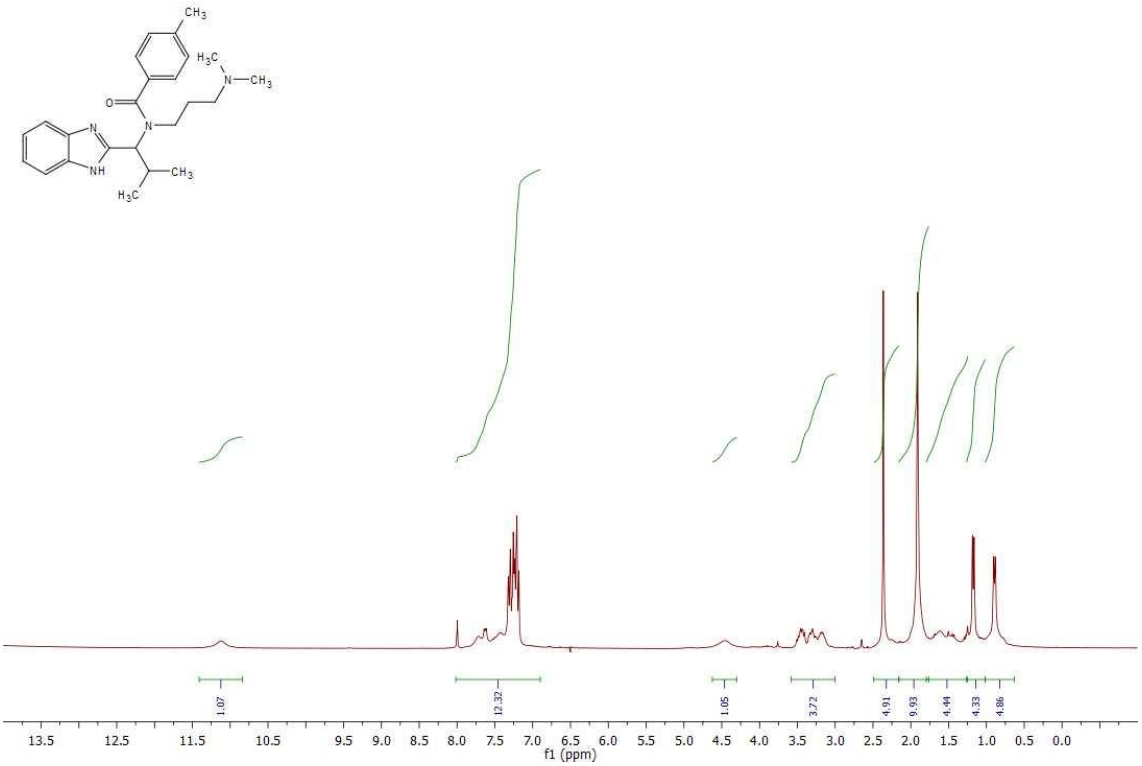


6g

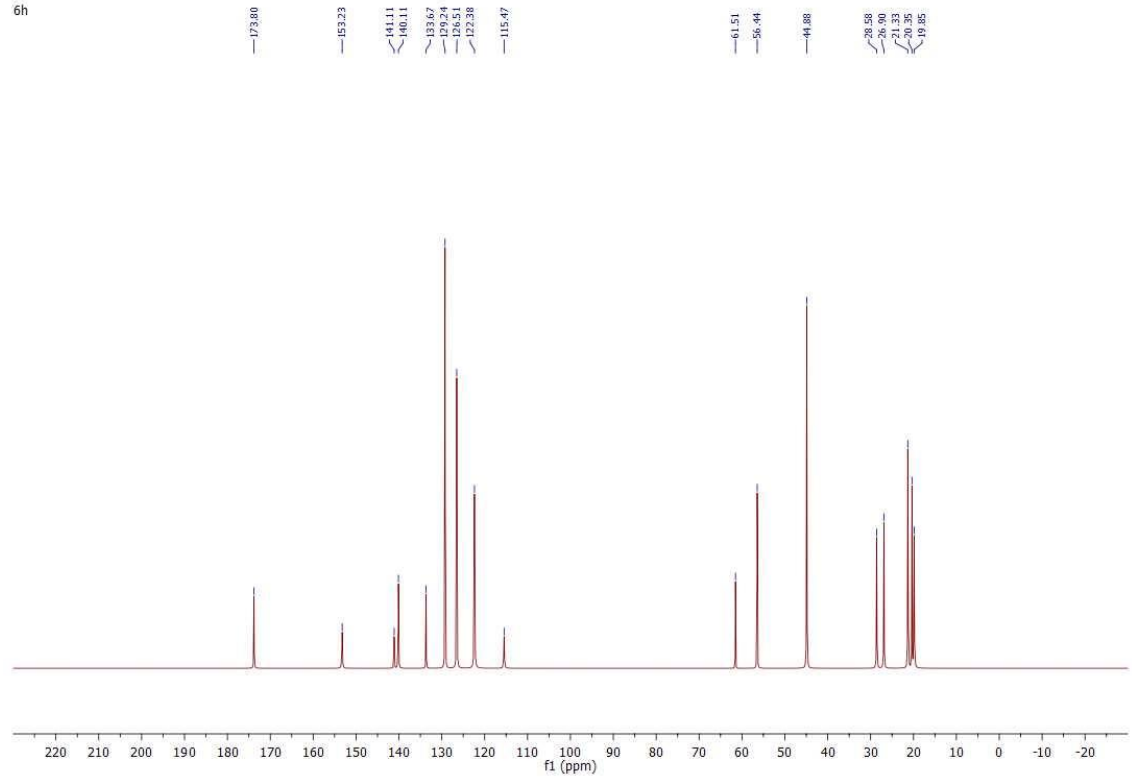


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6h

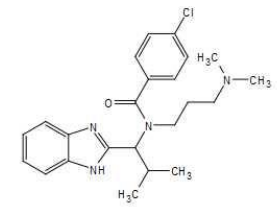


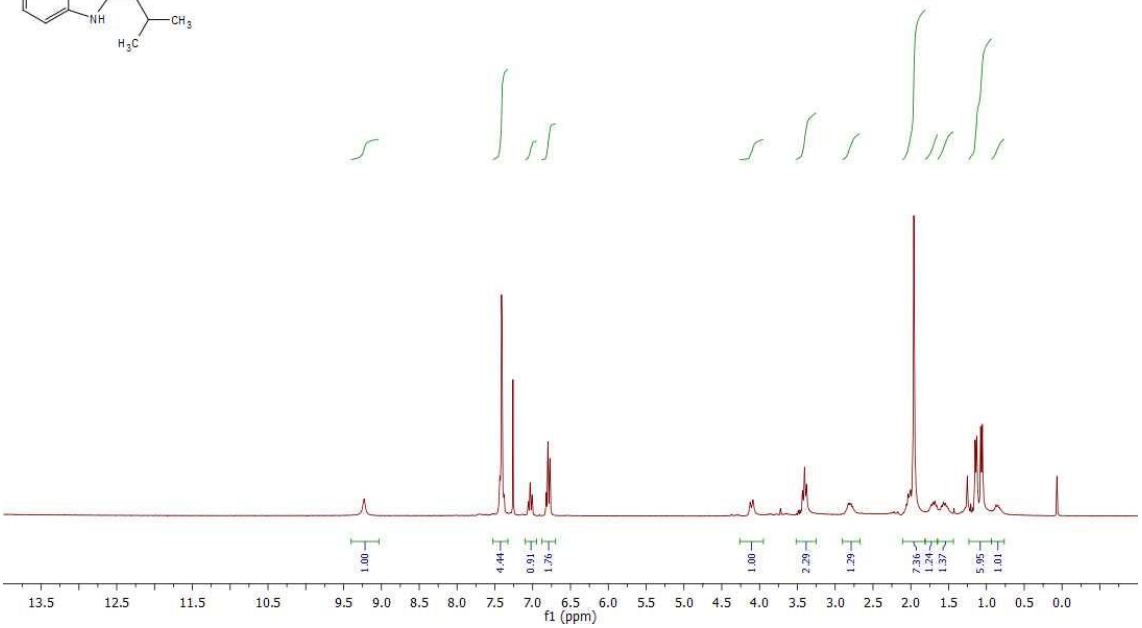
6h



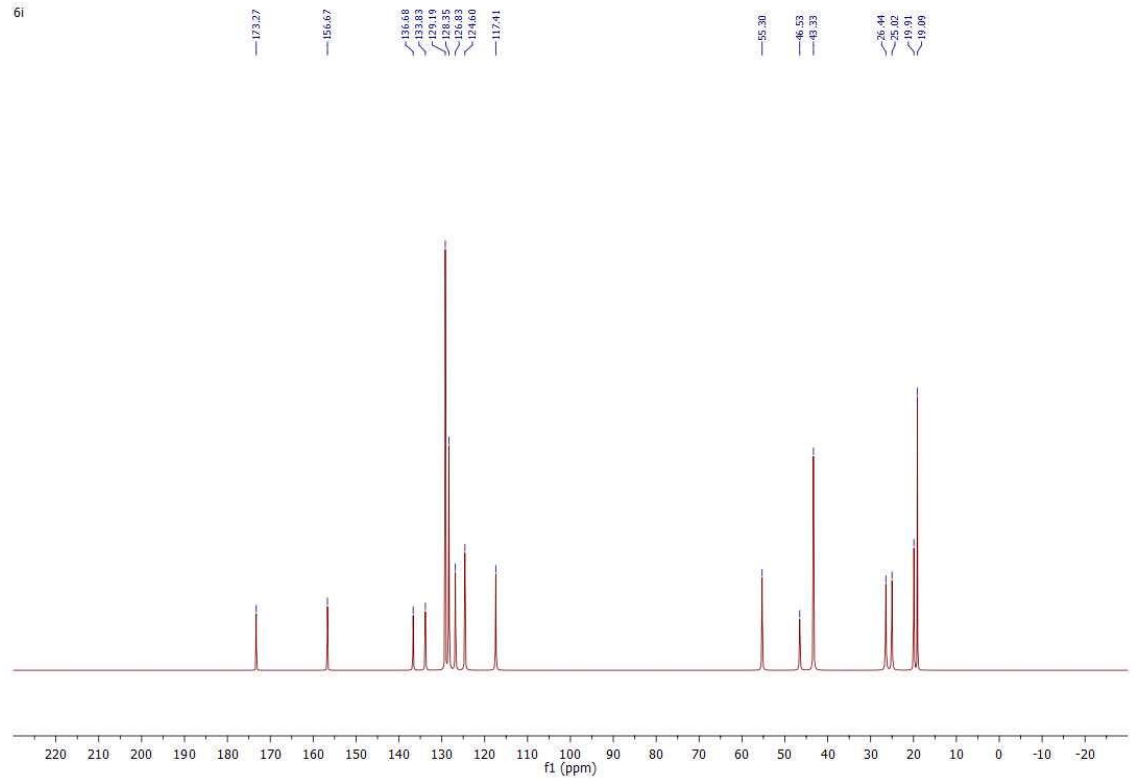
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6i

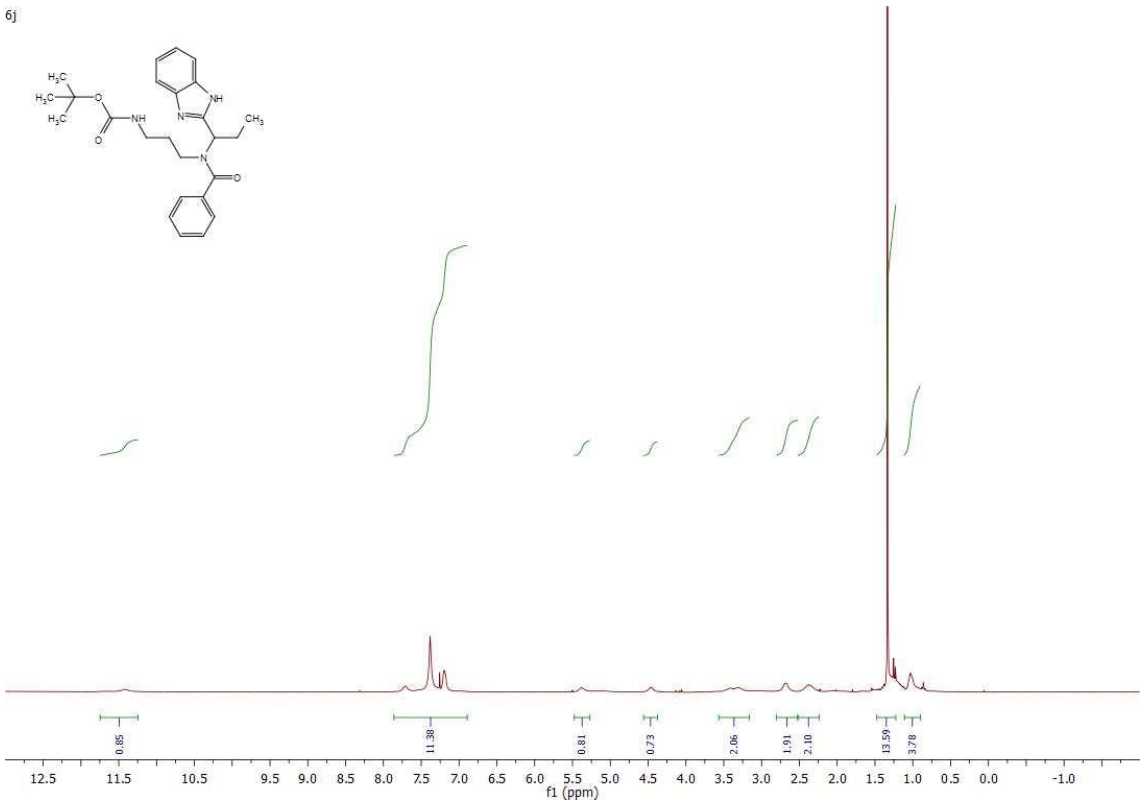


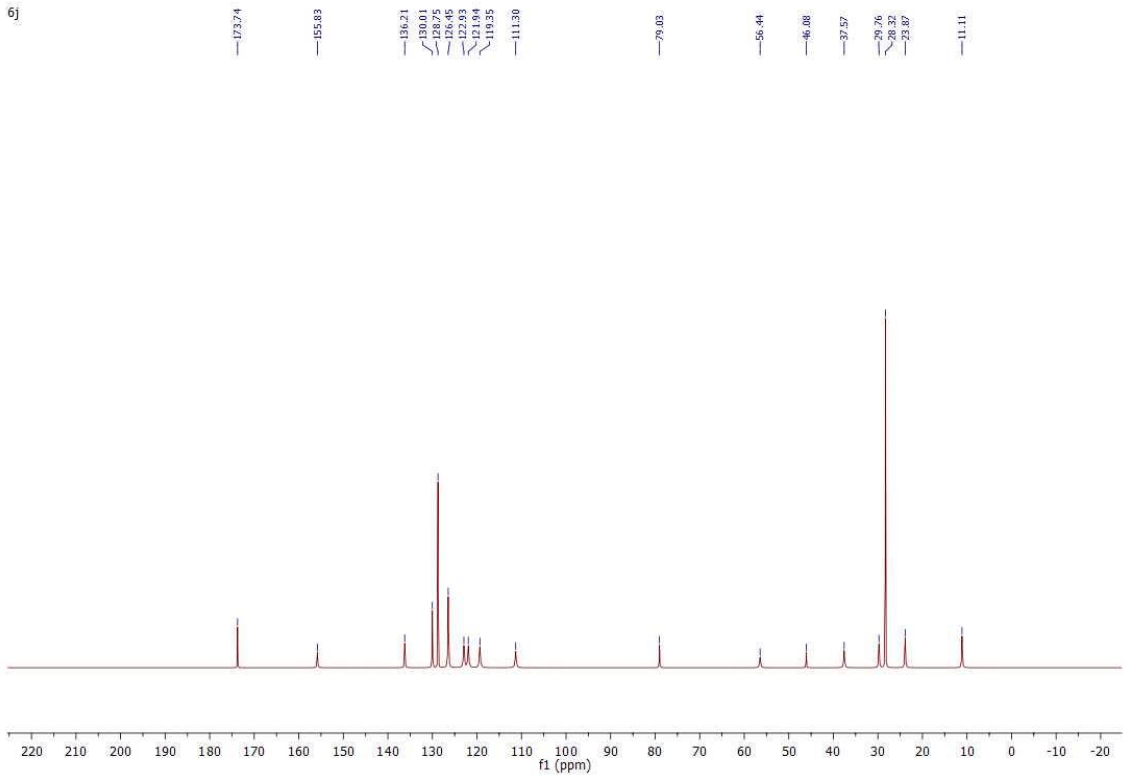


6i



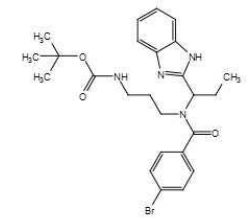
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

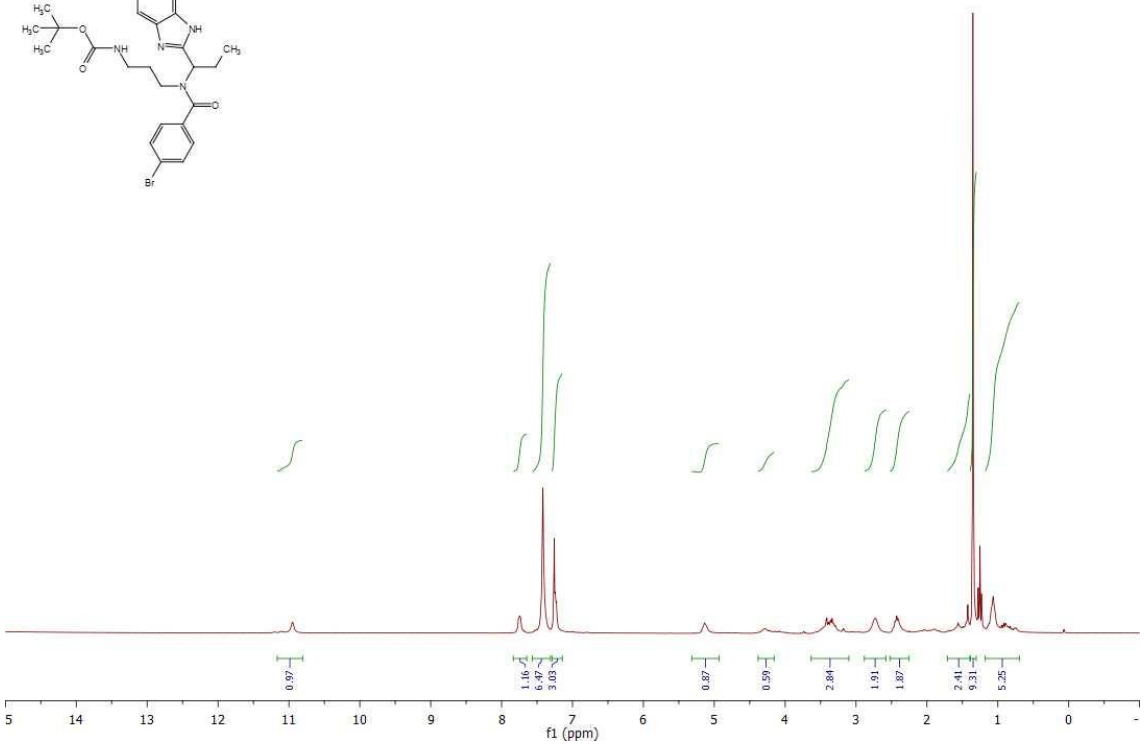




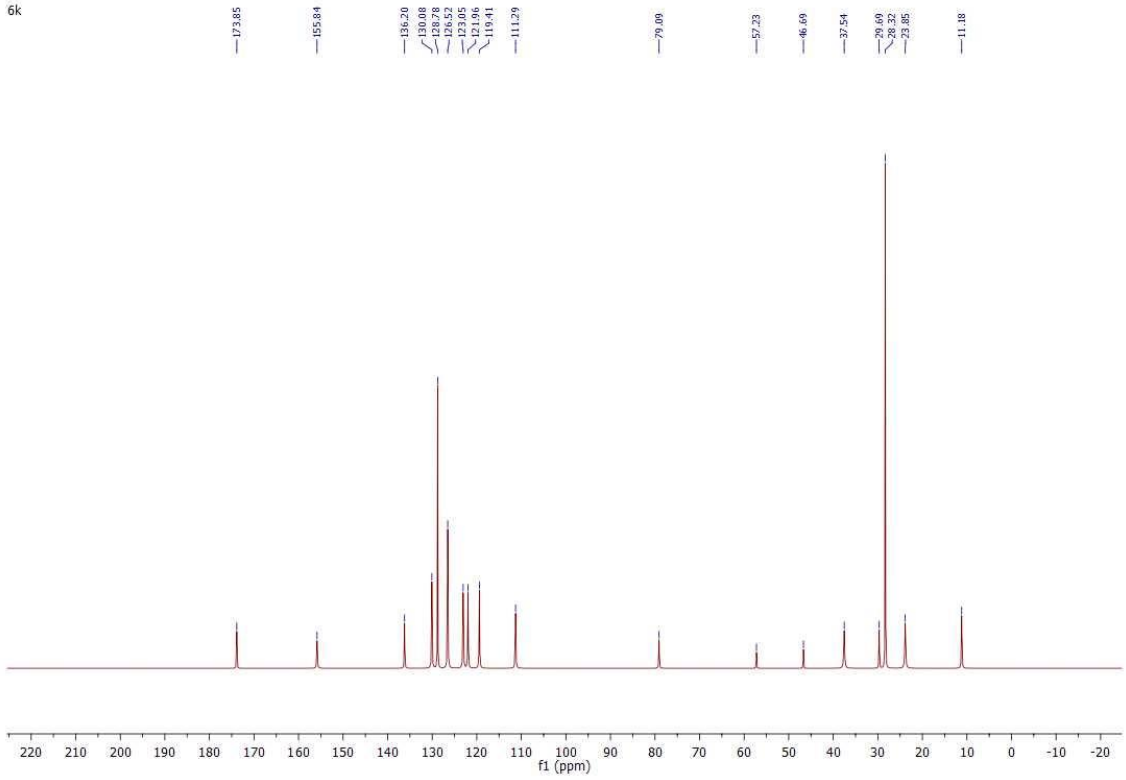
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6k



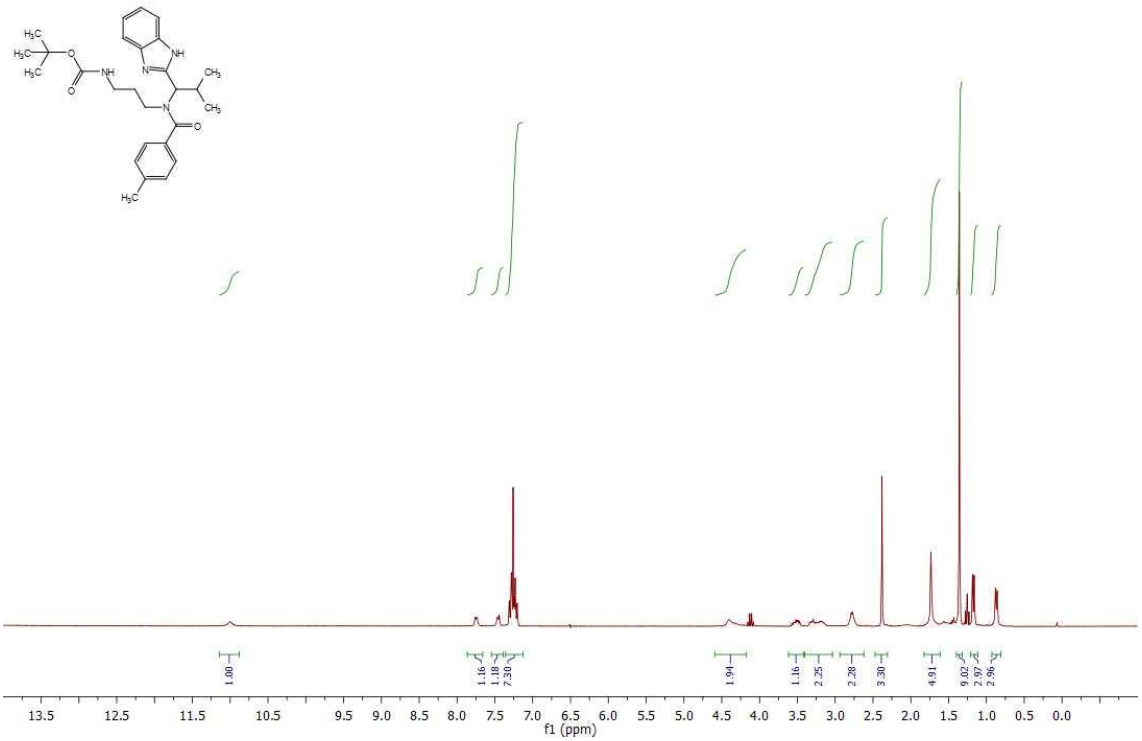


6k

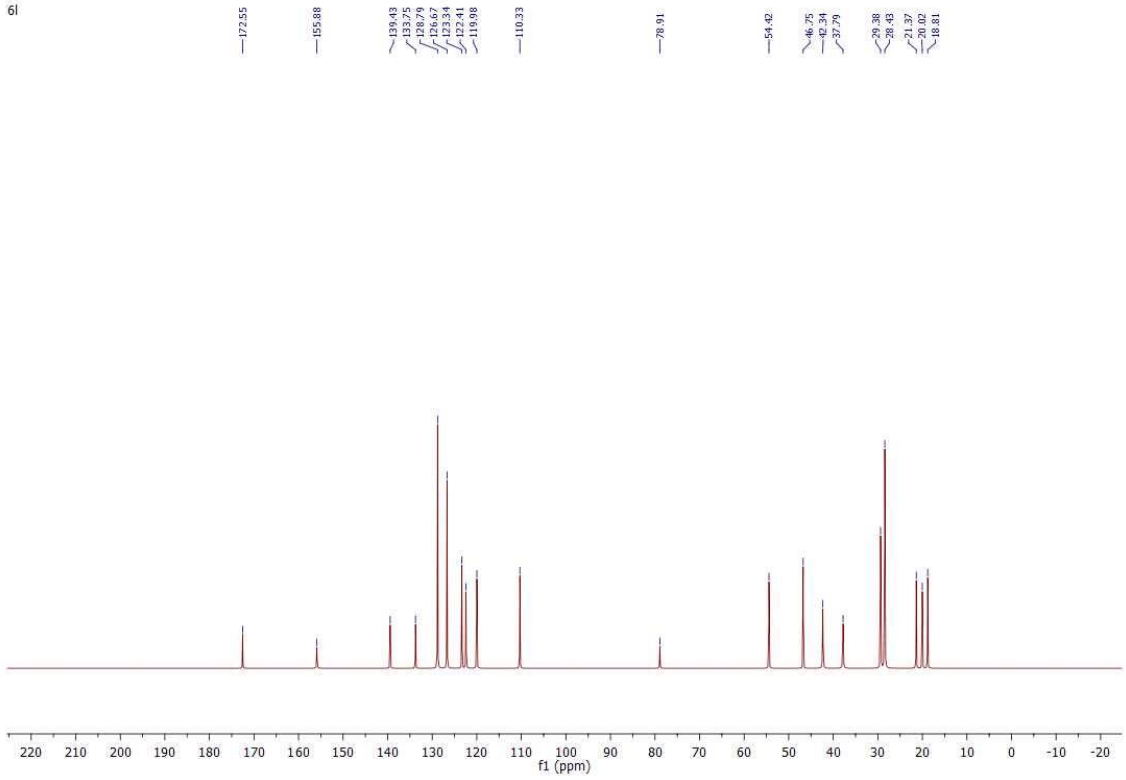


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6l

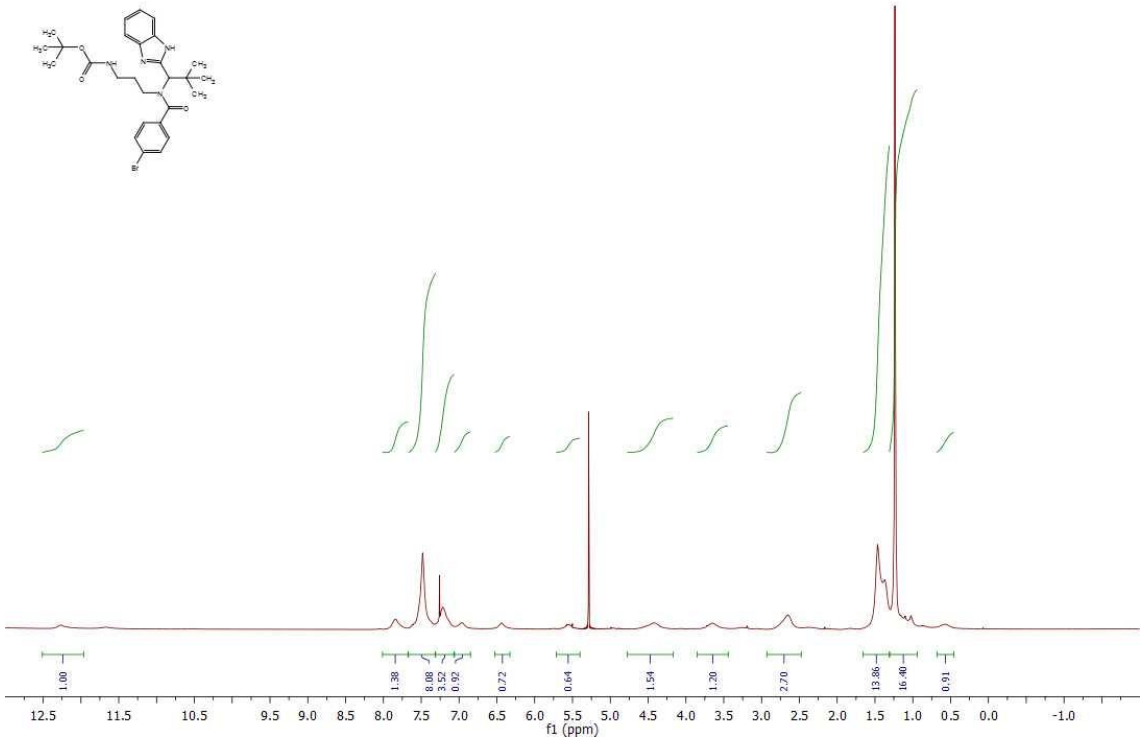


6l

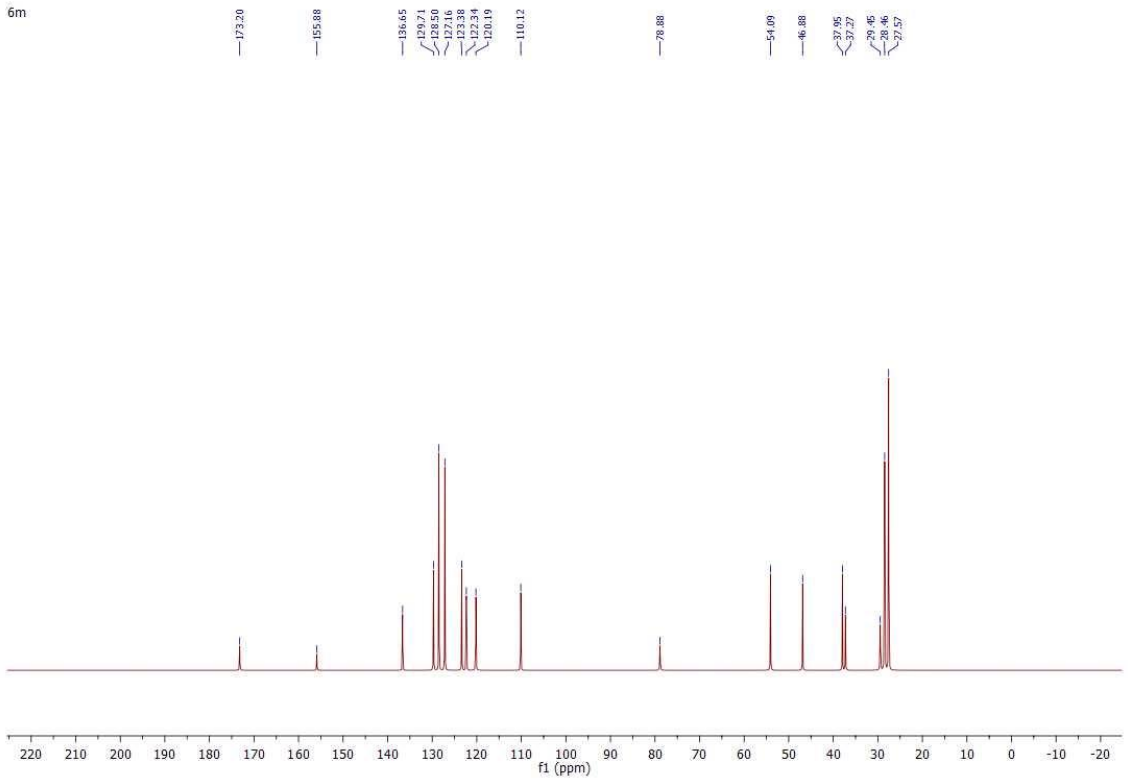


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

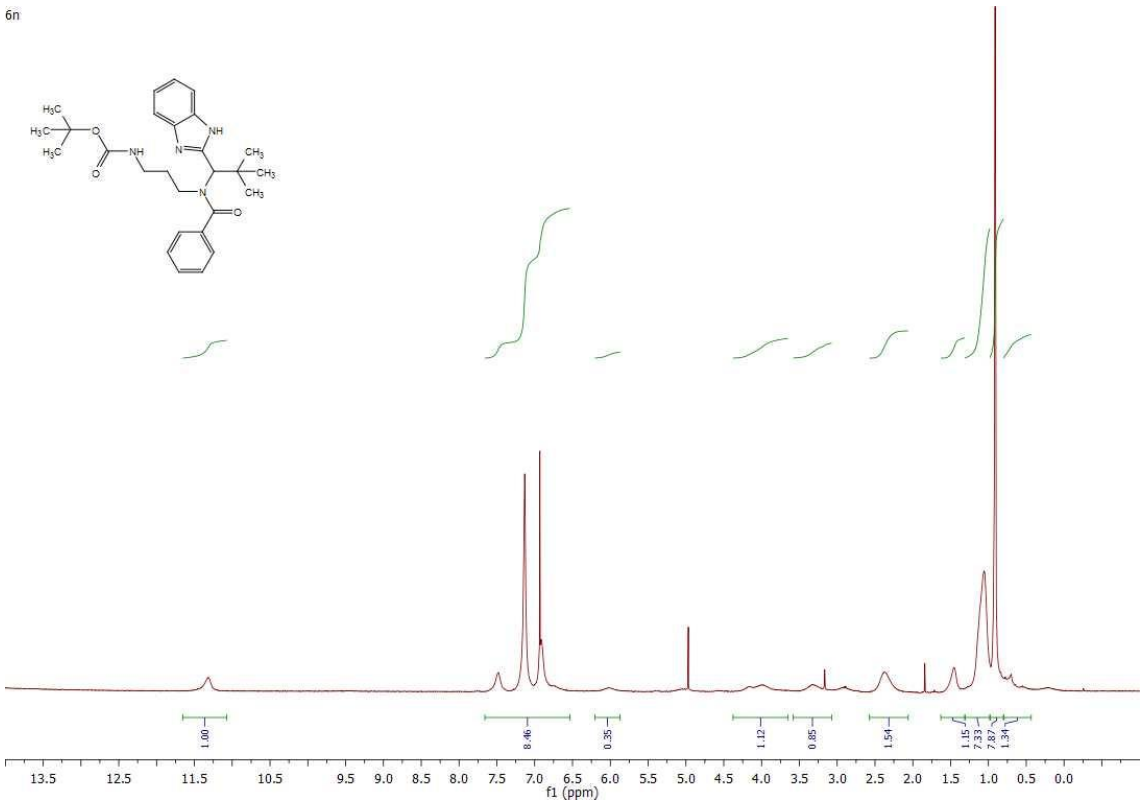
6m

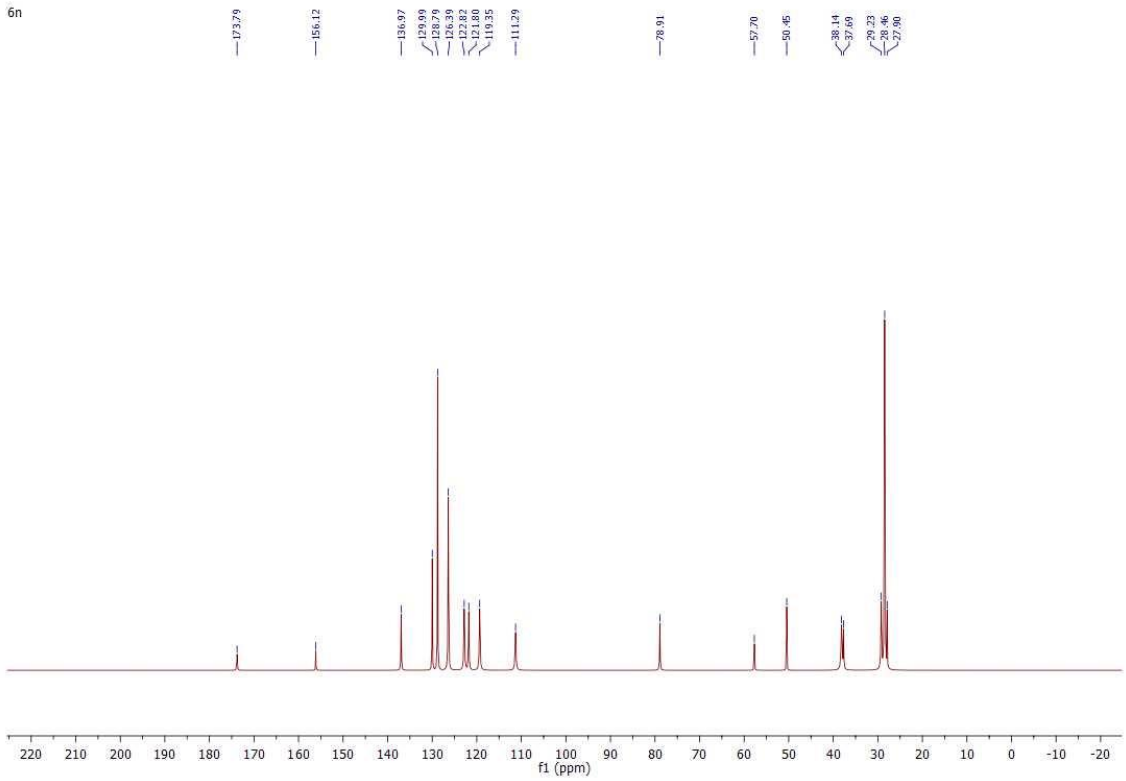


6m



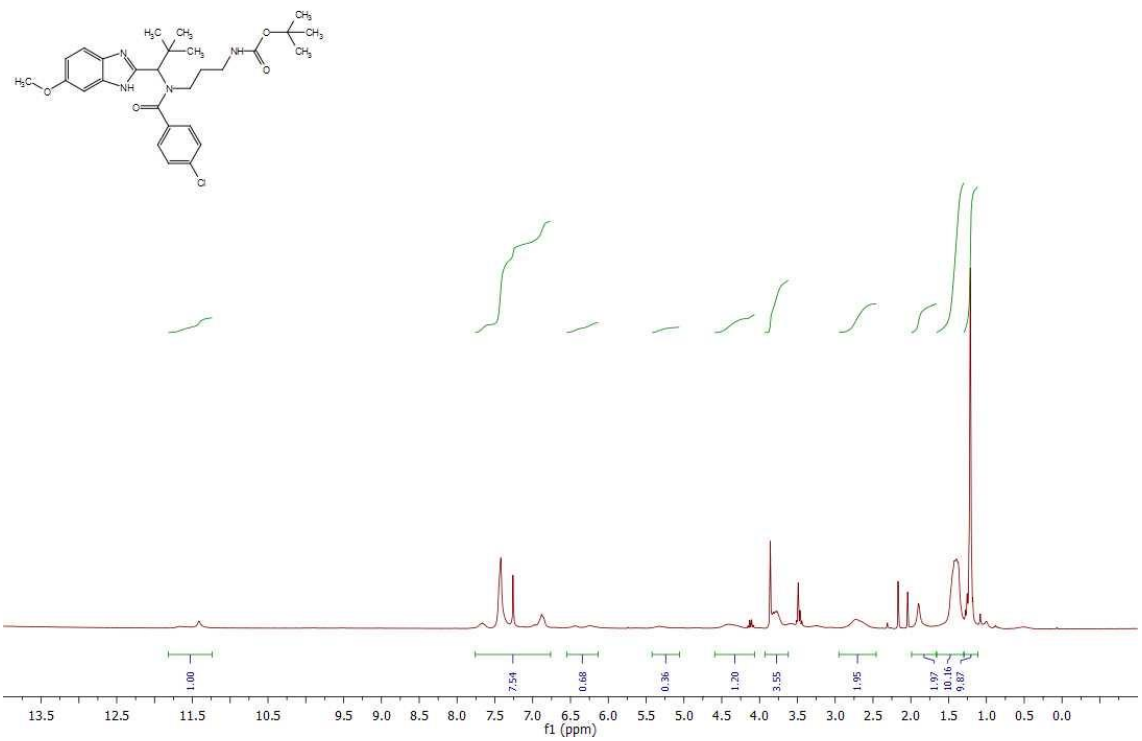
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



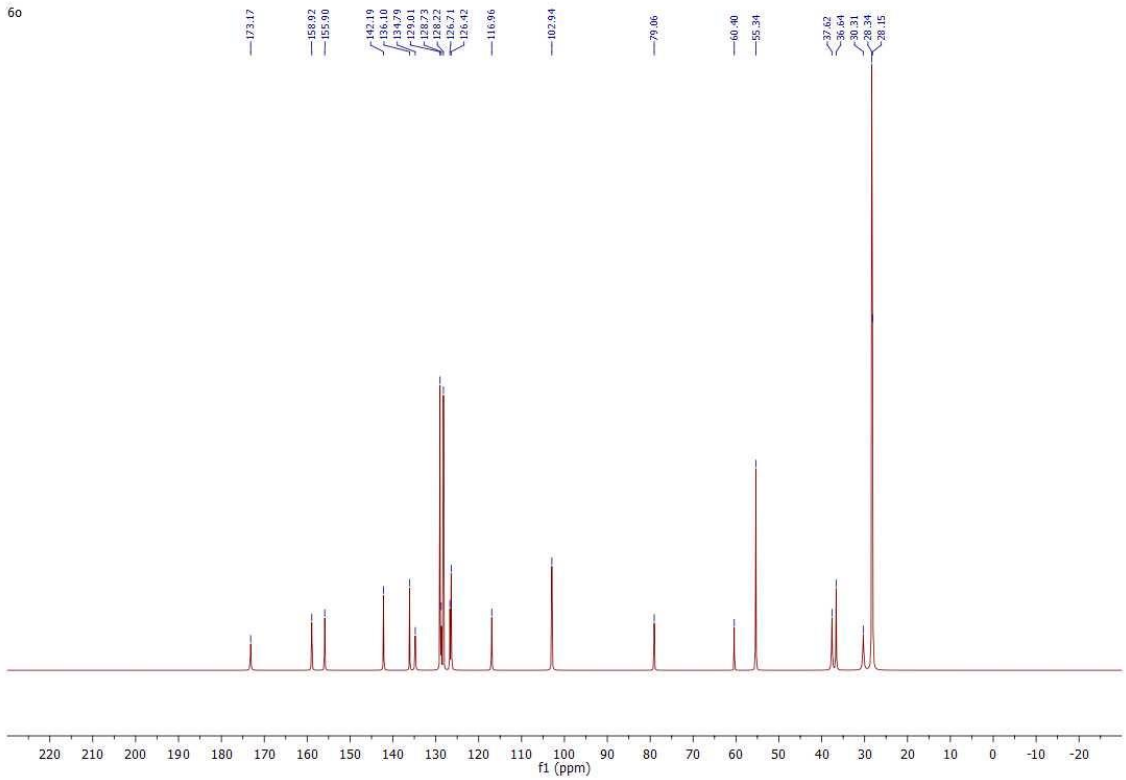


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6o

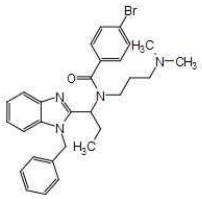


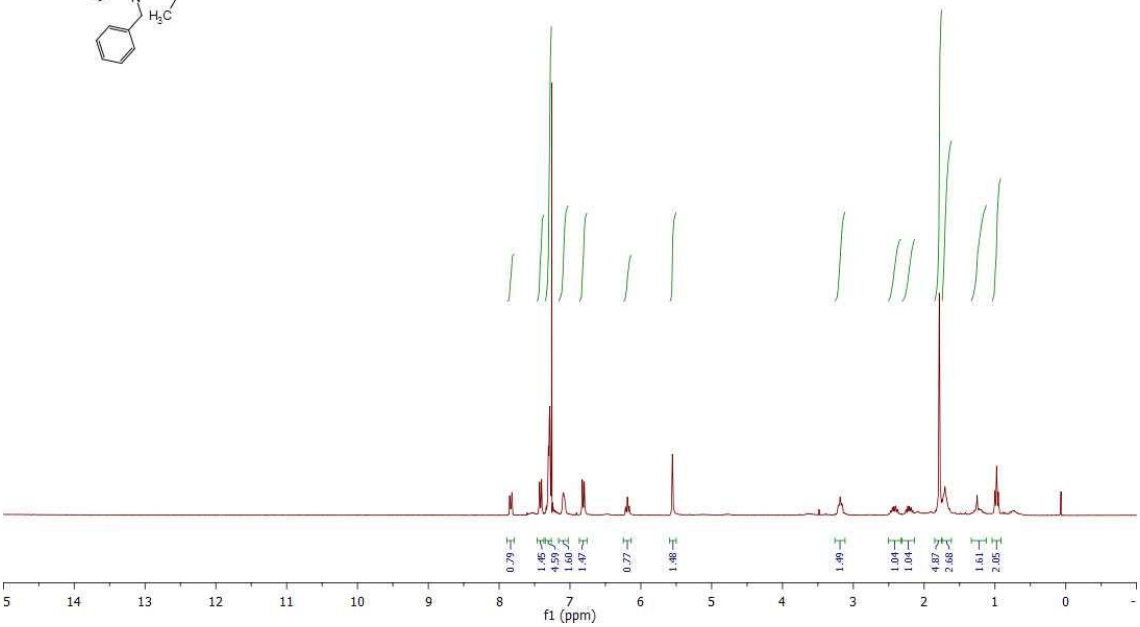
6o



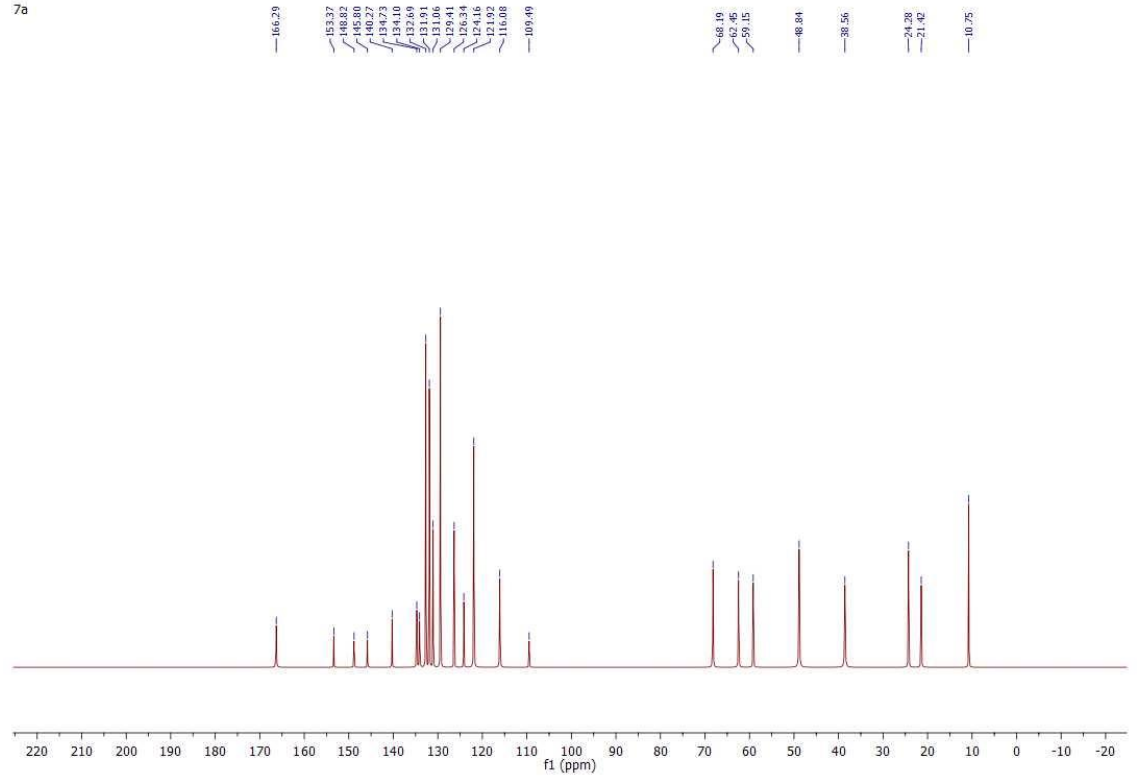
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7a



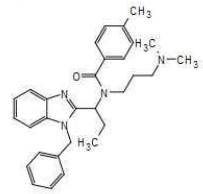


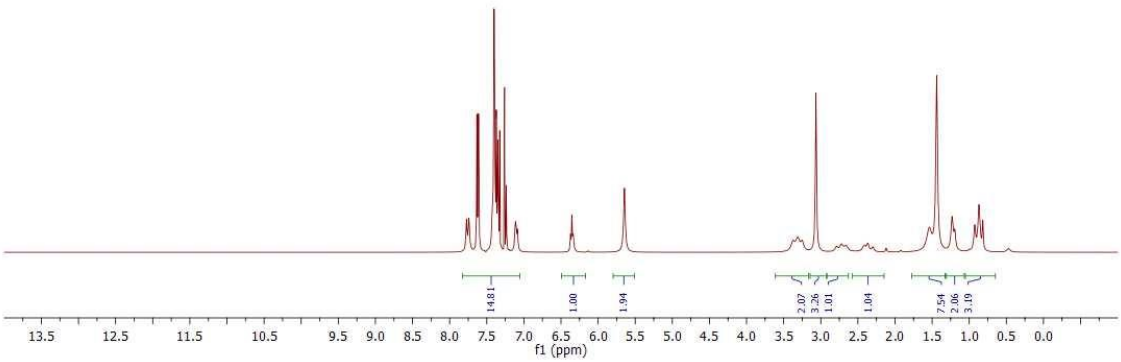
7a



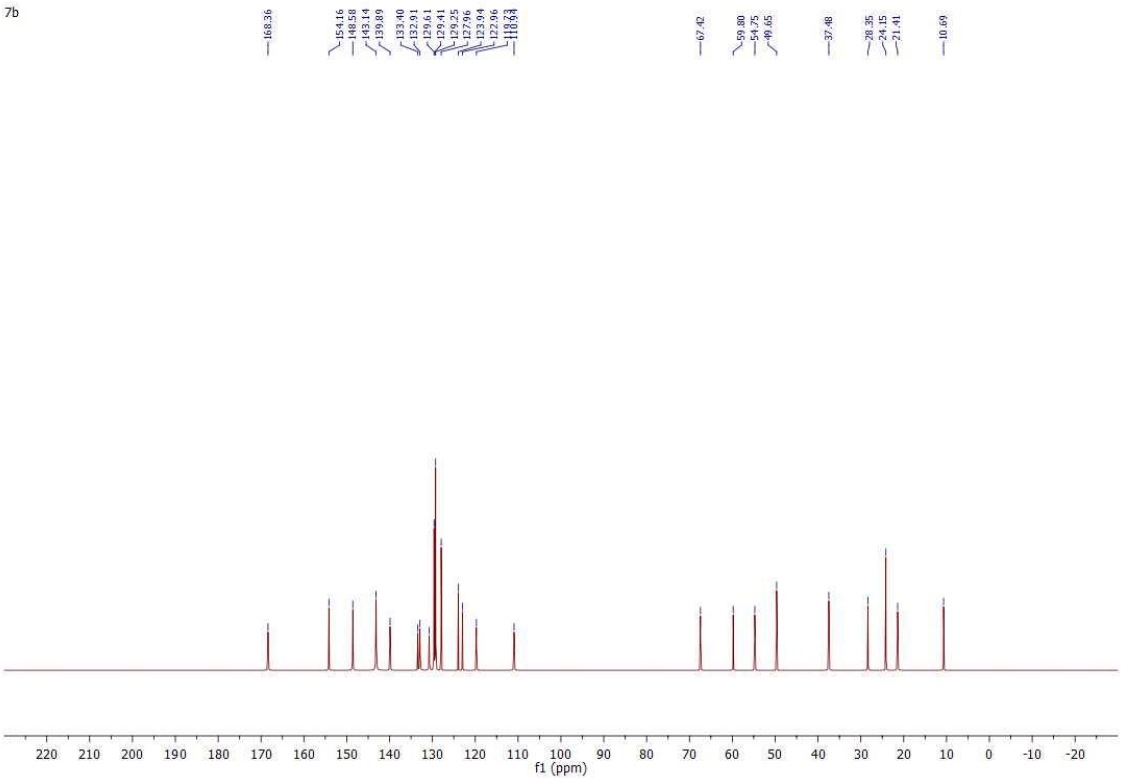
USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

7b

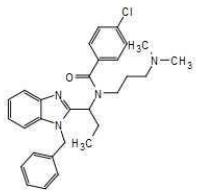


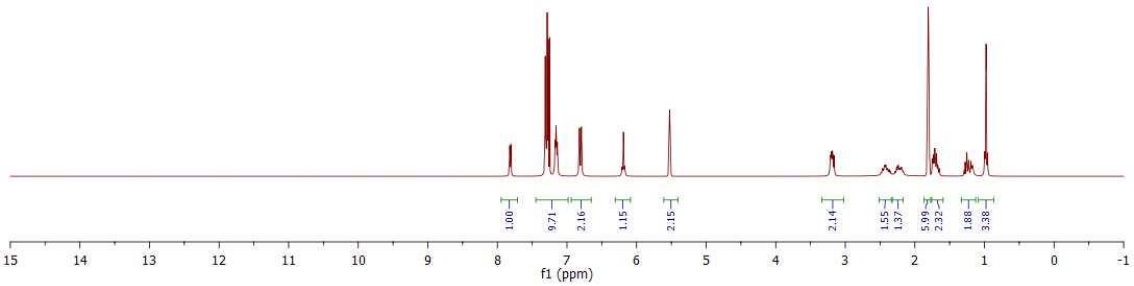

14.81
1.00
1.94
2.07
3.26
1.01
1.04
7.54
2.06
3.19
f1 (ppm)

7b

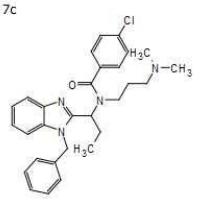

168.36
154.16
148.58
143.14
139.89
133.40
132.91
129.61
129.41
129.25
127.96
123.94
122.96
110.94
67.42
59.80
54.75
40.65
37.48
28.35
24.15
21.41
10.69
f1 (ppm)

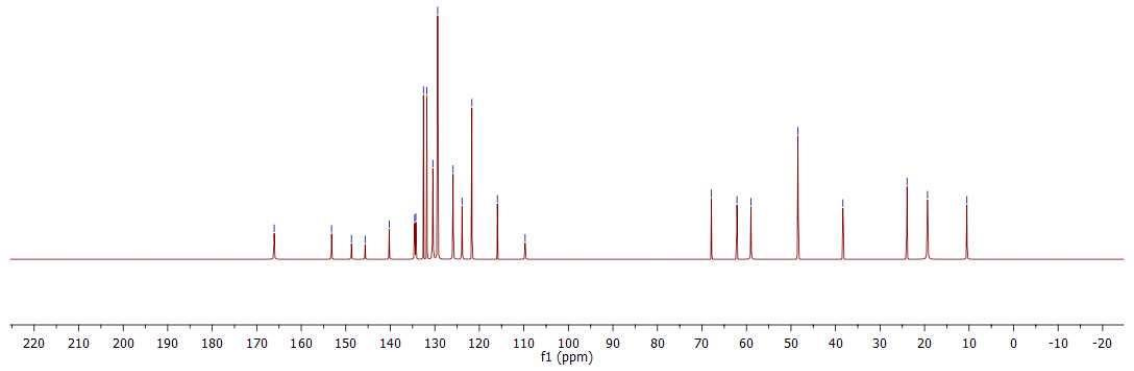
7c





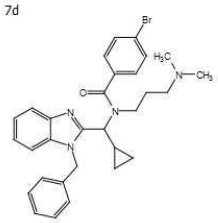
7c

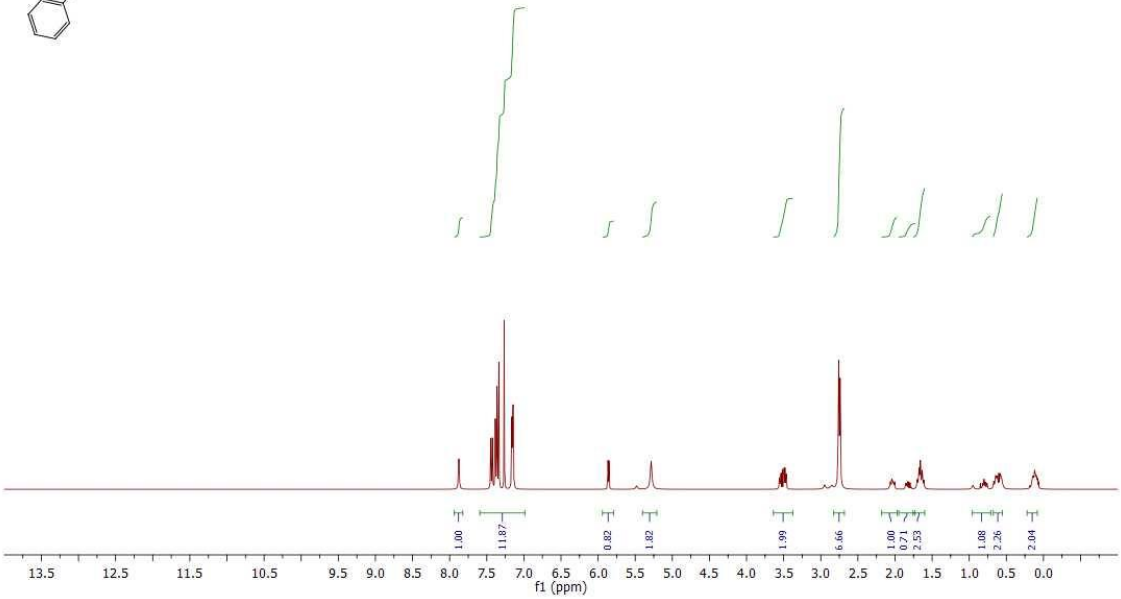




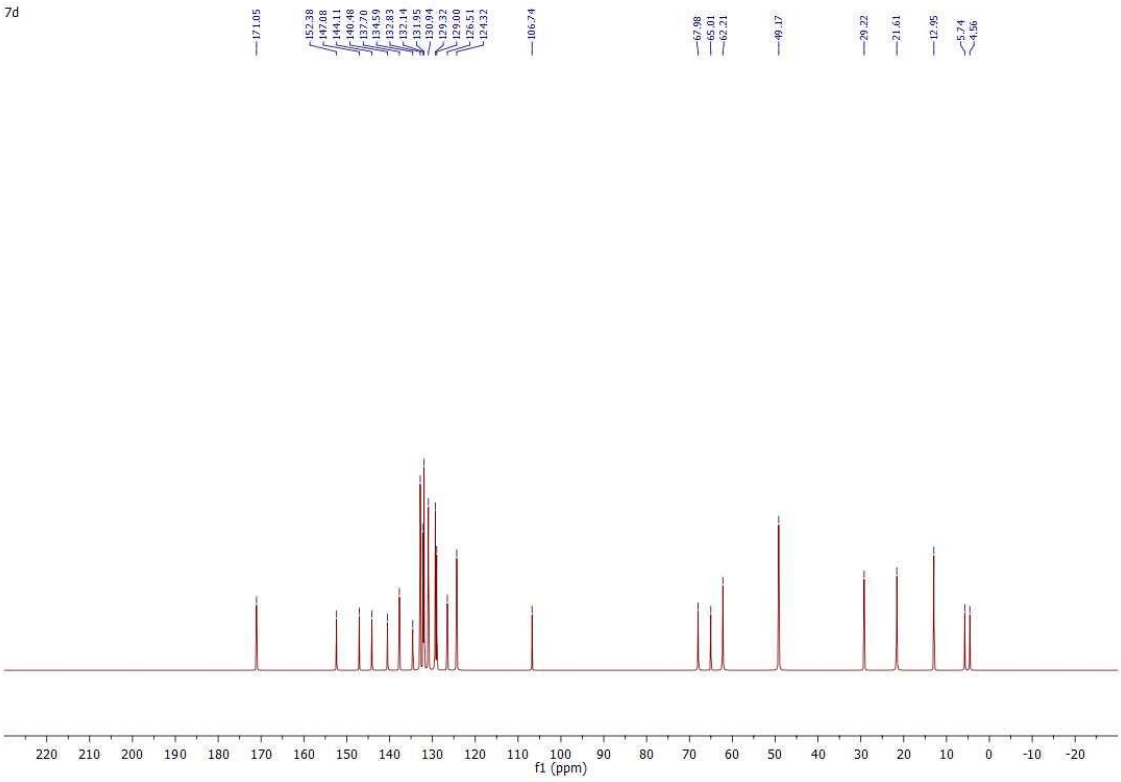
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7d



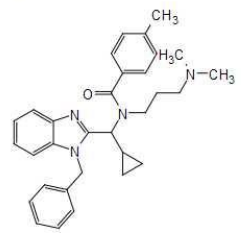


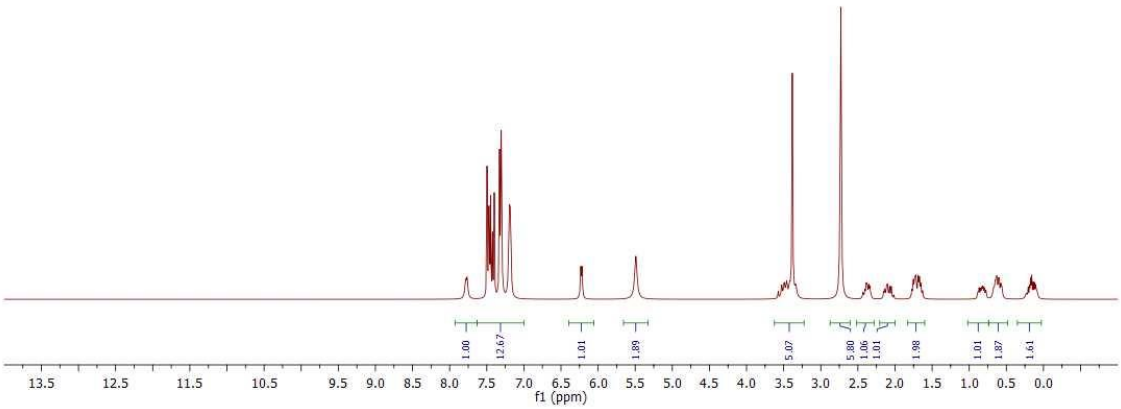
7d



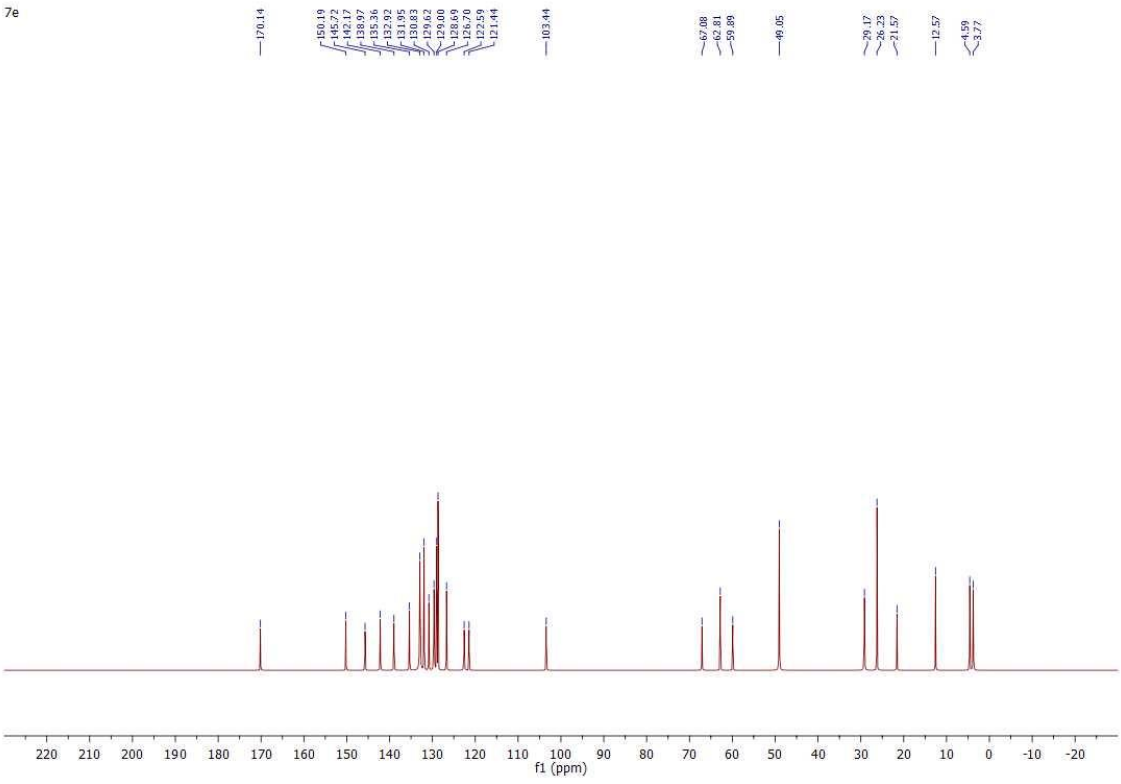
USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

7e

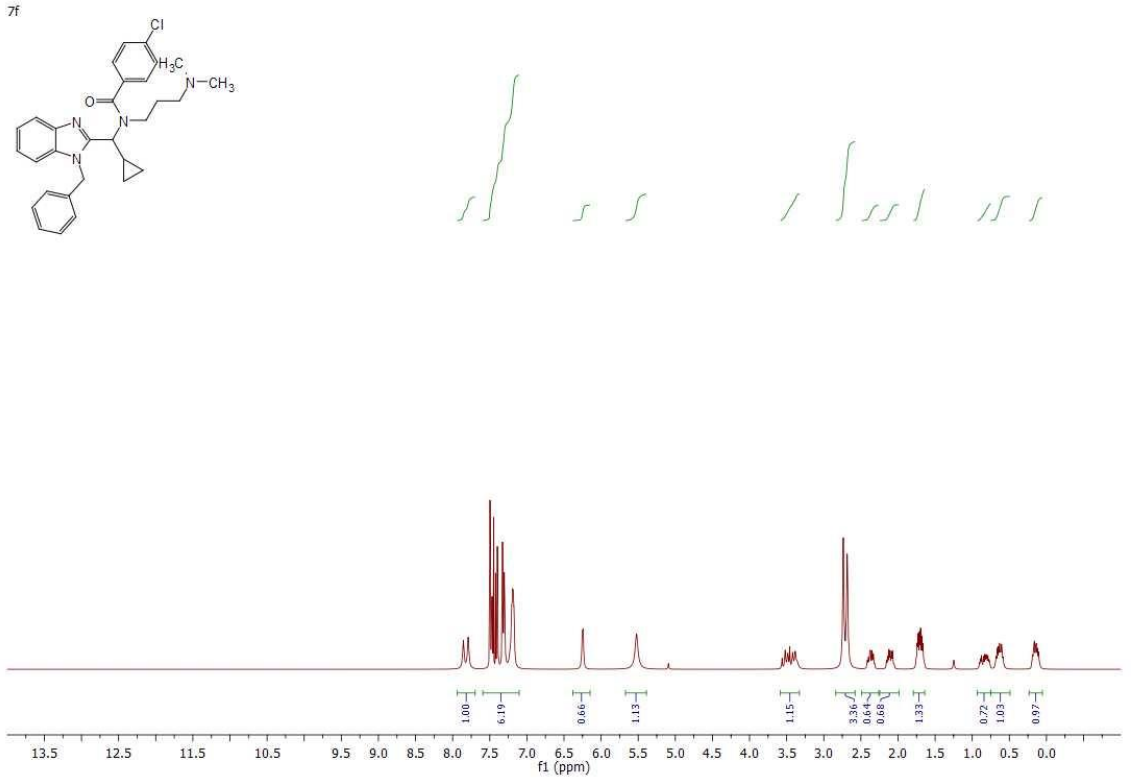


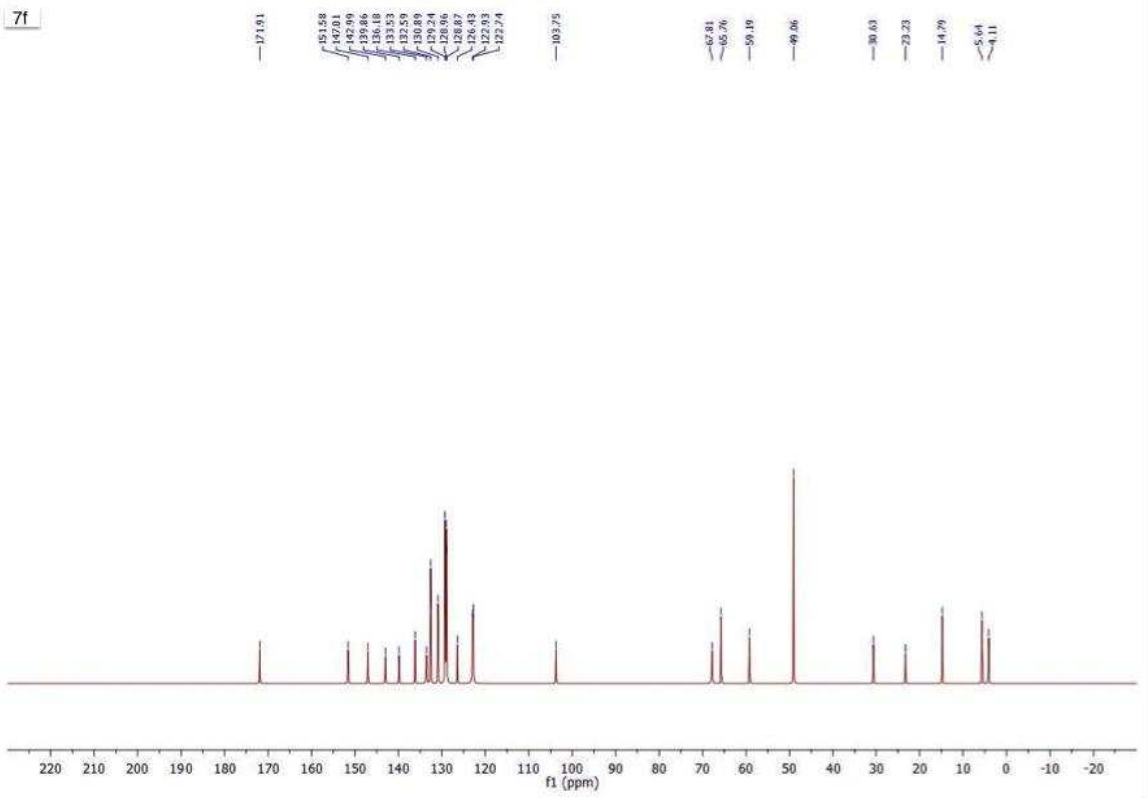


7e



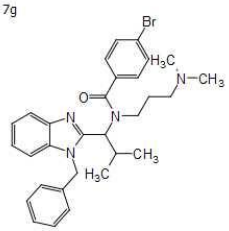
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

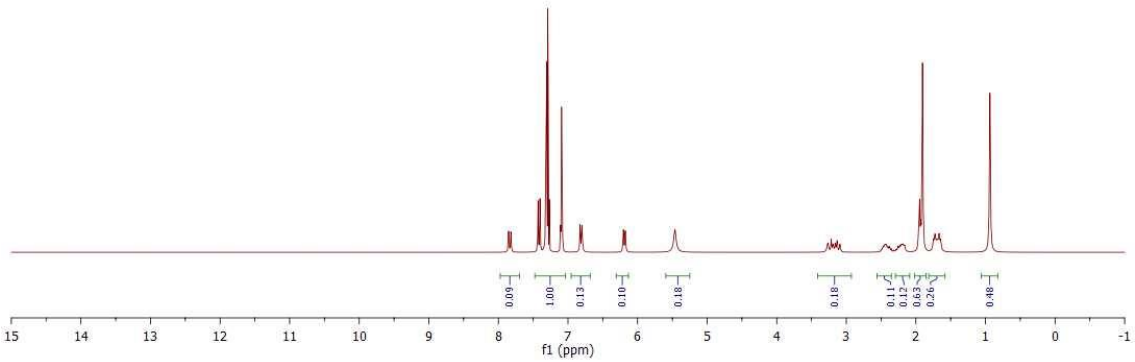




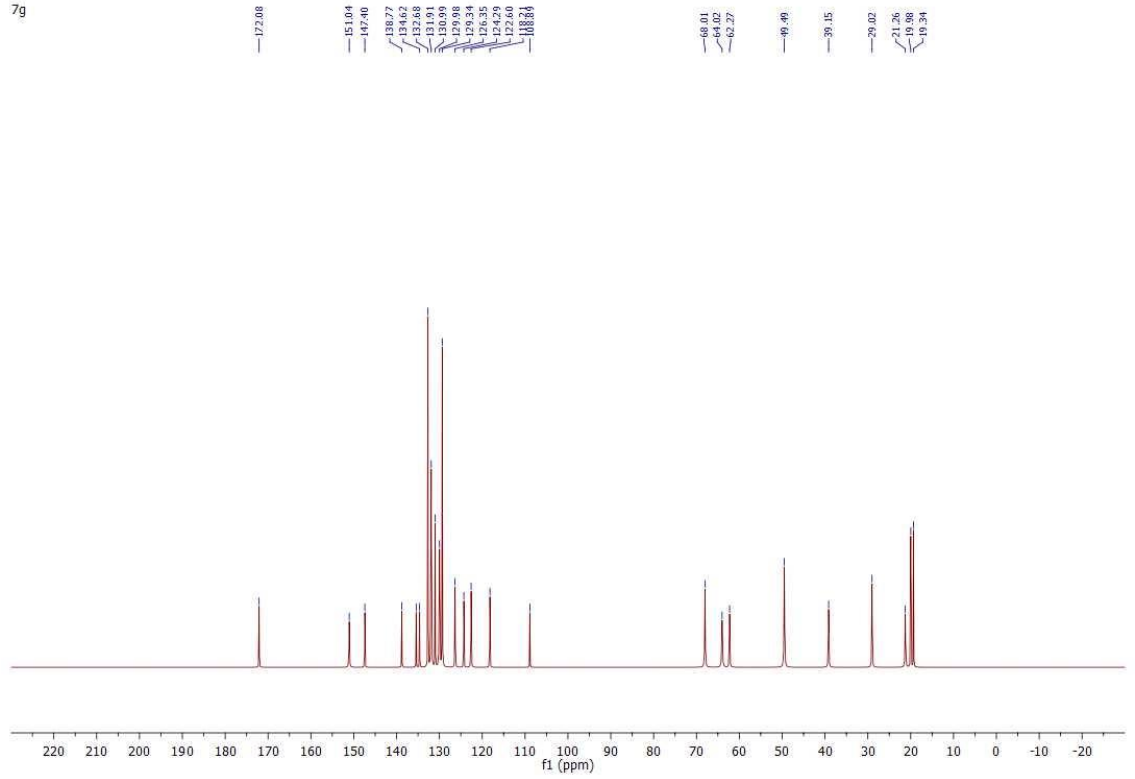
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7g



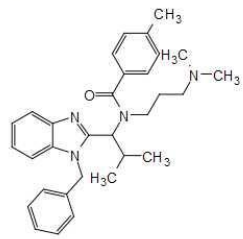


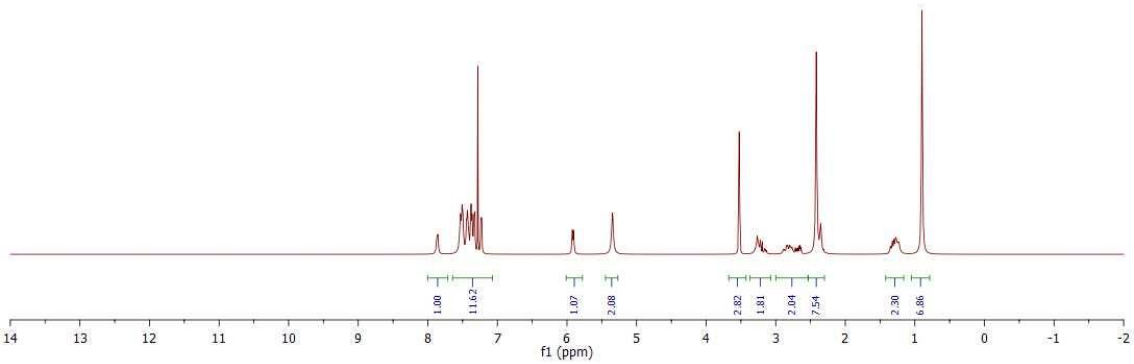
7g



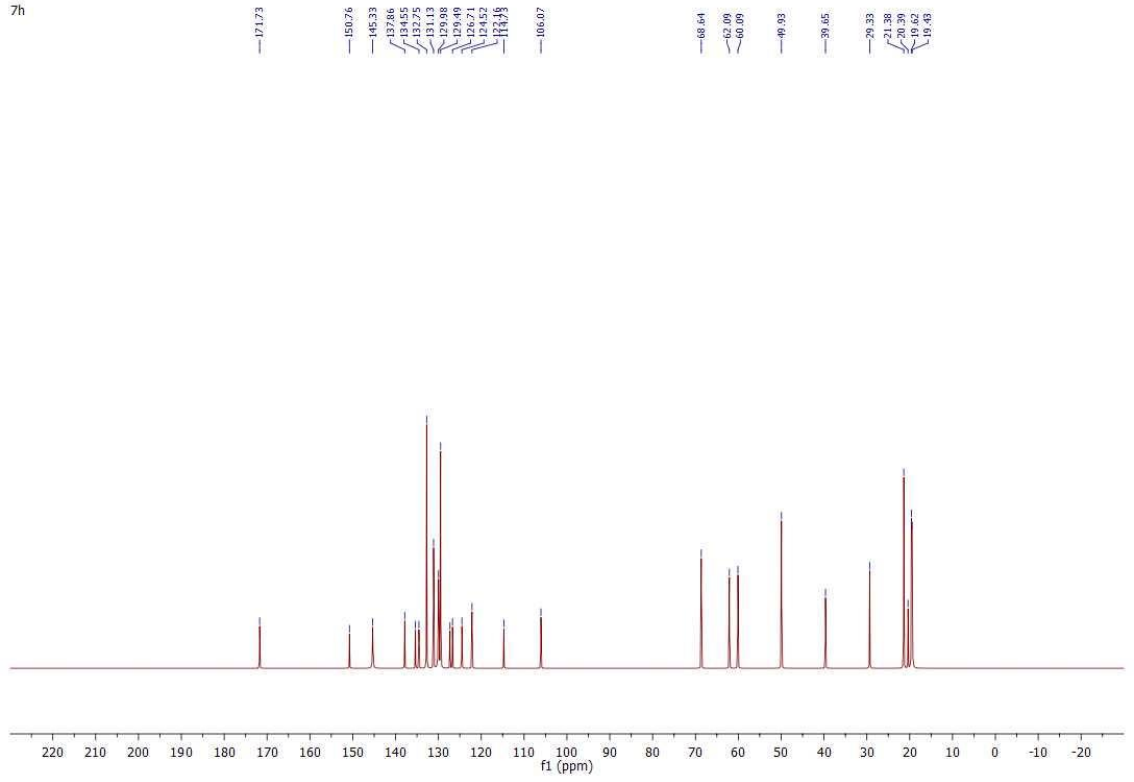
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7h



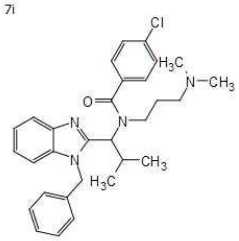


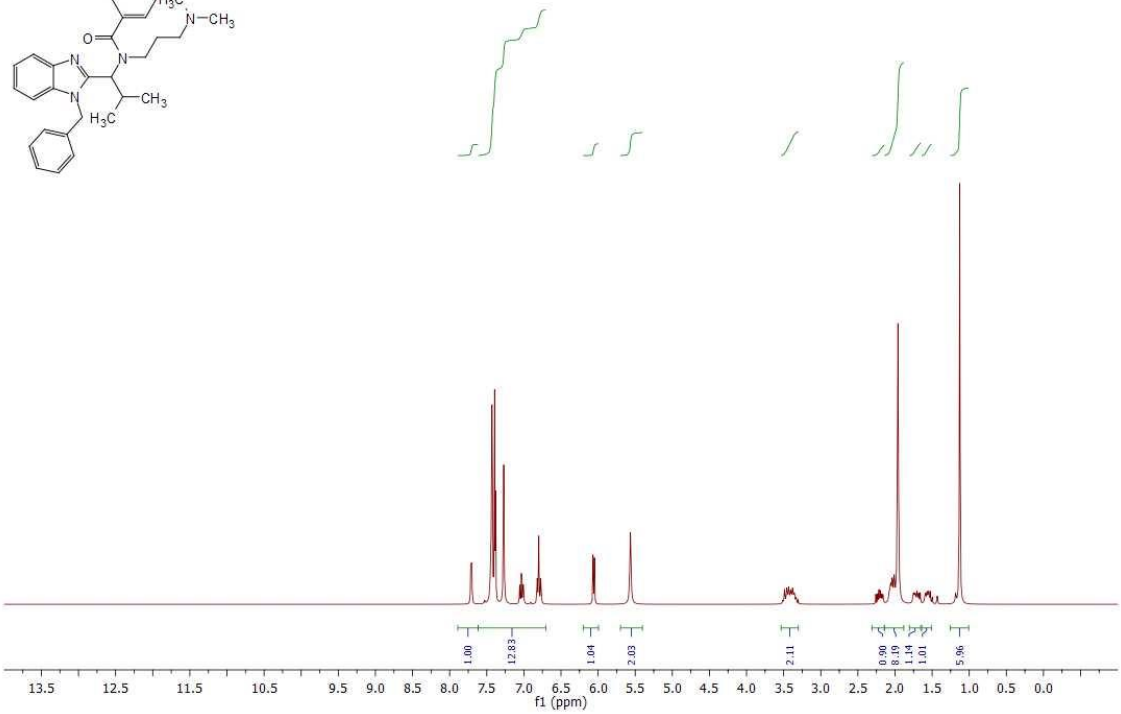
7h



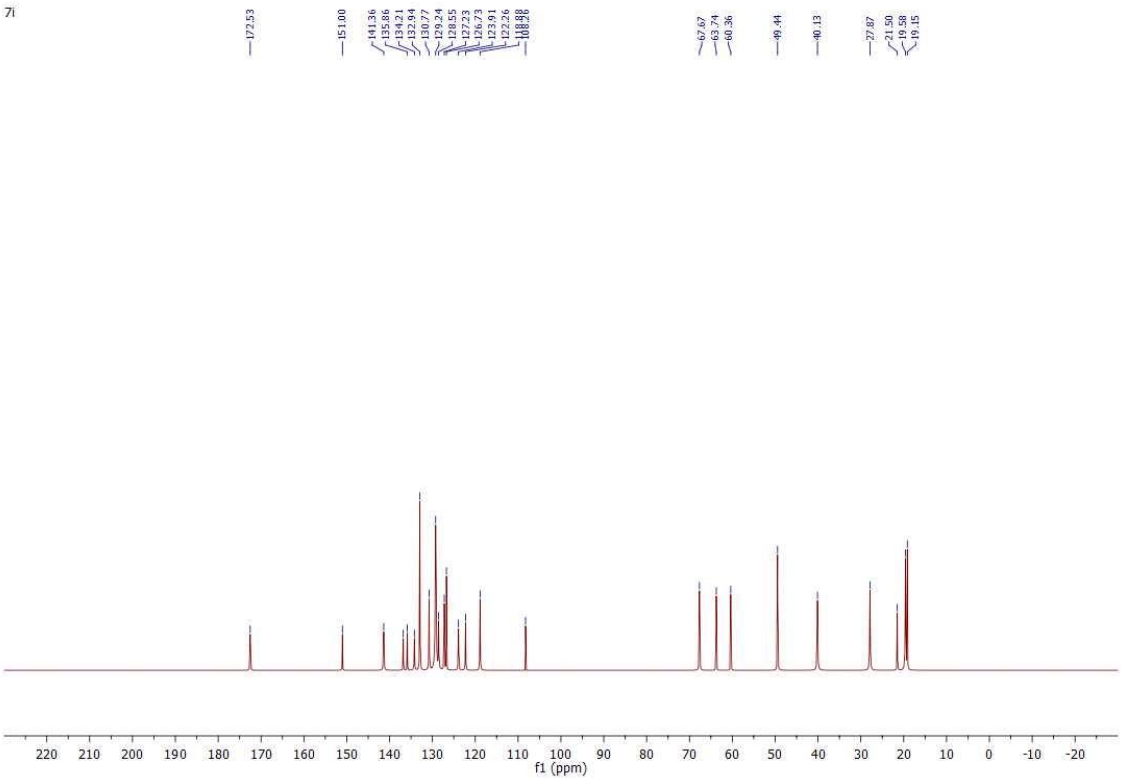
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7i



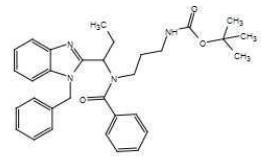


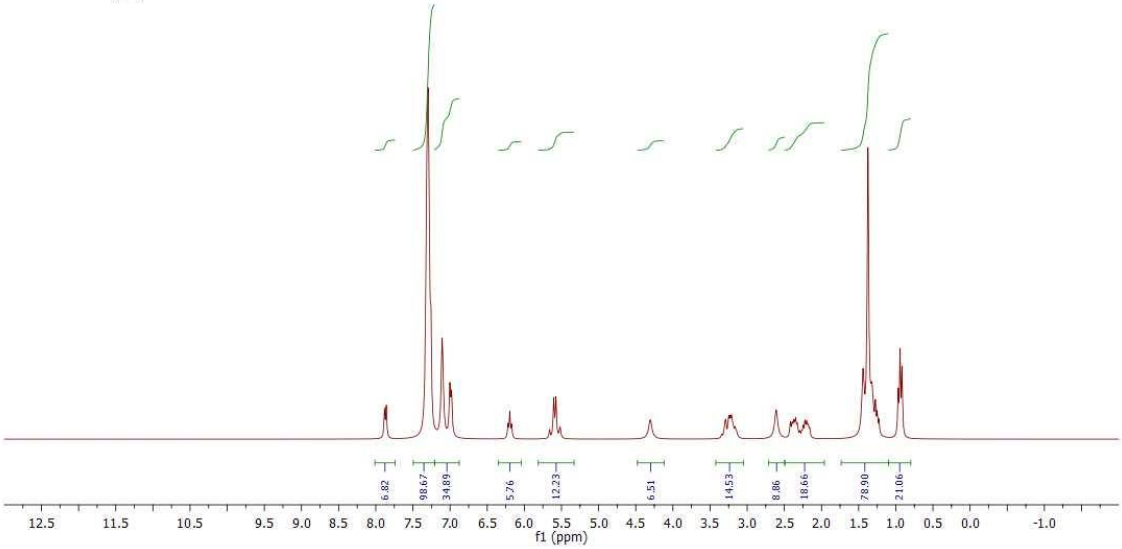
7i



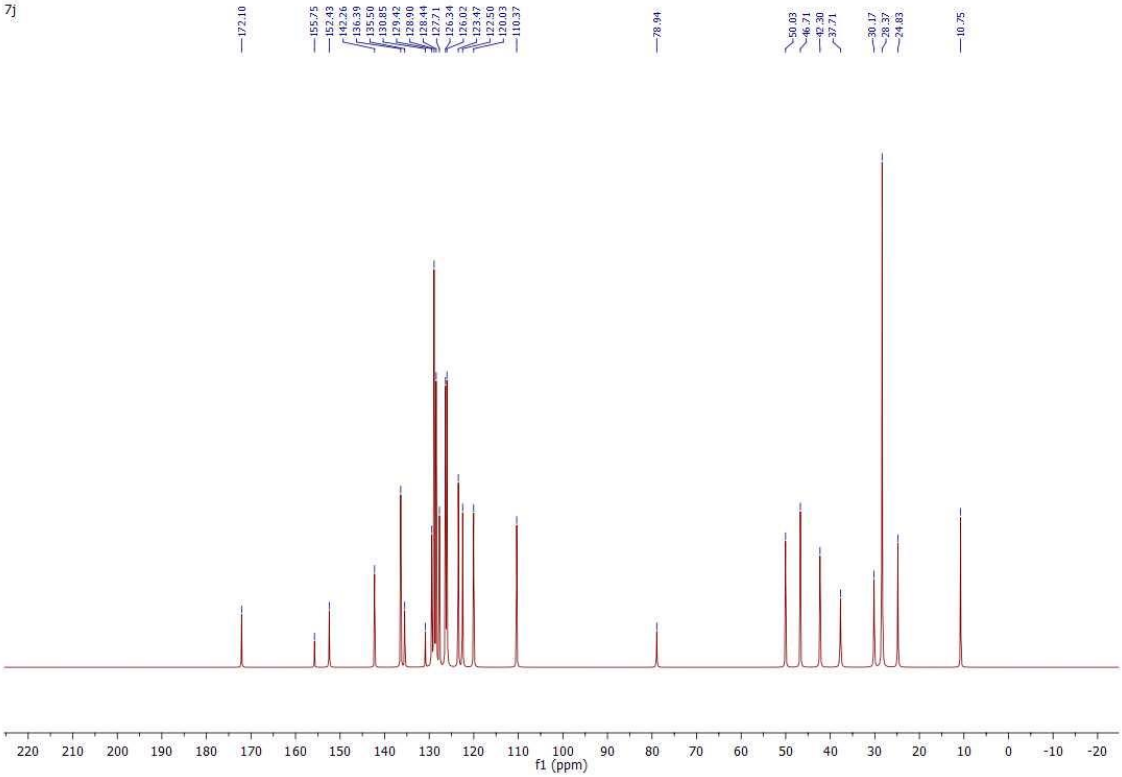
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7j



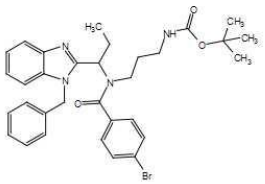


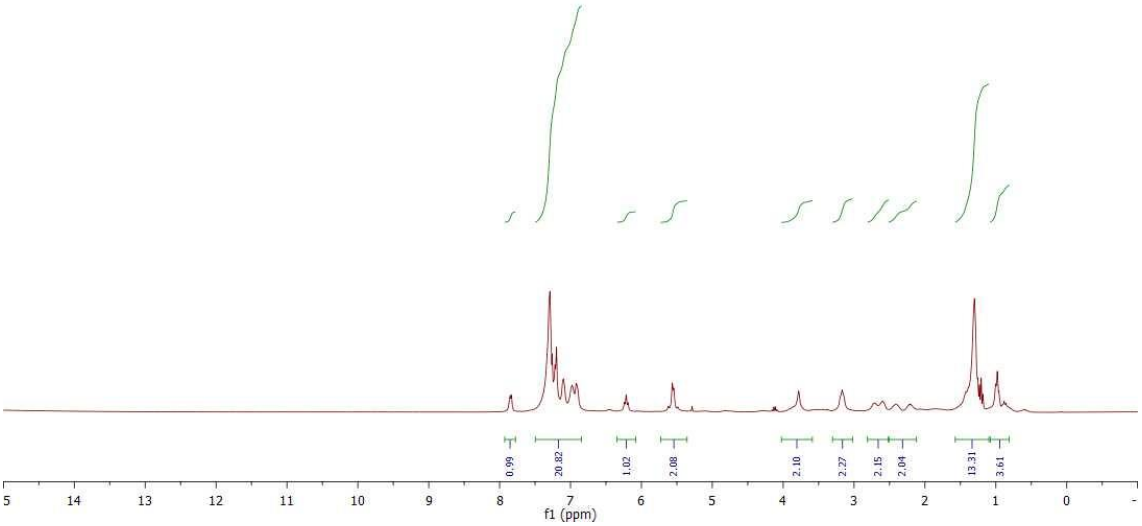
7j



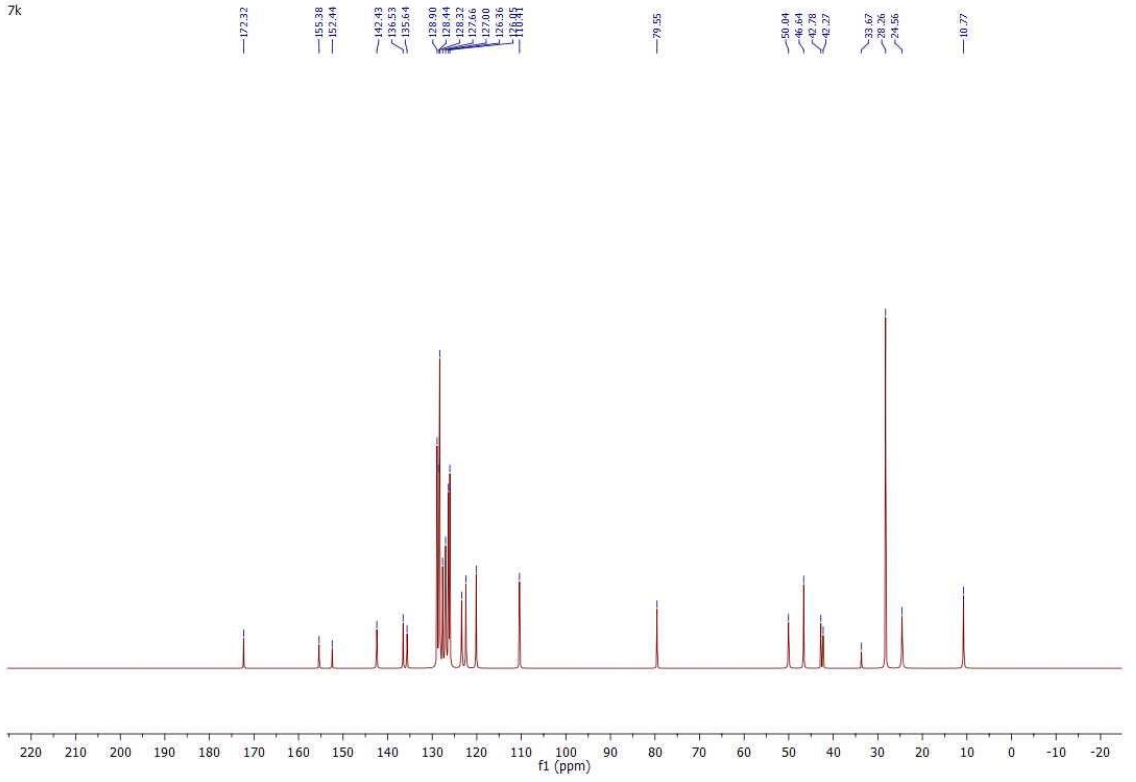
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7k



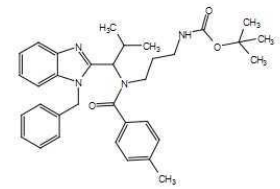


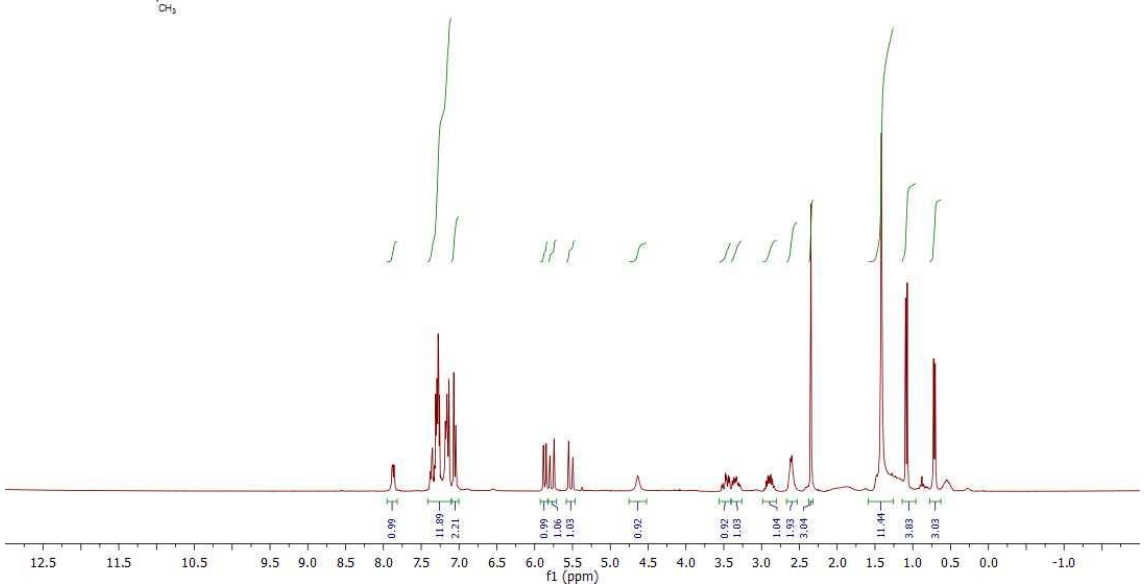
7k



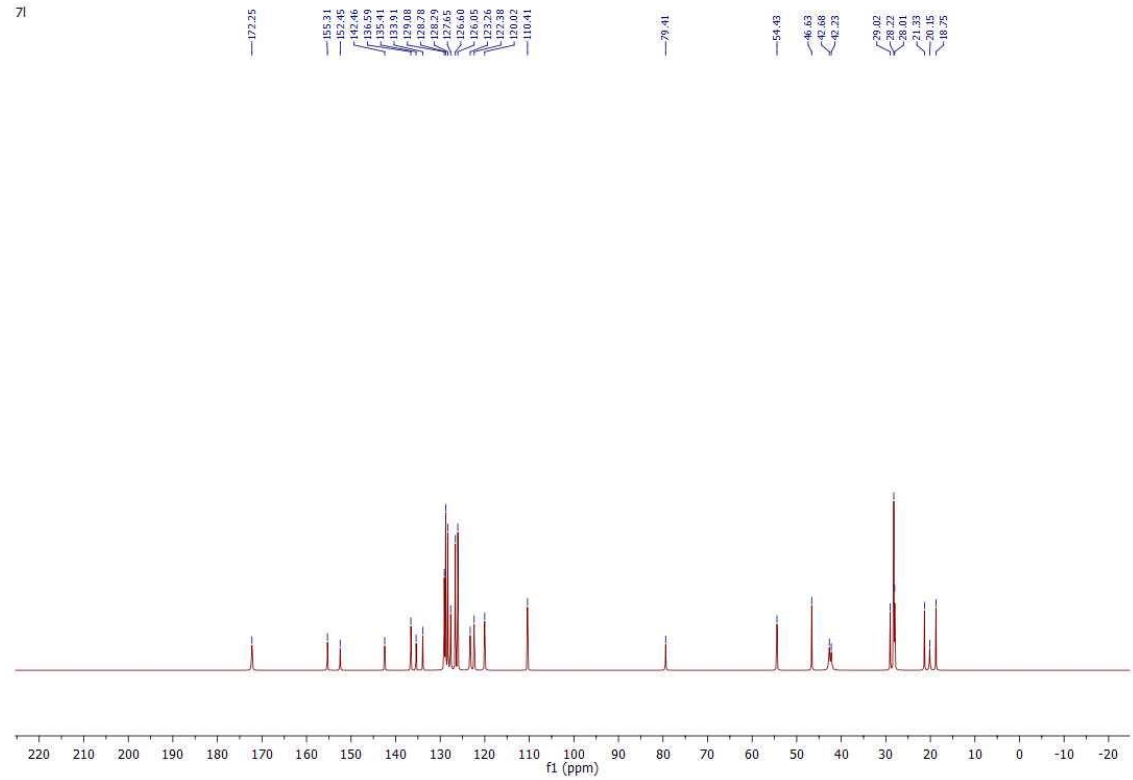
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7l



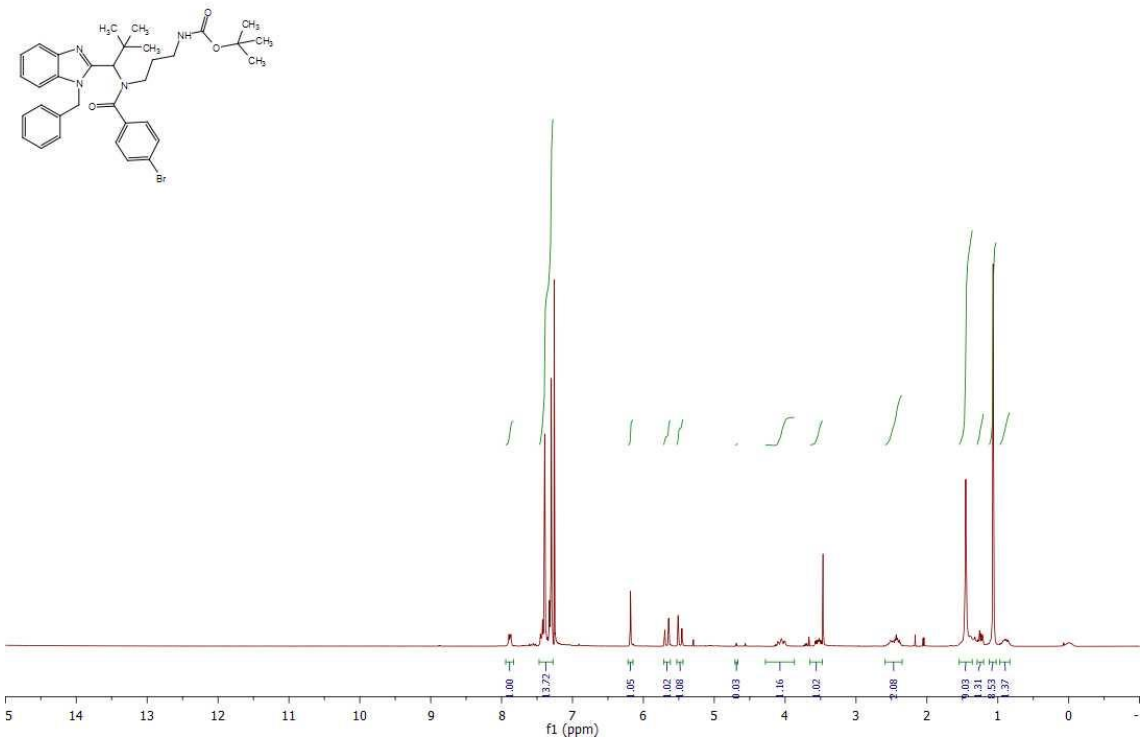


7l

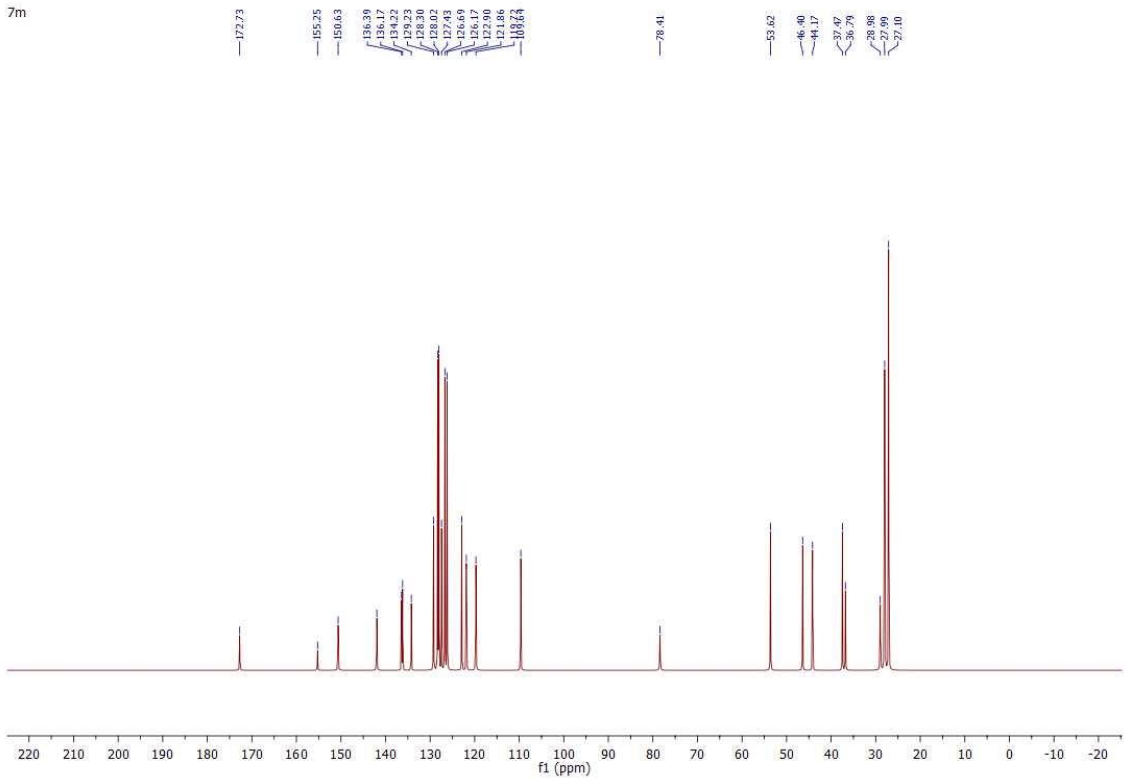


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7m

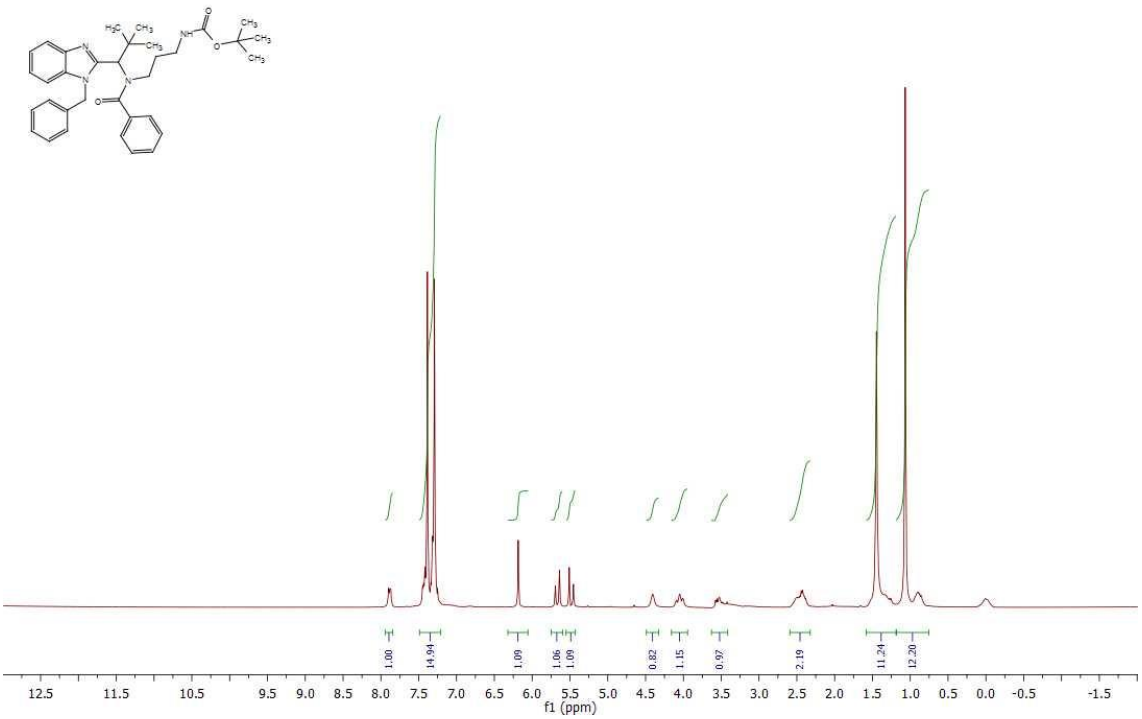


7m

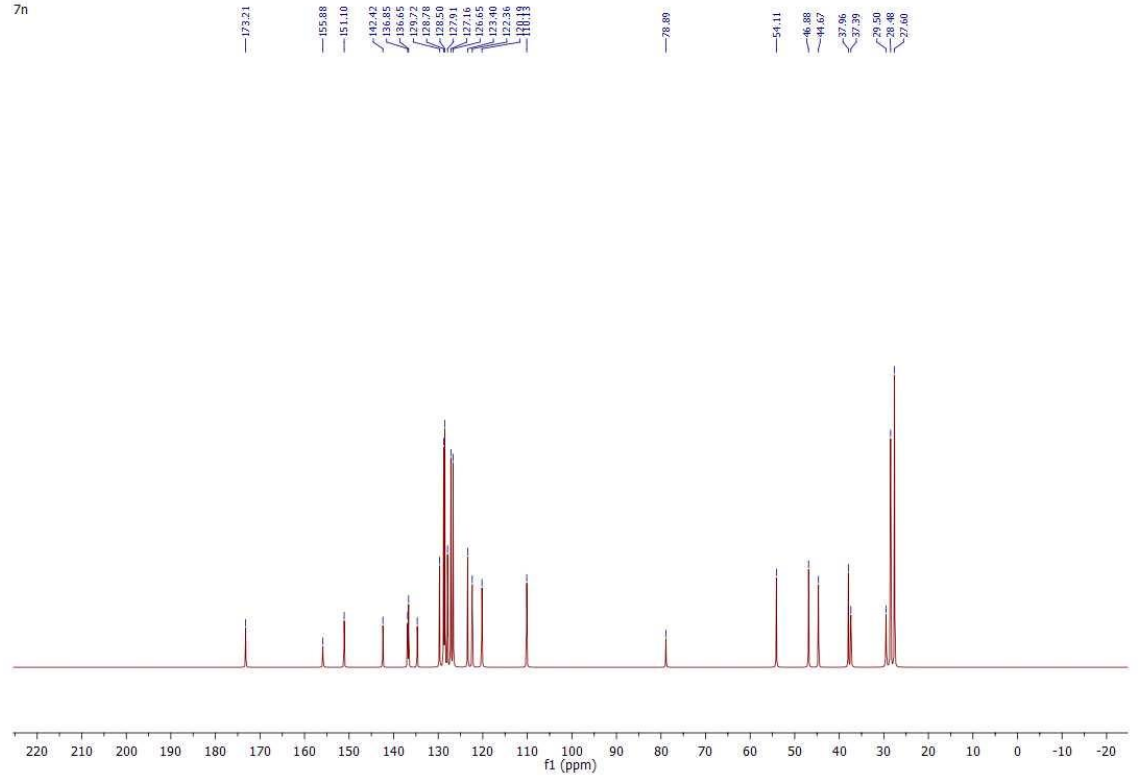


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

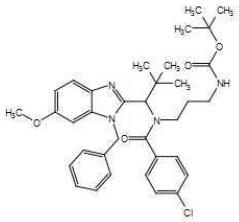
7n

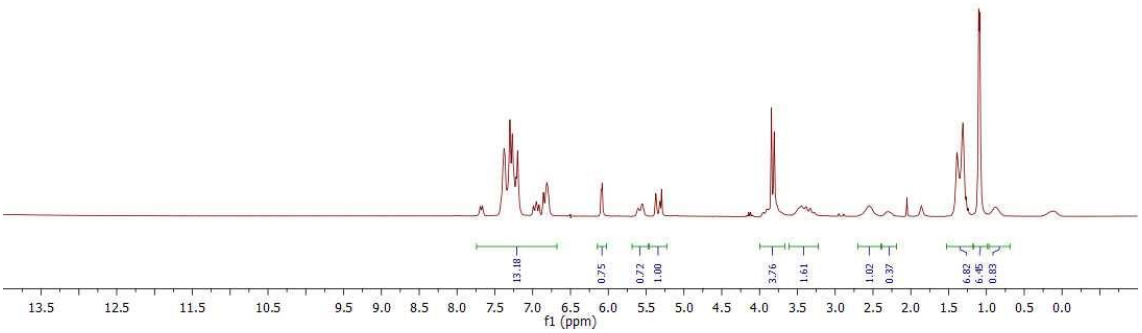

1.00
14.94
1.09
1.06
1.09
0.82
1.15
0.97
2.19
11.24
12.20
f1 (ppm)

7n

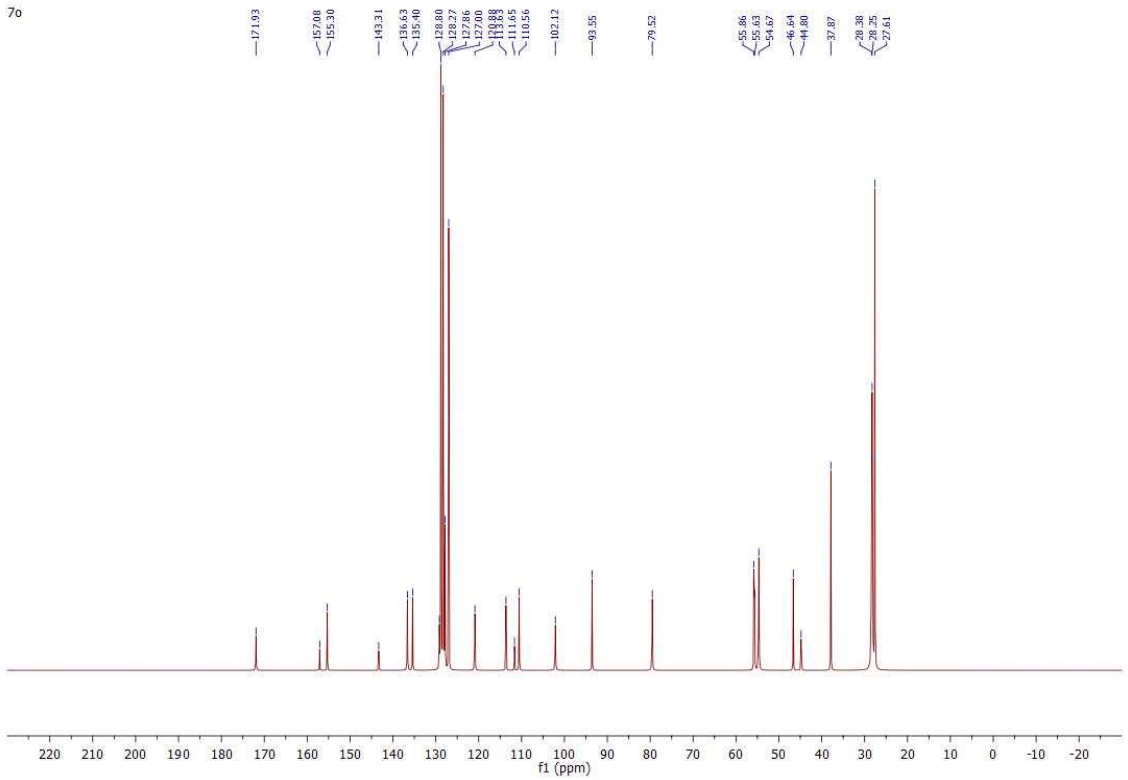

173.21
155.88
151.10
142.42
136.85
136.65
129.72
128.78
128.50
127.91
127.71
126.65
123.90
122.36
110.19
110.13
78.89
54.11
46.88
44.67
37.96
37.39
29.50
28.48
27.60
f1 (ppm)

7o



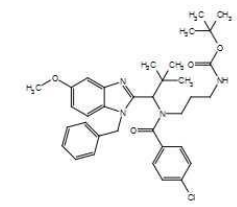


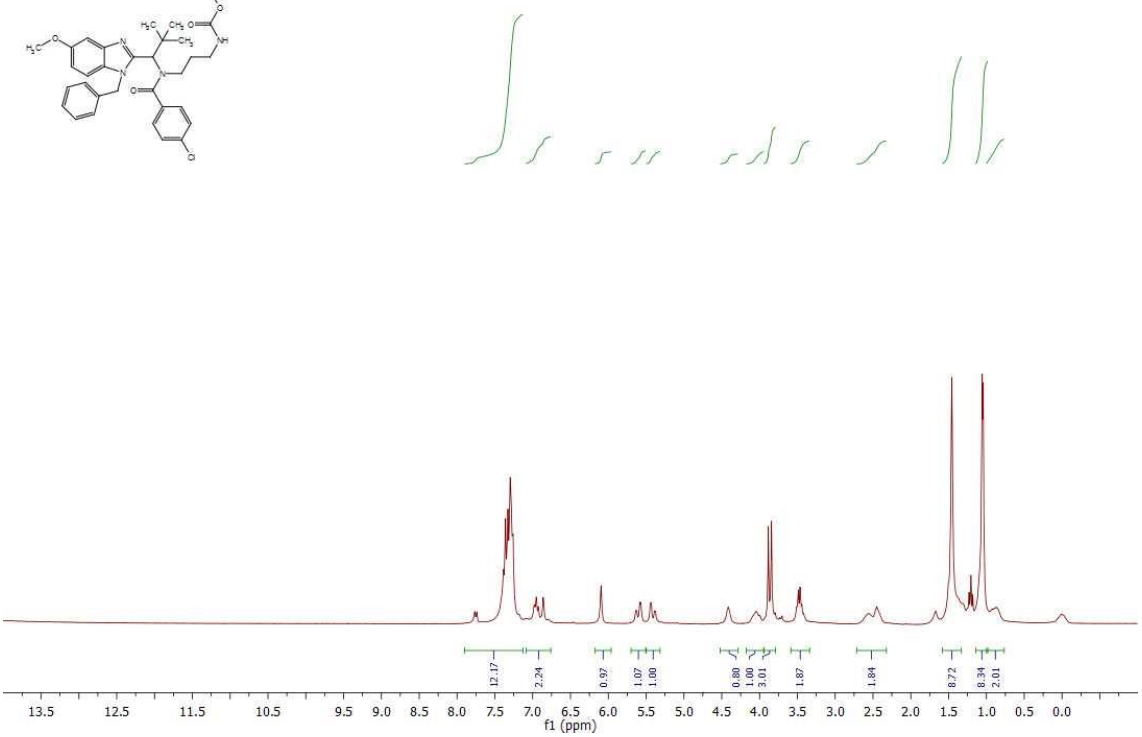
7o



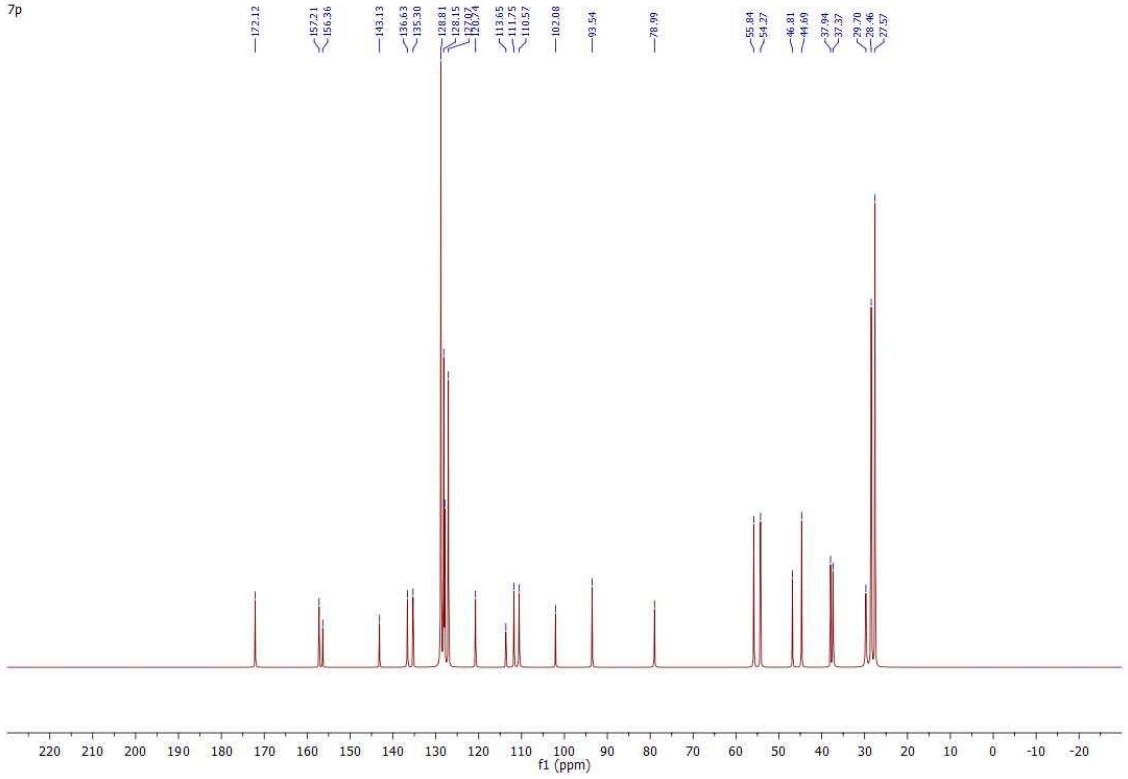
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

7p



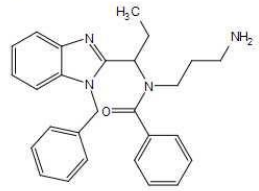


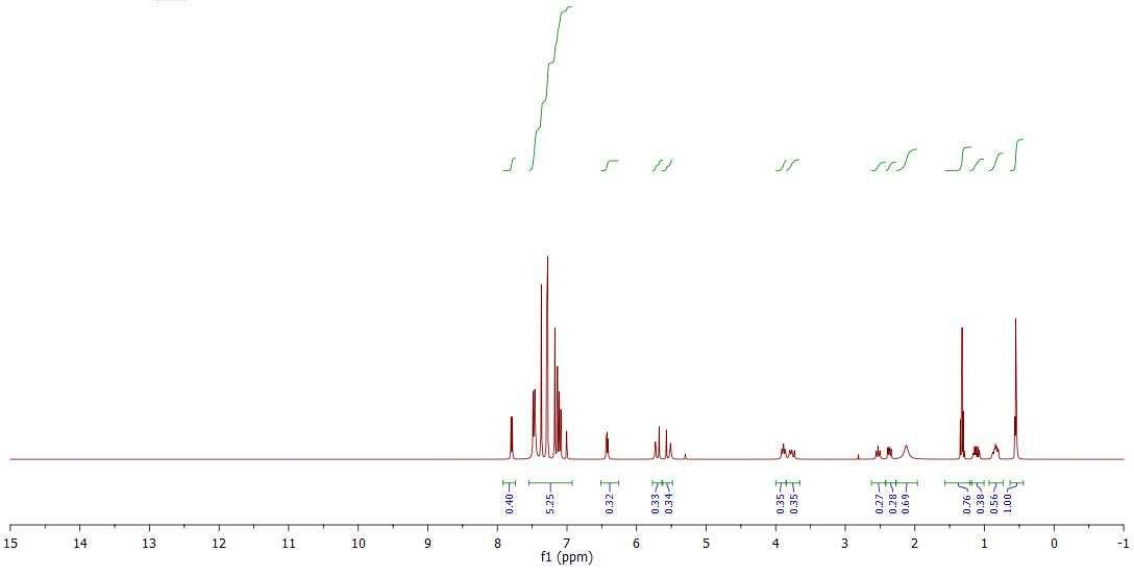
7p



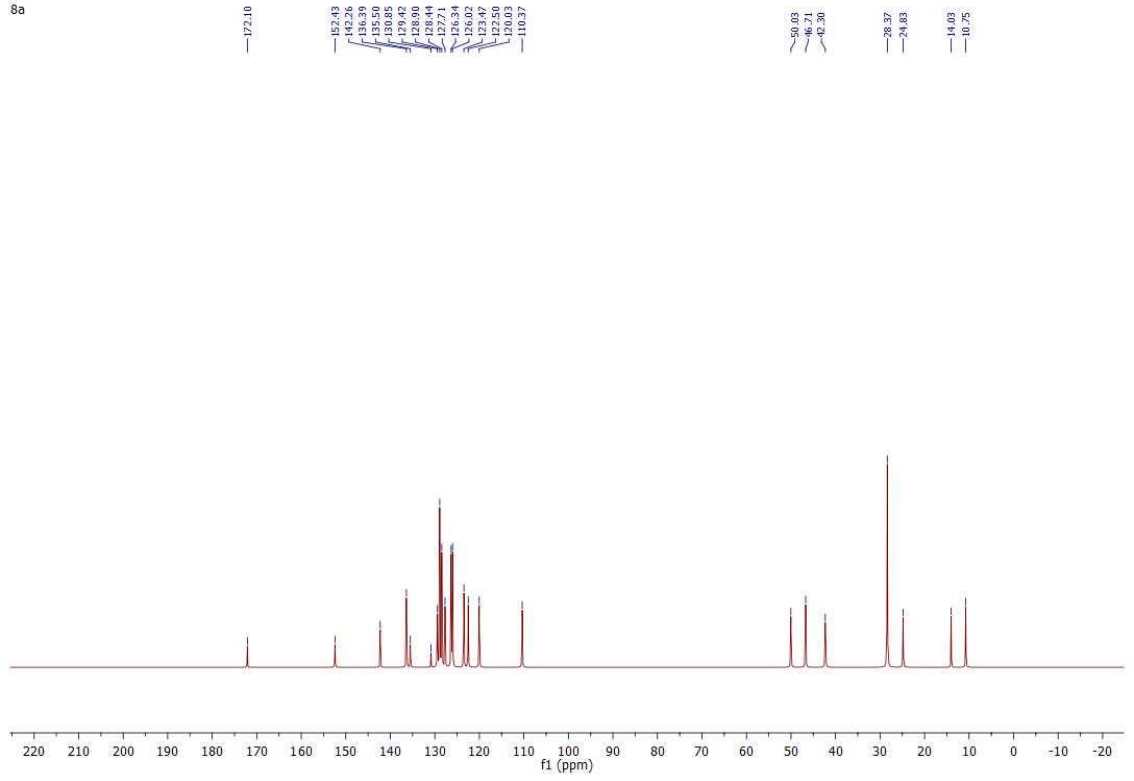
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

8a



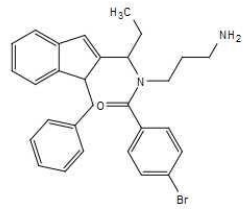


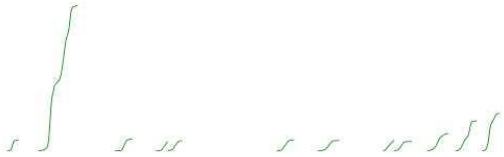
8a

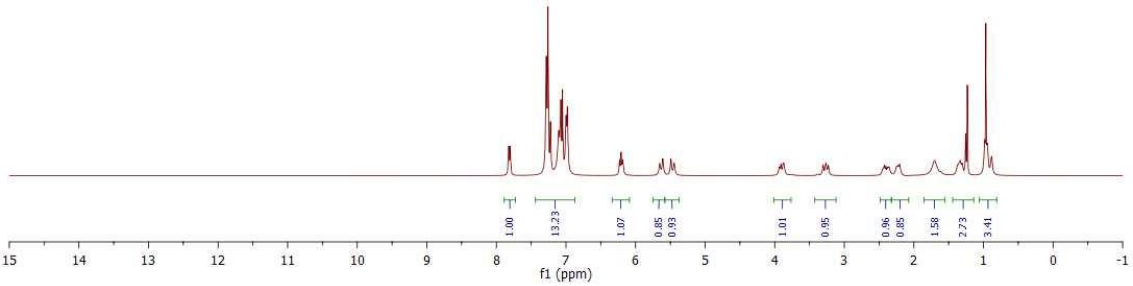


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

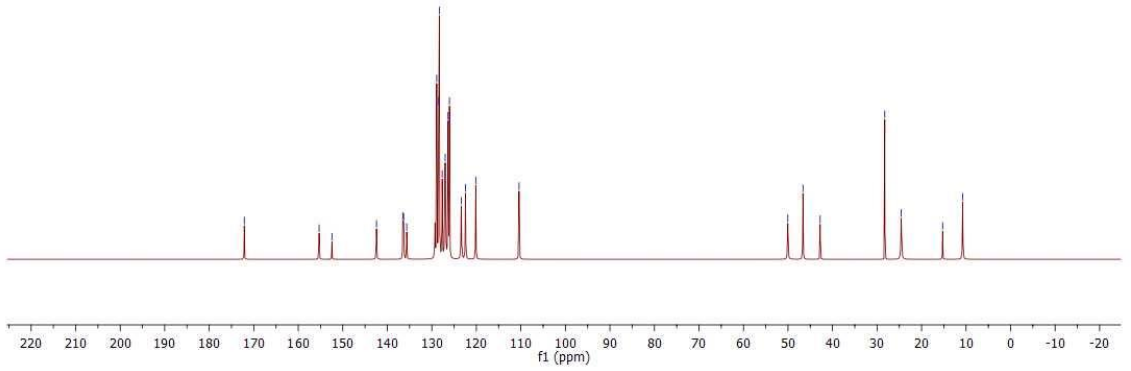
8b





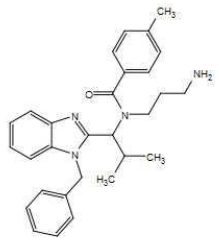


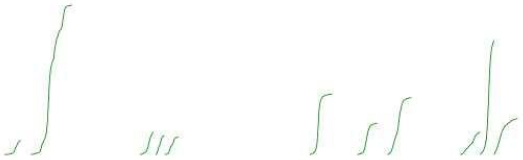
8b

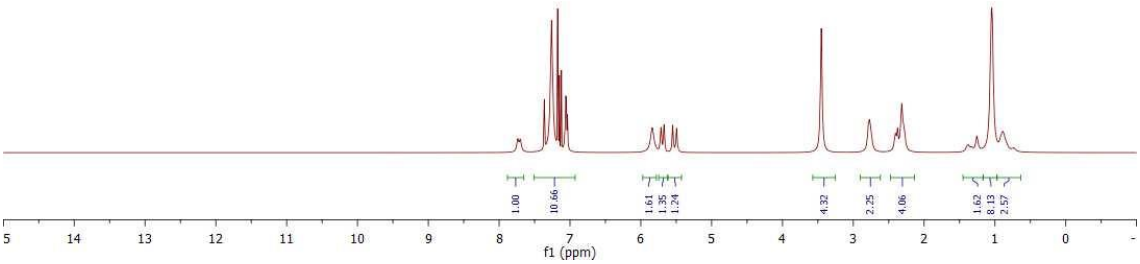


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

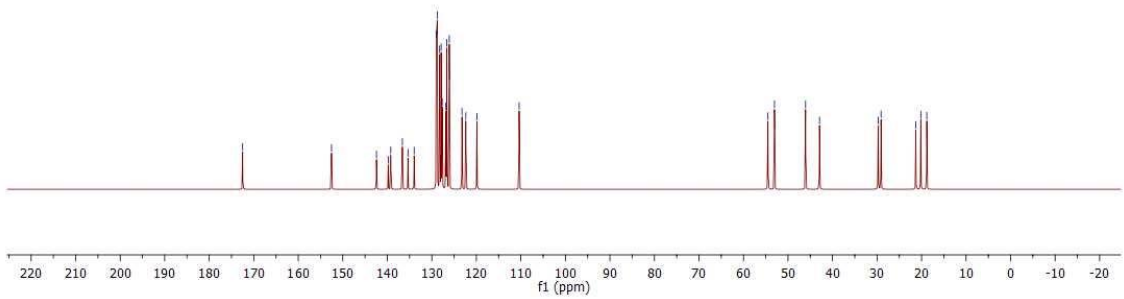
8c





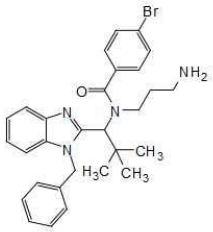


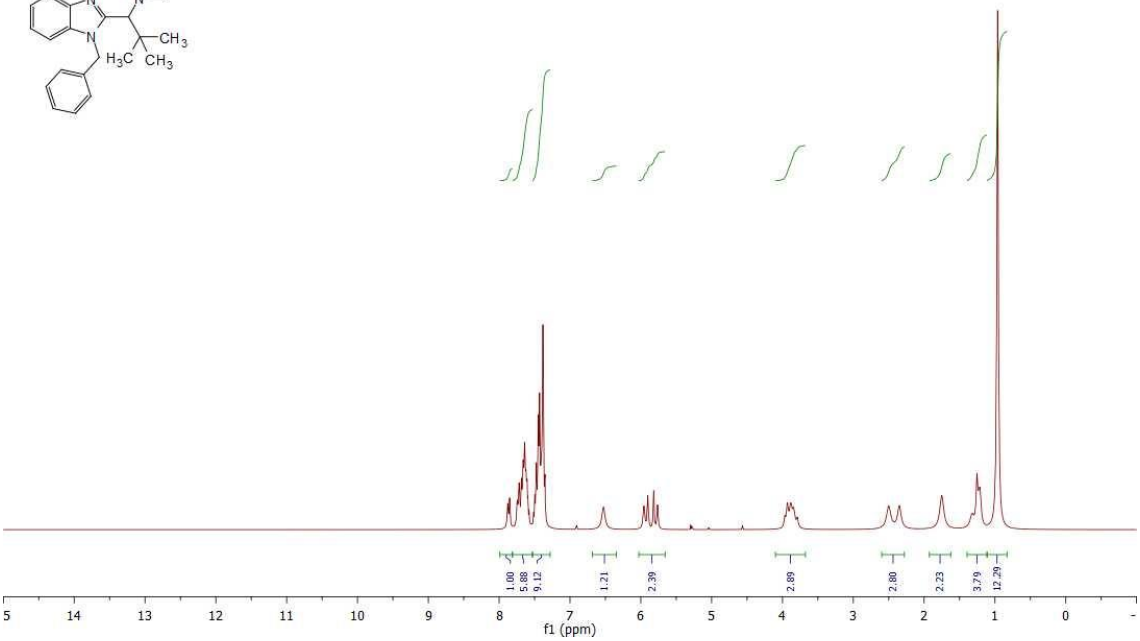
8c



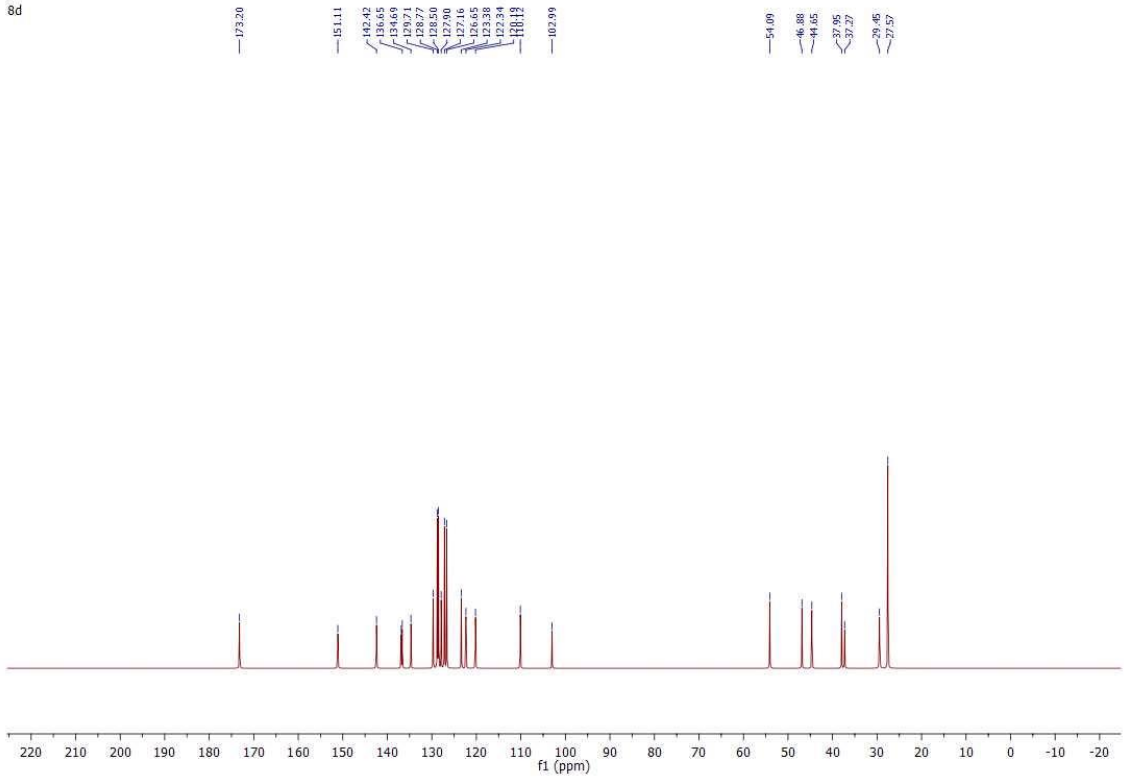
USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

8d



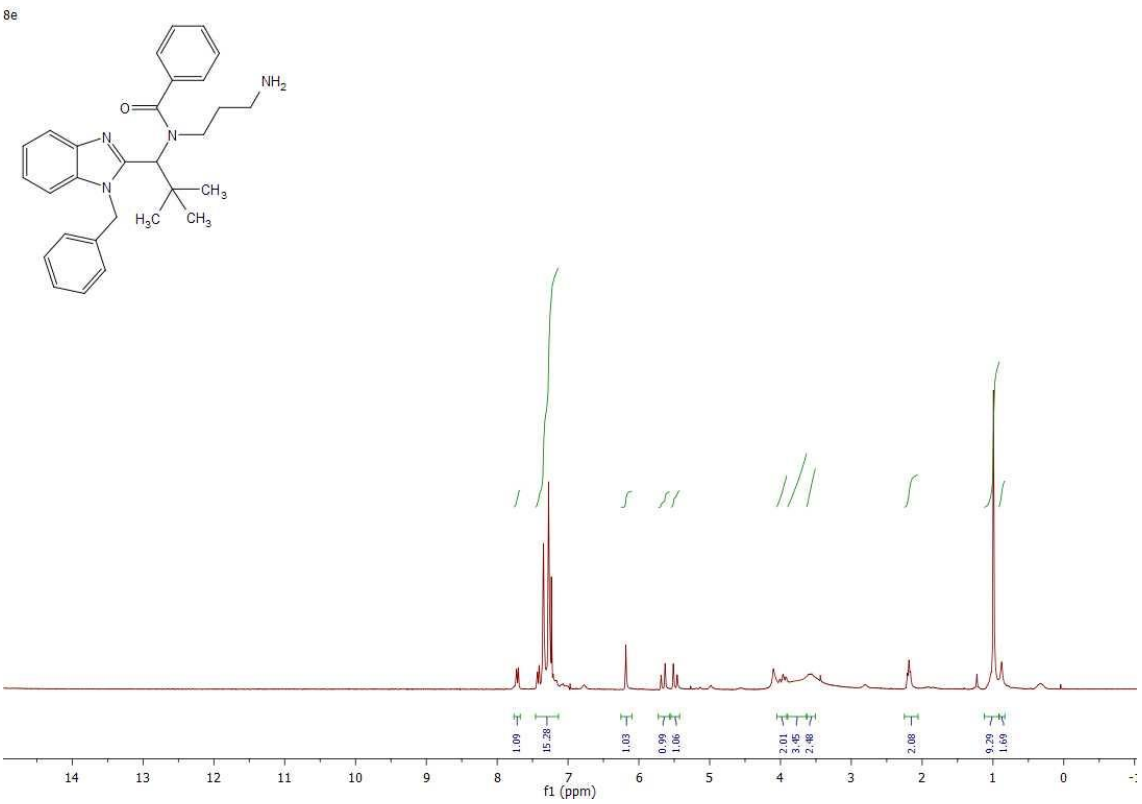


8d

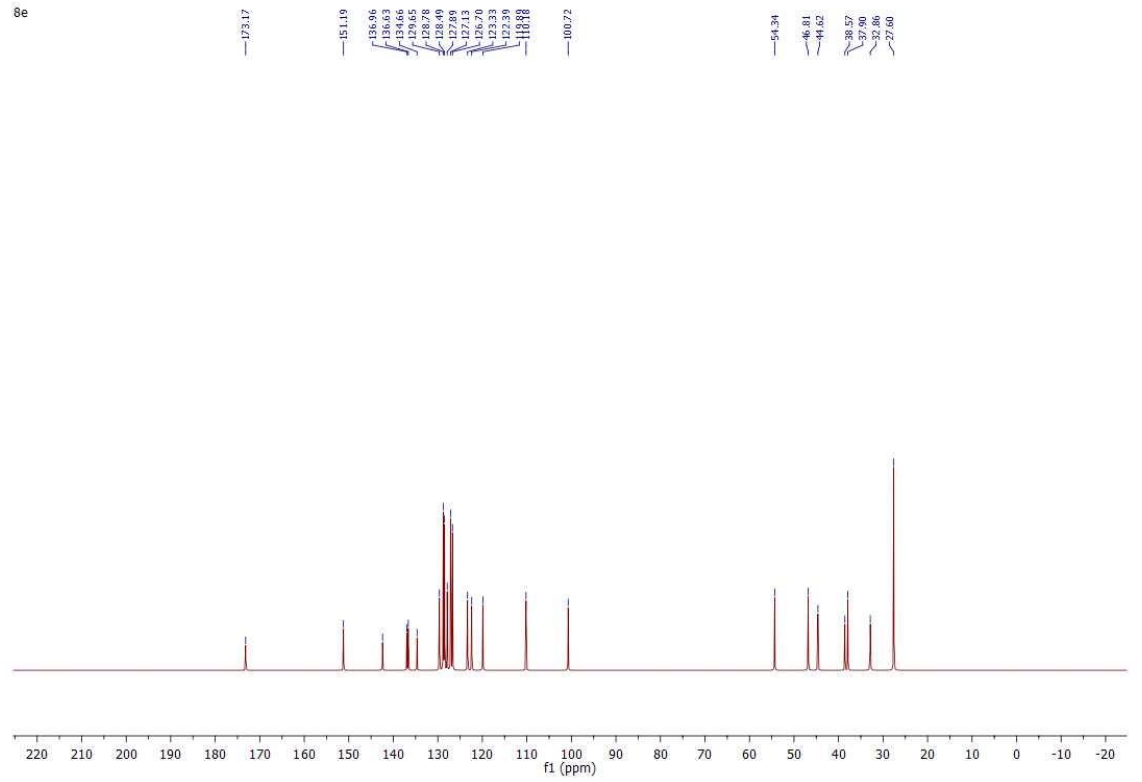


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

8e

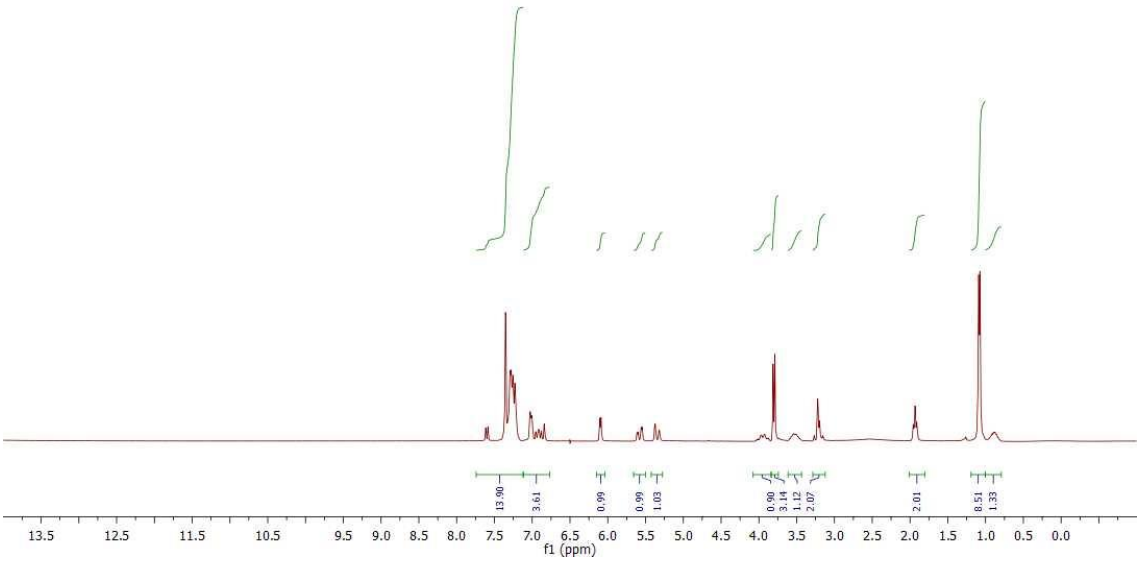


8e

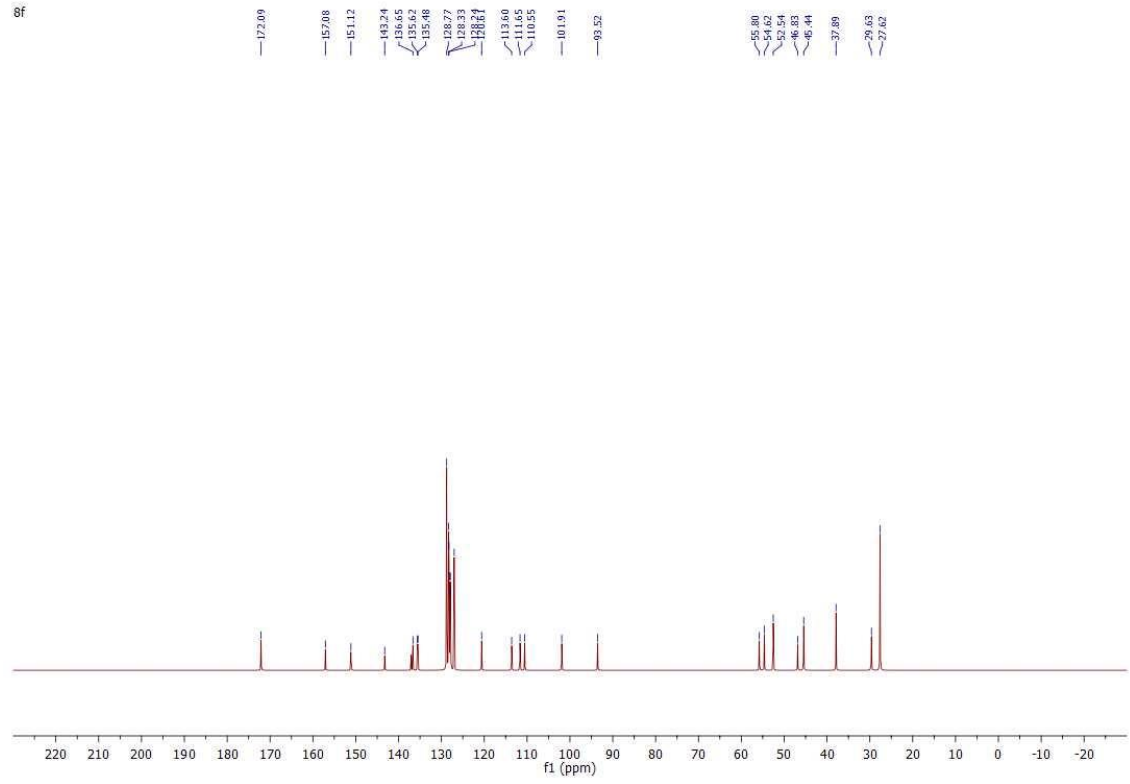


USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

8f

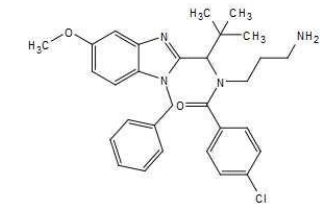


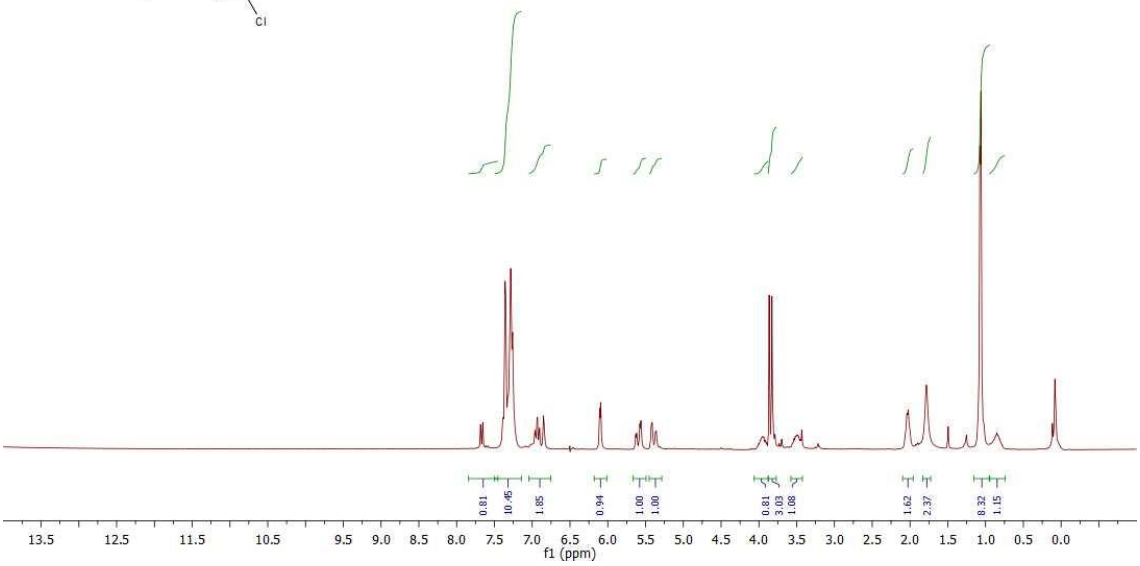
8f



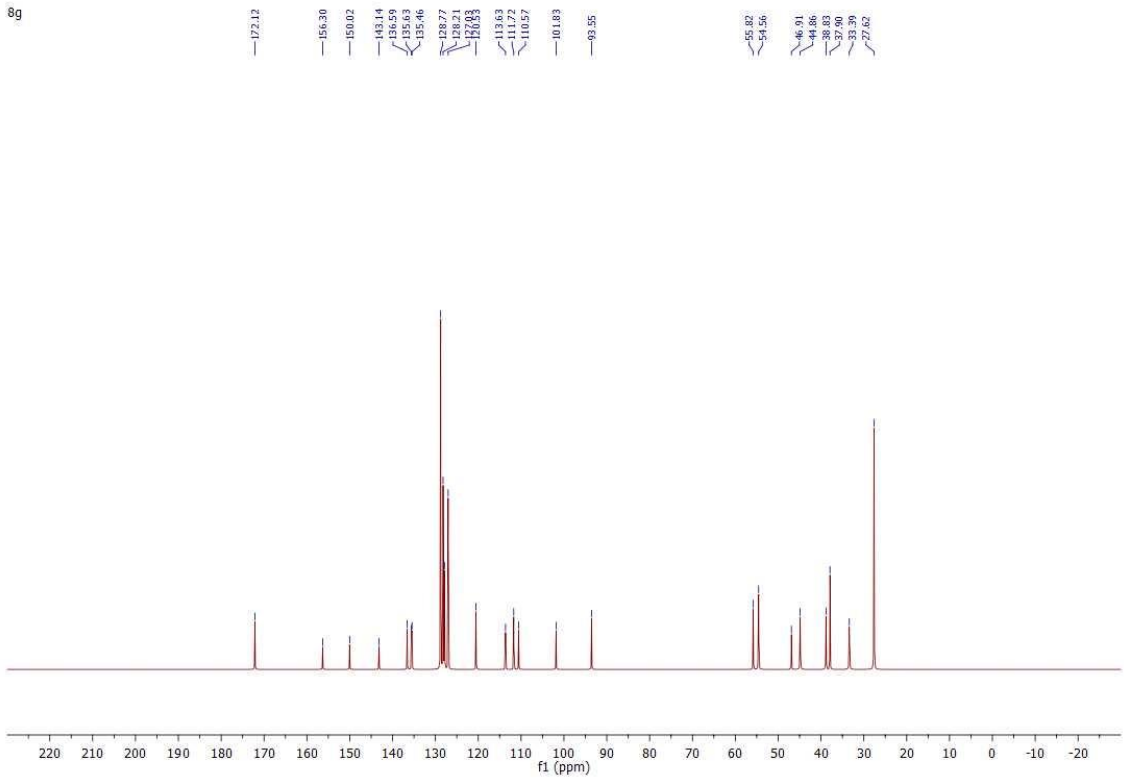
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

8g



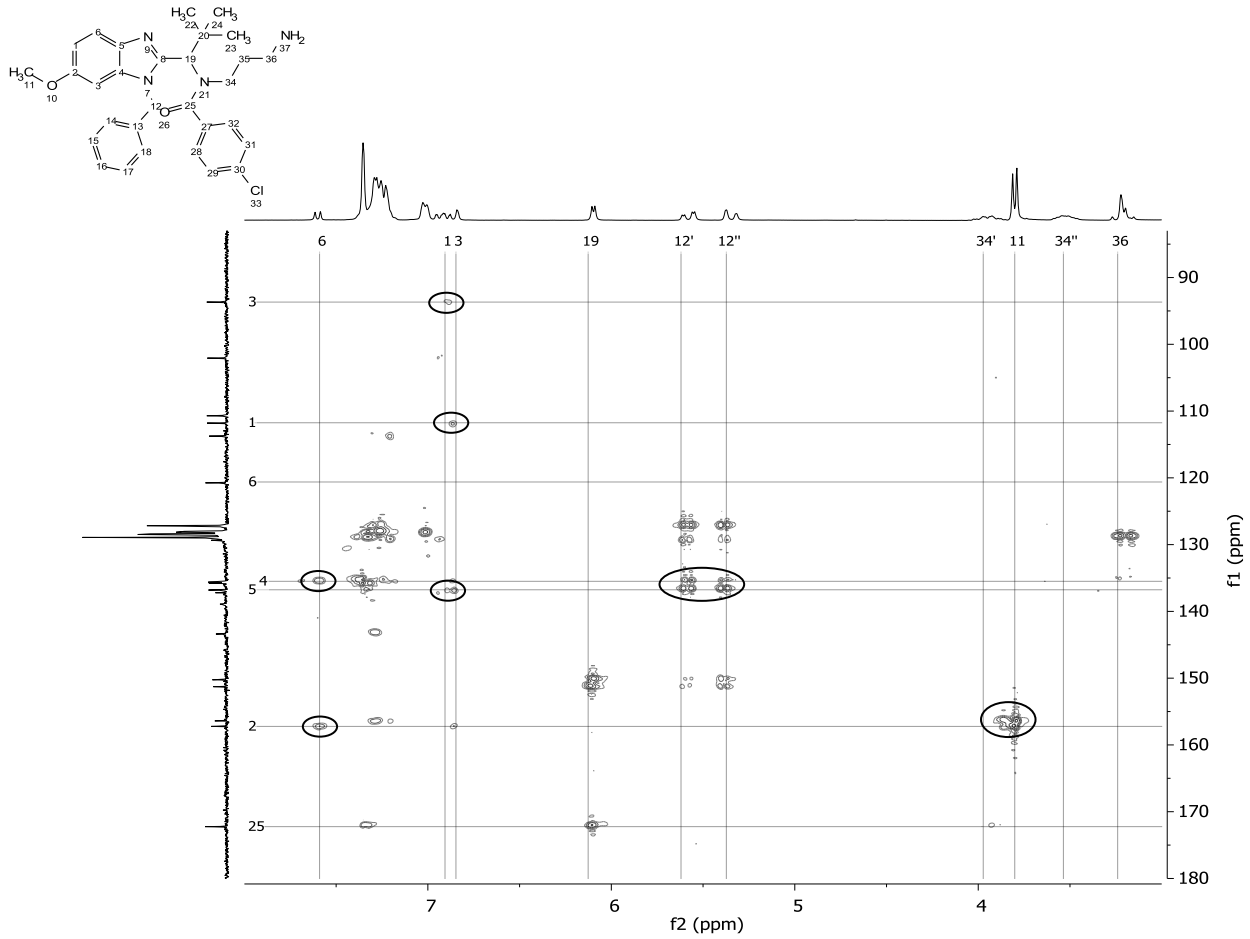


8g



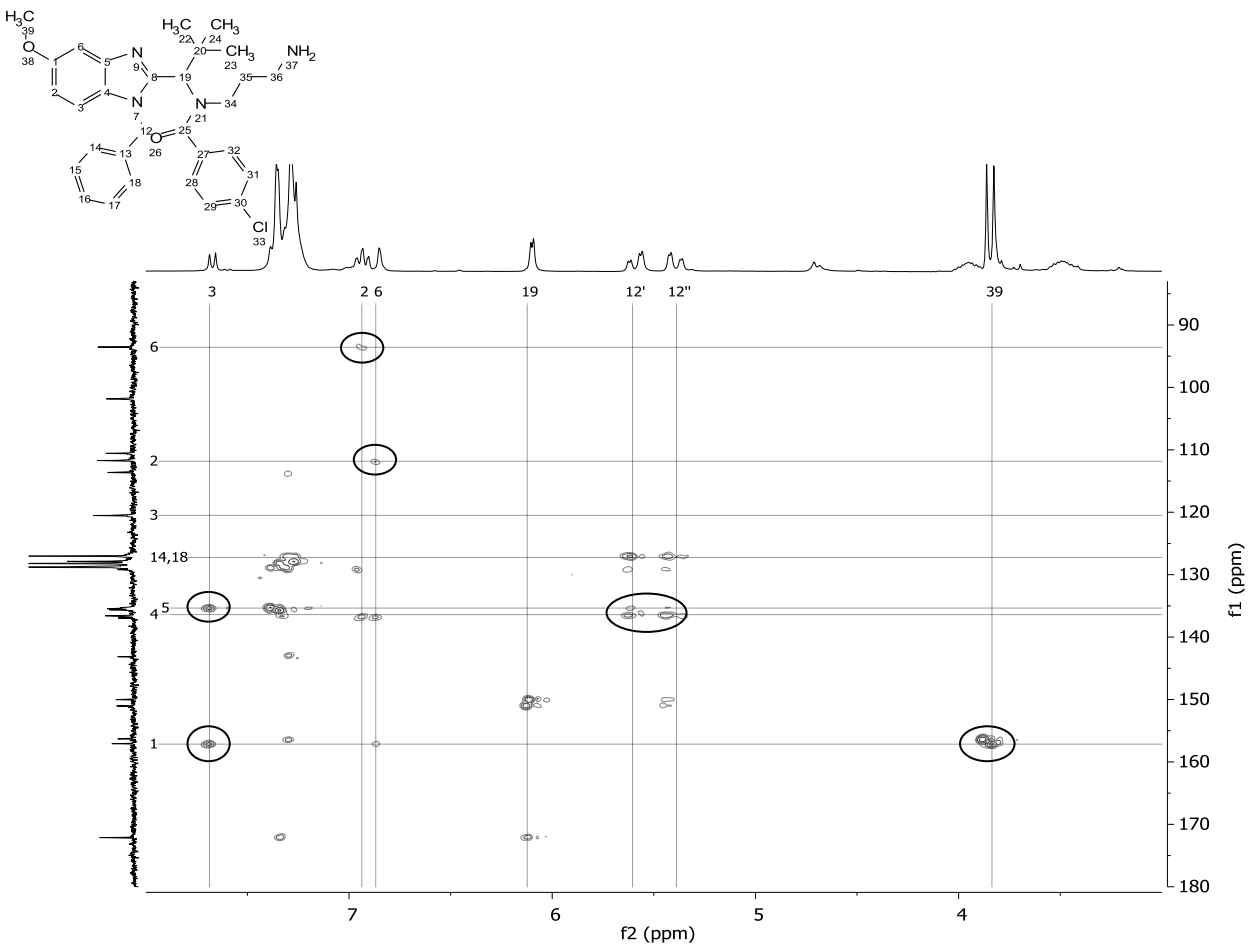
USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

HMBC of compound 8f



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

HMBC of compound 8g.



USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

III. Computational methodologies.

The computational experiments were performed on a 4 CPU (Intel Core2 Quad CPU Q9550 @ 2.83 GHz) ACPI x64 Linux workstation (operating system: Ubuntu ver. 12.04). Protein structures were handled with Chimera 1.5.3 software[1]. The structures of the compounds were prepared using MarvinSketch 5.5.0.1 software[2] and OpenBabel 2.2.3 softwares[3].

The 4AP0 (KSP in complex with ispinesib) structure was downloaded from the Protein Data Bank (PDB) database and used for all molecular docking simulations. The structure was uploaded in Chimera software and converted in the ".mol2" format through the "DockPrep" function, that corrected the missing side chains and the wrong rotamers, added the hydrogen atoms and the partial charges and removed the water and the ions. The protein and the ligand structures were then saved in separate files. All the ligand files were drawn with MarvinSketch and the 3D structures were computed with the "clean 3D" function. The molecules were properly protonated at pH = 7.2 with OpenBabel.

The docking studies were performed with Surflex-Dock ver.2.6 software[4]. Briefly, the software defines the binding site features through the generation of the *protomol* that is used to evaluate the binding energy of the putative binding poses generated for the ligands. The *protomol* was centered on the coordinates of ispinesib and was computed with the following parameters: -proto_thresh 0.2; -proto_bloat 2 (these parameters generated a more extended *protomol*, thus allowing a better exploration of the binding site). The ligands were then docked using the

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

following parameters: +premin; +remin; -multistart 5; -ndock_final 20 (the docking engine started placing the ligands stochastically in the *protomol* for 5 times, finally yielding the 20 lowest energies poses. The ligand structures were structurally minimized both before and after docking simulations by activating the premin and remin functions).

The poses were finally selected by visual inspection. The binding poses of compounds SB-743921 and pyrrolotriazine-1 were compared with that of ispinesib by superimposing the PDB complexes 4AS7 and 2GM1 to 4AP0 using the MatchMaker function of Chimera software. The results of superimposistion as well as the docked poses for the other compounds in Figure 1-a of the text are reported in Figure S1.

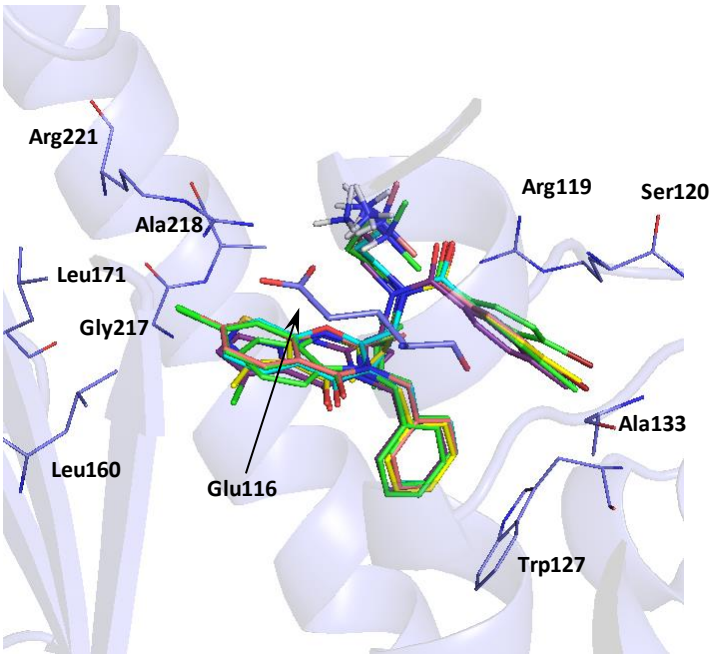


Figure S1. Comparison of the binding modes of ispinesib (green carbon sticks), SB-743921 (cyan carbon sticks), Pyrrolotriazine-1 (violet carbon sticks), AZD4877 (yellow carbon sticks), CK0106023 (pink carbon sticks) and CPUYJ039 (gray carbon sticks). KSP is represented as a

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

blue cartoon (80% transparency). The poses of ispinesib, SB-743921 and pyrrolotriazine-1 were obtained through the superimposition of the crystallographic complexes between compounds and KSP (4AP0, 4AS7 and 2GM1 respectively). All the other poses were obtained through docking simulation as explained above.

The binding poses and the relative Surflex score values are reported in Figure S2.

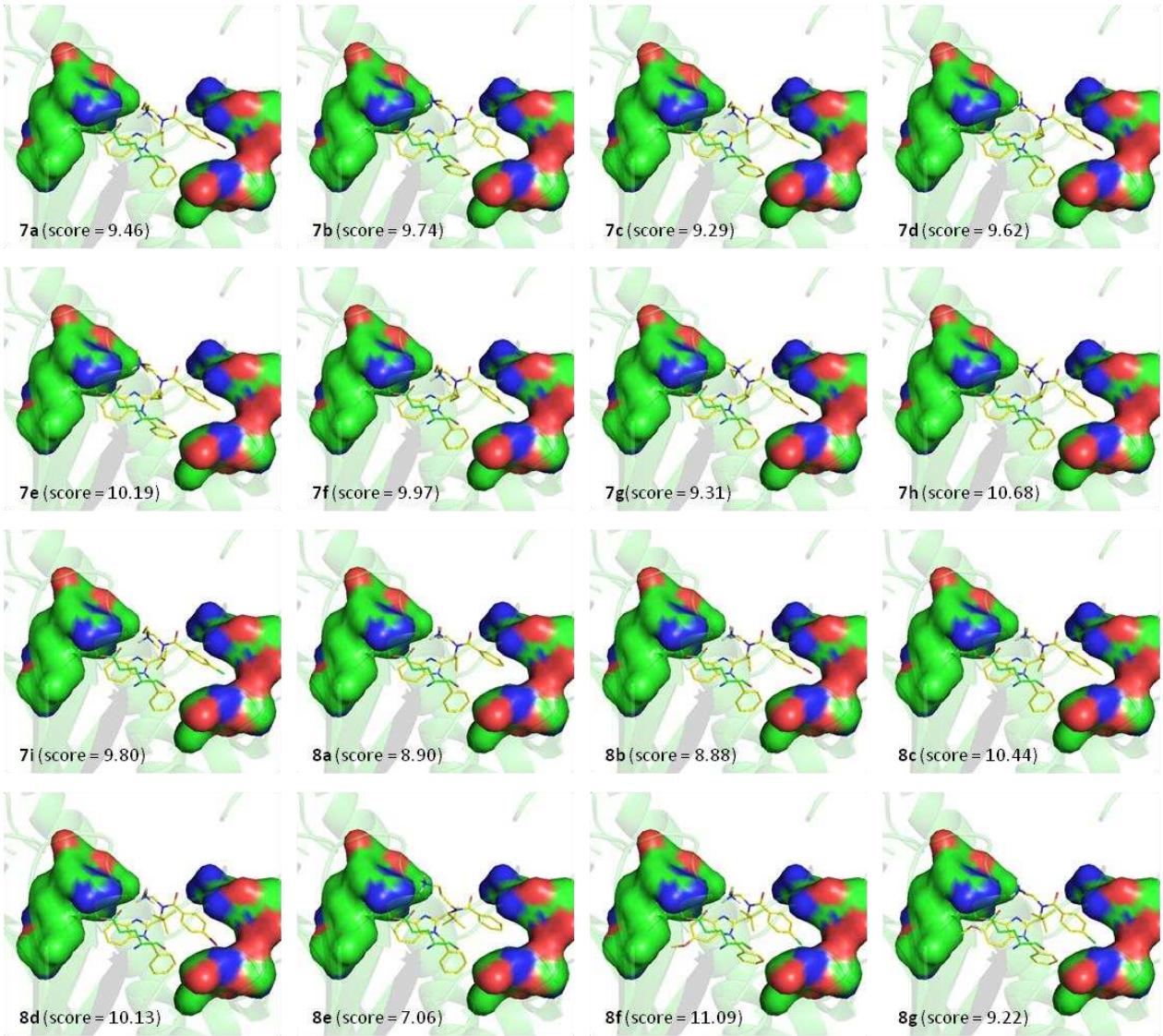


Figure S2. Binding poses and Surflex score values for CPUYJ039 (**7a**) and its analogs **7b**–**8g**.

We assumed that the contribution to the pharmacological activity of these series was almost

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

exclusively provided by one of the enantiomers (R), while the other (S) was completely inactive. The amino acids surrounding the binding site (see Figure 2b in the text) are shown as surface mode.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

IV. Figure S3. The Biological activities of **8d**, **8e** and **8g**.

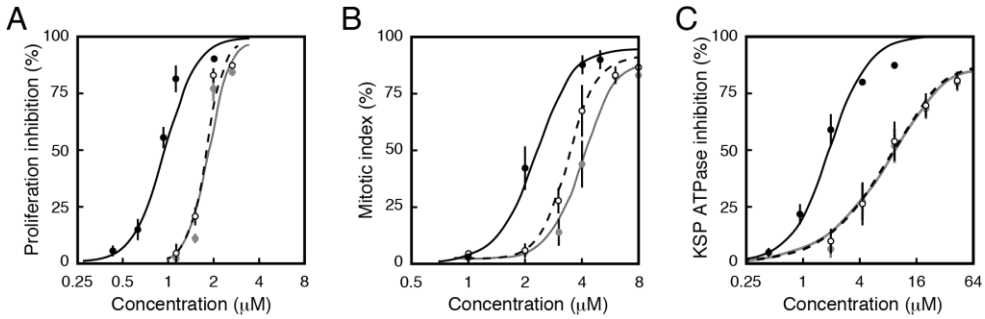


Figure S3. The biological activities of **8d**, **8e** and **8g**. The inhibitory activities of **8d**, **8e** and **8g** for HCT116 cell proliferation (A), cell cycle progression (B), and the KSP ATPase (C). The data points of **8d**, **8e** and **8g** are represented by open, gray and closed circles, respecively. Dashed, gray and solid lines show the concentration-response curves for the inhibitory activities of **8d**, **8e** and **8g**, respectively. Points, mean of at least three independent experiments; bar, SD.

V. Experimental Procedures for biological evaluations.

***In vitro* ATPase assay**. The microtubule-stimulated KSP ATPase assays were performed as described previously.[5] Briefly, 40 nM recombinant KSP motor domain carrying residues 1 to 369 of KSP was used with 350 nM microtubules in 15 μL of each reaction, where the ATP concentration at the beginning point was 30 μM. After incubation at 25 °C for 15 min, the reaction was terminated by Kinase-Glo Plus reagent (Promega). ATP consumption in each reaction was measured as luciferase-derived luminescence by ARVO Light (Perkin-Elmer). The assays were repeated at least three times per condition. IC_{50} values of each molecule were determined according to the median-effect equation.[6]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Cell proliferation assay. HeLa and HCT-116 cells were cultured in DMEM medium supplemented with 10% (v/v) FCS and antibiotics at 37 °C in a humidified 37 °C atmosphere containing 5% CO_2. The proliferation inhibition assays were performed as previously described.[7, 8] In short, cells were treated with each molecules for 72 h. The number of living cells in each assay was measured using the MTS reagent (Promega) and VersaMax plate reader (Molecular Device). The assays were repeated at least three times per condition. IC_{50} values of each molecule were determined according to the median-effect equation.[6]

Evaluation of Mitotic Arresting activity. The activities of molecules to arrest cell cycle at mitosis was evaluated as previously described.[7] Briefly, HeLa cells were treated with each molecule for 20 hours at 37 °C in a 5% CO_2 incubator. The cells were immunostained using a primary mouse monoclonal anti-α-tubulin antibody and a rabbit polyclonal anti-phospho-histone H3 (Ser10) Mitotic Marker antibody (Upstate) with counterstaining DNA using DAPI (Vector Laboratories). Mitotic cells were counted according to the reactivity with the Mitotic Marker antibody and the visual inspection of chromosomes. The assays were repeated at least three times per condition, and at least 500 cells were examined per assay. The mitotic arrest IC_{50} value of 8g was determined according to the median-effect equation.[6] Fluorescence images were taken by a DP30BW CCD camera coupled to an IX71 microscope (Olympus) and superimposed using Adobe Photoshop software.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

References:

(1) Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. UCSF Chimera-a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605.

(2) Marvin, Version 5.5.0.1, Program B; ChemAxon: Budapest, Hungary; www.chemaxon.com/products.

(3) O'Boyle, N. M.; Banck, M.; James, C. A.; Morley, C.; Vandermeersch, T.; Hutchison, G. R. Open Babel: An open chemical toolbox. *J. Cheminform.* **2011**, *3*, 33.

(4) Jain, A. N. Surflex: fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 499.

(5) Yokoyama, H.; Sawada, J; Katoh, S; Matsuno, K; Ogo, N; Ishikawa, Y; Hashimoto, H; Fujii, S; Asai, A. Structural basis of new allosteric inhibition in Kinesin spindle protein Eg5. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 1128.

(6) Chow; T. C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharm. Rev.* **2006**, *58*, 621.

(7) Takeuchi, T; Oishi, S; Watanabe, T; Ohno, H; Sawada, J; Matsuno, K; Asai, A; Asada, N; Kitaura, K; Fujii, N. Structure-activity relationships of carboline and carbazole derivatives as a novel class of ATP-competitive kinesin spindle protein inhibitors. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 4839.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(8) Ogo, N; Ishikawa, Y; Sawada, J; Matsuno, K; Hashimoto, A; Asai, A. Structure-Guided Design of Novel l-Cysteine Derivatives as Potent KSP Inhibitors. *ACS Med. Chem. Lett.* **2015**, *6*, 1004.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

PUBLICACIÓN 4:

Enantiospecific Recognition at the A2B Adenosine Receptor by Alkyl 2-Cyanoimino-4-substituted-6-methyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylates

Carbajales, C.,[1,2] Azuaje, J.,[1,2] Oliveira, A.,[4] Loza, M.I.,[3] Brea, J.,[3] Cadavid, M.I.,[3] Masaguer, C.F.,[2] García-Mera, X.,[2] Gutiérrez-De-Terán, H.,[4] Sotelo, E.[1,2]
Revista: *Journal of Medicinal Chemistry*
ISSN: 1520-4804 Año de publicación: 2017 Volumen: 60 Número: 8 Páginas: 3372-3382.
DOI: https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00138

[1] Centro Singular de Investigación en Química Biolóxica e Materiais Moleculares (CIQUS).
[2] Departamento de Química Orgánica, Facultade de Farmacia, Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain.
[3] Drug screening platform/Biofarma research group, Centro Singular de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CIMUS), Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain.
[4] Department of Cell and Molecular Biology, Uppsala University, Uppsala SE-75124.

Contribución específica en la publicación:
Metodología e investigación: planteamiento y desarrollo de los experimentos químicos. Adquisición y análisis de datos.

Índices de calidad:
Q1 (1/70) en Medicinal Chemistry en el año 2017.
Impact Factor: 6,2.
Artículo de investigación, correspondiente al Capítulo 4 de esta memoria.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Journal of Medicinal Chemistry

Article

pubs.acs.org/jmc

Enantiospecific Recognition at the A_{2B} Adenosine Receptor by Alkyl 2-Cyanoimino-4-substituted-6-methyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylates

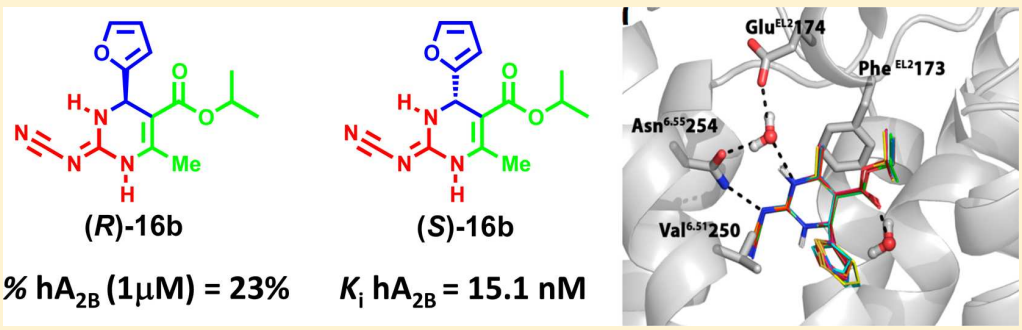
Carlos Carbajales,[†,‡] Jhonny Azuaje,[†,‡] Ana Oliveira,[∥] María I. Loza,[§] José Brea,[§] María I. Cadavid,[§] Christian F. Masaguer,[‡] Xerardo García-Mera,[‡] Hugo Gutiérrez-de-Terán,[*,∥] and Eddy Sotelo[*,†,‡]

[†]Centro Singular de Investigación en Química Biolóxica e Materiais Moleculares (CIQUS), [‡]Departamento de Química Orgánica, Facultade de FarmaciaUniversidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

[§]Drug Screening Platform/Biofarma Research Group, Centro Singular de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CIMUS), Universidade de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

[∥]Department of Cell and Molecular Biology, Uppsala University, Uppsala SE-75124, Sweden

Supporting Information



ABSTRACT: A novel family of structurally simple, potent, and selective nonxanthine A_{2B}AR ligands was identified, and its antagonistic behavior confirmed through functional experiments. The reported alkyl 2-cyanoimino-4-substituted-6-methyl-1,2,3,4-tetrahy-dropyrimidine-5-carboxylates (**16**) were designed by bioisosteric replacement of the carbonyl group at position 2 in a series of 3,4-dihydropyrimidin-2-ones. The scaffold (**16**) documented herein contains a chiral center at the heterocycle. Accordingly, the most attractive ligand of the series [(±)**16b**, K_i = 24.3 nM] was resolved into its two enantiomers by chiral HPLC, and the absolute configuration was established by circular dichroism. The biological evaluation of both enantiomers demonstrated enantiospecific recognition at A_{2B}AR, with the (*S*)-**16b** enantiomer retaining all the affinity (K_i = 15.1 nM), as predicted earlier by molecular modeling. This constitutes the first example of enantiospecific recognition at the A_{2B} adenosine receptor and opens new possibilities in ligand design for this receptor.

INTRODUCTION

A set of specific receptors, classified as A_1, A_{2A}, A_{2B}, and A_3 adenosine receptors (ARs), mediate the plethora of physiological processes regulated by the purine nucleoside adenosine.[1,2] Accordingly, since their discovery, ARs have been considered to be attractive targets in drug discovery.[3,4] ARs belong to the superfamily of the G-protein coupled receptors (GPCRs), and they therefore exert their physiological roles by activation or inhibition of different secondary messenger systems.[2,3] Our improved understanding of the physiology, pharmacology, and structural and molecular biology of adenosine signaling pathways supports the development of potent and selective ligands, ultimately leading to the introduction of novel therapeutic strategies to address significant unmet medical needs.[5−7]

The A_{2B}AR is ubiquitously expressed in the body, and it regulates a wide range of physiopathological events.[8−11] It is generally defined as a low affinity receptor[12] that remains silent under physiological conditions but is rapidly activated during chronic highly oxidative stress conditions (e.g., hyperglycemia or mast cell activation). Recent evidence supports the situation where the A_{2B}AR is transcriptionally regulated by factors implicated in inflammatory hypoxia,[12] thus participating in key biological processes (e.g., vascular tone, glucose homeostasis, pulmonary inflammation, inflammatory response, or pain). Nevertheless, from a pharmacological perspective, A_{2B}AR is the least well characterized of the four AR subtypes due to its general low affinity toward prototypic AR ligands.[13,14] Accordingly, novel potent and selective A_{2B}AR antagonists are required for drug development or as pharmacological tools to

Received: January 26, 2017
Published: April 3, 2017

Downloaded via UNIV DE SANTIAGO DE COMPOSTELA on April 24, 2023 at 16:19:38 (UTC).
See https://pubs.acs.org/sharingguidelines for options on how to legitimately share published articles.

ACS Publications © 2017 American Chemical Society

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00138
J. Med. Chem. 2017, 60, 3372−3382

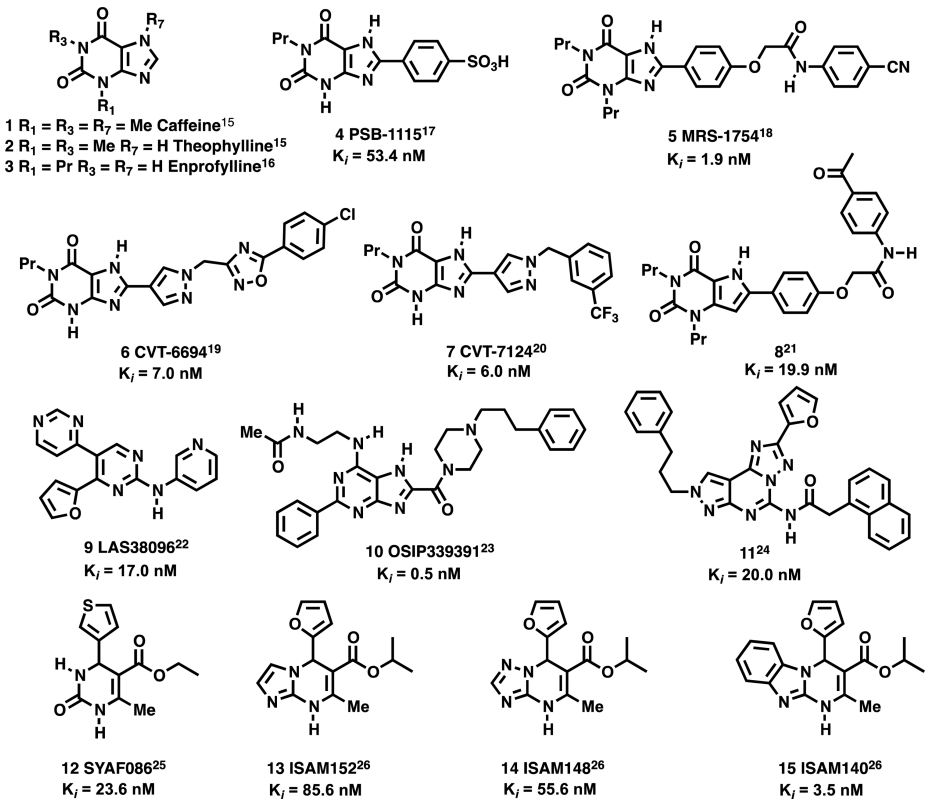


Figure 1. Structures of representative A_{2B}AR antagonists.[15−26]

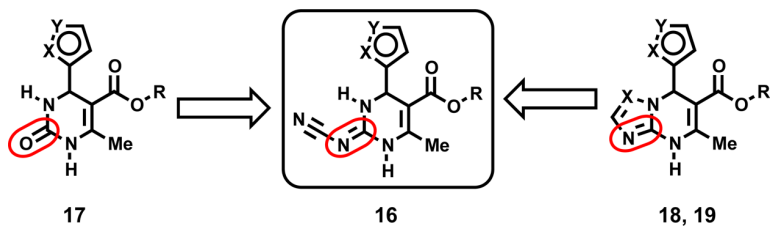


Figure 2. Design strategy employed for the target structures (**16**).

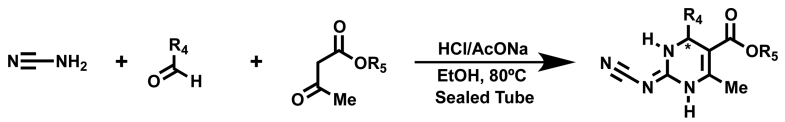
validate novel therapeutic applications (e.g., asthma, colitis, diabetic retinopathy, or cancer).[8−11]

The search for A_{2B}AR antagonists[5−7] has been traditionally focused on naturally occurring xanthines (Figure 1, compounds **1**−**3**),[15,16] which have evolved into several high-affinity and selective ligands (Figure 1, compounds **4**−**7**),[17−20] including xanthine-like compounds (Figure 1, compound **8**).[21] In contrast, only a few examples of potent and selective nonxanthine A_{2B}AR antagonists have been described (Figure 1, compounds **9**−**15**).[22−26] In common with all AR ligands, all known A_{2B}AR antagonists contain a planar central scaffold (Figure 1, compounds **1**−**11**), which prevents the establishment of stereoselective ligand−target interactions. Hence, the assessment of novel chemotypes that have stereodiverse topologies provides solid foundations to explore alternative and stereospecific binding modes, thus reconciling molecular simplicity with optimal affinity and selectivity profiles.

We recently documented the first family of nonplanar, structurally simple, selective, and high-affinity A_{2B}AR antagonists based on the 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-one scaffold (Figure 1, compound **12**).[25] The excellent synthetic feasibility of this scaffold, which is readily assembled through a Biginelli multicomponent reaction, enabled the rapid assessment of the most prominent features of the structure−activity and selectivity relationships in this series. In an effort to explore new chemotypes exhibiting high A_{2B}AR affinity, we then reported the pharmacological properties of three series of analogues, namely 3-deaza[pyridin-2(1*H*)-ones] and bicyclic and tricyclic derivatives fused at positions 2,3 or 5,6 of the heterocyclic framework.[26] That study revealed the potential of structural diversification at face 2 of the diazinone scaffold and highlighted some promising bicyclic (**13**, **14**) and tricyclic (**15**) ligands (Figure 1).[26] We report here the discovery of a novel family of potent and highly selective A_{2B}AR antagonists based on the 2-cyanoimino-4-substituted-6-methyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate scaffold. The two enantiomers of the most attractive ligand (**16b**) were separated by chiral HPLC and their absolute configurations established by circular dichroism. The biological evaluation of the two enantiomers demonstrated that the affinity is exclusively due to the (*S*)-**16b** enantiomer, in line with our previous[25,26] and current molecular

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00138
J. Med. Chem. 2017, 60, 3372−3382

Scheme 1. Synthesis and Molecular Properties of the 2-Cyanoimino-4-substituted-6-methyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylates 16



20

21a) R_4 = 2-Furyl
21b) R_4 = 3-Furyl
21c) R_4 = 2-Thienyl
21d) R_4 = 3-Thienyl
21e) R_4 = Phenyl
21f) R_4 = Cyclopentyl

22a) R_5 = Et
22b) R_5 = *i*-Pr

16a) R_4 = 2-Furyl, R_5 = Et, 80%
16b) R_4 = 2-Furyl, R_5 = *i*-Pr, 72%
16c) R_4 = 3-Furyl, R_5 = Et, 81%
16d) R_4 = 3-Furyl, R_5 = *i*-Pr, 68%
16e) R_4 = 2-Thienyl, R_5 = Et, 89%
16f) R_4 = 2-Thienyl, R_5 = *i*-Pr, 90%
16g) R_4 = 3-Thienyl, R_5 = Et, 82%
16h) R_4 = 3-Thienyl, R_5 = *i*-Pr, 90%
16i) R_4 = Phenyl, R_5 = Et, 93%
16j) R_4 = Phenyl, R_5 = *i*-Pr, 91%
16k) R_4 = Cyclopentyl, R_5 = Et, 82%
16l) R_4 = Cyclopentyl, R_5 = *i*-Pr, 85%

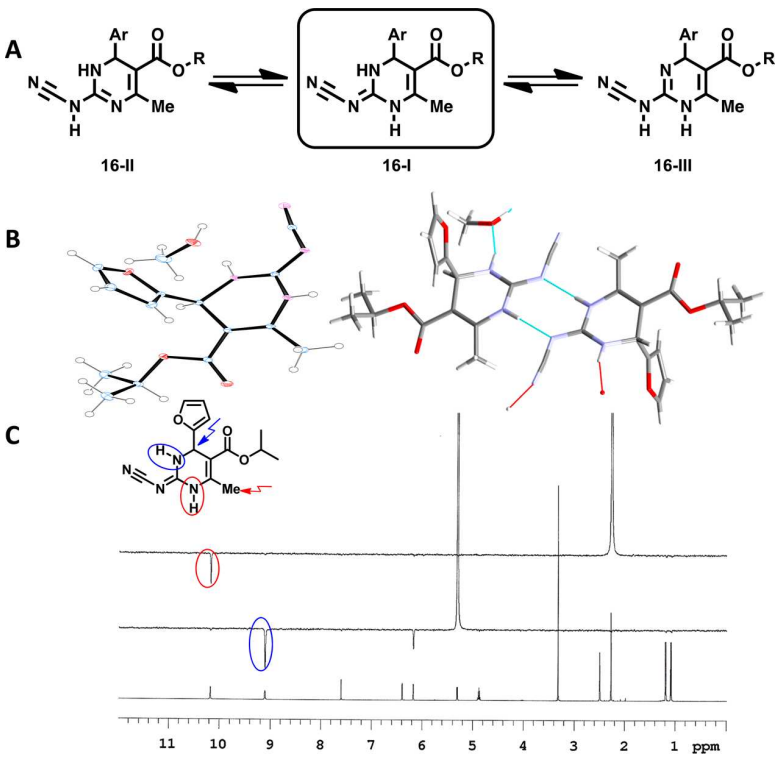


Figure 3. Structural analysis of 2-cyanoimino-4-(furan-2-yl)-6-methyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylates (**16**). (A) Possible tautomeric forms of **16**. (B) ORTEP diagram of racemic **16b** (CCDC1475413). (C) NOE experiments employing **16b**. Lower trace: 300 MHz ^{1}H NMR of **16b** (DMSO-d_6). Middle trace: NOE difference spectrum of **16b**; irradiation of proton at position 4. Upper trace: NOE difference spectrum of **16b**; irradiation of the methyl group at position 6.

models, constituting the first example of enantiospecific recognition at A_{2B}AR.

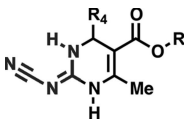
RESULTS AND DISCUSSION

The design of the 2-cyanoimino-4-substituted-6-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-pyrimidine-5-carboxylates (Figure 2) was based on the bioisosteric replacement of the carbonyl group at position 2 of the 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-one scaffold (**17**),[25] or the imino group present at the azole ring fused to the pyrimidine core in bicyclic derivatives (**18** and **19**),[26] by an exocyclic cyanoimino group (Figure 2). Such an apparently subtle structural modification should, however, affect the conformational, electronic, steric, and lipophilic characteristics of the scaffold, with a potential impact on the pharmacological profile for the ARs. On the basis of the SAR observed for the previous series (**17**–**19**), our *h*A_{2B}AR model,[25,26] and the prospective modeling study performed in this work (see below), the most advantageous substituents at positions 4 and 5 of the pyrimidine scaffold were retained. Thus, once the new series of compounds had been synthesized and pharmacologically evaluated, we performed a comparative analysis between the most similar scaffolds (**16** and **17**).

Chemistry. In the same way as the 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones (**17**) that inspired this work,[25] the compounds documented here (**16**) were assembled by employing a

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00138
J. Med. Chem. 2017, 60, 3372−3382

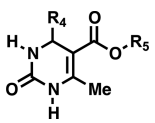
Table 1. Structure and Affinity Binding Data for the 2-Cyanamido-4-substituted-1,4-dihydropyrimidine-5-carboxylates 16 at the Human Adenosine Receptors



			K_i (nM) or % at 1 μM[a]			
compd	R_4	R_5	hA_1[b]	hA_{2A}[c]	hA_{2B}[d]	hA_3[e]
16a	2-furyl	Et	27%	20%	900 ± 6	20%
16b (SY1K024)	2-furyl	*i*-Pr	21%	19%	24.3 ± 0.9	4%
16c	3-furyl	Et	28%	31%	102 ± 3	14%
16d (SY1K025)	3-furyl	*i*-Pr	34%	25%	59.4 ± 1.8	41%
16e (SY1K022)	2-thienyl	Et	26%	33%	51.0 ± 2.1	3%
16f	2-thienyl	*i*-Pr	31%	16%	349.1 ± 3	27%
16g	3-thienyl	Et	29%	30%	461 ± 2	23%
16h	3-thienyl	*i*-Pr	11%	18%	647 ± 4	13%
16i	phenyl	Et	18%	13%	25%	13%
16j	phenyl	*i*-Pr	20%	12%	32%	6%
16k	cyclopentyl	Et	11%	10%	19%	4%
16l	cyclopentyl	*i*-Pr	3%	5%	11%	3%
DPCPX			2.2 ± 0.2	157 ± 2.9	73.2 ± 2.0	1722 ± 11
ZM241385 (**23**)			683 ± 4.1	1.90 ± 0.1	65.7 ± 1.7	863 ± 4.0

[a] n = 3 for K_i values, or n = 2 for percentage displacement of specific binding. [b] Displacement of specific [^{3}H]DPCPX binding in adenosine A_1 receptors expressed in human CHO cells. [c] Displacement of specific [^{3}H]4-(2-[7-amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-*a*][1,3,5]triazin-5-ylamino]ethyl)phenol (**23**) binding in adenosine A_{2A} receptors expressed in human HeLa cells. [d] Displacement of specific [^{3}H]DPCPX binding in human HEK-293 cells. [e] Displacement of specific [^{3}H]NECA binding in adenosine A_3 receptors expressed in human HeLa cells.

Table 2. Structure and Affinity Binding Data for the 3,4-Dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones 17 at the Human Adenosine Receptors[26]



			K_i (nM) or % at 1 μM[a]			
compd	R_4	R	hA_1[b]	hA_{2A}[c]	hA_{2B}[d]	hA_3[e]
17a	2-furyl	Et	18%	41%	585.5 ± 61	2%
17b	2-furyl	*i*-Pr	20%	30%	40.8 ± 3.1	1%
17c	3-furyl	Et	21%	39%	39.6 ± 2.9	1%
17d	3-furyl	*i*-Pr	25%	26%	1486 ± 41	3%
17e	2-thienyl	Et	1%	33%	44%	1%
17f	2-thienyl	*i*-Pr	37%	19%	44%	14%
12g	3-thienyl	Et	22%	39%	23.6 ± 1.3	24%
17h	3-thienyl	*i*-Pr	26%	25%	56.7 ± 2.9	1%
17i	phenyl	Et	1%	10%	2%	2%
17j	phenyl	*i*-Pr	2%	1%	2%	2%
17k	cyclopentyl	Et	3%	1%	2%	18%
17l	cyclopentyl	*i*-Pr	1%	1%	3%	7%
DPCPX			2.2 ± 0.2	157 ± 2.9	73.2 ± 2.0	1722 ± 11
(**23**)			683 ± 4.1	1.90 ± 0.1	65.7 ± 1.7	863 ± 4.0

[a] n = 3 for K_i values, or n = 2 for percentage displacement of specific binding. [b] Displacement of specific [^{3}H]DPCPX binding in adenosine A_1 receptors expressed in human CHO cells. [c] Displacement of specific [^{3}H]4-(2-[7-amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-*a*][1,3,5]triazin-5-ylamino]ethyl)phenol (**23**) binding in adenosine A_{2A} receptors expressed in human HeLa cells. [d] Displacement of specific [^{3}H]DPCPX binding in human HEK-293 cells. [e] Displacement of specific [^{3}H]NECA binding in adenosine A_3 receptors expressed in human HeLa cells.

multicomponent reaction approach (MCR).[27] The Biginelli-inspired reaction behind our synthetic strategy is depicted in Scheme 1. Following a previously described procedure,[28] cyanamide (**20**), a β-ketoester (**21a–b**), and the corresponding carbaldehyde (**22a–d**) were heated (80 °C) in ethanol using HCl/NaOAc as catalyst in a sealed tube for 4–6 h. The target 2-cyanoimino-4-substituted-6-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-pyrimidine-5-carboxylates (**16a–j**) were isolated in moderate to excellent yields (68–93%) after purification by either column chromatography or recrystallization (2-propanol). The reaction sequence started with the autocondensation of cyanamide in situ to afford the cyanoguanidine intermediate, which was then combined with either the aldehyde or the β-ketoester following any of the alternative mechanistic pathways proposed for the

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00138
J. Med. Chem. 2017, 60, 3372–3382

Biginelli heterocyclization.[28] An exhaustive description of the synthetic method and the complete structural and spectroscopic data for all compounds are provided in the Experimental Section. Assuming the superposition of the scaffolds discussed above, a collection of compounds was therefore prepared in which, according to the SAR trends of chemotype **17**,[25] we maintained the substituents at positions 4 (2-furyl, 3-furyl, 2-thienyl, and 3-thienyl) and 5 (ethoxycarbonyl or isopropyloxycarbonyl) of the heterocycle (**16a**–**h**). Addtionally, phenyl and cyclopentyl groups were introduced at position 4 (compounds **16i**–**l**) to evaluate the effect of removing the heterocyclic core.

As stated above (Figure 2), the exocyclic cyanoimino group at position 2 in **16** was conceived as a bioisoster of the carbonyl group in **17** in such a way that the NH groups remaining at positions 1 and 3 would play equivalent roles in the two scaffolds. However, as depicted in Figure 3, there are three possible tautomeric forms for scaffold **16**, which due to the different H-bond patterns would potentially lead to distinct binding modes between tautomers. To determine the prevalent tautomeric form, both in the solid state and in solution, X-ray crystallography and NMR spectroscopy (1D NOE difference experiments) were carried out and provided full information on the structure of a representative compound in the series, namely isopropyl 2-cyanoimino-4-(furan-2-yl)-6-methyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (**16b**). The crystallographic data of a monocrystal of **16b** confirmed the prevalence of tautomer **16-I** in the solid state (Figure 3B), additionally providing further evidence for the pseudo boat conformation adopted by the heterocyclic ring. This is a common feature assumed for the parent series (**17**–**19**)[25,26] and constitutes a major structural difference from all known A_{2B} antagonists,[6,7,13,14] which are planar structures. The one-dimensional (1D) NOE difference experiments on **16b** (Figure 3C) unambiguously confirmed that the predominant tautomer is indeed the one initially considered (Figure 3, **16-I**), at least in DMSO-d_6 solution. Accordingly, the new heterocyclic core displays optimal overlay of chemical groups with the model scaffold **17** (Figure 2).

Biological Evaluation. The affinities of the new ligands (**16**) for the four (A_1, A_{2A}, A_{2B}, and A_3) human adenosine receptor subtypes were determined in vitro with radioligand binding assays.[29] Human adenosine receptors expressed in transfected CHO (A_1AR), HeLa (A_{2A}AR and A_3AR), and HEK-293 (A_{2B}AR) cells were employed. The data obtained are provided in Table 1. As in previous studies,[25,26] all compounds were initially evaluated as racemic mixtures. The biological data are expressed as $K_i \pm$ SEM (nM, $n = 3$) or as percentage inhibition of specific binding at 1 μM ($n = 2$, average) for those compounds that did not fully displace radioligand binding. For the sake of comparison, the biological data obtained for the 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-one parent series (**17**) are also included (Table 2). K_i values were obtained by fitting the data with nonlinear regression using Prism 2.1 software (GraphPad, San Diego, CA). For those compounds that showed either little affinity or poor solubility, a percentage inhibition of specific binding is reported. Results are the mean of three experiments ($n = 3$), each performed in duplicate.

Functional Experiments. cAMP Assays. As part of the pharmacological characterization of this novel series of selective A_{2B}AR ligands, the most appealing compound of the series (**16b**) was tested in cAMP assays in order to evaluate its ability to inhibit NECA-stimulated (10 μM) cAMP production. These experiments (see Supporting Information) confirmed that **16b** inhibits cAMP accumulation, which validates the antagonistic behavior at A_{2B}AR of the novel chemotype described here. A comparison of the K_i and K_B values reveals a good correlation between data obtained from the binding (K_i = 24.3 nM) and functional assays (K_B = 116.0 nM).

Structure–Activity Relationships and Molecular Modeling. In the following section the structure–affinity and structure–selectivity relationships established from the pharmacological data are described. The trends are further supported and explained in the context of a computational 3D model of the hA$_{2B}$AR. For the sake of comparison, Table 2 contains the pharmacological data obtained for the parent pyrimidin-2(1*H*)-one series **17**,[26] evaluated as racemic mixtures, with the addition of four novel compounds that explore cyclopentyl and phenyl substituents at position 4. The pharmacological data obtained for the new series (**16**), also evaluated as racemic mixtures, are listed in Table 1. Several interesting hA$_{2B}$AR ligands can be identified that have high potency (K_i < 60 nM) and, most importantly, excellent subtype selectivity, with most ligands presenting low percentage inhibition at the remaining ARs (<35% at 1 μM) and resulting in selectivity indexes >100-fold for the most potent ligands. Ligand **16b** exhibits the most attractive pharmacological profile of the series as it elicits affinity in the low nanomolar range (K_i = 24.3 nM) and has outstanding selectivity toward hA$_1$, hA$_{2A}$, and hA$_3$ ARs.

The subseries bearing (2- or 3-) furyl rings at position 4 of the heterocyclic core generally elicited superior affinity at the hA$_{2B}$AR than their (2- or 3-) thienyl congeners, with the 2-furyl derivative **16a** being the only exception to this trend (K_i = 900 nM). More precisely, the combination of the furyl group at position 4 and an isopropyl residue at the ester moiety systematically provides better affinity (cf. pairs **16a**/**16b** and, to a lesser extent, **16c**/**16d**). Interestingly, the opposite effect was observed for compounds containing a (2- or 3-) thienyl group, for which the ethyl esters exhibited superior affinity (cf. pairs **16e**/**16f** and, to a lesser extent, **16g**/**16h**). As compared to the parent 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-one series (Table 2 and Supporting Information, Figure S2), the significant increase in affinity observed for ligands bearing a 2-thienyl residue at position 4 (cf. pairs **16e**/**17e** and **16f**/**17f**) is remarkable. Thus, while their 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-one congeners are practically inactive (44% at 1 μM), **16e** and **16f** have attractive K_i values (51.02 and 349 nM, respectively). A similar trend is observed for the aforementioned combination of furyl at position 4 (in particular 3-furyl) and an isopropyl ester (i.e., **16d**/**17d**, where there is a 25-fold K_i difference). Curiously, a slight opposite effect is observed for the equivalent ligands containing ethyl ester residues, where substitution of the carbonyl at position 2 by a cyanoimino group is detrimental for the affinity (cf. pairs **17a**/**16a**, **17c**/**16c**). In contrast, 2-cyanoimino-4-substituted-6-methyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylates bearing a 3-thienyl framework at position 4 (**16g**–**h**) exhibit attenuated affinities (K_i = 533 and 647 nM, respectively) when compared to their 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-one congeners **17g**–**h** (K_i = 23.6 and 56.7 nM, respectively). Finally, the compounds bearing phenyl (**16i**–**j**) or cyclopentyl (**16k**–**l**) rings at position 4 are deprived of affinity at any of the four ARs. This behavior, which was reproduced by the introduction of these substituents in the parent scaffold **17** (Table 2, compounds **17i**–**l**), clearly suggests that the requirements of the binding cavity of the

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00138
J. Med. Chem. 2017, 60, 3372–3382

substituent at position 4 of the two scaffolds are common and highly specific within the $hA_{2B}AR$ binding pocket.

To project the observed SAR onto receptor−ligand interactions and to assess the further growth of these series, the binding mode of the new antagonists to the $hA_{2B}AR$ was explored with molecular docking using our previously refined computational model of this receptor.[25] Each molecule with a measured K_i for the $hA_{2B}AR$ (i.e., **16a−h**) was subject to four parallel dockings: with or without the presence of predicted water molecules in the binding site, as previously identified,[26] and considering the two possible enantiomers in each case. The results were then pulled together to elucidate the possible binding mode(s) for equivalent enantiomers in the series. It should be noted that, due to the different substituents on the scaffold, the *R*/*S* nomenclature does not necessarily correspond with the topological equivalences (see Supporting Information, Figure S3). In line with our previous report,[26] analysis of the docking poses provided clear evidence that the topologically equivalent isomer to (*S*)-**16b** was the only one that could achieve any convergent solutions in the series. Indeed, two putative binding modes were identified only for this stereoisomer, namely pose A and pose B (Figure 4). In both cases,

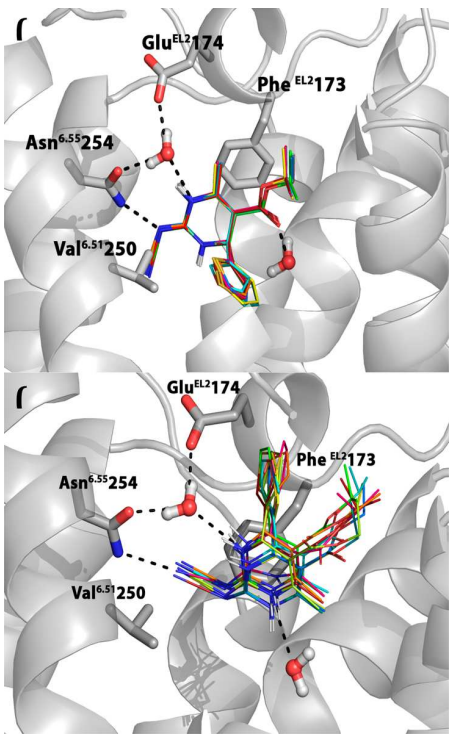


Figure 4. Two possible binding modes, A (top) and B (bottom), proposed for compounds in series **16**. In thin sticks, compounds with a measured have K_i value at the $hA_{2B}AR$. The receptor is shown in gray ribbons, with residues that contribute to ligand binding in sticks and labeled. The two water molecules that mediate the binding stability are shown, and dashed lines depict H-bond interactions.

the heterocyclic ring is stabilized by aromatic interactions with the side chain of Phe173^{EL2} in such a way that one of the N atoms within the cyanoimino group contribute to the key hydrogen-bonding with the side chain of Asn254$^{6.55}$, a totally conserved residue in ARs that interacts with all ligands crystallized to date.[30] In pose A (Figure 4, top), the cyanoimino group is oriented toward the interior of the binding site in the region defined by Val250$^{6.51}$ so that the hydrogen bond with the amino side chain of Asn254$^{6.55}$ is established with the exocyclic imino nitrogen. This pose is comparable to that previously reported for the parent series **12**[25] as well as for the bicyclic and tricyclic derivatives **18−19**.[26] Remarkably, the two water molecules predicted in that study[26] also play an important role in ligand−receptor interactions for the present series **16**. One of these water molecules mediates an H-bond network between Asn254$^{6.55}$, Glu174^{EL2}, and one of the NH groups in the dihydropyrimidine ring (N1 in pose A, N3 in pose B, see Figure 4). The second water molecule is equivalent to a structural water observed in the crystal structures of $hA_{2A}AR$ with 4-(2-[7-amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazolo[2,3-*a*]-[1,3,5]triazin-5-ylamino]ethyl)phenol (**23**).[30,31] In pose A, this water molecule mediates an internal hydrogen bond between the alkoxy substituent and the furan/thienyl ring, as previously described for series **18−19**.[26] In the alternative binding pose B, the cyanoimino substituent points toward the side chain of Asn254$^{6.55}$ and the H-bond with this residue is achieved in this case through the cyano group. This second (inner) water molecule stabilizes the NH at position 3 of the ligand scaffold and could potentially bridge an H-bonding interaction with His278$^{7.43}$.

From the SAR study, it emerged that cyclopentyl and phenyl substituents (compounds **16i−l**) are detrimental for the affinity, suggesting that these scaffolds cannot be easily accommodated in the binding site. These results are consistent with binding mode A, where this substituent points to the inner pocket in a tight and regioselective cavity presided by the $A_{2B}AR$ specific residue Val250$^{6.51}$. The phenyl and cyclopentyl substituents would not fit optimally here and, furthermore, they would displace the second water molecule consistently observed in $A_{2A}AR$ crystal structures,[31,32] which mediates interactions with the receptor for this and similar scaffolds.[26] In contrast, in binding mode B the aromatic substituents in position 4 are located in the extracellular region. This is a region of intrinsic flexibility that could in principle readjust to accommodate more bulky substituents. However, it could be argued that binding mode B is less feasible to explain the SAR of the aromatic substitution but the lower reliability of the homology models of the loops does not rule out the possibility that this region may contain a stereoselective pocket.

As occurred with the previous series (**17−19**, Figure 1), the present $A_{2B}AR$ selective antagonists (**16**) were obtained and initially tested as racemates. It is noteworthy that our molecular models predict that there is only one enantiomer [(*S*)-**16b** and topologically equivalent enantiomers, see Supporting Information, Figure S3] that should bind the active site of the $A_{2B}AR$. This model of an enantioselective interaction with the $A_{2B}AR$ binding pocket, which was initially proposed for the previous series of antagonists,[26] was reinforced by the observation that aromatization of the central heterocycle in series **12** abolished the $A_{2B}AR$ affinity.[25] In an effort to confirm this enantioselective model, it was decided to separate the most attractive ligand identified [(±)-**16b**] into its respective enantiomers. A combination of chiral HPLC and circular dichroism (CD) spectroscopy was employed to achieve this aim, in the same way as described for previous examples of the pharmacologically active 3,4-dihydropyrimidin-2-ones.[33−35] Semipreparative HPLC separation of the racemic 1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-2-one (±)-**16b** on a chiral stationary phase (see Experimental Section) provided each enantiomer with excellent stereo-

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00138
J. Med. Chem. 2017, 60, 3372−3382

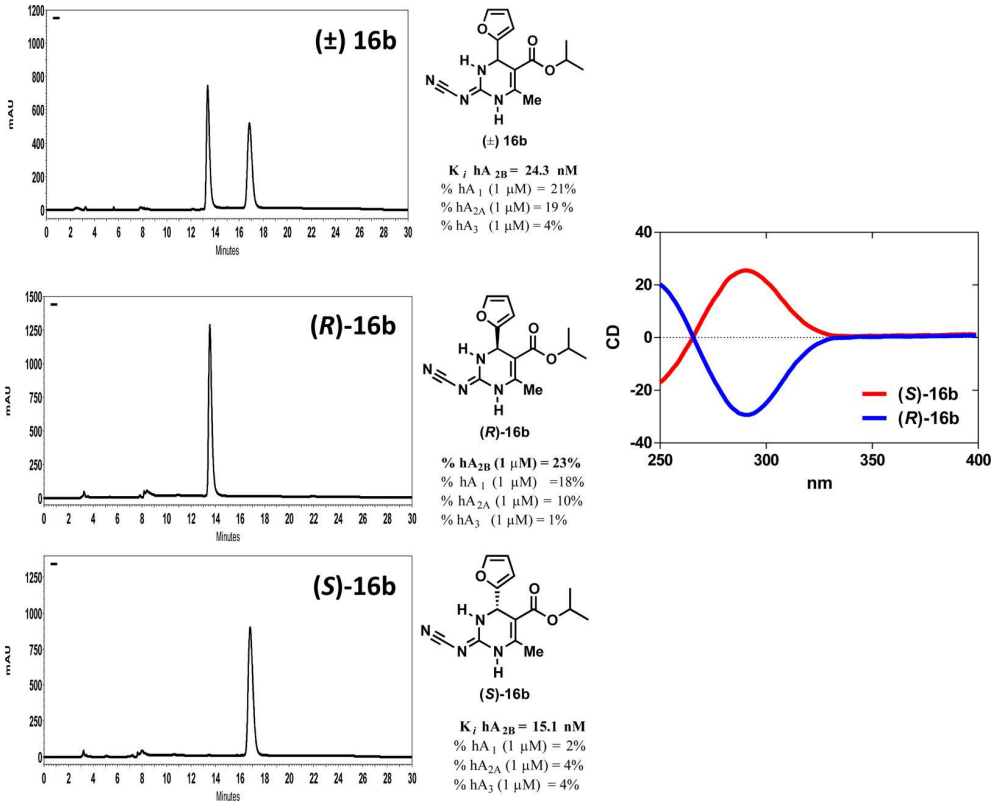


Figure 5. Chiral HPLC traces, circular dichroism spectra, absolute configuration, and biological data for (*R*)-**16b** and (*S*)-**16b**.

chemical purity (>99%). The characteristic CD activity of the enamide chromophore at around 300 nm allowed the unambiguous assignment of the absolute configuration of each enantiomer (Figure 5)[33−35] by comparison with the reported CD data for enantiopure 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones of known configuration.[34,35] At this wavelength, the enantiomer that showed a negative Cotton effect (blue line) was identified as (*R*)-**16b**, while the stereoisomer that gave positive Cotton effect (red line) was assigned as (*S*)-**16b**.

The pharmacological profiles of the two enantiomers [(*R*)-**16b** and (*S*)-**16b**] at the four human adenosine receptors were then examined (Figure 5). The results confirmed that the observed affinity at the A_{2B}AR is due to the (*S*)-**16b** enantiomer (K_i = 15.10 nM), which is almost twice as potent as the racemic mixture [**16b**, (K_i = 24.3 nM)], whereas (*R*)-**16b** is inactive on the four ARs (Figure 5). To the best of our knowledge, this is the first example of an A_{2B}AR antagonist that has an enantiospecific recognition profile. Moreover, this result confirms the binding mode hypothesis for this series (Figure 4), which is in agreement with our previous proposal for the analogous bioisosteres **17**−**19**.[26]

CONCLUSION

A novel family of structurally simple, potent, and highly selective A_{2B}AR antagonists based on the 2-cyanoimino-4-substituted-6-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-pyrimidine-5-carboxylate chemotype has been studied. The biological data and the SAR obtained for this scaffold are consistent with those obtained for a previous series [i.e., the 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-one scaffold (**17**)[25]], thus validating our design based on bioisosteric replacement of the carbonyl by a cyano group. The binding mode of the two series was also consistent, with a stereospecific interaction proposed between the isomer (*S*)-**16b** and analogues and the receptor. The hypothesis of a stereospecific interaction with the binding site at the A_{2B}AR was confirmed experimentally for the first time, with the eutomer [(*S*)-**16**] exhibiting remarkable potency (K_i value of 15.1 nM) while retaining the full selectivity profile at the four ARs. This study constitutes the first example of enantiospecific recognition at the A_{2B}AR and opens new possibilities in ligand design for this receptor.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemistry. Commercially available starting materials and reagents were purchased and used without further purification from freshly opened containers. All solvents were purified and dried by standard methods. Organic extracts were dried with anhydrous Na_2SO_4. The reactions were monitored by TLC, and purified compounds each showed a single spot. Unless stated otherwise, UV light and/or iodine vapor were used for the detection of compounds. The synthesis and purification of all compounds were accomplished using the equipment routinely available in organic chemistry laboratories. Most of the preparative experiments were performed in coated vials on an organic synthesizer with orbital stirring. Purification of isolated products was carried out by column chromatography. Compounds were routinely characterized by spectroscopic and analytical methods. Melting points were determined on a melting point apparatus and are uncorrected. The chemical structures of the compounds were determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy (^{1}H and ^{13}C NMR) and high-resolution mass spectroscopy (HRMS). Unless otherwise stated NMR spectra were recorded in $CDCl_3$. Chemical shifts are given as δ values against tetramethylsilane as internal standard, and J values are given in Hz. Analytical HPLC was performed on an Agilent 1100 system using an Agilent Zorbax SB-Phenyl, 2.1 mm × 150 mm, 5 μm column with gradient elution using the mobile phases (A) H_2O

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00138
J. Med. Chem. 2017, 60, 3372−3382

containing 0.1% CF_3COOH and (B) MeCN and a flow rate of 1 mL/min. The purity of all tested compounds was determined to be >95%. The NOE experiments were performed employing the model compound **16b**. Irradiation of the methyl group at position 6 (δ = 2.26 ppm) led to an NOE effect (2.6%) at the signal corresponding to the NH group at position 1 of the heterocycle (δ = 10.16 ppm); similarly, irradiation at position 1 (NH, δ = 10.16 ppm) led to an NOE effect (8.60%) at the signal corresponding to the methyl group at position 6 (δ = 2.26 ppm). Irradiation of the proton at position 4 of the heterocyclic core (δ = 5.29 ppm) led to an NOE effect (5.34%), with the signal corresponding to the proton of the NH present at in position 3 of the ring (δH = 9.09 ppm), and a similar experiment irradiating the proton at position 3 (NH, δ = 9.09 ppm) led to an NOE effect (12.26%), with the proton at position 4 of the heterocycle. The chiral resolution of **16b** was performed using a Hitachi ELITE chromatograph (L-2130 pump, L-2350 column oven, and a L-2455 diode array detector) with a 250 mm × 4.6 mm Chiralcel OD-H column (DAICEL) equilibrated with *n*-hexane/*i*-propanol = 90/10 at 25 °C. Both enantiomers [(*S*)-**16** (1.20 mg, retention time 13.4 min) and (*R*)-**16** (1.05 mg, retention time 16.8 min)] were isolated and their stereochemical purity analyzed by chiral HPLC (>99% for each enantiomer) and then characterized by NMR in $CDCl_3$. Circular dichroism spectra were recorded on a Jasco-815 system equipped with a Peltier-type thermostatic accessory (CDF-426S, Jasco). Measurements were carried out at 20 °C using a 1 mm quartz cell in a volume of 300−350 mL. Compounds (0.1 mg) were dissolved in MeOH (1.0 mL). The instrument settings were: bandwidth, 1.0 nm; data pitch, 1.0 nm; speed, 500 nm/min; accumulation, 10; wavelengths, 400−190 nm.

General Procedure for the Synthesis of Derivatives 16.[28] A mixture of cyanamide **20** (2 mmol), the corresponding aldehyde **21a−d** (1 mmol), the 1,3-dicarbonyl compound **22a−b** (1 mmol), sodium acetate (1 mmol), and concentrated hydrochloric acid (0.5 mL) in 7 mL of ethanol in a coated Kimble vial was stirred by orbital stirring at 80 °C for 8 h. After completion of the reaction, as indicated by TLC, the reaction mixture was poured onto crushed ice and stirred for 10 min. The solid was filtered off under reduced pressure, washed with ice-cold water (20 mL), and then purified either by recrystallization or column chromatography on silica gel.

*(±)-Ethyl 2-Cyanoimino-4-(furan-2-yl)-6-methyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (**16a**).* Purified by flash chromatography (hexane/EtOAc 5:3) to afford **16a** as a pale-yellow solid, 76%; mp 244−245 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 10.26 (bs, 1H), 9.27 (bs, 1H), 7.41 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 6.95 (t, J = 3.8 Hz, 1H), 6.91 (bs, 1H), 5.51 (d, J = 3.9 1H), 4.07 (q, J = 5.4, 2H), 2.27 (s, 3H), 1.14 (t, J = 5.6 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ 164.9, 155.5, 147.2, 146.9, 127.4, 125.9, 124.8, 116.7, 102.2, 60.3, 49.0, 17.7, 14.5. HRMS (EI) m/z: calcd for $C_{13}H_{14}N_4O_3$ $[M]^+$ 274.1066, found 274.1069.

*(±)-Isopropyl 2-Cyanoimino-4-(furan-2-yl)-6-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-pyrimidine-5-carboxylate (**16b**).* Purified by flash chromatography (hexane/EtOAc 2:1) to afford **16b** as a white solid, 82%; mp 212−214 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 10.16 (bs, 1H), 9.09 (bs, 1H), 7.58 (d, J = 2.1 Hz, 1H), 6.38 (t, J = 2.2, 1H), 6.16 (d, J = 3.3 Hz, 1H), 5.29 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 4.87 (p, J = 6.2 Hz, 1H), 2.26 (s, 3H), 1.17 (d, J = 6.1 Hz, 3H), 1.07 (d, J = 6.0 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ 164.3, 155.7, 154.8, 147.2, 143.2, 116.7, 111.0, 106.9, 99.6, 67.5, 47.7, 22.1, 21.9, 17.7. HRMS (EI) m/z: calcd for $C_{14}H_{16}N_4O_3$ $[M]^+$ 288.1222, found 288.1225.

*Isopropyl (S)-2-Cyanoimino-4-(furan-2-yl)-6-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-pyrimidine-5-carboxylate ((S)-**16b**).* A 250 mm × 4.6 mm Chiralcel OD-H column (DAICEL) was equilibrated with *n*-hexane/*i*-propanol = 90/10, at 25 °C, 1.20 mg, retention time 13.4 min ee >99%.

*Isopropyl (R)-2-Cyanoimino-4-(furan-2-yl)-6-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-pyrimidine-5-carboxylate ((R)-**16b**).* A 250 mm × 4.6 mm Chiralcel OD-H column (DAICEL) wasequilibrated with *n*-hexane/*i*-propanol = 90/10, at 25 °C, 1.05 mg, retention time 16.8 min ee >99%.

*(±)-Ethyl 2-Cyanoimino-4-(furan-3-yl)-6-methyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (**16c**).* Purified by flash chromatography (hexane/EtOAc 2:1) to afford **16c** as a pale-yellow solid, 62%; mp 241−243 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 10.11 (bs, 1H), 9.02 (bs, 1H), 7.57 (bs, 1H), 7.44 (bs, 1H), 6.34 (bs, 1H), 5.20 (bs, 1H), 4.06 (q, J = 6.2, 2H), 2.25 (s, 3H), 1.14 (t, J = 7.0 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ 165.0, 155.9, 146.9, 144.4, 139.7, 127.9, 116.9, 109.4, 100.3, 60.2, 45.8, 17.7, 14.6. HRMS (EI) m/z: calcd for $C_{13}H_{14}N_4O_3$ $[M]^+$ 274.1066, found 274.1067.

*(±)-Isopropyl 2-Cyanoimino-4-(furan-3-yl)-6-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-pyrimidine-5-carboxylate (**16d**).* Purified by flash chromatography (hexane/EtOAc 2:1) to afford **16d** as a pale-yellow solid, 73%; mp 220−221 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 10.08 (bs, 1H), 9.00 (bs, 1H), 7.58 (d J = 1.7 Hz, 1H), 7.30 (s, 1H), 6.33 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 5.18 (d, J = 3.9 Hz, 1H), 4.89 (p, J = 6.1 Hz, 1H), 2.24 (s, 3H), 1.18 (d, J = 6.2 Hz, 3H), 1.10 (d, J = 6.2 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ 164.5, 155.9, 146.6, 144.4, 139.7, 128.0, 116.9, 109.4, 101.6, 67.5, 45.8, 22.2, 22.0, 17.7. HRMS (EI) m/z: calcd for $C_{14}H_{16}N_4O_3$ $[M]^+$ 288.1222, found 288.1224.

*(±)-Ethyl 2-Cyanoimino-6-methyl-4-(thiophen-2-yl)-1,2,3,4-tetrahydro-pyrimidine-5-carboxylate (**16e**).* Purified by flash chromatography (hexane/EtOAc 5:3) to afford **16e** as a yellow solid, 81%; mp 243−244 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 10.19 (bs, 1H), 9.12 (bs, 1H), 7.59 (bs, 1H), 6.38 (bs, 1H), 6.17 (d, J = 2.8 Hz, 1H), 5.31 (d, J = 2.9 Hz, 1H), 4.05 (q, J = 6.9, Hz, 2H), 2.26 (s, 3H), 1.13 (t, J = 7.0 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ 164.8, 155.7, 154.6, 147.4, 143.3, 116.7, 111.0, 106.8, 99.3, 60.2, 47.5, 17.7, 14.5. HRMS (EI) m/z: calcd for $C_{13}H_{14}N_4O_2S$ $[M]^+$ 290.0837, found 290.0840.

*(±)-Isopropyl 2-Cyanoimino-6-methyl-4-(thiophen-2-yl)-1,2,3,4-tetrahydro-pyrimidine-5-carboxylate (**16f**).* Purified by flash chromatography (hexane/EtOAc 2:1) to afford **16f** as a white solid, 83%; mp 219−221 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 10.23 (bs, 1H), 9.25 (bs, 1H), 7.41 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 6.96 (t, J = 4.2 Hz, 2H), 6.91 (bs, 1H), 5.49 (s, 1H), 4.89 (p, J = 6.0 Hz, 1H), 2.26 (s, 3H), 1.18 (d, J = 6.0 Hz, 3H), 1.08 (d, J = 6.0 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ 164.4, 155.5, 147.3, 146.6, 127.4, 125.9, 124.8, 116.7, 102.4, 67.7, 49.1, 22.2, 21.9, 17.6. HRMS (EI) m/z: calcd for $C_{14}H_{16}N_4O_2S$ $[M]^+$ 304.0994, found 304.0997.

*(±)-Ethyl 2-Cyanoimino-6-methyl-4-(thiophen-3-yl)-1,2,3,4-tetrahydro-pyrimidine-5-carboxylate (**16g**).* Purified by flash chromatography (hexane/EtOAc 5:3) to afford **16g** as an intense yellow solid, 72%; mp 192−194 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 10.12 (bs, 1H), 9.11 (bs, 1H), 7.49 (d, J = 4.9 Hz, 1H), 7.21 (s, 1H), 6.98 (d, J = 4.5 Hz, 1H), 5.31 (d, J = 3.2 Hz, 1H), 4.06 (q, J = 7.0 Hz, 2H), 2.26 (s, 3H), 1.13 (t, J = 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ 165.1, 155.7, 146.6, 144.3, 127.6, 126.4, 122.3, 116.9, 101.9, 60.2, 49.2, 17.7, 14.5. HRMS (EI) m/z: calcd for $C_{13}H_{14}N_4O_2S$ $[M]^+$ 290.0837, found 290.0839.

*(±)-Isopropyl 2-Cyanoimino-6-methyl-4-(thiophen-3-yl)-1,2,3,4-tetrahydropyri-midine-5-carboxylate (**16h**).* Purified by flash chromatography (hexane/EtOAc 2:1) to afford **16h** as a pale-yellow solid, 89%; mp 209−211 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 10.09 (bs, 1H), 9.09 (bs, 1H), 7.49 (d, J = 5.0 Hz, 1H), 7.20 (s, 1H), 6.97 (d, J = 5.0, 1H), 5.29 (s, 1H), 4.87 (p, J = 6.1 Hz, 1H), 2.25 (s, 3H), 1.17 (d, J = 6.2 Hz, 3H), 1.06 (d, J = 6.2 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ 164.7, 155.6, 146.3, 144.5, 127.6, 126.4, 122.3, 116.9, 102.1, 67.5, 49.3, 22.2, 21.9, 17.7. HRMS (EI) m/z: calcd for $C_{14}H_{16}N_4O_2S$ $[M]^+$ 304.0994, found 304.0993.

*(±)-Ethyl 2-Cyanoimino-6-methyl-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (**16i**).* Purified by flash chromatography (hexane/EtOAc 5:3) to afford **16i** as a white solid, 85%; mp 248−249 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 10.12 (bs, 1H), 9.09 (bs, 1H), 7.42−7.16 (m, 5H), 5.24 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 4.09 (q, J = 7 Hz, 2H), 2.29 (s, 3H), 1.08 (t, J = 7.1 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ 165.1, 155.3, 146.4, 143.7, 129.1, 128.3, 126.9, 116.9, 101.7, 60.1, 53.7, 17.7, 14.4. HRMS (EI) m/z: calcd for $C_{15}H_{16}N_4O_2$ $[M]^+$ 284.1273, found 284.1270.

*(±)-Isopropyl 2-Cyanoimino-6-methyl-4-phenyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (**16j**).* Purified by flash chromatography (hexane/EtOAc 2:1) to afford **16j** as a white solid, 62%; mp 214−216 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 10.08 (bs, 1H), 9.06 (bs,1H), 7.46−7.17 (m, 5H), 5.22 (d, J = 3.6 Hz, 1H), 4.81 (p, J = 6.3 Hz, 1H),

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00138
J. Med. Chem. 2017, 60, 3372−3382

2.28 (s, 3H), 1.14 (d, J = 6.2 Hz, 3H), 0.96 (d, J = 6.2 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ 164.6, 155.2, 146.2, 143.8, 129.0, 128.3, 127.0, 116.9, 101.9, 67.5, 53.9, 22.1, 21.8, 17.7. HRMS (EI) m/z: calcd for $C_{16}H_{18}N_4O_2[M]^+$ 298.1430, found 298.1429.

*(±)-Ethyl 2-Cyanoimino-4-cyclopentyl-6-methyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylate (**16k**).* Purified by flash chromatography (hexane/EtOAc 5:3) to afford **16k** as a white solid 85%; mp 219−221 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, DMSO-d_6) δ 9.92 (bs, 1H), 8.68 (bs, 1H), 4.10 (q, J = 6.9 Hz, 2H), 3.31 (s, 1H), 2.19 (s, 3H), 1.93 (bs, 1H), 1.63−1.25 (m, 8H), 1.18 (t, J = 6.9 Hz, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO-d_6) δ 170.40, 161.14, 151.08, 121.93, 106.91, 64.81, 57.47, 51.73, 32.57, 32.40, 29.61, 29.36, 22.43, 19.35. HRMS (EI) m/z: calcd for $C_{15}H_{16}N_4O_2$ $[M]^+$ 276.1586, found 276.1589.

*(±)-Isopropyl 2-Cyanoimino-4-cyclopentyl-6-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-pyrimidine-5-carboxylate (**16l**).* Purified by flash chromatography (hexane/EtOAc 2:1) to afford **16l** as a white solid, 62%; mp 222−223 °C. ^{1}H NMR (300 MHz, $ClCD_3$) δ 8.56 (bs, 1H), 7.26 (bs, 1H), 5.08 (hept, J = 6.2 Hz, 1H), 4.41 (d, J = 4.2 Hz, 1H), 2.34 (s, 3H), 2.26−1.98 (m, 1H), 1.91−1.40 (m, 8H), 1.27 (d, J = 6.2 Hz, 6H). ^{13}C NMR (75 MHz, $ClCD_3$) δ 164.94, 156.93, 143.46, 116.57, 104.34, 68.05, 53.95, 46.96, 28.03, 27.71, 24.84, 24.53, 21.96, 21.82, 18.06. HRMS (EI) m/z: calcd for $C_{16}H_{18}N_4O_2[M]^+$ 290.1743, found 290.1746.

Pharmacology. Radioligand binding competition assays were performed in vitro using human receptors expressed in transfected CHO (hA$_1$), HeLa (hA$_{2A}$ and hA$_1$), or HEK-293 (hA$_{2B}$) cells as described previously.[25,26,35] (^{3}H)-1,3-Dipropyl-8-cyclopentylxanthine ([^{3}H]DPCPX) for A$_1$AR and A$_{2B}$AR, (^{3}H)-4-(2-[7-amino-2-(2-furyl)-[1,2,4]triazolo[2,3-*a*][1,3,5]triazin-5-ylamino]ethyl)phenol ([^{3}H]-**23**) for A$_{2A}$AR, and (^{3}H)-1-(6-amino-9*H*-purin-9-yl)-1-deoxy-*N*-ethyl-β-D-ribofuranuronamide ([^{3}H]NECA) for A$_3$AR were employed as radioligands in binding assays. A brief description is given below. Adenosine A$_1$ receptor competition binding experiments were carried out in membranes made from CHO-A$_1$ cells labeled with 2 nM [^{3}H]DPCPX. Nonspecific binding was determined in the presence of 10 μM R-PIA. The reaction mixture was incubated at 25 °C for 60 min. Adenosine A$_{2A}$ receptor competition binding experiments were carried out in membranes from HeLa-A$_{2A}$ cells labeled with 3 nM [^{3}H]-**23**. Nonspecific binding was determined in the presence of 50 μM NECA. The reaction mixture was incubated at 25 °C for 30 min. Adenosine A$_{2B}$ receptor competition binding experiments were carried out in membranes from HEK-293-A$_{2B}$ cells (Euroscreen, Gosselies, Belgium) labeled with 35 nM [^{3}H]DPCPX. Nonspecific binding was determined in the presence of 400 μM NECA. The reaction mixture was incubated at 25 °C for 30 min. Adenosine A$_3$ receptor competition binding experiments were carried out in membranes from HeLa-A$_3$ cells labeled with 30 nM [^{3}H]NECA. Nonspecific binding was determined in the presence of 100 μM R-PIA. The reaction mixture was incubated at 25 °C for 180 min.

Functional Experiments. cAMP Assays. These assays were performed at adenosine receptors transfected using a cAMP enzyme immunoassay kit (Amersham Biosciences) following previously described protocols.[25,26] HEK-293 cells were seeded (10000 cells/well) in 96-well culture plates and incubated at 37 °C in an atmosphere with 5% CO_2 in Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 (EMEM F-12), containing 10% fetal calf serum (FCS) and 1% L-glutamine. Cells were washed three times with 200 μL of assay medium (EMEM-F12 and 25 mM HEPES pH = 7.4) and preincubated with assay medium containing 30 μM rolipram and test compounds at 37 °C for 15 min. Then 10 μM NECA was incubated for 15 min at 37 °C (total incubation time 30 min). Reaction was stopped with lysis buffer supplied in the kit, and the enzyme immunoassay was carried out for the detection of intracellular cAMP at 450 nm in an Ultra Evolution detector (Tecan).

Data Analysis. IC$_{50}$ values were obtained by fitting the data by a nonlinear regression using Prism 2.1 software (GraphPad, San Diego, CA). K_i values were obtained from Cheng−Prusoff equation.[36] For those compounds that showed either little affinity or poor solubility, a percentage inhibition of specific binding is reported. Results are the mean of three experiments (n = 3) each performed in duplicate. Functional KB values were calculated from IC$_{50}$ values by using the method of Leff and Dougall.[37]

Computational Modeling. Our computational strategy for the structure-based design of adenosine receptor ligands has recently been reviewed,[38] and it involves a combination of homology modeling and ligand−receptor docking.

Homology Modeling of the hA$_{2B}$AR. The generation of the inactive 3D structure of this receptor, used for the docking of antagonists, consisted of the following sequential steps: (i) Manual curation of the sequence alignment with the template A$_{2A}$AR (PDB 3EML),[31] (ii) generation and selection of homology models and loop refinement procedures with Modeler,[39] (iii) assessment of Asn/Gln/His rotamers and side chain protonation states with the Molprobity web server (http://molprobity.biochem.duke.edu/), and (iv) use of tools from the Schrödinger Suite for energetic structural refinements.[40]

Ligand Docking. Both the *R* and the *S* stereoisomers for each ligand were built and optimized in 3D using the Maestro graphical interface and the LigPrep utility from the Schrödinger suite.[40] Each ligand was docked 20 times with default (high accuracy) genetic algorithm (GA) search parameters, using the scoring function Chemscore as implemented in GOLD[41] and allowing full flexibility for the ligand, including flipping of amide bonds. The search sphere was centered on the side chain (CD1) of Ile$^{7.39}$ and expanded with a radius of 15 Å, thus ensuring a generous enough search space comprising the antagonist binding site experimentally determined for adenosine receptors. Two water molecules were considered in the binding cavity, as proposed[42] previously and confirmed here by MD simulations (see below). The potential water contribution for the binding is only included in the final docking pose if it produces an increase in the predicted scoring, and the hydrogen bond network is optimized (option *toogle trans_spin 2* in GOLD). Additionally, the two rotamers of Asn$^{6.55}$ were also taken into consideration using the *assemble structure* option in GOLD. The criterion for the selection of docking poses was based on a combination of the Chemscore ranking and the population (convergence) of the solutions according to a clustering criteria of 1 Å.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00138.

Experimental details, biological data and curves obtained during functional assays (PDF)

Molecular formula strings (CSV)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*For E.S.: phone, +34 881815732; fax, +34-881815702; E-mail, e.sotelo@usc.es.

*For H.G.d.-T.: phone, +46184715056; E-mail, hugo.gutierrez@icm.uu.se.

ORCID

Eddy Sotelo: 0000-0001-5571-2812

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by the Consellería de Cultura, Educación e Ordenación Universitaria of the Galician Government (grant GPC2014/03), Centro Singular de Investigación de Galicia accreditation 2016−2019 (ED431G/09) and the European Regional Development Fund (ERDF), the Swedish Research Council (grant 521-2014-2118), and by the Swedish strategic research program eSSENCE. The

computations were performed on resources provided by the Swedish National Infrastructure for Computing (SNIC). Our laboratories are part of the European COST Action CM1207 (GLISTEN).

DEDICATION

Dedicated to the memory of Professor Antonio Espinosa Úbeda (Granada University, Spain).

ABBREVIATIONS USED

ARs, adenosine receptors; GPCRs, G protein-coupled receptors; $A_{2B}R$, human A_{2B} adenosine receptors; $A_{2A}R$, human A_{2A} adenosine receptors; SAR, structure−activity relationships; MCR, multicomponent reaction; MD, molecular dynamics; CHO cells, Chinese hamster ovary cells; c-AMP, cyclic adenosine monophosphate; SEM, standard error of the mean; HPLC, high performance liquid chromatography; NOE, nuclear Overhauser effect; CD, circular dichroism; PDB, Protein Data Bank; RMSD, root mean square deviation

REFERENCES

(1) Fredholm, B. B.; Arslan, G.; Halldner, L.; Kull, B.; Schulte, G.; Wasserman, W. Structure and function of adenosine receptors and their genes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2000**, *362*, 364−374.

(2) Murphree, L. J.; Linden, J. Adenosine receptors. *Encycl. Biol. Chem.* **2004**, *1*, 34−39.

(3) Fredholm, B. B.; IJzerman, A. P.; Jacobson, K. A.; Linden, J.; Müller, C. E. Nomenclature and classification of adenosine receptors − An update. *Pharmacol. Rev.* **2011**, *63*, 1−34.

(4) *Adenosine Receptors in Health and Disease*; Handbook of Experimental Pharmacology; Wilson, C. N., Mustafa, S. J., Eds.; Springer: Berlin, 2009; Vol. *193*.

(5) Baraldi, P. G.; Tabrizi, M. A.; Gessi, S.; Borea, P. A. Adenosine receptor antagonists: translating medicinal chemistry and pharmacology into clinical utility. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 238−263.

(6) Jacobson, K. A.; Gao, Z. G. Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2006**, *5*, 247−264.

(7) Müller, C. E.; Jacobson, A. J. Recent developments in adenosine receptor ligands and their potential as novel drugs. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2011**, *1808*, 1290−1308.

(8) Pierce, K. D.; Furlong, T. J.; Selbie, L. A.; Shine, J. Molecular cloning and expression of an adenosine A_{2B} receptor from human brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, *187*, 86−93.

(9) Gessi, S.; Varani, K.; Merighi, S.; Cattabriga, E.; Pancaldi, C.; Szabadkai, Y.; Rizzuto, R.; Klotz, K. N.; Leung, E.; Mac Lennan, S.; Baraldi, P. G.; Borea, P. A. Expression, pharmacological profile and functional coupling of A_{2B} receptors in a recombinant system and in peripheral blood cells using a novel selective antagonist radioligand, [3H]MRE2029-F20. *Mol. Pharmacol.* **2005**, *67*, 2137−2147.

(10) Feoktistov, I.; Biaggioni, I. Adenosine A_{2B} receptors. *Pharmacol. Rev.* **1997**, *49*, 381−402.

(11) Popoli, P.; Pepponi, R. Potential therapeutic relevance of adenosine A_{2B} and A_{2A} receptors in the central nervous system. *CNS Neurol. Disord.: Drug Targets* **2012**, *11*, 664−674.

(12) Aherne, C. M.; Kewley, E. M.; Eltzschig, H. K. The resurgence of A_{2B} adenosine receptor signaling. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2011**, *1808*, 1329−1339.

(13) Müller, C. E.; Jacobson, A. J. Recent developments in adenosine receptor ligands and their potential as novel drugs. *Biochim. Biophys. Acta, Biomembr.* **2011**, *1808*, 1290−1308.

(14) Kalla, R. V.; Zablocki, J. Progress in the discovery of selective, high affinity A_{2B} adenosine receptor antagonists as clinical candidates. *Purinergic Signalling* **2009**, *5*, 21−29.

(15) Jacobson, K. A.; IJzerman, A. P.; Linden, J. 1,3-Dialkylxanthine derivatives having high potency as antagonists at human A_{2B} adenosine receptors. *Drug Dev. Res.* **1999**, *47*, 45−53.

(16) Robeva, A. S.; Woodard, R.; Jin, X.; Gao, Z.; Bhattacharya, S.; Taylor, H. E.; Rosin, D. L.; Linden, J. Molecular characterization of recombinant human adenosine receptors. *Drug Dev. Res.* **1996**, *39*, 243−252.

(17) Hayallah, A. M.; Sandoval-Ramirez, J.; Reith, U.; Schobert, U.; Preiss, B.; Schumacher, B.; Daly, J. W.; Müller, C. E. 1,8-Disubstituted xanthine derivatives: synthesis of potent A_{2B} selective adenosine receptor antagonists. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1500−1510.

(18) Kim, Y. C.; Ji, X.; Melman, N.; Linden, J.; Jacobson, K. A. Anilide derivatives of an 8-phenylxanthine carboxylic congener are highly potent and selective antagonists at human A2B adenosine receptors. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 1165−1172.

(19) Kalla, R. V.; Elzein, E.; Perry, T.; Li, X.; Gimbel, A.; Yang, M.; Zeng, D.; Zablocki, J. Selective, high affinity A_{2B} adenosine receptor antagonists: N-1 monosubstituted 8-(pyrazol-4-yl)xanthines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 1397−1401.

(20) Carotti, A.; Cadavid, M. I.; Centeno, N. B.; Esteve, C.; Loza, M. I.; Martínez, A.; Nieto, R.; Ravina, E.; Sanz, F.; Segarra, V.; Sotelo, E.; Stefanachi, A.; Vidal, B. Design, synthesis, and structure-activity relationships of 1-,3-,8-, and 9-substituted-9-deazaxanthines at the human A_{2B} adenosine receptor. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 282−299.

(21) Stefanachi, A.; Brea, J. M.; Cadavid, M. I.; Centeno, N. B.; Esteve, C.; Loza, M. I.; Martínez, A.; Nieto, R.; Ravina, E.; Sanz, F.; Segarra, V.; Sotelo, E.; Vidal, B.; Carotti, A. 1-, 3- and 8-substituted-9-deazaxanthines as potent and selective antagonists at the human A_{2B} adenosine receptor. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 2852−2869.

(22) Vidal, B.; Nueda, A.; Esteve, C.; Domenech, T.; Benito, S.; Reinoso, R. F.; Pont, M.; Calbet, M.; López, R.; Cadavid, M. I.; Loza, M. I.; Cardenas, A.; Godessart, N.; Beleta, J.; Warrellow, G.; Ryder, H. Discovery and characterization of 4′-(2-Furyl)-N-pyridin-3-yl-4,5′-bipyrimidin-2′-amine (LAS38096), a potent, selective, and efficacious A_{2B} adenosine receptor antagonist. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2732−2736.

(23) Stewart, M.; Steinig, A. G.; Ma, C.; Song, J. P.; McKibben, B.; Castelhano, A. L.; MacLennan, S. J. [^{3}H]OSIP339391, A selective, novel, and high affinity antagonist radioligand for adenosine A_{2B} receptors. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *68*, 305−312.

(24) Pastorin, G.; Da Ros, T.; Spalluto, G.; Deflorian, F.; Moro, S.; Cacciari, B.; Baraldi, P. G.; Gessi, S.; Varani, K.; Borea, P. A. Pyrazolo[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine derivatives as adenosine receptor antagonists. Influence of the N5 substituent on the affinity at the human A_3 and A_{2B} adenosine receptor subtypes: A molecular modeling investigation. *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 4287−4296.

(25) Crespo, A.; El Maatougui, A.; Biagini, P.; Azuaje, J.; Coelho, A.; Brea, J.; Loza, M. I.; Cadavid, M. I.; García-Mera, X.; Gutiérrez-de-Terán, H.; Sotelo, E. Discovery of 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones as a novel class of potent and selective A_{2B} adenosine receptor antagonists. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 1031−1036.

(26) El Maatougui, A.; Azuaje, J.; González-Gómez, M.; Miguez, G.; Crespo, A.; Carbajales, C.; Escalante, L.; García-Mera, X.; Gutiérrez de Terán, H.; Sotelo, E. Discovery of potent and highly selective A_{2B} adenosine receptor antagonist chemotypes. *J. Med. Chem.* **2016**, *59*, 1967−1983.

(27) *Multicomponent Reactions*; Zhu, J., Bienayme, H., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2005.

(28) Hulme, R.; Zamora, O. D. P.; Mota, E. J.; Pastén, M. A.; Contreras-Rojas, R.; Miranda, R.; Valencia-Hernández, J.; Correa-Basurto, J.; Trujillo-Ferrara, J.; Delgado, F. Cyanamide: a convenient building block to synthesize 4-aryl-2-cyanoimino-3,4-dihydro-1*H*-pyrimidine systems via a multicomponent reaction. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 3372−3380.

(29) Yaziji, V.; Rodríguez, D.; Gutiérrez-de-Terán, H.; Coelho, A.; Caamaño, O.; García-Mera, X.; Brea, J.; Loza, M. I.; Cadavid, M. I.; Sotelo, E. Pyrimidine derivatives as potent and selective A_3 adenosine antagonists. *J. Med. Chem.* **2011**, *54*, 457−471.

(30) Gutiérrez-de-Terán, H.; Sallander, J.; Sotelo, E. Structure-based rational design of adenosine receptor ligands. *Curr. Top. Med. Chem.* **2017**, *17*, 40−58.

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00138
J. Med. Chem. 2017, 60, 3372−3382

(31) Jaakola, V. P.; Griffith, M. T.; Hanson, M. A.; Cherezov, V.; Chien, E. Y.; Lane, J. R.; IJzerman, A. P.; Stevens, R. C. The 2.6 angstrom crystal structure of a human A_{2A} adenosine receptor bound to an antagonist. *Science* **2008**, *322*, 1211−1217.
(32) Liu, W.; Chun, E.; Thompson, A. A.; Chubukov, P.; Xu, F.; Katritch, V.; Han, G. W.; Roth, C. B.; Heitman, L. H.; IJzerman, A. P.; Cherezov, V.; Stevens, R. C. Structural basis for allosteric regulation of GPCRs by sodium ions. *Science* **2012**, *337*, 232−236.
(33) Lacotte, P.; Buisson, D. A.; Ambroise, Y. Synthesis, evaluation and absolute configuration assignment of novel dihydropyrimidin-2-ones as picomolar iodide symporter inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *62*, 722−727.
(34) Uray, G.; Verdino, P.; Belaj, F.; Kappe, C. O.; Fabian, W. M. F. Absolute configuration in 4-alkyl- and 4-aryl-3,4-dihydropyrimidinones: a combined theoretical and experimental investigation. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 6685−6694.
(35) Krenn, W.; Verdino, P.; Uray, G.; Faber, K.; Kappe, C. O. Determination of absolute configuration in 4-aryl-3,4-dihydro-2(1*H*)-pyrimidones by high performance liquid chromatography and cd spectroscopy. *Chirality* **1999**, *11*, 659−662.
(36) Cheng, Y. C.; Prusoff, W. E. Relationship between the inhibition constant (K1) and the concentration of inhibitor which causes 50% inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochem. Pharmacol.* **1973**, *22*, 3099−3108.
(37) Leff, P.; Dougall, I. G. Further concerns over Cheng-Prusoff analysis. *Trends Pharmacol. Sci.* **1993**, *14*, 110−112.
(38) Gutiérrez-de-Terán, H.; Keranen, H.; Azuaje, J.; Åqvist, J.; Sotelo, E. In *G-Protein Coupled Receptor Screening Assays*; Methods in Molecular Biology; Walker, J. M., Ed.; Springer: Clifton, NJ, 2015; Vol. *1272*, pp 271−291.
(39) Sali, A.; Blundell, T. L. Comparative protein modeling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 779−815.
(40) *Maestro*, version 9.8; Schrödinger, LLC: New York, 2009.
(41) Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Taylor, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **2003**, *52*, 609−623.
(42) Azuaje, J.; Carbajales, C.; González-Gómez, M.; Coelho, A.; Caamaño, O.; Gutiérrez-de-Terán, H.; Sotelo, E. Pyrazin-2(1*H*)-ones as a novel class of selective A_3 adenosine receptor antagonists. *Future Med. Chem.* **2015**, *7*, 1373−1380.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00138
J. Med. Chem. 2017, 60, 3372−3382

SUPPORTING INFORMATION

Enantiospecific Recognition at the A_{2B} Adenosine Receptor by Alkyl 2-Cyanoimino-4-substituted-6-methyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylates

Carlos Carbajales,[1,2] Jhonny Azuaje, [1,2] Ana Oliveira,[4] María I. Loza,[3] José Brea,[3] María I. Cadavid,[3] Christian F. Masaguer,[2] Xerardo García-Mera,[2] Hugo Gutiérrez-de-Terán[4*] and Eddy Sotelo[1,2*]

[1]Centro Singular de Investigación en Química Biolóxica e Materiais Moleculares (CIQUS), [2]Departamento de Química Orgánica, Facultade de Farmacia. Universidade de Santiago de Compostela, 15782. Santiago de Compostela, Spain. [3]Centro Singular de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CIMUS). Universidade de Santiago de Compostela, 15782. Santiago de Compostela, Spain. [4]Department of Cell and Molecular Biology, Uppsala University, Uppsala SE-75124.

TABLE OF CONTENTS

Pharmacology…….. S1

Stereochemistry……..……. S2

Computational Models ...……. S3

References…… S4

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Pharmacology. Functional Experiments. cAMP Assays. These assays were performed at adenosine receptors transfected using a cAMP einzymeimmunoassay kit (Amersham Biosciences) following previously described protocols.[1,2] HEK-293 cells were seeded (10000 cells/well) in 96-well culture plates and incubated at 37ºC in an atmosphere with 5% CO_2 in Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 (EMEM F-12), containing 10% Foetal Calf Serum (FCS) and 1% L-Glutamine. Cells were washed 3x with 200 µl assay medium (EMEM-F12 and 25 mM HEPES pH=7.4) and pre-incubated with assay medium containing 30 µM rolipram and test compounds at 37ºC for 15 min. 10 µM NECA was incubated for 15 min at 37ºC (total incubation time 30 min). Reaction was stopped with lysis buffer supplied in the kit and the einzymeimmunoassay was carried out for detection of intracellular cAMP at 450 nm in an Ultra Evolution detector (Tecan).

	% Emax NECA 10µM			
Concentration	**16b**		**ZM241385**	
1,00E-04	2,260258	6,265102	0	0
1,00E-05	24,94936	32,17421	0,0	0,0
1,00E-06	62,01891	57,96759	6,0	6,7
1,00E-07	63,70695	65,93518	50,1	65,1
1,00E-08	82,74815	98,34571	65,6	83,0
1,00E-09	93,7002	100,844	94,1	104,5
1,00E-10	100,1688	100,956	96,5	103,5
Kb	**116,01 nM**		**8,7 nM**	

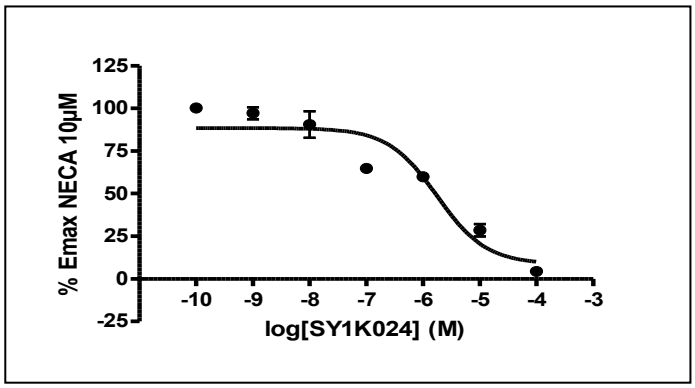


Figure S1. Functional experiments employing **16b**: Concentration-response curve obtained for **16b** over 10 µM NECA-elicited cAMP formation.

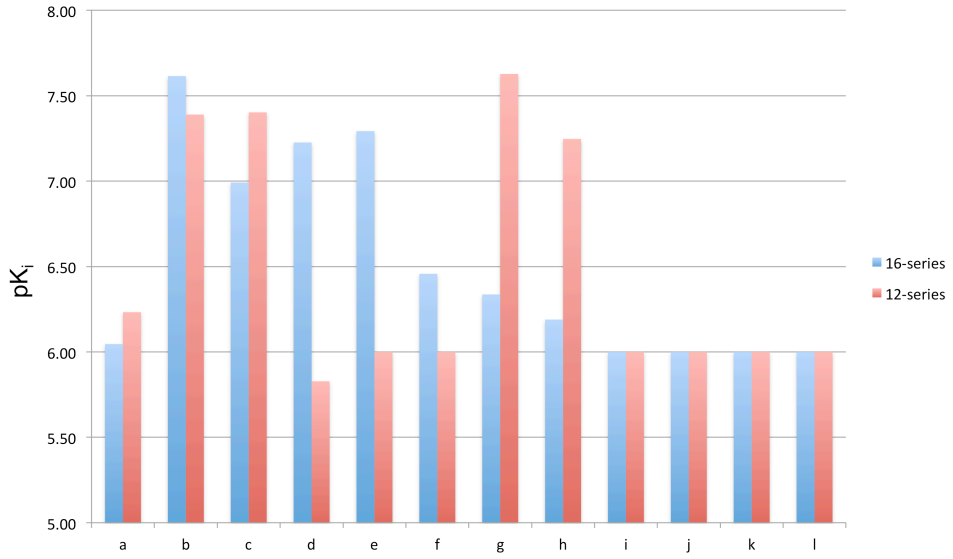


Figure S2: Comparison of the binding affinities of scaffolds **12** (red) and **16** (blue), where compounds were paired on the basis of the equivalence of substituents at positions 4 and 5.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

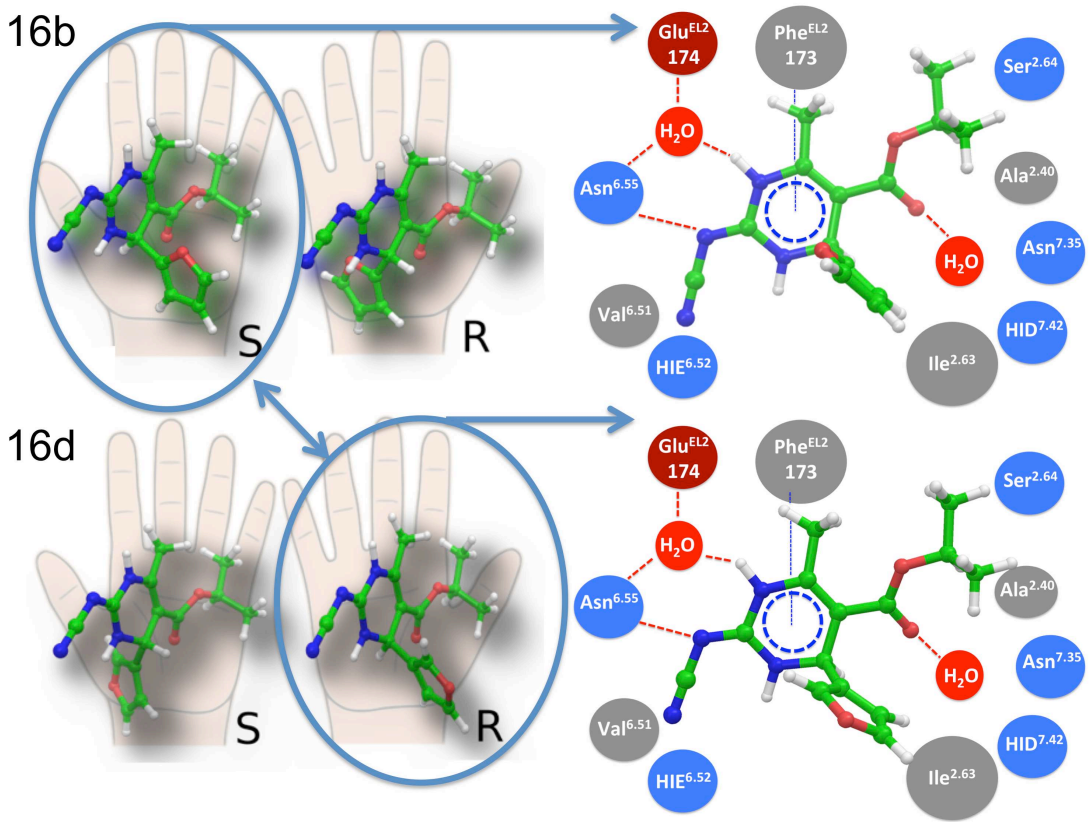


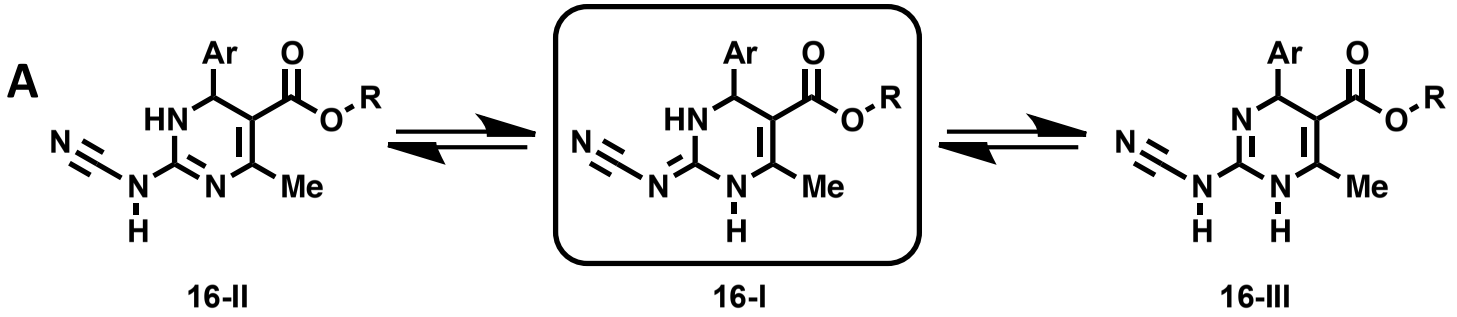
Figure S3: Topological equivalence of stereoisomers. Compounds **16b** (top) and **16d** (bottom) have converse assignation of R and S stereoisomery for topologically equivalent isomers. The interactions with the receptor of the topologically equivalent isomers to that experimentally verified as the active enantiomer [*(S)*-**16b**] are highlighted.

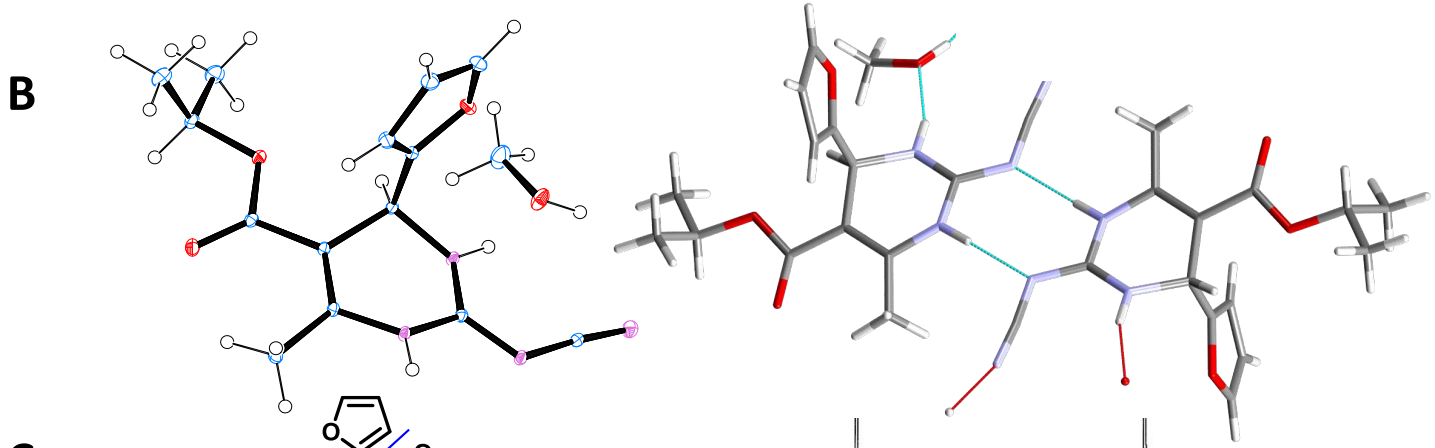
References:

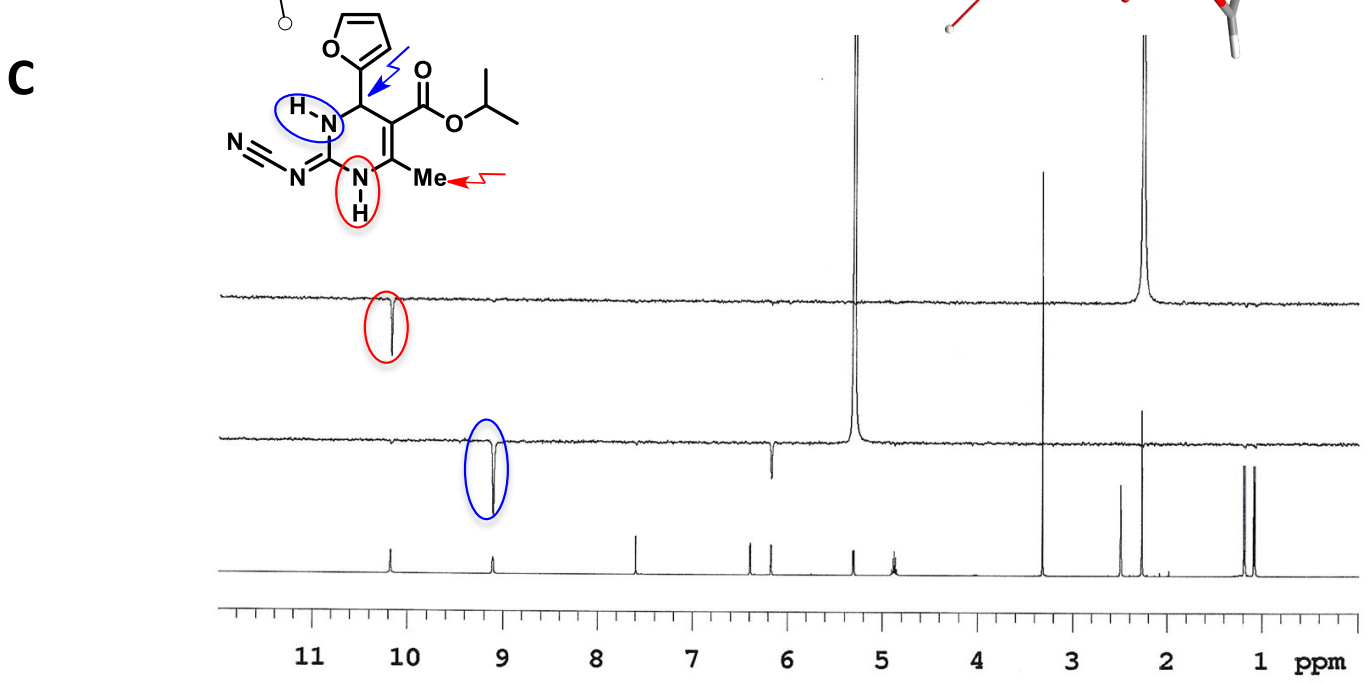
(1) Crespo, A. El Maatougui, A. Biagini, P. Azuaje, J. Coelho, A. Brea, J. Loza, M. I. Cadavid, M. I. García-Mera, X. Gutiérrez-de-Terán, H. Sotelo, E. Discovery of 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ones as a novel class of potent and selective A_{2B} adenosine receptor antagonists. *ACS Med. Chem. Lett*. **2013**, *4*, 1031–1036.

(2) Vidal, B. Nueda, A. Esteve, C. Domenech, T. Benito, S. Reinoso, R. F. Pont, M. Calbet, M. López, R. Cadavid, M. I. Loza, M. I. Cardenas, A. Godessart, N. Beleta, J. Warrellow, G. Ryder, H. Discovery and characterization of 4'-(2-Furyl)-N-pyridin-3-yl-4,5'-bipyrimidin-2'-amine (LAS38096), a potent, selective, and efficacious A_{2B} adenosine receptor antagonist. *J. Med. Chem*. **2007**, *50*, 2732–2736.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA


A
Ar
O
R
HN
N
N
Me
H
16-II
16-I
16-III


B


C
O
H
N
N
N
H
Me
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
ppm

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

El trabajo experimental desarrollado durante el periodo de esta Tesis que forma parte de esta memoria abarca aproximadamente siete años. Durante este periodo, he trabajado además en otros proyectos y publicado, consecuentemente, otros artículos que no aparecen recogidos en esta memoria, ya que no están directamente relacionados con los dos ejes fundamentales temáticos y el contexto de esta Tesis: Reacciones Multicomponente y su aplicación en cáncer.

Desde mis comienzos en los Laboratorios de la Facultad de Farmacia de la USC hasta la etapa final de mis investigaciones, desarrolladas en el CIQUS (Centro de Investigaciones Biológicas y Materiales Moleculares) me planteé, como temática genérica, el estudio de la aplicación de las reacciones multicomponente a procesos de descubrimiento de nuevos fármacos. Como se ha comentado previamente en la parte metodológica, el grupo Combiomed venía llevando a cabo desde hacía años la aplicación de una filosofía basada en la aplicación de procesos de síntesis de fármacos de alta eficacia (*High Throughput Synthesis*) en diferentes proyectos de investigación. Podríamos decir que históricamente el grupo comenzó la aplicación de este tipo de filosofía mediante la implementación de reacciones de tipo *one pot* y en general, funcionalizaciones consecutivas principalmente en diferentes series de azinonas (sobre todo piridazinonas). Posteriormente se aplicaron técnicas propias de la Química Combinatoria tales como la aplicación de reactivos soportados en química en disolución (SPOS) y en general, el trabajo con resinas y polímeros diversos, empleando sintetizadores orgánicos robóticos más propios de la industria que del ámbito académico. En esos años, el grupo comenzó diferentes investigaciones encaminadas a la búsqueda de moléculas que modulasen los receptores de adenosina, fruto de una estrecha colaboración con la Doctora María Isabel Loza y Doña María Isabel Cadavid. Las primeras series de compuestos fueron preparadas por una de las reacciones más ampliamente empleadas en el grupo: las reacciones de Biginelli. Con el paso del tiempo, el grupo adquirió en todos estos años un amplio conocimiento sobre la modulación de los receptores de adenosina. También en esos años se comenzaron las investigaciones sobre RMCs con isonitrilos. Posteriormente y a medida que los laboratorios estuvieron mejor equipados gracias a la concesión de sucesivos proyectos, y sobre todo en las nuevas instalaciones que ofrecía el CIQUS, se ampliaron los procedimientos multicomponente y su aplicación a diferentes ámbitos, como por ejemplo herramientas farmacológicas tales como ligandos fluorescentes para aplicación en el sistema nervioso central. Este proyecto se enmarca en ese comienzo, con la experimentación con las RMC basadas en isonitrilos.

En lo que sigue, discutiré los aspectos más significativos de cada trabajo publicado y en particular su significado en el conjunto de esta Tesis. Las conexiones o puntos en común entre ellos, así como las dificultades con las que me enfrenté, ya fueren en las condiciones de optimización de las síntesis, la caracterización de compuestos o la interpretación de los resultados de actividad farmacológica para establecimiento de las Relaciones Estructura Actividad (REA), aspectos que frecuentemente no aparecen detallados en las publicaciones científicas por razones de brevedad y/o espacio.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.1 CAPÍTULO I: REACCIONES MULTICOMPONENTE EN DESCUBRIMIENTO DE FÁRMACOS ANTIMITÓTICOS (PUBLICACIÓN 1)

5.1.1 Objetivo específico del trabajo

El primer trabajo de esta Memoria consistió en una revisión del estado del arte en materia de antimitóticos y más específicamente aquellos obtenidos mediante reacciones multicomponente.

La publicación forma parte de un volumen especial de la revista *Current Topics in Medicinal Chemistry* dedicado a agentes antimitóticos titulado: "*Thematic Issue: Structure-Based Drug Design and Combinatorial Chemistry in the Search of Antimitotic Agents*" y que recoge otros nueve artículos centrados en agentes antimitóticos.

Aunque esta revisión fue escrita una vez que ya se habían comenzado nuestras investigaciones sobre la diana KSP en materia de síntesis de compuestos, el objetivo de este trabajo fue asentar y ampliar los conocimientos sobre esta temática, principalmente en lo relativo al empleo de procedimientos sintéticos basados en reacciones multicomponente.

La revisión analiza una metodología que continúa siendo emergente: el desarrollo y la aplicación de reacciones multicomponente (RMC). Sin embargo, las RMC son ahora una parte integral ya consolidada del trabajo de cualquier unidad de investigación médica industrial o académica. Dentro de la investigación en Química Farmacéutica centrada en cáncer, los enfoques de RMC dirigidas, centradas en dianas antimitóticas específicas, brindan nuevas soluciones para la química médica del siglo XXI. En esta revisión se discute, por lo tanto, desde un punto de vista químico-farmacológico la contribución de estos procedimientos al descubrimiento de fármacos antimitóticos que se encontraban en esos momentos en ensayos clínicos. La revisión se centra en las rutas sintéticas empleadas para obtener diferentes familias de fármacos antimitóticos.

5.1.2 Fuentes de información empleadas

Las principales bases de datos empleadas fueron PubMed®[114] y sobre todo Scifinder®[115]. Como fuente de información estructural se consultó también la base de datos del Protein Data Bank[116], para el acceso a estructuras cristalográficas.

5.1.3 Aspectos más destacables comentados en la revisión

El artículo comienza explicando la importancia de la mitosis en el proceso de división celular, en el contexto del cáncer. Se hace hincapié en el nuevo concepto de terapia dirigida y la necesidad de herramientas farmacológicas específicas, particularmente, moléculas inhibidoras de diferentes proteínas clave en el escenario de la mitosis (quinasas Aurora, Polo, quinesinas como CENP-E, KSP, etc). La intervención sobre estas dianas pretende resolver los problemas asociados al uso de los antimitóticos clásicos. Particularmente, la neurotoxicidad inducida por fármacos muy establecidos en la terapia anticáncer (como los taxanos o los alcaloides de la Vinca) que es consecuencia

directa de su mecanismo de acción, ya que estos fármacos actúan directamente sobre los dímeros de tubulina que constituyen los microtúbulos que componen el huso mitótico. Estas dianas a las que me he referido anteriormente llamadas “nuevos antimitóticos” se contraponen a los “antimitóticos clásicos” o venenos mitóticos. La continuidad en el uso de antimitóticos clásicos como los "taxanos" y las "vincas" a pesar del desarrollo de nuevos fármacos antimitóticos se puede considerar paradójica desde ciertos puntos de vista. Sin embargo, hay varias razones que explican por qué estos antimitóticos clásicos siguen siendo utilizados en la clínica. Esto es principalmente debido a su efectividad en comparación con los resultados relativamente pobres obtenidos en ensayos clínicos por los nuevos fármacos antimitóticos que actúan en nuevos targets mitóticos (AUK, Polo y otras quinasas como Bub-R1, Mad-2, CDK-1, etc). Por este motivo, se ha especulado que el éxito de los venenos de microtúbulos (taxanos, vincas, etc) podría deberse a su capacidad para apuntar a funciones no mitóticas de los microtúbulos.

La revisión se centra, a continuación, en los procedimientos basados en la utilización de las reacciones multicomponente en la síntesis de estructuras biológicamente muy relevantes como antimitóticos, poniendo especial énfasis en las estructuras químicas generadas a partir de los building blocks apropiados. Es destacable las síntesis para la variación estructural del antimitótico Tubulisina. Las tubulisinas se encuentran entre los agentes antimitóticos más potentes conocidos hasta la fecha, con una actividad citotóxica extraordinariamente alta, que también se extiende a líneas celulares resistentes a múltiples fármacos. Estos tetrapéptidos inusuales interfieren en el funcionamiento del huso de los microtúbulos y fueron aislados por primera vez por el grupo de Höofle a partir de caldos de cultivo de mixobacterias. Tal y como se describe en el artículo, Wessjohann y colaboradores sintetizaron análogos de productos naturales de tubulisina (llamados tubugis) mediante una combinación de tres tipos diferentes de reacciones multicomponente (Ugis) basadas en isonitrilos.

El artículo repasa también la aplicación de reacciones multicomponente para la generación de análogos de la colchicina, otro compuesto antimitótico. Otros procedimientos destacables son los llevados a cabo para la síntesis de análogos de la combrestatina de tipo benzo[*b*]furanos, activos sobre el sitio de unión de la Colchicina, así como análogos del *S*-Monastrol (primer inhibidor de la KSP) descritas por Kappe, o el Ispinesib (potente inhibidor de KSP en estudios clínicos), cuya ruta fue acortada mediante una reacción multicomponente descrita por Cesare Tron. Este trabajo describe una síntesis alternativa a metodologías sintéticas más complejas empleados por la industria farmacéutica para la preparación de ispinesib racémico, mediante una ruta abreviada en pocos pasos, de esta molécula. Este trabajo nos inspiró y nos proporcionó ideas para la configuración del artículo descrito en el capítulo 3 de esta memoria.

La revisión aborda también un concepto capital que desarrollo en la Tesis: La aplicación de RMCs y el empleo de herramientas computacionales para un Diseño basado en la estructura (*Structure Based Drug Design*, SBDD). A primera vista, podría pensarse que las RMC y el SBDD son dos herramientas algo contradictorias, porque mientras las primeras tienen como objetivo la síntesis de grandes colecciones de moléculas (Las RMC pueden producir potencialmente millones de compuestos, más de lo deseado o útil por síntesis paralela), el SBDD intenta seleccionar pocas moléculas que sean activas en un objetivo en cuestión. Las limitaciones y fortalezas del SBDD y las RMCs son complementarias.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.1.4 Conclusiones específicas en el marco de la Tesis

Este trabajo bibliográfico sirvió como un importante análisis del conocimiento sobre el tema específico en el cual estaba desarrollando mi trabajo experimental. Los procedimientos sintéticos recopilados en esta revisión bibliográfica del año 2014, sirvieron de ayuda e inspiración para el diseño de nuevas rutas sintéticas aplicables a nuestro proyecto concreto, centrado en la síntesis de series de bencimidazoles diversamente decorados y que componen los capítulos II y III de esta memoria.

Hoy en día la aplicación de técnicas de inteligencia artificial (IA) en el diseño de moléculas "a la carta" es un campo en crecimiento en la investigación de fármacos y la química computacional. Estas técnicas se utilizan para acelerar y optimizar el proceso de diseño de moléculas específicas para objetivos terapéuticos. Por este motivo, existe un interesante campo de aplicación para el químico farmacéutico en este campo, ya que dispone de los conocimientos sintéticos necesarios para conceptualizar las moléculas objetivo y por otro lado conoce la naturaleza de las interacciones fármaco-proteína que busca, y en general, posee un conocimiento de la biología de la diana en cuestión.

Por último, la actualización de la información sobre el estado del arte relativo, particularmente constatando la intensidad de investigación que se estaba llevando a cabo por parte de muchos grupos nos confirmó la relevancia y el interés de estas dianas antimitóticas, particularmente la quinesina KSP.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.2 CAPÍTULO II: DISEÑO BASADO EN LA ESTRUCTURA DE NUEVOS INHIBIDORES DE KSP-EG5 ASISTIDO POR UNA REACCIÓN MULTICOMPONENTE DIRIGIDA (PUBLICACIÓN 2)

5.2.1 Objetivo específico del trabajo

El objetivo y el planteamiento general del segundo trabajo de esta Tesis constituyó un desafiante ejercicio desde el punto de vista químico farmacéutico: realizar un diseño racional *de novo* de nuevas quimiotecas de moléculas originales, específicamente dirigidas hacia un determinado sitio de unión de una diana concreta, implicada en un proceso tumoral, empleando RMCs. En este proyecto inicial, se buscó pues, la adaptabilidad de un procedimiento químico multicomponente a la topología de una determinada diana antitumoral. Este proceso requeriría no solamente la elección adecuada del tipo de reacción multicomponente adaptada sino también un adecuado proceso de modificación estructural (por ejemplo, procesos de ciclación de aductos) de los productos generados por ella en los productos finales. La búsqueda de dianas tumorales de interés y relevancia nos hizo estudiar diferentes alternativas entre diversas dianas tumorales (principalmente quinasas Aurora o Polo o quinesinas). Por las características señaladas en el capítulo anterior, relativas al interés generado por los oncólogos hacia la diana KSP, y aprovechando las oportunidades derivadas de la información cristalográfica disponible, se inició una investigación sobre esta quinesina mitótica en particular.

La adaptabilidad del procedimiento químico a la diana en cuestión a la que antes me he referido, tuvo en consideración la disponibilidad de los reactivos en cuestión, para lograr una decoración final adecuada a la topología de la diana, por ejemplo, complementando zonas polares o hidrofóbicas con el ligando (complementariedad química). Al mismo tiempo, se intentó un diseño racional en el cual las distancias y geometrías en el ligando se complementasen en tamaño y forma con el sitio de unión de la diana KSP (complementariedad geométrica). Por lo tanto, el planteamiento fundamental consistió en un enfoque multidisciplinar integrado que combinó:

a) Diseño de fármacos basado en la estructura (SBDD).
b) Aproximación sintética basada en la aplicación de las Reacciones multicomponente (específicamente para este proyecto, las reacciones de Ugi).
c) Caracterización funcional en enzimas. Realización de ensayos celulares para el descubrimiento de nuevos inhibidores de la proteína del huso mitótico, la quinesina (KSP), con actividad antiproliferativa.

Mi contribución específica este trabajo experimental se centró en:

- Desarrollo del procedimiento químico (empleando reacciones multicomponente) de preparación de una quimioteca dirigida.
- Síntesis, purificación y caracterización estructural de los compuestos sintetizados (RMN, masas, etc).
- Interpretación de los resultados de relación estructura-actividad (REA) antitumoral preliminar de estas series.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

A continuación, se detallan aspectos importantes del trabajo publicado, que merecen ser destacados y que contextualizan su aplicación y explicación en el marco de esta Tesis.

5.2.2 Desarrollo experimental

5.2.2.1 Diseño de una quimioteca de ligandos de tipo bencimidazol a partir de la observación de la estructura de la diana KSP. Diseño computacional

El punto de partida del diseño de la síntesis multicomponente se basó en una serie de ligandos estructuralmente emparentados y que interaccionan sobre la diana KSP en un sitio alostérico. En particular: el S-monastrol,[117] (Figura 5.2.2.1, a) primer inhibidor descrito para esta diana. La moderada actividad (IC_{50} de monastrol es de 30 μM frente a KSP ATPasa y de 12,3 a 49,9 μg/ml como potencia celular) y sus propiedades "*no drug*-like" llevaron a los investigadores a modificar su estructura a través de más estudios de optimización del *hit* para encontrar nuevos inhibidores de KSP con mejores potencias celulares y menores efectos secundarios. La STLC[118] (Figura 5.2.2.1, b), más potente que el anterior, es un potente inhibidor KSP de referencia en diversos ensayos. El uso de STLC fue limitado debido a sus pobres propiedades fisicoquímicas y permeabilidad celular reducida. Se estudiaron modificaciones a la estructura STLC a lo largo de los años, pero ninguno de estos derivados ha llegado a ensayos clínicos hasta ahora. A pesar de ello, todavía están en curso investigaciones sobre este compuesto y sus derivados como inhibidores de KSP. También se tuvieron en consideración los ligandos más potentes descritos en ese momento, como un derivado del tiadiazol (ARRY-520)[119] (Figura 5.2.2.1, c) o la pirrolotriazina[120] (Figura 5.2.2.1, d) que dispusiesen de una estructura cristalográfica en el PDB. Como se puede observar en la figura 5.2.2.1, la disposición de estos tres fármacos bastante diferentes entre sí, pero clarifican el tipo de interacciones que pueden establecerse con la diana, por lo que se tomaron como referencia.

En estas series se buscó la interacción hacia los siguientes bolsillos o *pockets*:

a) Un bolsillo "occidental", *Western Pocket,* que consiste esencialmente en una cavidad definida por residuos Trp127, Tyr211 y Pro137,
b) un bolsillo "oriental", *Eastern Pocket,* definido como una grieta interna formada por residuos Leu160, Phe239 y la columna vertebral de Ala218 en el segmento α-helicoidal,
c) un bolsillo menor, *Minor Pocket,* ubicado en el área profunda delimitada por Tyr211 y la columna vertebral de Glu215.

Tomando como referencia la estructura cristalográfica previa (PDB ID: 2GM1) que contiene la pirrolotriazina-1, visualizamos el diseño de nuevos compuestos basados en una estructura de heterociclo planar similar como punto de partida para nuestro programa de inhibidores de KSP. En base a esta información se diseñó un procedimiento experimental que permitiese preparar una arquitectura molecular basada en el núcleo de bencimidazol apropiadamente sustituido, el cual podría proporcionar características similares de acción biológica con respecto a otros heterociclos como quinazolinonas, pirrolidinas, cromonas, que ya habían sido exploradas por otros grupos y compañías farmacéuticas.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

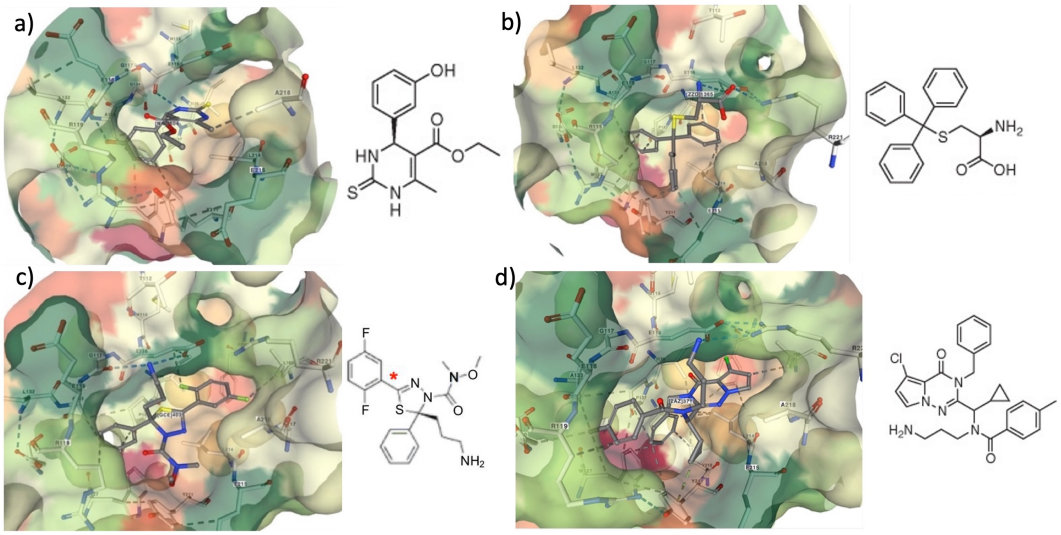
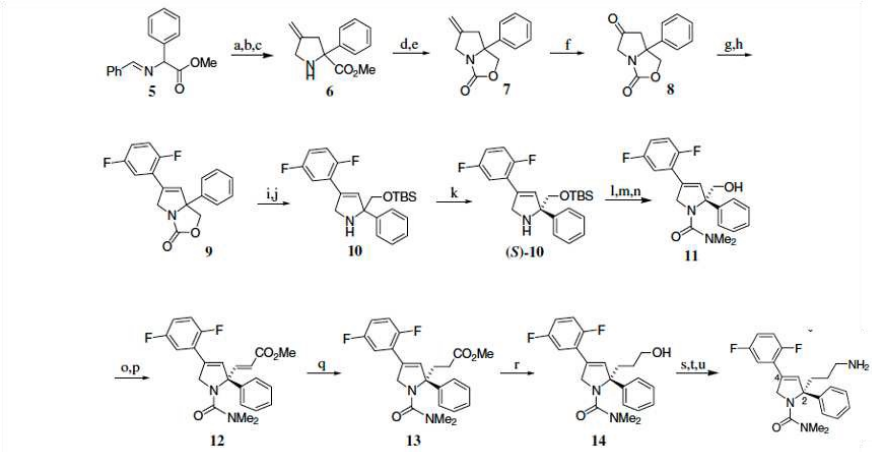


Figura 5.2.2.1a: Representación de los modos de unión y estructuras químicas de los siguientes ligandos en el sitio alostérico L5/a2/a3 de la KSP para a) S-Monastrol, b) STLC, c) Tiadiazol ARRY-520, d) pirrolotriazina-1 (2GM1).

Los estudios basados en la observación de las diferentes estructuras cristalográficas, así como los primeros ensayos de docking iniciales sobre KSP y de diseño computacional fueron realizados por el Dr. Coelho en la Universidad de Padua (Italia) empleando el programa MOE.[121] Posteriormente, a la vez que se iniciaron los preparativos para la síntesis de las primeras series de compuestos en laboratorio se realizó un análisis computacional más detallado de las primeras series. Estas propuestas para síntesis fueron realizadas por el profesor Hugo Gutierrez de Terán (Universidad de Upsala, Suecia), empleando el programa GOLD. En general, estos estudios confirmaron un buen acomodo de la estructura planar (correspondiente al anillo de bencimidazol) en el centro del sitio de unión alostérico objeto de estudio. A partir de aquí, se buscó una interacción favorable mediante el diseño de ligandos basado en la decoración con halógenos en el anillo de bencimidazol para su correcta interacción con el *Eastern pocket* así como residuos hidrofóbicos para su interacción con el *Minor pocket*. Estas interacciones se podrían satisfacer con estructuras de tipo bencimidazol obtenibles por reacción de Ugi con los scaffolds adecuados y posterior ciclación.

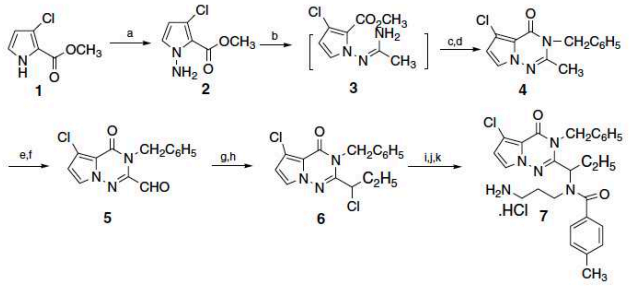
Un análisis exhaustivo de los complejos procesos sintéticos requeridos para obtener inhibidores de KSP como los mostrados en los esquemas de la página siguiente, particularmente los potentes inhibidores pirrólicos de Cox y colaboradores (Esquema 5.2.2.1a)[122]y la Pirrolotriazina-1, (Esquema 5.2.2.1b) revela la síntesis de arquitecturas moleculares exclusivas como principal cuello de botella en la buscar inhibidores de KSP. La pirrolotriazina-1 requiere 11 pasos de síntesis[123] mientras el ispinesib[124,125] es preparado por la industria farmacéutica en al menos 7 (Esquema 5.2.2.1c). Ello nos animó a buscar si cabe con mayor interés, ligandos afines a KSP mediante rutas cortas, empleando las RMC como motor principal de esas rutas. La preparación de estos y otros ejemplos de ligandos similares se muestran en los siguientes esquemas:

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



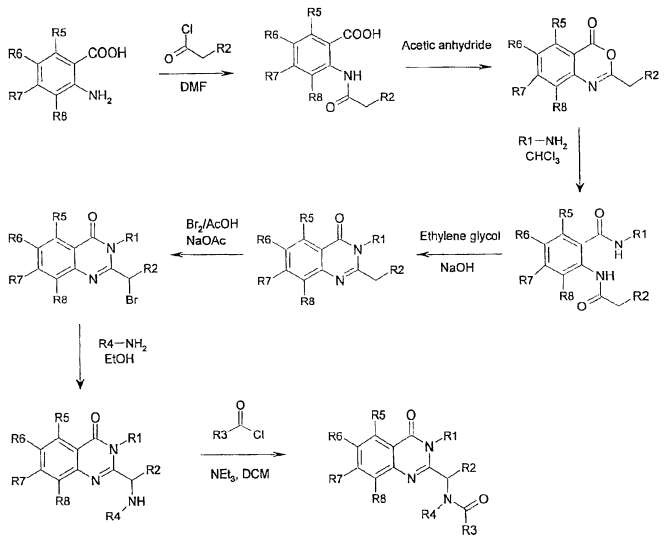
Scheme 1. Reagents and conditions: (a) $ClCH_2C(CH_2)CH_2Cl$, Bu_4NHSO_4, 10 M NaOH, DCM; (b) 1MHCl; (c) Na_2CO_3/H_2O; (d) LAH, THF, 0 °C to rt; (e) CDI, TEA, DCM; (f) O_3, DCM, −78 °C, then DMS (~20% yield from **5**, trituration from acetone); (g) NaHMDS, THF, −78 °C, then $PhN(Tf)_2$; (h) 2,5-difluoroboronic acid, Na_2CO_3, LiCl, $Pd(PPh_3)_4$, DME (64% for 2 steps); (i) 10 M NaOH, EtOH, 60 °C; (j) TBSCl, imidazole, 5% DMF in DCM (96% for 2 steps); (k) Chiralpak AD, 1% iPrOH in hexanes (0.1% DEA as modifier), first isomer to elute is the desired (*S*)-isomer; (l) triphosgene, TEA, THF; (m) $NHMe_2$; (n) HF-TEA, CH_3CN (90% for 3 steps); (o) Dess–Martin Periodinane, DCM (quant); (p) trimethyl phosphonoacetate, NaH, THF (67%); (q) $NiCl_2$, $NaBH_4$, MeOH, 0 °C; (r) $LiBH_4$, 3:1 THF/MeOH (55% from **12**); (s) MsCl, TEA, DCM; (t) NaN_3, DMF, 50 °C; (u) PPh_3, THF, 55 °C, then H_2O (43% for three steps).

Esquema 5.2.2.1a: Ruta sintética para acceder a los inhibidores pirrólicos descritos por Cox y colaboradores.[122]



Scheme 1. Reagents and conditions: (a) 2,4-dinitrophenoxyamine, NaH, DMF, rt; (b) CH_3CN, HCl, dioxane, 82 °C; (c) CH_3CN, Et_3N, 85 °C; (d) Cs_2CO_3, BnBr, dioxane, 95 °C; (e) DMF dimethylacetal, $MgSO_4$, DMF, 146 °C; (f) $NaIO_4$, THF, pH 7 buffer, rt; (g) ethyl magnesiumbromide, CH_2Cl_2, −78 to −50 °C; (h) $SOCl_2$, pyridine, CH_2Cl_2, 0 °C to rt; (i) *N*-Boc-1,3-diaminopropane, EtOH, reflux temp; (j) *p*-toluoyl chloride, Et_3N, CH_2Cl_2, rt; (k) 4 M HCl/dioxane, rt.

Esquema 5.2.2.1b: Síntesis de la pirrolotriazina-1.[123]



Esquema 5.2.2.1c: Síntesis del ispinesib y análogos descritos en la patente.[126]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

La elección de los sustituyentes apropiados para decorar el *scaffold* de bencimidazol se basó en una combinación de dos criterios: la disponibilidad comercial de los reactivos, y la complementariedad de los compuestos diseñados con las tres cavidades que forman el sitio de unión de KSP. La figura 5.2.2.1b muestra los bloques de construcción (*building blocks*) seleccionados para la construcción de la biblioteca virtual, es decir los reactivos a emplear en la Ugi-4C, necesarios para la generación de benzimidazoles adecuadamente funcionalizados. La Figura también muestra el modo de unión común propuesto identificado para los 18 compuestos programados para síntesis en laboratorio, que se encontró en todos los casos dentro del 10% superior de poses puntuadas según lo ofrecido por el programa GOLD. Es decir, un alto grado de consenso en cuanto al modo de unión. Esta figura muestra consistentemente el isómero S en el centro quiral de la alquilamida, pero sin embargo no se observaron diferencias significativas en la "*binding pose*" o "pose cristalográfica" común en experimentos de docking separados realizados con los isómeros *R* y *S* (datos no mostrados).

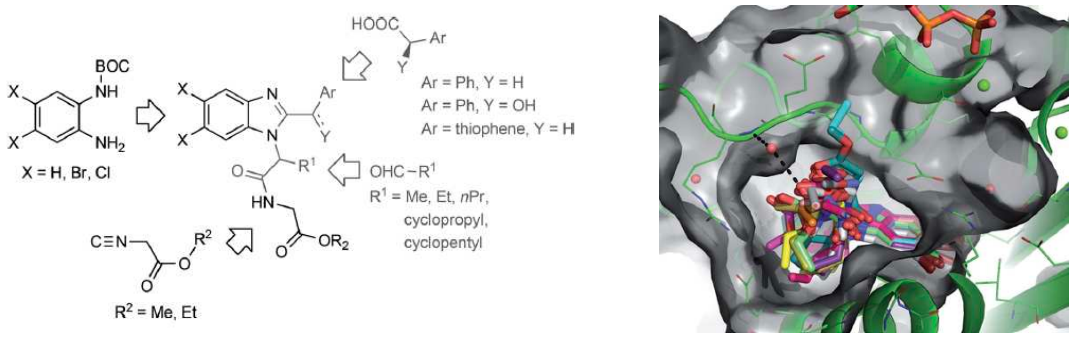


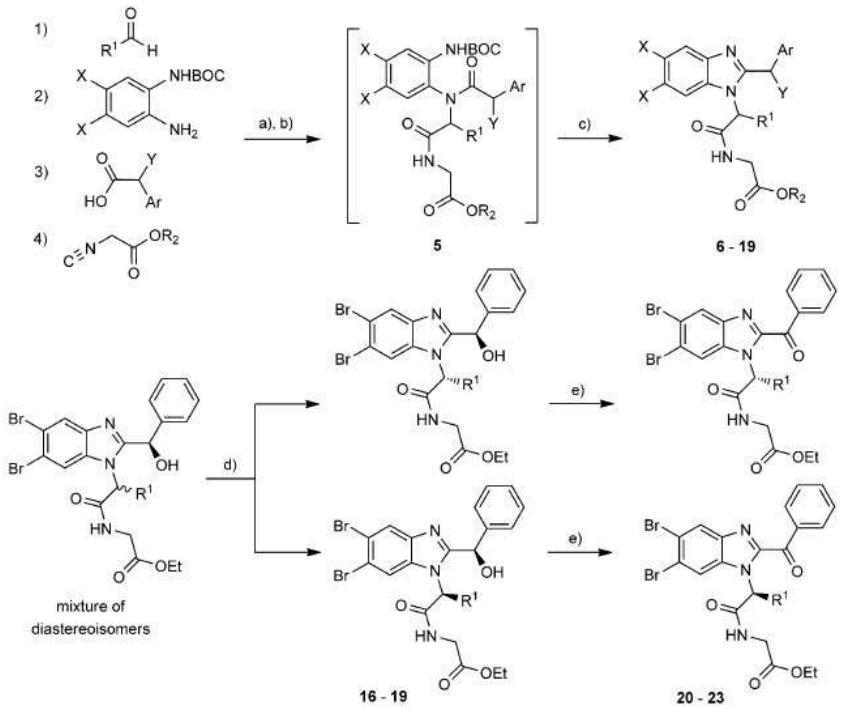
Figura 5.2.2.1b: Building blocks empleados en la U-4CR y modo de unión previsto por GOLD.

5.2.2.2 Síntesis química: Aplicación de las reacciones de Ugi dirigidas al sitio de unión alostérico Eg5 de la KSP

La preparación de las series de bencimidazoles se muestra en el esquema 5.2.2.2 y se sintetizaron por medio de una condensación tipo cuatro componentes de Ugi (reacción Ugi-4C), altamente eficiente y versátil y la subsiguiente remoción/ciclación del grupo protector Boc. Se emplearon una variedad de aldehídos alifáticos 1, *N*-Boc-orto-fenilendiaminas halo-sustituidas, derivados del ácido fenilacético o *d*-mandélico y los dos isonitrilos funcionalizados para realizar la reacción de Ugi. Desde el punto de vista químico, las principales dificultades que encontramos durante el desarrollo de estas series se pueden reunir en los siguientes puntos:

- Rendimientos moderados/bajos de la reacción de Ugi inicial.
- Poca disponibilidad comercial de isonitrilos adaptables a nuestros requerimientos para la diana. La disponibilidad de orto-feniléndiaminas protegidas con BOC era también algo escasa.
- Necesidad (al igual que en trabajo anterior) de empleo de un scavenger de isonitrilos eficiente para evitar contaminación del laboratorio, debido a la alta volatilidad de algunos de ellos.

El proceso de ciclación mediante desprotección del grupo BOC empleando TFA se realizó sin mayores dificultades. En cuanto a las oxidaciones bencílicas finales, nuestro grupo de investigación tenía experiencia en este tipo de tranformaciones, que no ofrecieron ningún problema, empleando MnO_2. Las oxidaciones del OH bencílico se llevaron a cabo para proporcionar mayor rigidez al ligando en esa zona dirigida al *Eastern Pocket*. Al tratarse de moléculas pequeñas, la caracterización por RMN no fue especialmente dificultosa.



Scheme 3. Synthetic strategy used to obtain compounds **6–23**. a) MeOH, RT, 24–72 h; b) PS-TsOH (1.5 equiv), 1 h, RT; c) TFA/DCE (1:5), 6–24 h; d) separation of diastereoisomers by column chromatography; e) MnO_2 (20 equiv), CH_2Cl_2, 4 h, RT.

Esquema 5.2.2.2: Esquema sintético y condiciones de reacción diseñados en el trabajo.

5.2.2.3 Otras herramientas y metodologías empleadas en estas síntesis

Entre las herramientas metodológicas experimentales y equipos empleados en los trabajos de la Tesis (Figura 5.2.2.3), y más concretamente en este proyecto, caben destacar:

- Sintetizador Orgánico PLS 4x6: Herramienta fundamental para el desarrollo de síntesis multicomponente en paralelo.
- Microondas CEM-Discover (el microondas se empleó para los procesos de ciclación en el trabajo de investigación correspondiente al capítulo III).
- Sistema de purificación automatizado CombiFlash.
- Preparativas-TLC o cromatografía de columna para la purificación de compuestos.
- Empleo de reactivos soportados como scavengers de isontitrilos.

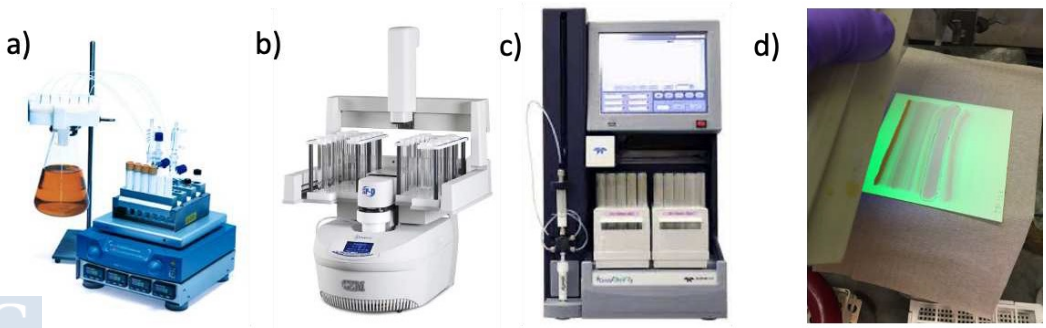


Figura 5.2.2.3: a) Sintetizador orgánico PLS 4x6, b) Microondas CEM discover, c) CombiFlash Rf 75 system, 10-100 mL/min, 75 psi (without injection valve), d) preparativas para purificación de compuestos.

5.2.2.4 Ensayos de actividad antitumoral

Los ensayos farmacológicos de actividad antitumoral de las primeras series de compuestos generados fueron llevados a cabo por el grupo de investigación del profesor Pedro Lazo, de la IUOPA de la Universidad de Oviedo. Durante las etapas preliminares de ensayos, es importante destacar que numerosos compuestos pertenecientes a la quimioteca *Combiomed* (alrededor de 100 compuestos por heterociclos variados) del grupo de investigación Combiomed fueron ensayados frente a KSP (ensayo ATPasa). A pesar de la variedad y cantidad de compuestos evaluados, ninguno de ellos mostró una actividad significativa frente a la quinesina Eg5, lo cual indica la dificultad de encontrar *hits* iniciales específicos para ella. Los primeros experimentos fueron realizados por el Doctor Miguel Ángel Prado y la doctora Belén Fernández García con nuestros compuestos empleando kits de la proteína KSP (Kitocinetics®). La información obtenida de estos primeros experimentos fue muy valiosa en esos momentos iniciales del proyecto. La metodología inicial consistió en realizar un cribado farmacológico centrado en la actividad sobre la enzima KSP (ensayo ATPasa). A partir de aquí, las moléculas con mejor perfil serían ensayadas en cultivos celulares tumorales (HCT-116 o HeLa).

Un aspecto importante en la evaluación farmacológica de esta clase de compuestos, con una actividad antitumoral muy específica, es el estudio de sus fenotipos. En particular, la inhibición de KSP ofrece un fenotipo muy característico en forma de monoaster (estrella), cuando se produce el arresto mitótico. Por ello, la manera de comprobar que nuestros prototipos "han dado en la diana" es a través de la confirmación de que presentan este fenotipo tan característico y que se diferencia claramente del fenotipo que provocan otros agentes antimitóticos como los taxanos (también llamados taxoides, como placitaxel) o los alcaloides de la vinca (como la vinblastina) (Figura 5.2.2.4).

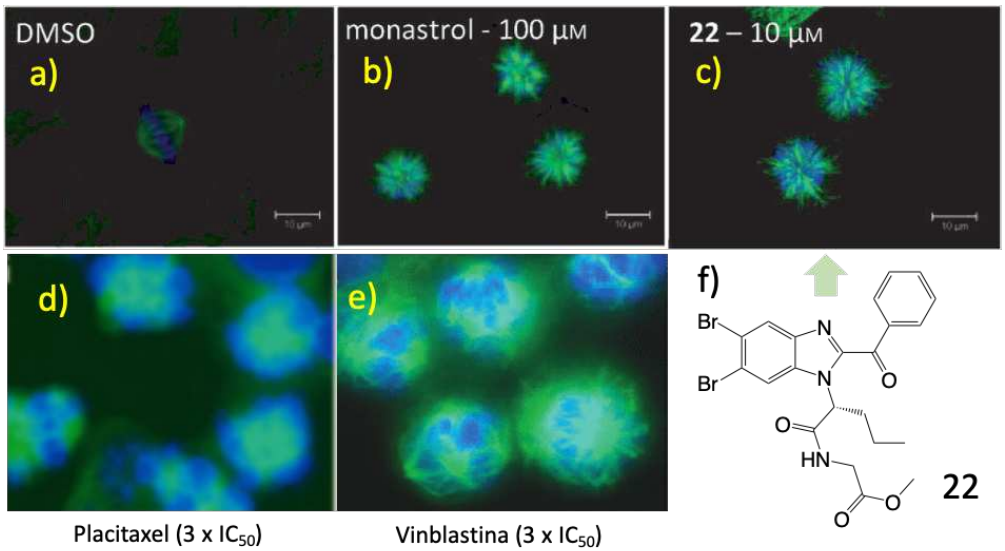


Figura 5.2.2.4: Fenotipo característico de a) una célula sin tratar, b) S-monastrol, c) compuesto 22 (derivado bencimidazólico), d) Placitaxel, e) Vinblatina, f) estructura química de 22.

La evaluación farmacológica de la actividad antitumoral para proyecto centrado en la búsqueda de ligandos inhibidores de KSP no estuvo exenta de dificultades, fundamentalmente debidas a que en la USC no existían grupos que tuviesen experiencia en esta diana o en otras similares. Lamentablemente, por razones de reorganización interna, el grupo del prof. Lazo cesó su actividad como grupo de investigación en mitad

del proyecto por lo que tuvimos que encontrar otros grupos de investigación farmacológicos que estuviesen en disposición de completar los ensayos de evaluación *ATPasa*, *actividad celular en líneas tumorales y ensayos fenotípicos* de nuestras tandas de moléculas. Afortunadamente, el grupo del Prof. Manuel Freire-Garabal (catedrático de farmacología, Facultad de Medicina, USC) se unió al proyecto y pudieron completarse exitosamente los estudios de los compuestos de tipo bencimidazol relatados en el capítulo II. Por esta razón, en la publicación 2, aparecen dos grupos de farmacología como firmantes.

Posteriormente, para la evaluación de las series de compuestos descritos en el capítulo III, iniciamos una nueva colaboración con uno de los mejores grupos en KSP a nivel mundial: el profesor Junichi Sawada y Akira Asai, de la Universidad de Shizuoka, Japón. Este grupo estaba ya especializado en la búsqueda de inhibidores de KSP (particularmente en ligandos derivados de STLC) y sobre todo, en la expresión y purificación de la proteína KSP para ensayo. Esto supondría pues, una garantía para el segundo trabajo sobre KSP.

5.2.2.5 Relaciones estructura actividad preliminares

Los datos de actividad de estas series parecen confirmar que tanto los sustituyentes ciclopropilo o propilo son apropiados para el minor pocket, de acuerdo con las predicciones del programa de docking. Otra conclusión preliminar en estas series es que la presencia del carbonilo del resto benzoilo es esencial para una buena actividad antitumoral. Es importante señalar la importancia que sugiere el programa *GOLD* a una molécula de agua estructural presente en la proteína KSP y que parece ser importante en la unión de los ligandos **20-23**, a través de la interacción por puente de hidrógeno con el carbonilo del éster terminal (Figura 5.2.2.5).

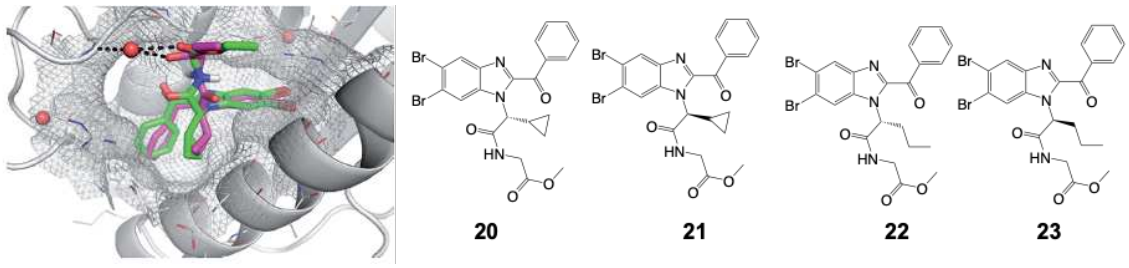


Figura 5.2.2.5: Superposición de las poses cristalográficas consensuadas por el programa GOLD, para los compuestos 20 y 21.

5..2.3 Conclusiones específicas en el marco de la Tesis

El trabajo significó un primer intento de aproximación multidisciplinar integrado, basado en un diseño *in silico*, que dirigió la síntesis de una serie de moléculas diseñadas para la inhibición de la KSP, y construidas mediante el empleo de la reacción multicomponente U-4CR. Los resultados farmacológicos demostraron la eficacia de este enfoque multidisciplinario: con la síntesis de solo 18 compuestos, obtuvimos compuestos con actividades inhibidoras de KSP-Eg5 mucho más altas que las del compuesto de referencia monastrol y comparables con las de STLC. En particular, los compuestos **20** y **22** se mostraron como prometedores para el desarrollo de un programa *hit-to-lead* basado en RMCs. A pesar de estos resultados, en el siguiente proyecto decidimos cambiar la síntesis hacia otros diseños que contemplasen una similitud mayor con ligandos como Ispinesib o la pirrolotrizina-1, diseños que se abordan en el capítulo III.

USC DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.3 CAPÍTULO III: ENSAMBLAJE MULTICOMPONENTE DEL INHIBIDOR DE LA QUINESINA DEL HUSO MITÓTICO (KSP), CPUYJ039 Y ANÁLOGOS, COMO AGENTES ANTIMITÓTICOS (PUBLICACIÓN 3)

5.3.1 Objetivo específico del trabajo

En el marco de un contexto continuista respecto al trabajo anterior, en este artículo nos propusimos como primer objetivo preparar mediante estrategias multicomponente el potente inhibidor de la quinesina del huso mitótico, el ligando CPUYJ039[127] y un conjunto de análogos (Figura 5.3.1). La preparación de estos compuestos se llevó a cabo mediante un "enfoque orientado al objetivo" (*Target Oriented Synthesis*). Se planteó un diseño basado en una reacción de Ugi que utiliza isonitrilos de derivados del 2-nitrobenceno como componentes clave. Con esta nueva estrategia sintética, se pretendió proporcionar un nuevo acceso sencillo y económico a potentes antimitóticos basados en estructuras de tipo bencimidazol. En particular, en este trabajo se intentó un diseño en el cual se maximizasen las interacciones del fármaco con el sitio alostérico de la diana KSP, respecto a las series sintetizadas en el capítulo 2. Esto se observa mediante la presencia de un resto de tipo aminopropílico y un resto benzoilo sustituido en las nuevas series (Figura 5.3.1). Como en el trabajo precedente discutido en el capítulo anterior, se pretendió obtener datos de actividad biológica preliminar frente a KSP en estas series, y definir elementos estructurales esenciales para una adecuada actividad antitumoral en líneas HCT116 y HeLa.

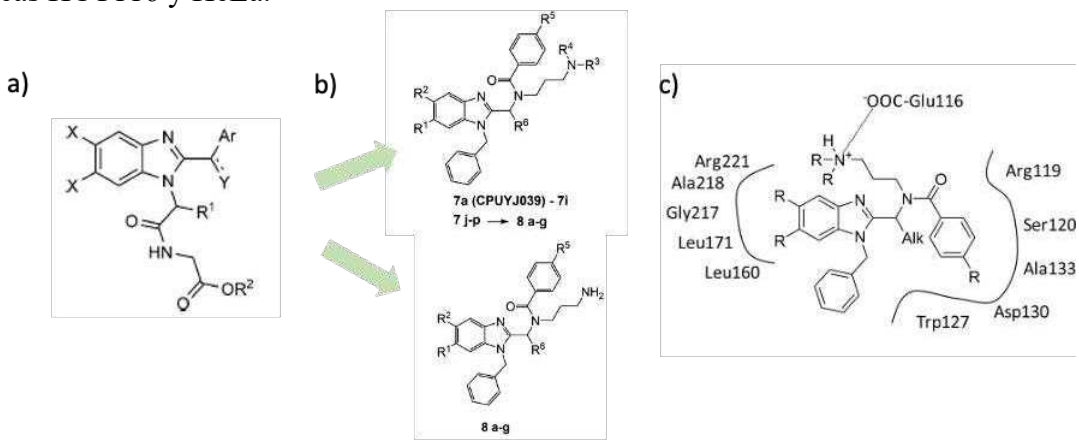


Figura 5.3.1: a) Series de bencimidazoles sintetizadas en el capítulo II, b) series de bencimidazoles planteadas en el capítulo III, c) interacciones buscadas con las nuevas series.

5.3.2 Desarrollo del trabajo experimental

5.3.2.1 Diseño de una quimioteca dirigida en base a la información estructural

La inspiración para este trabajo se basa en los resultados obtenidos en la publicación descrita anteriormente en el capítulo 2. En este segundo proyecto relacionado con la búsqueda de nuevos inhibidores de la KSP, realizamos una exploración bibliográfica sobre los ligandos más potentes sobre la diana KSP, particularmente aquellos que ejercen su acción a través de la interacción con el sitio alostérico de Eg5, también llamado “sitio del monastrol”. En ese momento existían algunos cristales

interesantes y con resolución adecuada para realizar estudios de docking y realizar propuestas de nuevas estructuras.

Teniendo en consideración el buen perfil farmacológico de los primeros bencimidazoles del capítulo II (que habían mostrado ya un buen perfil in vivo) a través de procesos multicomponente, se intentó diseñar una nueva ruta sintética que permitiese preparar análogos, similares en la medida de lo posible, a los fármacos en desarrollo en ese momento o que se encontraban en fase de ensayos clínicos tales como el Ispinesib, SB-743921 o AZD4877, entre otros (Figura 5.3.2.1). Particularmente, se tuvo en consideración la diferente configuración y disposición de las estructuras cristalográficas de la proteína que constituye la diana KSP en función de los ligandos. Específicamente, se observó que algunos ligandos inhibidores provocan, en la estructura de la diana, la apertura de un nuevo bolsillo en el sitio de unión, llamado "*cooperative pocket*". Para el caso de moléculas antes mencionadas, como se observa en la figura 5.3.1.2.b, el resto de tipo benzoilo presente en el resto exocíclico se sitúa entre los residuos Asp130, Arg119 y Glu118 del sitio alostérico. También se observa en estos ligandos cómo es posible el establecimiento de un puente de hidrógeno entre el grupo amino terminal (o dimetilamino) de estas moléculas, con un residuo de Glu116.

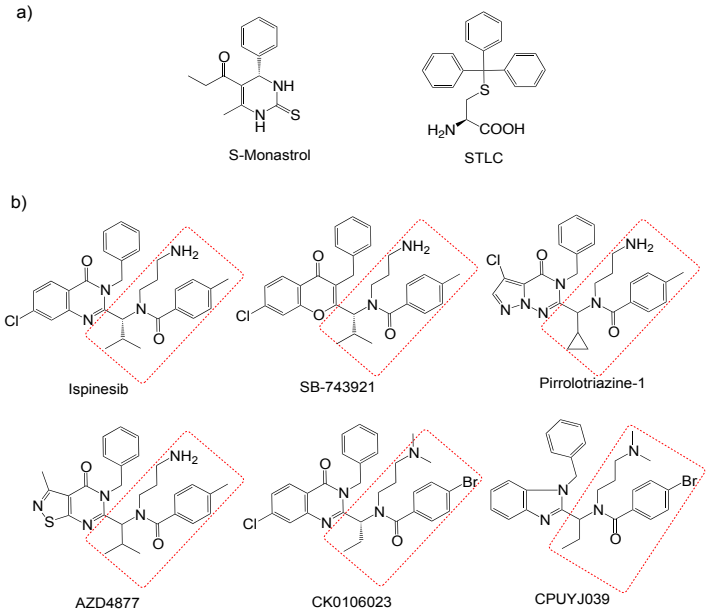


Figura 5.3.2.1: a) Ligandos de referencia iniciales b) Ligandos en ensayos clínicos o patentados.

5.3.2.2 Herramentas computacionales

Los estudios computacionales que guiaron las síntesis fueron realizados por el profesor Giovanni Marzaro (Universidad de Padua, Italia), empleando el programa Surflex. En general, estos estudios confirmaron de nuevo un buen acomodo de la estructura planar (correspondiente al anillo de bencimidazol) en el centro del sitio de unión alostérico objeto de estudio, así como la previsión de buena interacción del grupo amino o dimetilamino terminal de los ligandos previstos, con un residuo de Glu116 situado en el "techo" de la diana. Al igual que en el trabajo anterior, se buscó una interacción favorable mediante el diseño de ligandos con halógenos en el anillo de bencimidazol para su correcta interacción con el *Eastern pocket* y residuos hidrofóbicos para su interacción con el *Minor pocket*, además de la nueva interacción por puente de hidrógeno de la cadena con el grupo amino y el resto Glu116 antes comentado. Estas

interacciones se podrían satisfacer con estructuras de tipo bencimidazol obtenibles por reacción de Ugi con los *scaffolds* adecuados y posterior ciclación. En general, tal y como se comenta en el trabajo, se lograron buenas predicciones de superposición entre las diferentes estructuras planteadas para síntesis y buena complementariedad con la topología de la diana. En la figura 5.3.2.2a podemos apreciar los modos de unión de diferentes estructuras (ispinesib,[128] otro potente derivado pirrólico,[129] SB-743921,[130] y la pirrolotrizina-1[131]) que se comportan como potentes inhibidores de KSP. Como se puede observar, las estructuras cristalográficas ofrecen mucha información acerca de los requerimientos estructurales para una correcta interacción fármaco proteína.

Debido a la falta de información cristalográfica acerca del ligando que nos inspiró el trabajo, CPUYJ039, se realizaron experimentos de docking (Figura 5.3.2.2b) con este compuesto y otros cristales. Hay que tener en cuenta que esta molécula posee un grupo dimetilamino al final de la cadena propílica exocíclica. Esto no suele ser lo más frecuente en este tipo de ligandos frente a KSP (existe otro ligando, análogo del ispinesib, el CK0106023[132] , que contiene un resto de tipo dimetialmino, que también se encontraba en ensayos clínicos, el cual nos sirvió también de inspiración para el diseño de prototipos con restos dimetilamino y NH_2 terminal). A continuación, se muestran las estructuras cristalográficas publicadas en el PDB conteniendo los ligandos de interés que se tomaron como referencia en los estudios de docking:

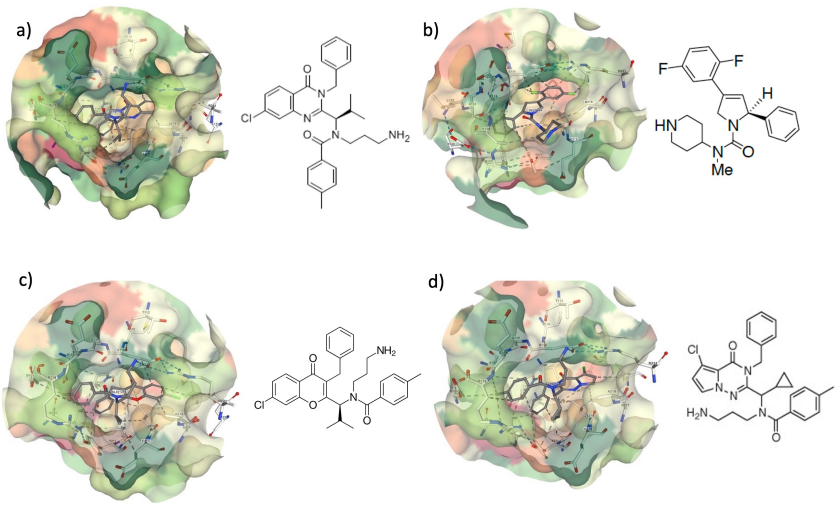


Figura 5.3.2.2a: Modos de union de diferentes inhibidores de KSP.

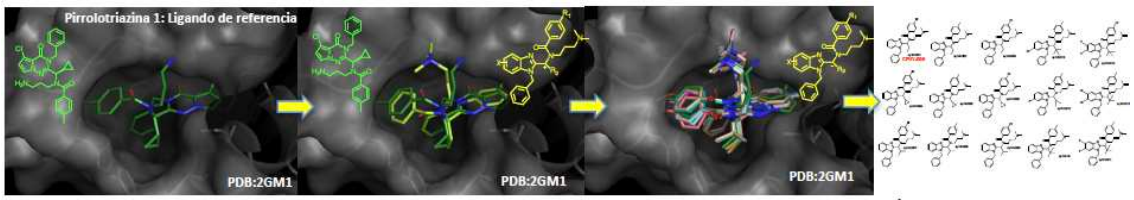


Figura 5.3.2.2b: Poses cristalográficas generadas por el programa Surflex, relativas a CPUYJ039 y análogos, tomando 2GM1 como cristal y la prrolotriazina-1, de referencia.

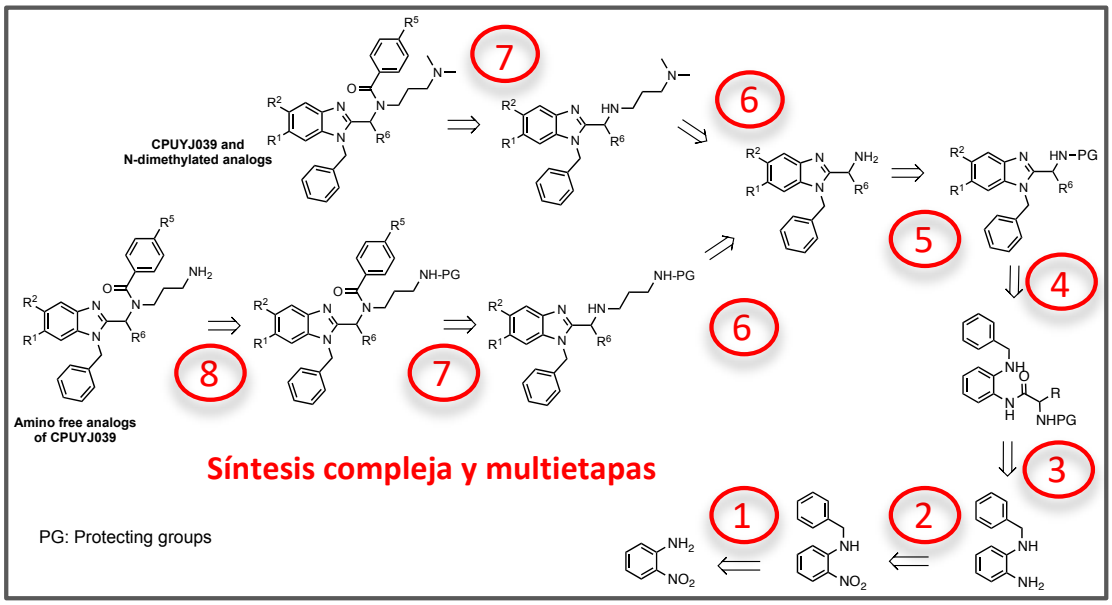
5.3.2.3 Diseño del procedimiento químico.

En el inicio del proyecto, observamos ligandos afines a KSP ya reportados. Particularmente el ligando llamado CPUYJ039, publicado por un grupo de investigación de la Universidad de Nanjing (China), captó nuestra atención. Por una parte, por la actividad mostrada por esa molécula (buena actividad inhibitoria KSP, pero mala actividad celular) y por otra, por la posibilidad de que podría ser sintetizada en muy pocos pasos de síntesis, al tratarse de un bencimidazol, a través de una estrategia basada en una

USC DE SANTIAGO

reacción de Ugi inicial, utilizando los scaffolds apropiados y una decoración posterior adecuada a la topología de la diana.

Durante el desarrollo de este proyecto, descubrimos la existencia de una patente que permitiría acceder a esta clase de compuestos, reportada por Chiron Corp.,[133] y decidimos diseñar una ruta más corta para acceder a esta clase de compuestos, similares a la pirrolotriazina o el Ispinesib. Como se puede observar en el esquema 5.3.2.3a, con estos procedimientos se requieren hasta 7 pasos de síntesis para preparar CPUYJ039 y 8 pasos para obtener un análogo de con grupo amino libre.

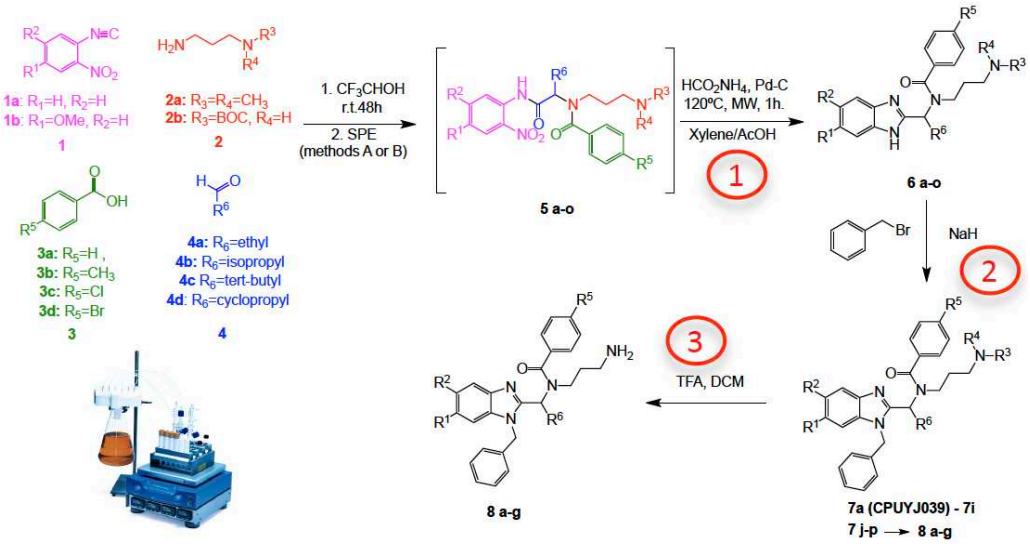


Esquema 5.3.2.3a: Fragmento de una figura correspondiente a la patente Chiron mostrando los siete pasos que se requerirían para preparar las series de bencimidazoles planteadas en el trabajo, incluída CPYUJ039.

La estrategia sintética diseñada y desarrollada en nuestro laboratorio consistió en 2 o 3 etapas de síntesis (dependiendo si el ligando porta un grupo dimetilamino o un grupo amino libre) e incluye una reacción inicial multicomponente de Ugi (4CR) en un sintetizador en paralelo (esquema 5.3.2.3b). Los intermedios generados son ciclados a través de la desprotección del grupo BOC (paso 1). El paso final consistió en una bencilación de los bencimidazoles obtenidos en el paso anterior para dar los productos finales. El procedimiento descrito supone una reducción de 5 etapas de síntesis en comparación con la ruta de la patente Chiron (esquema 5.3.2.3a). Tal y como se describe en la publicación, un proceso crítico en esta síntesis fue la optimización de las condiciones de reacción, que requirieron el uso de trifluoroetanol como disolvente para realizar satisfactoriamente las Ugis iniciales. Otros puntos delicados de esta ruta sintética fueron las ciclaciones de los aductos de Ugi, que requirieron el uso del microondas.

Por lo tanto, en este trabajo demostramos cómo se puede acceder a estas estructuras mediante un procedimiento más rápido y en menos etapas de síntesis, en comparación con los procedimientos seguidos en la patente Chiron para la obtención de este tipo de compuestos (esquema 5.3.2.3b).

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA



Esquema 5.3.2.3b: Ruta sintética propuesta para la síntesis de CPUYJ039 y análogos.

Es importante destacar, en estos trabajos en los cuales se emplea la síntesis de Ugi (en general, síntesis con isonitrilos), la necesidad de utilizar scavengers o "secuestradores" de este tipo de reactivos. Esto es debido a sus desagradables propiedades organolépticas, que harían el trabajo en el laboratorio especialmente difícil para el caso de algunos isonitrilos (especialmente los más volátiles) incluso trabajando bajo campana de extracción. Por ello, nuestro grupo de investigación ideó una interesante propuesta basada en el empleo de un reactivo soportado consistente en una resina de poliestireno que soporta un grupo de tipo ácido *p*-toluensulfónico (PS-TsOH).[134] Al ser un reactivo de carácter ácido (tal y como se ha comentado en el apartado de metodología) puede ser empleado en procesos de extracción en fase sólida para el "rescate" de bases, como los grupos dimetilamino. Como puede observarse en el esquema 5.3.2.3b, esta estrategia facilita en gran medida la purificación. La estrategia se compone de un atrapamiento o "*catch*" (mediante la reacción entre la resina ácida y el grupo dimetilamino, básico) y un proceso de liberación del compuesto del seno del polímero (*release*) mediante un tratamiento con DIPEA, que permite la obtención de los compuestos **5a–i** (Método A), de manera satisfactoria. El procesamiento de los compuestos que contienen una cadena N-Boc-aminopropilo (**5j–o**) se realizó combinando el uso de dos reactivos soportados (PS-TsOH y PS-carbonato) para realizar el procesamiento después de la reacción de Ugi, actuando como secuestradores, para el eventual exceso de amina e isonitrilo (PS-TsOH) así como de ácido (PS-carbonato) a temperatura ambiente (Método B). Es importante recordar que los grupos R-NHBOC carecen de suficiente basicidad para ser afectados por PS-TsOH (Método B). La purificación de los compuestos se llevó a cabo de manera similar al trabajo anterior.

5.3.2.4 Resultados de actividad antitumoral

Los ensayos de actividad antitumoral de estas series de compuestos fueron realizados por los profesores Akira Asai y Junichi Sawada, en Japón. El compuesto más interesante de la serie ofreció una potente inhibición de la KSP (ensayo enzimático ATPasa, **8g**: IC50= 1.8 μM), así como un interesante valor de citotoxicidad en HeLA, y HCT-116 (**8g**: IC_{50} HeLa= 1.3 μM, IC_{50} HCT-116= 1.0 μM), mostrando el fenotipo de inhibición KSP característico en forma de monoáster, igual que algunos otros de la serie (Figura 5.3.2.4). Otros ligandos potentes fueron **8d** y **8e**.

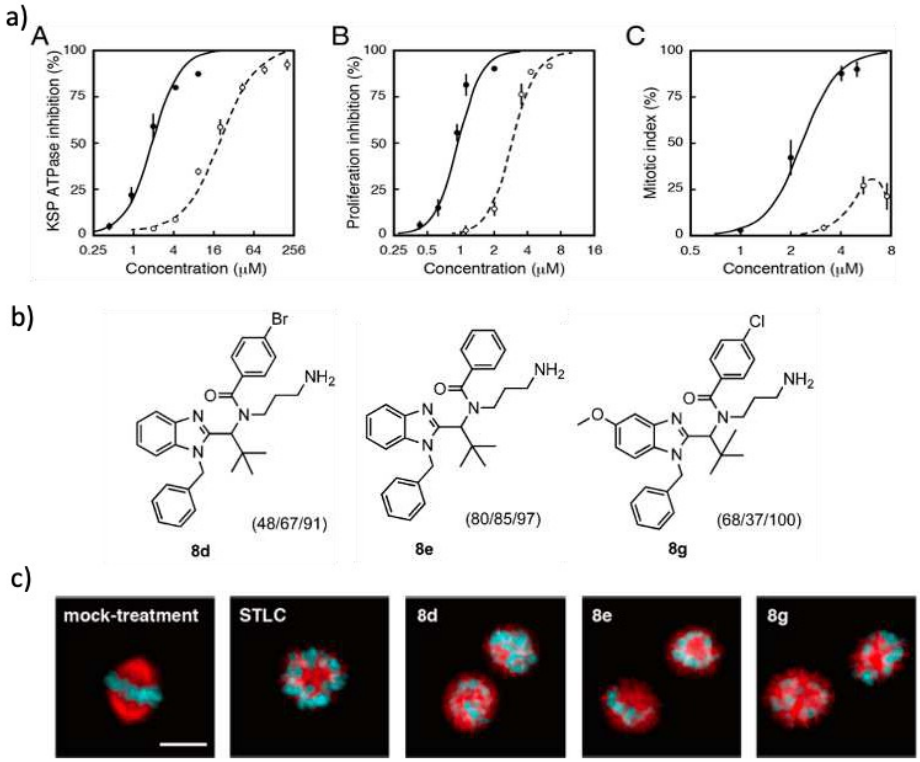


Figura 5.3.2.4: Curvas dosis-respuestaLas actividades biológicas de 8d, 8e y 8g. Las actividades inhibidoras de 8d, 8e y 8g para la proliferación celular HCT116 (A), la progresión del ciclo celular (B) y la KSP ATPasa (C). Los datos los puntos de 8d, 8e y 8g están representados por círculos abiertos, grises y cerrados, respectivamente. Fenotipo de inhibición KSP mostrado por 8d, 8e y 8g.

Los tres análogos más potentes, **8d**, **8e** y **8g**, tienen un sustituyente de tipo tert-butilo en la posición R6, así como un grupo amino al final de la cadena aminopropilo en común. Un sustituyente metoxilo en posición 5 mejora la actividad (**8g**). Estos compuestos con amino libre mostraron actividad anti-proliferativa más potente que la de CPUYJ039 y también se encontró que tenían una mayor actividad antimitótica para el análisis celular. Colectivamente estos datos nos indicaron que:

a) CPUYJ039 ofrece bastantes dudas como ligando antimitótico efectivo. Si bien es cierto que nuestros ensayos se centraron en el derivado racémico, su actividad celular es muy baja y la actividad frente a KSP reportada por Jiang (IC_{50}= 40 nm) es bajo nuestro punto de vista, bastante cuestionable. De hecho, ningún compuesto de la serie con dimetilamino mostró actividad celular significativa. A pesar de ello, la variación estructural que realizamos sobre este scaffold CPUYJ039 confirmó de alguna manera nuestras observaciones en los programas de docking,
b) En la Figura 5.3.2.4 se puede observar el claro fenotipo mostrado por los 3 compuestos más potentes de la serie preparada. Todos ellos mostraron un fenotipo característico de inhibición KSP.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.3.3 Conclusiones específicas de este trabajo en el contexto de la Tesis

Se han sintetizado series de bencimidazoles de tipo N-(3-aminopropil)-N-(1-(1-bencil-1*H*-indol-2-il)alquil)benzamidas, mediante una estrategia sintética corta basada en reacciones de Ugi, ciclación de los aductos intermedios y bencilación del núcleo de bencimidazol. Esta estrategia sintética acorta en varios pasos de síntesis esta clase de compuestos, descritos por primera vez en la mencionada patente Quiron.

Analizando los resultados obtenidos en el apartado anterior, podemos concluir que los datos publicados ($IC_{50\ ATPasa}$= 40 nM, $IC_{50in\ vivo}$: 2.3 μM de actividad celular HCT-116) acerca de la molécula principal sobre la cual se fundamentaron los estudios y el diseño inicial de nuestra estrategia sintética, el CPUYJ039 (reportada por Jiang), presentan ciertas dudas. Estas dudas surgen al no obtenerse datos similares de actividad ATPasa ni actividad celular para esta molécula, en los estudios de evaluación farmacológica por parte del profesor Sawada, tras haber sido sintetizada y caracterizada inequívocamente en nuestro laboratorio. Estos resultados farmacológicos empleando una proteína expresada por el doctor Sawada, ofrecieron un perfil farmacológico diferente al reportado por Jiang (CPUYJ039 resultó inactivo en el ensayo KSP y en el ensayo celular). Por otra parte, Jiang no reporta los datos de caracterización estructural de CPUYJ039, ni tenemos conocimiento de ninguna publicación describiendo la estructura de este compuesto. Por ello, es difícil extraer una conclusión acerca de si esa variabilidad en los resultados es consecuencia de las condiciones específicas del ensayo farmacológico sobre la proteína, o bien se trata de otra molécula que por alguna circunstancia se publicó con esa estructura. Una circunstancia que apoya esta versión es la observación de la diferente actividad farmacológica entre las series de compuestos preparadas en el trabajo. A pesar de ello, algunos de los nuevos análogos sintetizados y descritos en esta memoria lograron buenos valores de inhibición ATPasa de la KSP, así como buenos valores de actividad citotóxica en líneas tumorales (HTC116 y HeLa), lo que las valida como una buena base estructural basada en el núcleo de bencimidazol para la obtención de prototipos futuros para esta diana.

La conclusión más importante acerca de la REA preliminar, derivada de la evaluación farmacológica de las series de bencimidazoles análogos de CPYUJ039 es la importancia del grupo amino libre del resto aminopropilo. Este grupo funcional con mucha probabilidad interacciona con un residuo de Glutámico Glu116 presente en el sitio alostérico de la diana KSP. En contraste, las series de compuestos que contienen el resto dimetilaminopropílico fueron inactivas. Otro aspecto estructural importante es la presencia de un sustituyente metoxilo en posición 5 del anillo de bencimidazol para mejorar la actividad.

Colectivamente, del análisis de los resultados obtenidos por nosotros y la bibliografía relacionada, la interacción ligando-proteína óptima parece requerir un correcto acoplamiento entre el ligando y varios bolsillos (*pockets*) del sitio de unión alostérico KSP. La combinación de interacciones favorables sobre la cavidad central y 3 o 4 bolsillos de la KSP conduce a ligandos potentes.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

5.4 CAPÍTULO IV: RECONOCIMIENTO ENANTIOESPECÍFICO EN EL RECEPTOR A2B DE ADENOSINA POR ALQUIL 2-CIANOIMINO-6-METIL-1,2,3,4 TETRAHIDROPIRIMIDINA-5-CARBOXILATOS-4-SUSTITUIDOS (PUBLICACIÓN 4)

5.4.1 Introducción y objetivo el trabajo

El nucleósido purínico adenosina regula multitud de procesos fisiológicos,[135,136] mediante su unión a receptores específicos, conocidos como receptores de adenosina y clasificados en 4 subtipos: A_1, A_{2A}, A_{2B} y A_3 (ARs). Desde su descubrimiento, los ARs han sido considerados objetivos atractivos en la investigación de fármacos. [137,138] Los ARs pertenecen a la superfamilia de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) y, por lo tanto, ejercen sus funciones fisiológicas mediante la activación o inhibición de diferentes sistemas de segundos mensajeros.[135,136] Nuestra mejor comprensión de la fisiología, farmacología, y biología estructural y molecular de las vías de señalización de la adenosina respalda el desarrollo de ligandos potentes y selectivos, lo que conduce, en última instancia, a la introducción de nuevas estrategias terapéuticas para abordar necesidades médicas urgente.[139-141]

El A_{2B}AR se expresa de manera ubicua en el cuerpo y regula una amplia gama de eventos fisiopatológicos.[142,145] El A_{2B}AR se define generalmente como un receptor de baja afinidad[146] que permanece inactivo en condiciones fisiológicas, pero se activa rápidamente durante condiciones crónicas de estrés oxidativo (por ejemplo, hiperglucemia, inflamación o activación de mastocitos). Evidencias recientes respaldan que el A_{2B}AR está regulado de manera transcripcional por factores implicados en la hipoxia inflamatoria,[146] participando así en procesos fisiológicos clave (por ejemplo, tono vascular, homeostasis de la glucosa, inflamación pulmonar, respuesta inflamatoria o dolor). Sin embargo, desde una perspectiva farmacológica, el A_{2B}AR es el menos caracterizado de los cuatro subtipos de AR debido a su baja afinidad general hacia los ligandos prototípicos de AR.[141,147] En consecuencia, se requieren nuevos antagonistas potentes y selectivos del A_{2B}AR para el desarrollo de fármacos o como herramientas farmacológicas para validar nuevas aplicaciones terapéuticas (por ejemplo, asma, colitis, retinopatía diabética, inflamación o cáncer). [143-145]

La búsqueda de antagonistas del A_{2B}AR[139-141,147] se ha centrado tradicionalmente en las xantinas de origen natural (Figura 5.4.1, Compuestos **1**−**3**),[148-149] que han evolucionado estructuralmente para producir ligandos de alta afinidad y selectividad (Figura 5.4.1, Compuestos **4**−**7**),[150-152] incluyendo deaza-xantinas (Figura 5.4.1, Compuesto **8**).[19,20] [153,154] En contraste, solo se han descrito unos pocos ejemplos de antagonistas potentes y selectivos no xantínicos del A_{2B}AR (Figura 5.4.1, Compuestos **9**−**15**).[155-156] Al igual que todos los ligandos de AR conocidos, todos los antagonistas conocidos del A_{2B}AR contienen un andamiaje central plano (Figura 5.4.1, Compuestos **1**−**11**), lo que evita el establecimiento de interacciones estereoespecíficas ligando-receptor. Por lo tanto, la evaluación de nuevos quimiotipos que aporten topologías estereodiversas proporciona bases sólidas para explorar modos de unión alternativos y estereoespecíficos, conciliando así la simplicidad molecular con perfiles de afinidad y selectividad óptimos.

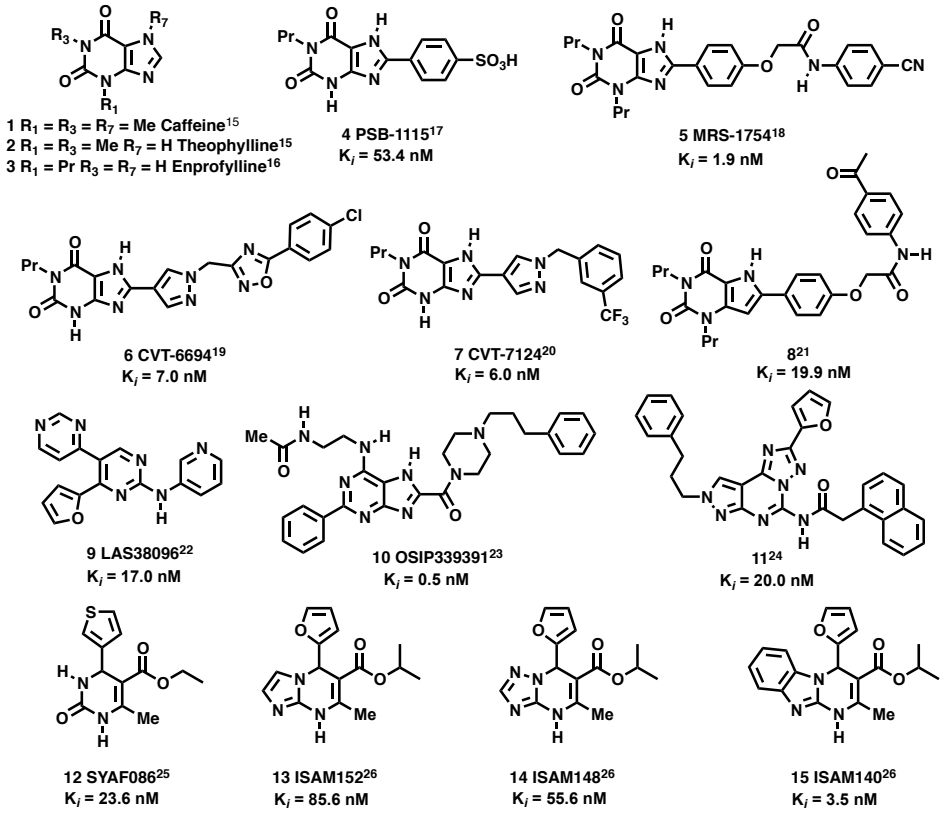


Figura 5.4.1 Estructuras de antagonistas A_{2B}AR representativos. [148-159]

Recientemente nuestro grupo documentó la primera familia de antagonistas A_{2B}AR no planares, estructuralmente simples, selectivos y de alta afinidad, basados en la estructura de 3,4-dihidropirimidin-2(1H)-ona (Figura 5.4.1, Compuesto **12**).[158] La factibilidad sintética de esta estructura, que se prepara eficientemente a través de una reacción multicomponente de Biginelli, permitió la evaluación rápida de las características más destacadas de las relaciones estructura-actividad y selectividad en esta serie. Con el objetivo de explorar nuevos prototipos que exhiban una alta afinidad hacia A_{2B}AR, posteriormente exploramos las propiedades farmacológicas de tres series de análogos: 3-deaza[piridin-2(1H)-onas] y derivados bicíclicos y tricíclicos fusionados en las posiciones 2,3 o 5,6 del esqueleto heterocíclico.[159] Ese estudio reveló el potencial de diversificación estructural en la posición 2 de la estructura central de diazinona y proporcionó algunos ligandos bicíclicos (**13**, **14**) y tricíclicos (**15**) prometedores (Figura 5.4.1).[159] En este capítulo describimos el descubrimiento de una nueva familia de antagonistas A_{2B}AR potentes y altamente selectivos basados en el esqueleto de 2-cianoimino-6-metil-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato sustituido en posición 4. Los dos enantiómeros del ligando más atractivo (**16b**) se separaron mediante HPLC quiral y sus configuraciones absolutas fueron establecidas mediante dicroísmo circular. La evaluación farmacológica de los dos enantiómeros demostró que la afinidad se debe exclusivamente al enantiómero **(*S*)-16b**, en línea con nuestros modelos moleculares previos[158,159] y actuales. Este es el primer ejemplo de reconocimiento enantiospecífico en el A_{2B}AR.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.4.2 Diseño

El diseño de los compuestos con estructura de 2-cianoimino-6-metil-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilatos (Figura 5.4.2) se basó en la sustitución bioisostérica del grupo carbonilo en la posición 2 de la estructura central de 3,4-dihidropirimidin-2(1H)-ona (**17**), [158] o del grupo imino presente en el anillo azol fusionado al núcleo de pirimidina en derivados bicíclicos (**18** y **19**),[159] por un grupo cianoimino exocíclico (Figura 5.4.2). Esta modificación estructural aparentemente sutil debería, sin embargo, afectar profundamente las características conformacionales, electrónicas, estéricas y lipofílicas de la estructura central, con un posible impacto en el perfil farmacológico de los ARs. Sobre la base de la SAR observada para la serie anterior (**17-19**), nuestro modelo *h*A_{2B}AR previo[158,159] y el estudio prospectivo de modelado realizado en este trabajo (ver más adelante), mantuvimos los mejores sustituyentes en las posiciones 4 y 5 de la estructura pirimidina. Así, una vez que se habían sintetizado y evaluado farmacológicamente la nueva serie de compuestos, realizamos un análisis comparativo entre las estructuras centrales más similares (**16** y **17**).

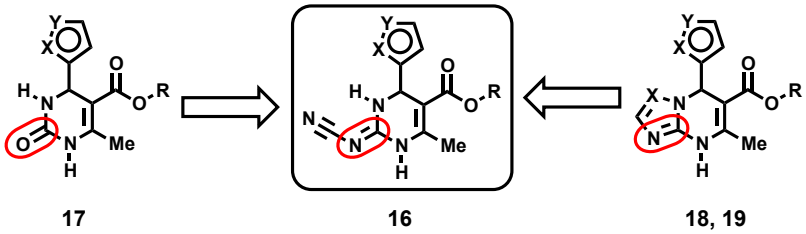


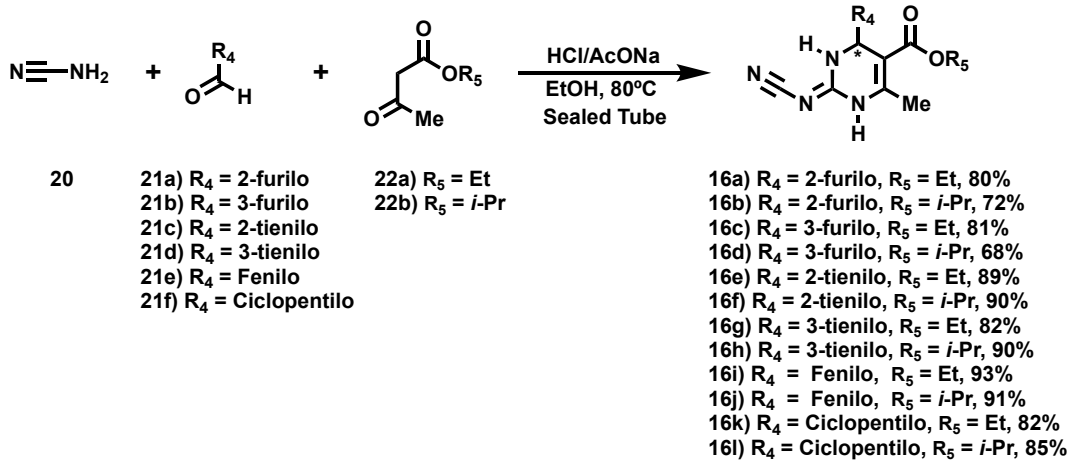
Figura 5.4.2. Estrategia de diseño empleada para las moléculas objetivo (**16**).

5.4.3 Química

Del mismo modo que las 3,4-dihidropirimidin-2(1H)-onas (**17**), que inspiraron este trabajo,[158] los compuestos documentados aquí (**16**) se ensamblaron mediante una aproximación multicomponente (MCR).[160] El Esquema 5.4.3 presenta la transformación, inspirada en la reacción de Biginelli, empleada como estrategia sintética. Siguiendo un procedimiento previamente descrito,[161] la cianamida (**20**), un β-cetoéster (**21a–b**) y el correspondiente carbaldehído (**22a–d**) se calentaron (80 ºC) en etanol utilizando HCl/NaOAc como catalizador en un tubo sellado durante 4-6 h. Los alquil 2-cianoimino-6-metil-1,2,3,4-tetrahidro-pirimidin-5-carboxilatos (**16a–j**) se aislaron en rendimientos moderados a excelentes (68-93%) después de su purificación mediante cromatografía en columna o recristalización (isopropanol). La secuencia de reacción comenzó con la autocondensación de la cianamida *in situ* para obtener el intermediario cianoguanidina, que luego se combinó con el aldehído o el β-cetoéster siguiendo cualquiera de las vías mecanísticas alternativas propuestas para la heterociclización de Biginelli.[161] En la parte experimental del capítulo IV de esta Tesis se proporciona una descripción exhaustiva del método sintético y los datos estructurales y espectroscópicos completos de todos los compuestos.

Asumiendo la superposición de las estructuras centrales discutidas anteriormente, se preparó una colección de compuestos en la que, de acuerdo con las tendencias SAR del quimiotipo[151,158] mantuvimos los sustituyentes en las posiciones 4 (2-furilo, 3-furilo y 2-tienilo y 3-tienilo) y 5 (etoxicarbonilo o isopropoxicarbonilo) del heterociclo (**16a–h**). Además, se introdujeron grupos fenilo y ciclopentilo en la posición 4 (compuestos **16i–l**) para evaluar el efecto de eliminar el núcleo heterocíclico.

USC DE SANTIAGO



Esquema 5.4.3. Síntesis y propiedades moleculares de los 2-cianoimino-4-sustituidos-6-metil-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilatos 16.

Como se indicó anteriormente (Figura 5.4.2), el grupo cianoimino exocíclico en la posición 2 de **16** se concibió como un bioisóstero del grupo carbonilo de **17** de tal manera que los grupos NH restantes en las posiciones 1 y 3 desempeñarían roles equivalentes en las dos estructuras centrales. Sin embargo, como se muestra en la Figura 5.4.4, existen tres posibles formas tautoméricas para la estructura central **16**, que debido a los diferentes patrones de enlace de hidrógeno podrían llevar a modos de unión distintos entre los tautoméros. Para determinar la forma tautomérica prevalente, tanto en estado sólido como en solución, se llevaron a cabo estudios de cristalografía de rayos X y espectroscopia de RMN (experimentos de diferencia NOE 1D) que proporcionaron información clave sobre la estructura de un compuesto representativo en la serie, concretamente el isopropil 2-cianoimino-4-(furano-2-il)-6-metil-1,2,3,4-tetrahidropirimidin-5-carboxilato (**16b**). Los datos cristalográficos de un monocristal de **16b** confirmaron la prevalencia del tautómero **16-I** en estado sólido (Figura 5.4.4.B), proporcionando además más evidencia de la conformación pseudo-bote adoptada por el anillo heterocíclico. Este es un rasgo común asumido para la serie principal (**17-19**)[158,159] y constituye una diferencia estructural importante con respecto a todos los antagonistas conocidos de A_{2B},[140,141,147] que son estructuras planas. Los experimentos de diferencia NOE unidimensionales (1D) en **16b** (Figura 5.4.4.C) confirmaron de manera inequívoca que el tautómero predominante es, de hecho, el inicialmente considerado (Figura 5.4.4, **16-I**), al menos en solución de DMSO-*d*$_6$. En consecuencia, el nuevo núcleo heterocíclico presenta una superposición óptima de grupos químicos con la estructura central modelo **17** (Figura 5.4.2).

5.4.4 Evaluación biológica

Las afinidades de los nuevos ligandos (**16**) por los cuatro subtipos de receptores de adenosina humanos (A_1, A_{2A}, A_{2B} y A_3) se determinaron in vitro mediante ensayos de unión de radioligandos.[158,159] Se emplearon receptores de adenosina humanos expresados en células CHO transfectadas (A_1AR), HeLa (A_{2A}AR y A_3AR) y HEK-293 (A_{2B}AR). Los radioligandos [^{3}H]-1,3-dipropil-8-ciclopentilxantina ([^{3}H]DPCPX) para A_1AR y A_{2B}AR, [^{3}H]ZM241385 para A_{2A}AR y [^{3}H]NECA para A_3AR se utilizaron en los ensayos de unión. Los datos obtenidos se presentan en la Tabla 5.4.4.1a. Como en estudios anteriores,[158,159] todos los compuestos se evaluaron inicialmente como mezclas racémicas. Los datos biológicos se expresan como K_i ± SEM (nM, n = 3) o como inhibición porcentual de la

unión específica al 1 µM (n = 2, promedio) para aquellos compuestos que no desplazaron completamente la unión al radioligando.

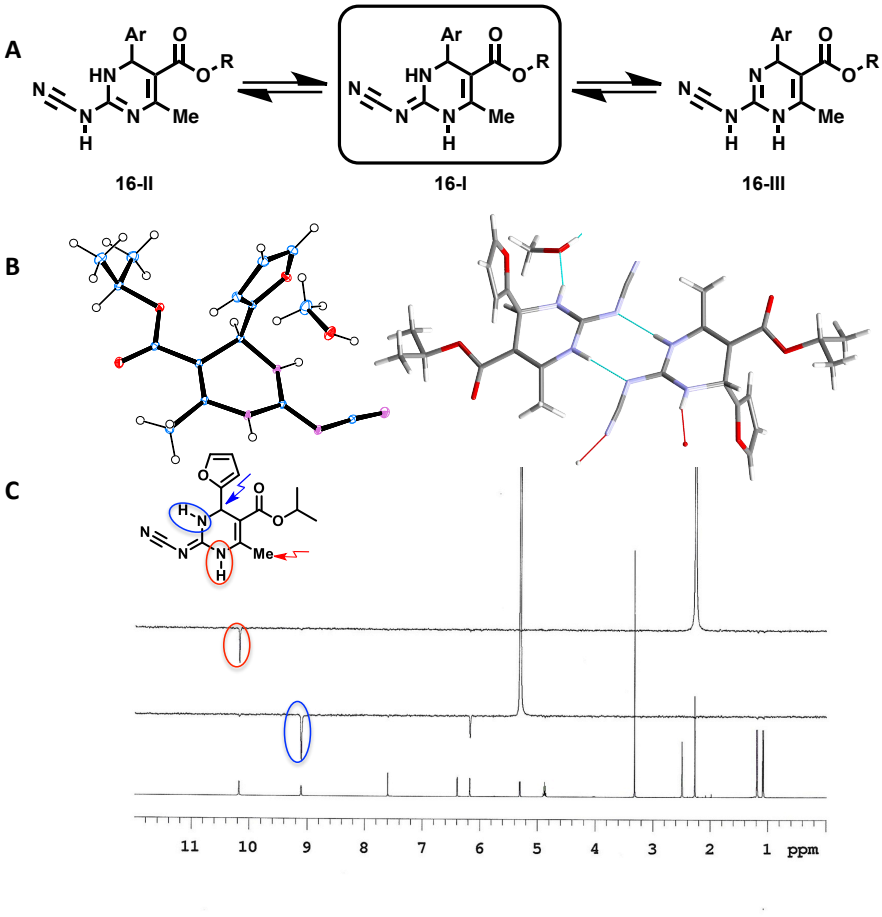


Figura 5.4.4. Análisis estructural de los alquil 2-cianoimino-4-(furano-2-il)-6-metil-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilatos (16). (A): Posibles formas tautoméricas de 16. (B): Diagrama de Ortep del 16b racémico (CCDC1475413). (C): Experimentos NOE empleando 16b: traza inferior: RMN 1H a 300 MHz de 16b (DMSO-d_6). Trazo central: Espectro de diferencia NOE de 16b; irradiación del protón en la posición 4. Trazo superior: Espectro de diferencia NOE de 16b; irradiación del grupo metilo en la posición 6.

Para fines de comparación, se incluyen los datos biológicos obtenidos para la serie principal de 3,4-dihidropirimidina-2(1H)-ona (**17**) (Tabla 5.4.4.1a). Los valores de K_i se obtuvieron ajustando los datos con regresión no lineal utilizando el software Prism 2.1 (GraphPad, San Diego, CA). Para aquellos compuestos que mostraron poca afinidad o baja solubilidad, se informa la inhibición porcentual de la unión específica. Los resultados son el promedio de tres experimentos (n = 3), cada uno realizado en duplicado.

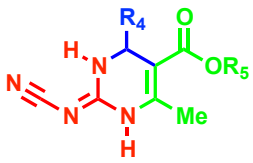
5.4.4.1. Experimentos funcionales. Ensayos de cAMP

Como parte de la caracterización farmacológica de esta nueva serie de ligandos selectivos de A_{2B}AR, el compuesto más atractivo de la serie (**16b**) se sometió a ensayos funcionales (cAMP) para evaluar su capacidad para inhibir la producción de cAMP estimulada por NECA (10 µM). Estos experimentos confirmaron que **16b** inhibe la acumulación de cAMP, lo que valida el comportamiento antagonista de los nuevos derivados descritos aquí frente al A_{2B}AR. Una comparación de los valores de K_i y K_B

USC DE COMPOSTELA

revela una buena correlación entre los datos obtenidos de los ensayos de unión (K_i = 24.3 nM) y los ensayos funcionales (K_B = 116.0 nM).

Tabla 5.4.4.1a. Datos de estructura y afinidad de unión de los 2-cianamido-4-sustituidos-1,4-dihidro-pirimidina-5-carboxilatos **16** en los receptores de adenosina humanos.

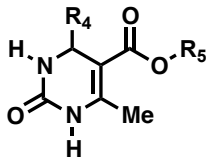


Comp	R_4	R_5	K_i (nM) o % a 1 µM[a]			
			hA1[b]	*hA2A*[c]	*hA2B*[d]	*hA3*[e]
16a	2-Furilo	Et	27%	20%	900 ± 6	20%
16b (SY1K024)	2-Furilo	*i*-Pr	21%	19%	24.3 ± 0.9	4%
16c	3-Furilo	Et	28%	31%	102 ± 3	14%
16d (SY1K025)	3-Furilo	*i*-Pr	34%	25%	59.4 ± 1.8	41%
16e (SY1K022)	2-Tienilo	Et	26%	33%	51.0 ± 2.1	3%
16f	2-Tienilo	*i*-Pr	31%	16%	349.1 ± 3	27%
16g	3-Tienilo	Et	29%	30%	461 ± 2	23%
16h	3-Tienilo	*i*-Pr	11%	18%	647 ± 4	13%
16i	Fenilo	Et	18%	13%	25%	13%
16j	Fenilo	*i*-Pr	20%	12%	32%	6%
16k	Ciclopentilo	Et	11%	10%	19%	4%
16l	Ciclopentilo	*i*-Pr	3%	5%	11%	3%
DPCPX	-	-	2.2 ± 0.2	157 ± 2.9	73.2 ± 2.0	1722 ± 11
ZM241385	-	-	683 ± 4.1	1.90 ± 0.1	65.7 ± 1.7	863 ± 4.0

[a]n = 3 para los valores Ki, o n = 2 para el porcentaje de desplazamiento de la unión específica [b]Desplazamiento de la unión específica [^{3}H]DPCPX en receptores de adenosina A_1 expresados en células CHO humanas. [c]Desplazamiento de la unión específica [^{3}H]4-(2-[7-amino-2-(2-furil)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ilamino]etil)fenol en receptores de adenosina A_{2A} expresados en células HeLa humanas. [d]Desplazamiento de la unión específica [^{3}H]DPCPX en células humanas HEK-293. [e]Desplazamiento de la unión específica [^{3}H]NECA en receptores de adenosina A_3 expresados en células humanas HeLa.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Tabla 5.4.4.1b. Estructura y afinidad de las 3,4-dihidropirimidin-2(1H)-onas 17 con los receptores de adenosina humanos.[24 158]



Comp	R_4	R	K_i (nM) o % a 1 µM[a]			
			hA1[b]	*hA2A*[c]	*hA2B*[d]	*hA3*[e]
17a	2-Furilo	Et	18%	41%	585.5 ± 61	2%
17b	2-Furilo	*i*-Pr	20%	30%	40.8 ± 3.1	1%
17c	3-Furilo	Et	21%	39%	39.6 ± 2.9	1%
17d	3-Furilo	*i*-Pr	25%	26%	1486 ± 41	3%
17e	2-Tienilo	Et	1%	33%	44%	1%
17f	2-Tienilo	*i*-Pr	37%	19%	44%	14%
12g	3-Tienilo	Et	22%	39%	23.6 ± 1.3	24%
17h	3-Tienilo	*i*-Pr	26%	25%	56.7 ±2.9	1%
17i	Fenilo	Et	1%	10%	2%	2%
17j	Fenilo	*i*-Pr	2%	1%	2%	2%
17k	Ciclopentilo	Et	3%	1%	2%	18%
17l	Ciclopentilo	*i*-Pr	1%	1%	3%	7%
DPCPX	-	-	2.2 ± 0.2	157 ± 2.9	73.2 ± 2.0	1722 ± 11
ZM241385	-	-	683 ± 4.1	1.90 ± 0.1	65.7 ± 1.7	863 ± 4.0

[a]n = 3 para los valores Ki, o n = 2 para el porcentaje de desplazamiento de la unión específica [b]Desplazamiento de la unión específica [^{3}H]DPCPX en receptores de adenosina A_1 expresados en células CHO humanas. [c]Desplazamiento de la unión específica [^{3}H]4-(2-[7-amino-2-(2-furil)[1,2,4]triazolo[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ilamino]etil)fenol en receptores de adenosina A_{2A} expresados en células HeLa humanas. [d]Desplazamiento de la unión específica [^{3}H]DPCPX en células humanas HEK-293. [e]Desplazamiento de la unión específica [^{3}H]NECA en receptores de adenosina A_3 expresados en células humanas HeLa.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.4.5. Análisis de relación estructura-actividad y modelado molecular

En esta sección se describen las relaciones estructura-afinidad y estructura-selectividad observada a partir de los datos farmacológicos obtenidos. Las tendencias se respaldan, y explican, en el contexto de un modelo computacional 3D del hA$_{2B}$AR. Para su comparación, la Tabla 5.4.4.1b contiene los datos farmacológicos obtenidos para la serie de pirimidin-2(1*H*)-onas modelo **17**,[159] evaluada como mezclas racémicas, con la adición de cuatro compuestos nuevos que exploran sustituyentes ciclopentilo y fenilo en la posición 4. Los datos farmacológicos obtenidos para la nueva serie (**16**), también evaluada como mezclas racémicas, se enumeran en la Tabla 5.4.4.1a. Se pueden identificar varios ligandos que se unen al A$_{2B}$AR con alta potencia (K_i < 60 nM) y, lo que es más importante, con una excelente selectividad frente al subtipo A$_{2B}$, con la mayoría de los ligandos presentando una baja inhibición porcentual en los restantes AR (< 35% a 1 μM) y mostrando índices de selectividad > 100 veces para los ligandos más potentes. El ligando **16b** presenta el perfil farmacológico más atractivo de la serie, ya que muestra afinidad en el rango bajo nanomolar (K_i = 24.3 nM) y una destacada selectividad frente a los receptores hA$_1$, hA$_{2A}$ y hA$_3$.

La subserie que lleva un anillo (2- o 3-) furilo en la posición 4 del núcleo heterocíclico generalmente mostró una afinidad superior en hA$_{2B}$AR a sus congéneres con (2- o 3-) tienilo, siendo el derivado 2-furilo **16a** la única excepción a esta tendencia (K_i = 900 nM). Más precisamente, la combinación del grupo furilo en la posición 4 y un residuo de isopropilo en la parte éster proporciona sistemáticamente una mejor afinidad (comparación de pares **16a**/**16b** y, en menor medida, **16c**/**16d**). Curiosamente, el efecto opuesto se observó para los compuestos que contienen un grupo tienilo (2- o 3-), en los que los ésteres de etilo mostraron una afinidad superior (comparaciones de pares **16e**/**16f** y, en menor medida, **16g**/**16h**). En comparación con la serie modelo [3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-onas (Tabla 5.4.4.1b)], se observa un aumento significativo la afinidad para los ligandos que llevan un residuo 2-tienilo en posición 4 (comparación de pares **16e**/**17e** y **16f**/**17f**. Así, mientras que sus análogos de 3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-ona son prácticamente inactivos (44% a 1 μM), **16e** y **16f** tienen valores de K_i atractivos (51.0 y 349 nM, respectivamente). Se observa una tendencia similar para los ligandos equivalentes que contienen un núcleo 3-tienilo en la posición 4 (**16g-h**), que muestran afinidades atenuadas (K_i = 533 y 647 nM, respectivamente) en comparación con sus análogos con estructura de 3,4-dihydropyrimidin-2(1*H*)-ona **17g-h** (K_i = 23.6 y 56.7 nM, respectivamente). Finalmente, los compuestos que llevan anillos fenilo (**16i–j**) o ciclopentilo (**16k–l**) en la posición 4 carecen de afinidad en cualquiera de los cuatro ARs. Este comportamiento, que se reprodujo en la estructura principal **17** (Tabla 5.4.4.1b, compuestos **17i–l**), sugiere claramente que los requisitos del sitio de unión del sustituyente en la posición 4 de las dos estructuras son comunes y altamente específicos en el sitio de unión ortostérico de hA$_{2B}$AR.

Con el fin de proyectar el SAR observado en las interacciones receptor-ligando y evaluar el crecimiento adicional de estas series, se exploró el modo de unión de los nuevos antagonistas frente al hA$_{2B}$AR mediante estudios de binding utilizando nuestro modelo computacional previamente refinado de este receptor.[159] Cada molécula con valor de K_i medido para hA$_{2B}$AR (es decir, **16a–h**) se sometió a cuatro acoplamientos paralelos: con o sin la presencia de moléculas de agua predichas en el sitio de unión, como se identificó previamente,[159] y considerando los dos posibles enantiómeros en cada caso. Los resultados se analizaron conjuntamente para dilucidar el posible modo de unión de equivalentes enantiómeros en la serie. Cabe destacar que, debido a los diferentes sustituyentes en la estructura, la nomenclatura *R*/*S* no corresponde necesariamente con

las equivalencias topológicas. En línea con nuestro trabajo anterior, el análisis de las posiciones de acoplamiento proporcionó evidencia clara de que el isómero topológicamente equivalente a **(*S*)-16b** fue el único que podía lograr soluciones convergentes en la serie. De hecho, se identificaron dos posibles modos de unión solo para este estereoisómero, a saber, pose A y pose B (Figura 5.4.3). En ambos casos, el anillo heterocíclico se estabiliza mediante interacciones aromáticas con la cadena lateral de Phe173^{ECL2} de tal manera que uno de los átomos de nitrógeno dentro del grupo cianoimino contribuye a la interacción clave de enlace de hidrógeno con la cadena lateral de Asn254^{6}, un residuo totalmente conservado en los ARs que interactúa con todos los ligandos cristalizados hasta la fecha. En la pose A (Figura 5.4.3, parte superior), el grupo cianoimino está orientado hacia el interior del sitio de unión en la región definida por Val250^{6} de modo que el enlace de hidrógeno con la cadena lateral del amino de Asn254^{6} se establece con el nitrógeno cianoimino exocíclico. Esta pose es comparable a la que identificamos previamente para la serie principal **12**[158] así como para los derivados bicíclicos y tricíclicos **18-19**.[159] De manera sorprendente, las dos moléculas de agua predichas en ese estudio también desempeñan un papel importante en las interacciones ligando-receptor para la serie actual **16**. Una de estas moléculas de agua media una red de enlaces de hidrógeno entre Asn254^{6}, Glu174^{EL2} y uno de los grupos NH en el anillo de dihidropirimidina (N1 en la pose A, N3 en la pose B, ver Figura 5.4.3). La segunda molécula de agua es equivalente a una molécula de agua estructural observada en las estructuras de cristal de *h*A$_{2A}$AR con ZM241385. En la pose A, esta molécula de agua media un enlace de hidrógeno interno entre el sustituyente alcoxi y el anillo de furano/tienilo, como se describió previamente para las series **18-19**. En la pose de unión alternativa B, el sustituyente cianoimino apunta hacia la cadena lateral de Asn254^{6}, y el enlace de hidrógeno con este residuo se logra en este caso a través del grupo ciano. Esta segunda molécula de agua (interna) estabiliza el NH en la posición 3 del armazón del ligando y podría potencialmente establecer una interacción de enlace de hidrógeno con His278^{7}.

Del estudio de la relación estructura-actividad (SAR) se desprende que los sustituyentes ciclopentilo y fenilo (compuestos **16i-l**) son perjudiciales para la afinidad, lo que sugiere que estas estructuras no pueden acomodarse fácilmente en el sitio de unión. Estos resultados son coherentes con el modo de unión A, donde este sustituyente apunta al bolsillo interior en una cavidad estrecha y regioselectiva presidida por el residuo específico de A$_{2B}$AR Val250^{6}. Los sustituyentes fenilo y ciclopentilo no se ajustarán aquí y, además, desplazarían la segunda molécula de agua que se observa constantemente en las estructuras de cristal de A$_{2A}$AR, que media interacciones con el receptor para estas estructuras y similares. Por otro lado, en el modo de unión B, los sustituyentes aromáticos en la posición 4 se encuentran en la región extracelular. Esta es una región de flexibilidad intrínseca que, en principio, podría readaptarse para acomodar sustituyentes más voluminosos. Sin embargo, se podría argumentar que el modo de unión B es menos factible para explicar las tendencias del SAR de la sustitución aromática, pero la menor fiabilidad de los modelos de homología de los bucles no descarta la posibilidad de que esta región pueda contener un bolsillo estereoselectivo.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

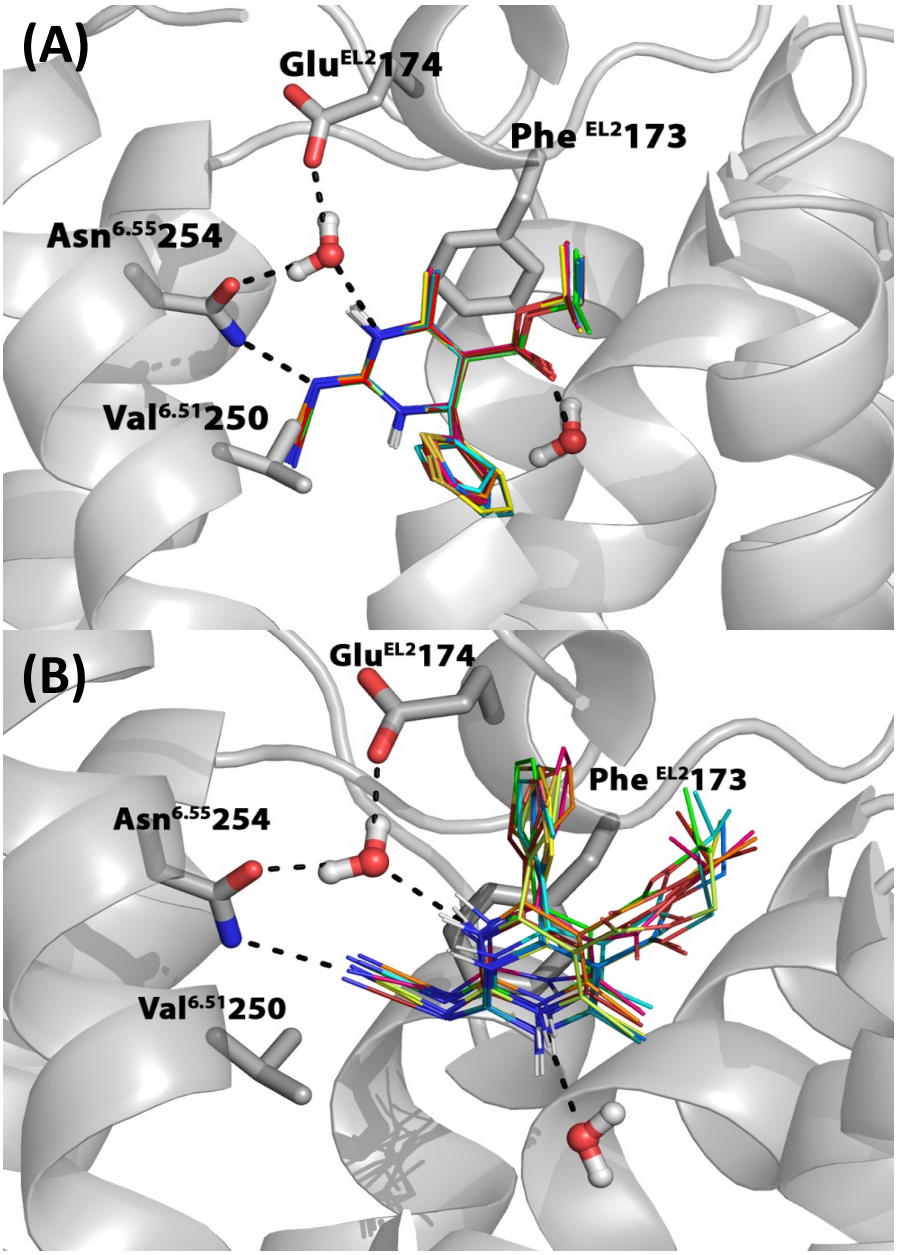


Figura 5.4.3. Modos de unión, A (arriba) y B (abajo), propuestos para los compuestos de la serie **16**. En líneas finas, los compuestos con un valor K_i medido en el *h*A_{2B}AR. El receptor se muestra en gris, con los residuos que contribuyen a la unión del ligando etiquetados. Se muestran las dos moléculas de agua que median la estabilidad de la unión, y las líneas discontinuas representan las interacciones de enlace H.

Al igual que ocurrió con la serie anterior (**17–19**, Figura 1), los antagonistas selectivos de A_{2B}AR aquí descritos (**16**) se obtuvieron y probaron inicialmente como racematos. Es destacable que nuestros modelos moleculares predicen que hay solo un enantiómero [**(*S*)-16b** y enantiómeros topológicamente equivalentes] que debería unirse al sitio activo de A_{2B}AR. Este modelo de interacción enantioselectiva con el bolsillo de unión de A_{2B}AR, que se propuso inicialmente para la serie anterior de antagonistas,[159] se reforzó con la observación de que la aromatización del heterociclo central en la serie **12** abolía la afinidad por A_{2B}AR.[159] En un esfuerzo por confirmar este modelo enantioselectivo, se decidió separar el ligando más atractivo identificado [**(±)16b**] en sus respectivos enantiómeros. Para ello se empleó una combinación de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) quiral y espectroscopía de dicroísmo circular (CD), de la

misma manera que se describe para ejemplos anteriores de 3,4-dihidropirimidin-2-ona farmacológicamente activa.[162-164] La separación semipreparativa por HPLC del racemato **16b** en una fase estacionaria quiral (consultar la parte experimental) proporcionó cada enantiómero con una excelente pureza estereoquímica (exceso enantiomérico >99%). La señal característica en el espectro de dicroísmo circular del cromóforo enamida (alrededor de 300 nm) permitió la asignación inequívoca de la configuración absoluta de cada enantiómero (Figura 5.4.5) [162-164] mediante la comparación con los datos de CD publicada para 3,4-dihidropirimidin-2-onas enantiopuras de configuración conocida.[163-164] Esta longitud de onda, el enantiómero que mostró un efecto Cotton negativo (línea azul) se identificó como **(*R*)-16b**, mientras que el estereoisómero que mostró un efecto Cotton positivo (línea roja) se asignó como **(*S*)-16b**.

Los perfiles farmacológicos de los dos enantiómeros [**(*R*)-16b** y **(*S*)-16b**] en los cuatro receptores de adenosina humanos se examinaron (Figura 5.4.5). Los resultados confirmaron que la afinidad observada en A_{2B}AR se debe al enantiómero **(*S*)-16b** (K_i = 15.1 nM), que es casi el doble de potente que la mezcla racémica [**16b**, (K_i = 24.3 nM)], mientras que **(*R*)-16b** es inactivo en los cuatro ARs (Figura 5.4.5). Hasta dónde llega nuestro conocimiento, este es el primer ejemplo de un antagonista de A_{2B}AR que tiene un perfil de reconocimiento enantioespecífico. Además, este resultado confirma la hipótesis del modo de unión para esta serie (Figura 5.4.5), que está de acuerdo con nuestra propuesta anterior para los bioisósteros análogos **17-19**.[159]

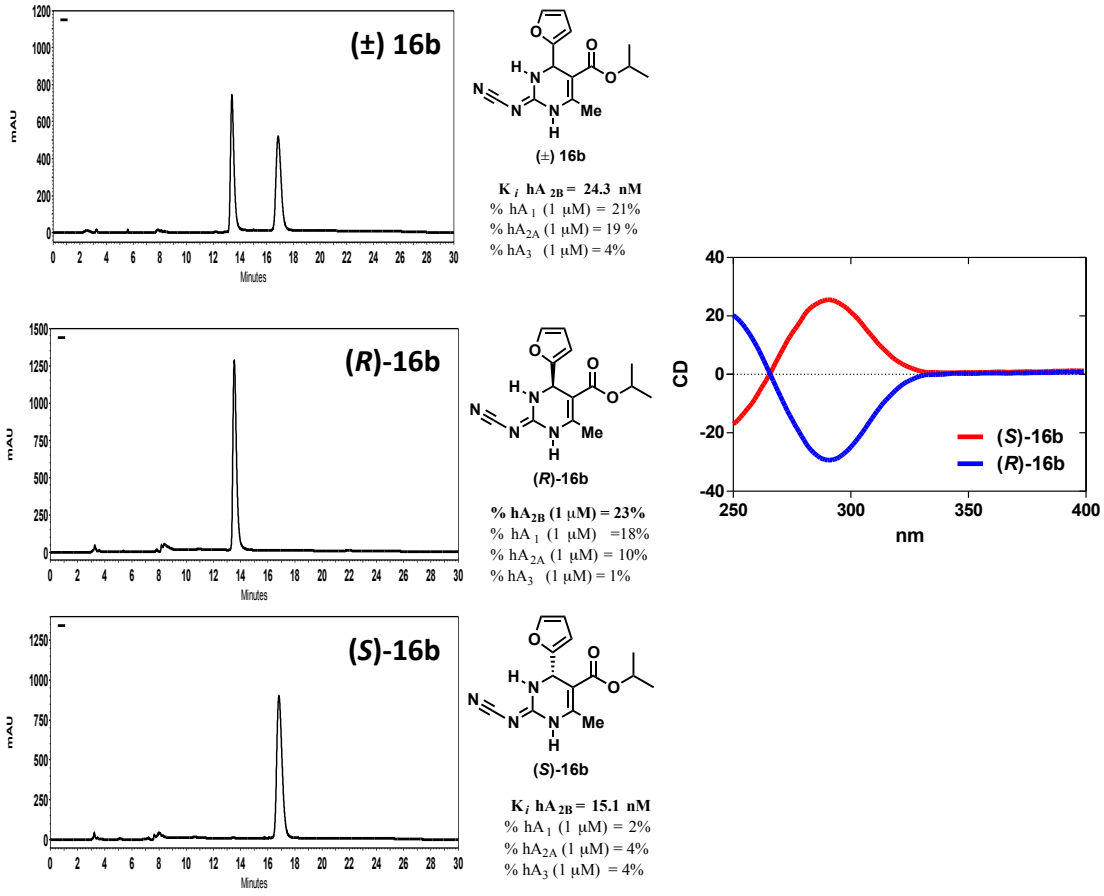


Figura 5.4.5. Señales de HPLC quiral, espectros de dicroísmo circular, configuración absoluta y datos biológicos para **(*R*)-16b** y **(*S*)-16b**.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.4.6 Consideraciones generales sobre los experimientos de evaluación farmacológica y modelado computacional

Ensayos de competición con radioligandos: Los ensayos de competición con radioligandos se llevaron a cabo *in vitro* por el grupo de la Profesora María I. Loza (Universidad de Santiago de Compostela, España) utilizando receptores de adenosina humanos expresados en células transfectadas HeLa [$hA_{2A}AR$ (9 pmol/mg de proteína) y hA_3AR (3 pmol/mg de proteína)], HEK-293 [$hA_{2B}AR$ (1.5 pmol/mg de proteína)] y CHO [hA_1AR (1.5 pmol/mg de proteína)], como se describe en trabajos previamente publicados.[158-159] A continuación se presenta una breve descripción. Los experimentos de competencia de unión de A_1AR se llevaron a cabo en membranas de células CHO-A_1 etiquetadas con 1 nM de [^{3}H]DPCPX (K_D = 0.7 nM). La unión no específica se determinó en presencia de 10 µM de R-PIA. La mezcla de reacción se incubó a 25 °C durante 60 minutos. Los experimentos de competencia de unión de $A_{2A}AR$ se llevaron a cabo en membranas de células HeLa-A_{2A} etiquetadas con 3 nM de [^{3}H]ZM241385 (K_D = 2 nM). La unión no específica se determinó en presencia de 50 µM de NECA. La mezcla de reacción se incubó a 25 °C durante 30 minutos. Los experimentos de competencia de unión de $A_{2B}AR$ se llevaron a cabo en membranas de células HEK-293-A_{2B} (Euroscreen, Gosselies, Bélgica) etiquetadas con 25 nM de [^{3}H]DPCPX (K_D = 21 nM). La unión no específica se determinó en presencia de 400 µM de NECA. La mezcla de reacción se incubó a 25 °C durante 30 minutos. Los experimentos de competencia de unión de A_3AR se llevaron a cabo en membranas de células HeLa-A_3 etiquetadas con 10 nM de [^{3}H]NECA (K_D = 8.7 nM). La unión no específica se determinó en presencia de 100 µM de R-PIA. La mezcla de reacción se incubó a 25 °C durante 180 minutos. Después del tiempo de incubación, las membranas se lavaron y filtraron, y la radioactividad se detectó en un lector Microbeta Trilux (PerkinElmer).

Ensayos funcionales. Acumulación de cAMP: Estos ensayos se llevaron a cabo en receptores de adenosina transfectados utilizando un kit de inmunoensayo de enzima cAMP (Amersham Biosciences) siguiendo los protocolos previamente descritos. Se sembraron células HEK-293 (10,000 células/pocillo) en placas de cultivo de 96 pocillos y se incubaron a 37ºC en una atmósfera con un 5% de CO2 en una mezcla de nutrientes del medio Eagle F-12 (EMEM F-12), que contenía un 10% de suero fetal bovino (FCS) y un 1% de L-Glutamina. Las células se lavaron tres veces con 200 µl de medio de ensayo (EMEM-F12 y 25 mM de HEPES, pH=7.4) y se preincubaron con medio de ensayo que contenía 30 µM de rolipram y compuestos de prueba a 37ºC durante 15 minutos. Se incubaron 10 µM de NECA durante 15 minutos a 37ºC (tiempo total de incubación 30 minutos). La reacción se detuvo con un tampón de lisis suministrado en el kit y se realizó el ensayo de inmunoensayo de enzima para la detección de cAMP intracelular a 450 nm en un detector Ultra Evolution (Tecan).

Análisis de datos: Los valores de IC_{50} se obtuvieron ajustando los datos mediante una regresión no lineal utilizando el software Prism 2.1 (GraphPad, San Diego, CA). Los valores de K_i se obtuvieron a partir de la ecuación de Cheng-Prusoff.[165] Para aquellos compuestos que mostraron poca afinidad o escasa solubilidad, se informa un porcentaje de inhibición de unión específica. Los resultados son el promedio de 3 experimentos (n = 3), cada uno realizado por duplicado. Los valores funcionales de K_B se calcularon a partir de los valores de IC_{50} utilizando el método de Leff y Dougall.[166]

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Modelado computacional: Nuestra estrategia computacional para el diseño basado en la estructura de ligandos de los receptores de adenosina ha sido revisada

recientemente[159] y comprende una combinación de modelado de homología y acoplamiento ligando-receptor.

Modelado de homología del *h*A_{2B}AR: La generación de la estructura 3D inactiva de este receptor, utilizada para el acoplamiento de antagonistas, consistió en los siguientes pasos secuenciales:

(i) Curación manual de la alineación de secuencia con la plantilla A_{2A}AR (código PDB 3EML),[167]

(ii) Generación y selección de modelos de homología y procedimientos de refinamiento de bucles con Modeler,[168]

(iii) Evaluación de los rotámeros de Asn/Gln/His y estados de protonación de las cadenas laterales con el servidor web Molprobity (http://molprobity.biochem.duke.edu/)

(iv) Uso de herramientas de la Suite Schrödinger para refinamientos estructurales energéticos.[169]

Acoplamiento de ligandos: Tanto los estereoisómeros R como S de cada ligando se construyeron y optimizaron en 3D utilizando la interfaz gráfica Maestro y la utilidad LigPrep de la Suite Schrödinger. Cada ligando se acopló 20 veces con parámetros de búsqueda de algoritmo genético (GA) por defecto (alta precisión), utilizando la función de puntuación Chemscore implementada en GOLD4[170]y permitiendo plena flexibilidad para el ligando, incluyendo la inversión de los enlaces amida. La esfera de búsqueda se centró en la cadena lateral (CD1) de Ile^7y se expandió con un radio de 15 Å, asegurando así un espacio de búsqueda lo suficientemente generoso que abarca el sitio de unión de antagonistas determinado experimentalmente para los receptores de adenosina. Se consideraron dos moléculas de agua en la cavidad de unión, como se propuso previamente[171] y se confirmó aquí mediante simulaciones de MD (Molecular Dynamics). La contribución potencial del agua para la unión solo se incluye en la posición final del acoplamiento si produce un aumento en la puntuación predicha, y la red de enlaces de hidrógeno se optimiza (opción toogle trans_spin 2 en GOLD). Además, se tuvieron en cuenta los dos rotámeros de Asn^6 utilizando la opción de estructura de ensamblaje en GOLD. El criterio de selección de las posiciones de acoplamiento se basó en una combinación de la clasificación de Chemscore y la población (convergencia) de las soluciones de acuerdo con un criterio de agrupación de 1 Å.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

5.4.7 Conclusiones específicas de este trabajo en el contexto de la Tesis

Durante este trabajo hemos descubierto una novedosa familia de antagonistas A_2BAR selectivos, potentes y de estructura simple basados en el quimiotipo 2-cianoimino-4-sustituido-6-metil-1,2,3,4-tetrahidro-pirimidina-5-carboxilato de alquilo. Los datos farmacológicos (afinidad y funcional) y la relación estructura-actividad (SAR) obtenidos para este nuevo núcleo heterocíclico son coherentes con los obtenidos para una serie anterior, lo que valida el diseño basado en la sustitución bioisostérica del grupo carbonilo por un grupo ciano-imino.

El modo de unión de ambas series también fue coherente, con una interacción estereoespecífica propuesta entre el isómero **(*S*)-16b** y análogos y el receptor. La hipótesis de una interacción estereoespecífica con el sitio de unión en el A_{2B}AR se confirmó experimentalmente por primera vez, con el eutómero **(*S*)-16** mostrando una notable potencia (valor K_i de 15.1 nM) y manteniendo el perfil completa selectividad respecto el resto de los receptores de adenosina. Este estudio representa el primer ejemplo de reconocimiento enantioespecífico en el A_{2B}AR y demuestra las ventajas competitivas de la aplicación de la química multicomponente como herramienta para acelerar los proyectos de descubrimiento de fármacos y en la generación de nuevos prototipos activos. Dos de los compuestos obtenidos en el marco de este capítulo (SY1K022 y SY1K024) están siendo probados en líneas celulares de cáncer de colon, en colaboración con el Dr. Jorge Barbazán (IDIS). Esos estudios han proporcionado resultados muy satisfactorios, evidenciando una notable actividad antiproliferativa (reducciones del 60-80% a 1 y 10 mM) evidenciando el potencial de los antagonistas A_{2B}AR en el marco de la terapia del cáncer.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

6. CONCLUSIONES

Esta Memoria de Tesis Doctoral describe una investigación basada en el descubrimiento de nuevos fármacos antitumorales mediante el empleo de reacciones multicomponente como motor principal en la generación de estructuras y en definitiva como herramienta de High Throughput Syntehsis.

El enfoque diferencial con respecto a otras aproximaciones sintéticas que utilizan reacciones multicomponente, radica en que en este trabajo el diseño de estas metodologías sintéticas se realizó teniendo en consideración sitios de unión específicos de dianas tumorales (KSP o receptor A_2B de adenosina) y la asistencia de herramientas computacionales (docking, modelado por homología, etc).

Las quimiotecas de compuestos, sintetizadas en esta Tesis, fueron obtenidas mediante reacciones multicomponente (reacciones de Ugi para el sitio de unión alostérico de la diana KSP o reacciones de Biginelli para la interacción con el receptor A_2B) así como estrategias de ciclación y/o decoración, para sitios de unión específicos de proteínas que están directamente relacionadas con el desarrollo de tumores.

Las metodologías empleadas en esta Tesis (RMCs, bioinformática y ensayo farmacológico) nos han permitido acceder de manera ágil a biomoléculas que interactúan con los sitios de unión de las dos dianas específicas que se han estudiado en este proyecto.

Las conclusiones generales más importantes de este trabajo de Tesis Doctoral pueden resumirse en los siguientes puntos:

- En el primer capítulo se describe una revisión bibliográfica realizada sobre el empleo de reacciones multicomponente en el campo del descubrimiento de fármacos antimitóticos. El desarrollo de nuevas MCR es una tarea intelectualmente desafiante que considera no solo la reactividad de los materiales iniciales, sino también la reactividad de las moléculas intermedias generadas *in situ*, su compatibilidad y su compartimentalización. En los últimos años ha habido algunos esfuerzos para sintetizar fármacos antimitóticos mediante MCR, pero estos intentos se han centrado principalmente en la síntesis de fármacos destinados a interactuar con los microtúbulos, en muchos casos como análogos de productos naturales. Sin embargo, las MCR dirigidas a nuevos objetivos antimitóticos emergentes son una herramienta poderosa para obtener nuevos fármacos clínicamente validados en los próximos años, y contribuirán a aclarar el verdadero potencial de las terapias antimitóticas.
- En el segundo capítulo, la investigación partió de un diseño *in silico* sobre el sitio de unión allostérico de KSP, que fue seguido por la síntesis de una serie de moléculas destinadas a la inhibición de la quinesina Eg5-KSP mediante el empleo de una reacción multicomponente U-4CR inical y posterior ciclación y decoración de los aductos generados, para dar compuestos de tipo bencimidazol, diversamente sustituidos. Los resultados farmacológicos demostraron la eficacia de este enfoque multidisciplinar: con la síntesis de solo 18 compuestos tipo bencimidazol, obtuvimos compuestos con actividades inhibidoras de KSP-Eg5 mucho más altas que las del compuesto de referencia monastrol y comparables o similares a las de fármacos de referencia como STLC. En particular, los compuestos **20** y **22** son prometedores para el desarrollo de un programa de hit-to-lead basado en reacciones multicomponente, con el objetivo de obtener

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

inhibidores de KSP altamente potentes que podrían utilizarse para tratar tumores que muestran resistencia a los tratamientos quimioterapéuticos actuales.

- En el tercer capítulo, se optimizó un enfoque multicomponente similar al efectuado en el trabajo anterior, basado en reacciones de Ugi y ciclación/decoración posterior. Este nuevo procedimiento químico es conciso y eficiente para la síntesis de nuevos inhibidores de KSP tipo N-bencil-benzimidazol, estructuralemnte diferentes a los del capítulo anterior, como agentes antimitóticos. Este procedimiento se basa en una Ugi-4CR inicial que empleó isonitrilos derivados de 2-nitrofenilo y permitió un acceso rápido al inhibidor de KSP, CPUYJ039, y a análogos dimetilados, así como a sus derivados que contienen un grupo amino libre, en comparación con los procedimientos de síntesis lineal actuales informados previamente. El descubrimiento de análogos de CPUYJ039 más optimizados indica el poder de nuestro nuevo método basado en MCR, que proporciona eficazmente posibles inhibidores mitóticos dirigidos al dominio motor de KSP.
- En el cuarto y último capítulo de esta Tesis, se estudió una novedosa familia de antagonistas altamente selectivos de A_{2B}AR basados en el quimiotipo de 2-cianoimino-4-sustituido-6-metil-1,2,3,4-tetrahidro-pirimidina-5-carboxilato, estructuralmente simples y potentes. Los datos biológicos y la relación estructura-actividad obtenidos para este scaffold son consistentes con los obtenidos para una serie anterior [es decir, el scaffold de 3,4-dihidropirimidin-2(1H)-ona], validando así nuestro diseño basado en la sustitución bioisostérica del grupo carbonilo por un grupo ciano. El modo de unión de ambas series también fue consistente, con una interacción estereoespecífica propuesta entre el isómero **(*S*)-16b** y análogos con el receptor. La hipótesis de una interacción estereoespecífica con el sitio de unión en A_2BAR se confirmó experimentalmente por primera vez, con el eutómero [**(*S*)-16**] mostrando una potencia notable (valor Ki de 15.1 nM) y manteniendo el perfil completo de selectividad en los cuatro receptores ARs. Este estudio constituye el primer ejemplo de reconocimiento enantiospecífico en A_{2B}AR y abre nuevas posibilidades en el diseño de ligandos para este receptor.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(1) Sociedad Española de Oncología Médica; SEOM. *Las Cifras Del Cáncer En España*; 2023; Vol. ISBN: 9788409481736.

(2) Gilman, A.; Philips, F. S. The Biological Actions and Therapeutic Applications of the B-Chloroethyl Amines and Sulfides. *Science (1979)* **1946**, *103* (2675), 409–436. https://doi.org/10.1126/science.103.2675.409.

(3) Jordan, M. A.; Wilson, L. Microtubules as a Target for Anticancer Drugs. *Nat Rev Cancer* **2004**, *4* (4), 253–265. https://doi.org/10.1038/nrc1317.

(4) Rowinsky, E. K.; Donehower, R. C. Paclitaxel (Taxol). *New England Journal of Medicine* **1995**, *332* (15), 1004–1014. https://doi.org/10.1056/NEJM199504133321507.

(5) Korde, L. A.; Somerfield, M. R.; Carey, L. A.; Crews, J. R.; Denduluri, N.; Hwang, E. S.; Khan, S. A.; Loibl, S.; Morris, E. A.; Perez, A.; Regan, M. M.; Spears, P. A.; Sudheendra, P. K.; Symmans, W. F.; Yung, R. L.; Harvey, B. E.; Hershman, D. L. Neoadjuvant Chemotherapy, Endocrine Therapy, and Targeted Therapy for Breast Cancer: ASCO Guideline. *Journal of Clinical Oncology* **2021**, *39* (13), 1485–1505. https://doi.org/10.1200/JCO.20.03399.

(6) Simsek, C.; Esin, E.; Yalcin, S. Metronomic Chemotherapy: A Systematic Review of the Literature and Clinical Experience. *J Oncol* **2019**, *2019*, 1–31. https://doi.org/10.1155/2019/5483791.

(7) June, C. H.; Sadelain, M. Chimeric Antigen Receptor Therapy. *New England Journal of Medicine* **2018**, *379* (1), 64–73. https://doi.org/10.1056/NEJMra1706169.

(8) Maude, S. L.; Laetsch, T. W.; Buechner, J.; Rives, S.; Boyer, M.; Bittencourt, H.; Bader, P.; Verneris, M. R.; Stefanski, H. E.; Myers, G. D.; Qayed, M.; De Moerloose, B.; Hiramatsu, H.; Schlis, K.; Davis, K. L.; Martin, P. L.; Nemecek, E. R.; Yanik, G. A.; Peters, C.; Baruchel, A.; Boissel, N.; Mechinaud, F.; Balduzzi, A.; Krueger, J.; June, C. H.; Levine, B. L.; Wood, P.; Taran, T.; Leung, M.; Mueller, K. T.; Zhang, Y.; Sen, K.; Lebwohl, D.; Pulsipher, M. A.; Grupp, S. A. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *New England Journal of Medicine* **2018**, *378* (5), 439–448. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1709866.

(9) Schuster, S. J.; Bishop, M. R.; Tam, C. S.; Waller, E. K.; Borchmann, P.; McGuirk, J. P.; Jäger, U.; Jaglowski, S.; Andreadis, C.; Westin, J. R.; Fleury, I.; Bachanova, V.; Foley, S. R.; Ho, P. J.; Mielke, S.; Magenau, J. M.; Holte, H.; Pantano, S.; Pacaud, L. B.; Awasthi, R.; Chu, J.; Anak, Ö.; Salles, G.; Maziarz, R. T. Tisagenlecleucel in Adult Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *New England Journal of Medicine* **2019**, *380* (1), 45–56. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1804980.

(10) Druker, B. J.; Talpaz, M.; Resta, D. J.; Peng, B.; Buchdunger, E.; Ford, J. M.; Lydon, N. B.; Kantarjian, H.; Capdeville, R.; Ohno-Jones, S.; Sawyers, C. L. Efficacy and Safety of a Specific Inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in Chronic Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* **2001**, *344* (14), 1031–1037. https://doi.org/10.1056/NEJM200104053441401.

(11) Ciardiello, F.; Tortora, G. EGFR Antagonists in Cancer Treatment. *New England Journal of Medicine* **2008**, *358* (11), 1160–1174. https://doi.org/10.1056/NEJMra0707704.

(12) Cunningham, D.; Hawkes, E. A.; Jack, A.; Qian, W.; Smith, P.; Mouncey, P.; Pocock, C.; Ardeshna, K. M.; Radford, J. A.; McMillan, A.; Davies, J.; Turner, D.; Kruger, A.; Johnson, P.; Gambell, J.; Linch, D. Rituximab plus Cyclophosphamide, Doxorubicin,

Vincristine, and Prednisolone in Patients with Newly Diagnosed Diffuse Large B-Cell Non-Hodgkin Lymphoma: A Phase 3 Comparison of Dose Intensification with 14-Day versus 21-Day Cycles. *The Lancet* **2013**, *381* (9880), 1817–1826. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(13)60313-X.

(13) von Minckwitz, G.; Procter, M.; de Azambuja, E.; Zardavas, D.; Benyunes, M.; Viale, G.; Suter, T.; Arahmani, A.; Rouchet, N.; Clark, E.; Knott, A.; Lang, I.; Levy, C.; Yardley, D. A.; Bines, J.; Gelber, R. D.; Piccart, M.; Baselga, J. Adjuvant Pertuzumab and Trastuzumab in Early HER2-Positive Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* **2017**, *377* (2), 122–131. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1703643.

(14) Slamon, D. J.; Leyland-Jones, B.; Shak, S.; Fuchs, H.; Paton, V.; Bajamonde, A.; Fleming, T.; Eiermann, W.; Wolter, J.; Pegram, M.; Baselga, J.; Norton, L. Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. *New England Journal of Medicine* **2001**, *344* (11), 783–792. https://doi.org/10.1056/NEJM200103153441101.

(15) Powell, S. F.; Abreu, D. R.; Langer, C. J.; Tafreshi, A.; Paz-Ares, L.; Kopp, H.-G.; Rodríguez-Cid, J.; Kowalski, D.; Cheng, Y.; Kurata, T.; Awad, M. M.; Lin, J.; Zhao, B.; Pietanza, M. C.; Piperdi, B.; Garassino, M. C. Pembrolizumab (Pembro) plus Platinum-Based Chemotherapy (Chemo) in NSCLC with Brain Metastases: Pooled Analysis of KEYNOTE-021, 189, and 407. *Annals of Oncology* **2019**, *30*, v606–v607. https://doi.org/10.1093/annonc/mdz260.005.

(16) Graziano, G.; Stefanachi, A.; Contino, M.; Prieto-Díaz, R.; Ligresti, A.; Kumar, P.; Scilimati, A.; Sotelo, E.; Leonetti, F. Multicomponent Reaction-Assisted Drug Discovery: A Time- and Cost-Effective Green Approach Speeding Up Identification and Optimization of Anticancer Drugs. *Int J Mol Sci* **2023**, *24* (7), 6581. https://doi.org/10.3390/ijms24076581.

(17) Al Bostami, R. D.; Abuwatfa, W. H.; Husseini, G. A. Recent Advances in Nanoparticle-Based Co-Delivery Systems for Cancer Therapy. *Nanomaterials* **2022**, *12* (15), 2672. https://doi.org/10.3390/nano12152672.

(18) Ledermann, J. A.; Canevari, S.; Thigpen, T. Targeting the Folate Receptor: Diagnostic and Therapeutic Approaches to Personalize Cancer Treatments. *Annals of Oncology* **2015**, *26* (10), 2034–2043. https://doi.org/10.1093/annonc/mdv250.

(19) Liu, C.; Chen, H.; Zhou, H.; Yu, S.; Wang, N.; Yao, W.; Lu, A.-H.; Qiao, W. Magnetic Resonance Imaging-Guided Multi-Stimulus-Responsive Drug Delivery Strategy for Personalized and Precise Cancer Treatment. *ACS Appl Mater Interfaces* **2021**, *13* (43), 50716–50732. https://doi.org/10.1021/acsami.1c13853.

(20) Shiekh, F. A. Personalized Nanomedicine: Future Medicine for Cancer Treatment. *Int J Nanomedicine* **2013**, 201. https://doi.org/10.2147/IJN.S41525.

(21) Venugopal, J. R.; Prabhakaran, M. P.; Mukherjee, S.; Ravichandran, R.; Dan, K.; Ramakrishna, S. Biomaterial Strategies for Alleviation of Myocardial Infarction. *J R Soc Interface* **2012**, *9* (66), 1–19. https://doi.org/10.1098/rsif.2011.0301.

(22) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144* (5), 646–674. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013.

(23) Rosenberg, S. A.; Restifo, N. P. Adoptive Cell Transfer as Personalized Immunotherapy for Human Cancer. *Science (1979)* **2015**, *348* (6230), 62–68. https://doi.org/10.1126/science.aaa4967.

(24) Ribas, A.; Wolchok, J. D. Cancer Immunotherapy Using Checkpoint Blockade. *Science (1979)* **2018**, *359* (6382), 1350–1355. https://doi.org/10.1126/science.aar4060.

(25) Jeong, J. H.; Oh, J. M.; Jeong, S. Y.; Lee, S.-W.; Lee, J.; Ahn, B.-C. Combination Treatment with the *BRAF* ^{V600E} Inhibitor Vemurafenib and the BH3 Mimetic Navitoclax

USC DE COMPOSTELA

for *BRAF* -Mutant Thyroid Carcinoma. *Thyroid* **2019**, *29* (4), 540–548. https://doi.org/10.1089/thy.2018.0511.

(26) Krop, I. E.; Kim, S.-B.; Martin, A. G.; LoRusso, P. M.; Ferrero, J.-M.; Badovinac-Crnjevic, T.; Hoersch, S.; Smitt, M.; Wildiers, H. Trastuzumab Emtansine versus Treatment of Physician's Choice in Patients with Previously Treated HER2-Positive Metastatic Breast Cancer (TH3RESA): Final Overall Survival Results from a Randomised Open-Label Phase 3 Trial. *Lancet Oncol* **2017**, *18* (6), 743–754. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30313-3.

(27) Hodi, F. S.; O'Day, S. J.; McDermott, D. F.; Weber, R. W.; Sosman, J. A.; Haanen, J. B.; Gonzalez, R.; Robert, C.; Schadendorf, D.; Hassel, J. C.; Akerley, W.; van den Eertwegh, A. J. M.; Lutzky, J.; Lorigan, P.; Vaubel, J. M.; Linette, G. P.; Hogg, D.; Ottensmeier, C. H.; Lebbé, C.; Peschel, C.; Quirt, I.; Clark, J. I.; Wolchok, J. D.; Weber, J. S.; Tian, J.; Yellin, M. J.; Nichol, G. M.; Hoos, A.; Urba, W. J. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *New England Journal of Medicine* **2010**, *363* (8), 711–723. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003466.

(28) Robert, C.; Schachter, J.; Long, G. V.; Arance, A.; Grob, J. J.; Mortier, L.; Daud, A.; Carlino, M. S.; McNeil, C.; Lotem, M.; Larkin, J.; Lorigan, P.; Neyns, B.; Blank, C. U.; Hamid, O.; Mateus, C.; Shapira-Frommer, R.; Kosh, M.; Zhou, H.; Ibrahim, N.; Ebbinghaus, S.; Ribas, A. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *New England Journal of Medicine* **2015**, *372* (26), 2521–2532. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1503093.

(29) Creative Commons -. *Attribution-NonCommercial-ShareAlike 2.0 Generic*. https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.en (accessed 2023-11-02).

(30) Rieder, C. L.; Maiato, H. Stuck in Division or Passing Through. *Dev Cell* **2004**, *7* (5), 637–651. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2004.09.002.

(31) Musacchio, A.; Salmon, E. D. The Spindle-Assembly Checkpoint in Space and Time. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2007**, *8* (5), 379–393. https://doi.org/10.1038/nrm2163.

(32) Wang X, Cheung HW, Chun AC, Jin DY, Wong YC. Mitotic checkpoint defects in human cancers and their implications to chemotherapy. *Front Biosci*. **2008**; (*13*), 2103-2114. doi:10.2741/2827

(33) Li, M.; Fang, X.; Baker, D. J.; Guo, L.; Gao, X.; Wei, Z.; Han, S.; van Deursen, J. M.; Zhang, P. The ATM–P53 Pathway Suppresses Aneuploidy-Induced Tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2010**, *107* (32), 14188–14193. https://doi.org/10.1073/pnas.1005960107.

(34) Abal, M.; Andreu, J.; Barasoain, I. Taxanes: Microtubule and Centrosome Targets, and Cell Cycle Dependent Mechanisms of Action. *Curr Cancer Drug Targets* **2003**, *3* (3), 193–203. https://doi.org/10.2174/1568009033481967.

(35) Kuznetsov, G.; Towle, M. J.; Cheng, H.; Kawamura, T.; TenDyke, K.; Liu, D.; Kishi, Y.; Yu, M. J.; Littlefield, B. A. Induction of Morphological and Biochemical Apoptosis Following Prolonged Mitotic Blockage by Halichondrin B Macrocyclic Ketone Analog E7389. *Cancer Res* **2004**, *64* (16), 5760–5766. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1169.

(36) Carleton, M.; Mao, M.; Biery, M.; Warrener, P.; Kim, S.; Buser, C.; Marshall, C. G.; Fernandes, C.; Annis, J.; Linsley, P. S. RNA Interference-Mediated Silencing of Mitotic Kinesin KIF14 Disrupts Cell Cycle Progression and Induces Cytokinesis Failure. *Mol Cell Biol* **2006**, *26* (10), 3853–3863. https://doi.org/10.1128/MCB.26.10.3853-3863.2006.

(37) Owusu, M.; Bannauer, P.; Ferreira da Silva, J.; Mourikis, T. P.; Jones, A.; Májek, P.; Caldera, M.; Wiedner, M.; Lardeau, C.-H.; Mueller, A. C.; Menche, J.; Kubicek, S.;

USC DE COMPOSTELA

Ciccarelli, F. D.; Loizou, J. I. Mapping the Human Kinome in Response to DNA Damage. *Cell Rep* **2019**, *26* (3), 555-563.e6. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.12.087.

(38) Stumpff, J.; von Dassow, G.; Wagenbach, M.; Asbury, C.; Wordeman, L. The Kinesin-8 Motor Kif18A Suppresses Kinetochore Movements to Control Mitotic Chromosome Alignment. *Dev Cell* **2008**, *14* (2), 252–262. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.11.014.

(39) Carmena, M.; Earnshaw, W. C. The Cellular Geography of Aurora Kinases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2003**, *4* (11), 842–854. https://doi.org/10.1038/nrm1245.

(40) Archambault, V.; Glover, D. M. Polo-like Kinases: Conservation and Divergence in Their Functions and Regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2009**, *10* (4), 265–275. https://doi.org/10.1038/nrm2653.

(41) Tanenbaum, M. E.; Macurek, L.; van der Vaart, B.; Galli, M.; Akhmanova, A.; Medema, R. H. A Complex of Kif18b and MCAK Promotes Microtubule Depolymerization and Is Negatively Regulated by Aurora Kinases. *Current Biology* **2011**, *21* (16), 1356–1365. https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.07.017.

(42) Škubník, J.; Jurášek, M.; Ruml, T.; Rimpelová, S. Mitotic Poisons in Research and Medicine. *Molecules* **2020**, *25* (20), 4632. https://doi.org/10.3390/molecules25204632.

(43) Barr, F. A.; Silljé, H. H. W.; Nigg, E. A. Polo-like Kinases and the Orchestration of Cell Division. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2004**, *5* (6), 429–441. https://doi.org/10.1038/nrm1401.

(44) Petronczki, M.; Glotzer, M.; Kraut, N.; Peters, J.-M. Polo-like Kinase 1 Triggers the Initiation of Cytokinesis in Human Cells by Promoting Recruitment of the RhoGEF Ect2 to the Central Spindle. *Dev Cell* **2007**, *12* (5), 713–725. https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.03.013.

(45) Rudolph, D.; Steegmaier, M.; Hoffmann, M.; Grauert, M.; Baum, A.; Quant, J.; Haslinger, C.; Garin-Chesa, P.; Adolf, G. R. BI 6727, A Polo-like Kinase Inhibitor with Improved Pharmacokinetic Profile and Broad Antitumor Activity. *Clinical Cancer Research* **2009**, *15* (9), 3094–3102. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2445.

(46) Gjertsen BT, Schöffski P. Discovery and development of the Polo-like kinase inhibitor volasertib in cancer therapy. *Leukemia*. **2015**; 29 (1): 11-19. doi:10.1038/leu.2014.222

(47) Pajtler, K. W.; Sadowski, N.; Ackermann, S.; Althoff, K.; Schönbeck, K.; Batzke, K.; Schäfers, S.; Odersky, A.; Heukamp, L.; Astrahantseff, K.; Künkele, A.; Deubzer, H. E.; Schramm, A.; Sprüssel, A.; Thor, T.; Lindner, S.; Eggert, A.; Fischer, M.; Schulte, J. H. The GSK461364 PLK1 Inhibitor Exhibits Strong Antitumoral Activity in Preclinical Neuroblastoma Models. *Oncotarget* **2017**, *8* (4), 6730–6741. https://doi.org/10.18632/oncotarget.14268.

(48) Melichar, B.; Adenis, A.; Lockhart, A. C.; Bennouna, J.; Dees, E. C.; Kayaleh, O.; Obermannova, R.; DeMichele, A.; Zatloukal, P.; Zhang, B.; Ullmann, C. D.; Schusterbauer, C. Safety and Activity of Alisertib, an Investigational Aurora Kinase A Inhibitor, in Patients with Breast Cancer, Small-Cell Lung Cancer, Non-Small-Cell Lung Cancer, Head and Neck Squamous-Cell Carcinoma, and Gastro-Oesophageal Adenocarcinoma: A Five-Arm Phase 2 Study. *Lancet Oncol* **2015**, *16* (4), 395–405. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70051-3.

(49) Schwartz, G. K.; Carvajal, R. D.; Midgley, R.; Rodig, S. J.; Stockman, P. K.; Ataman, O.; Wilson, D.; Das, S.; Shapiro, G. I. Phase I Study of Barasertib (AZD1152), a Selective Inhibitor of Aurora B Kinase, in Patients with Advanced Solid Tumors. *Invest New Drugs* **2013**, *31* (2), 370–380. https://doi.org/10.1007/s10637-012-9825-7.

(50) Qian, X.; McDonald, A.; Zhou, H.-J.; Adams, N. D.; Parrish, C. A.; Duffy, K. J.; Fitch, D. M.; Tedesco, R.; Ashcraft, L. W.; Yao, B.; Jiang, H.; Huang, J. K.; Marin, M. V.; Aroyan, C. E.; Wang, J.; Ahmed, S.; Burgess, J. L.; Chaudhari, A. M.; Donatelli, C. A.; Darcy, M. G.; Ridgers, L. H.; Newlander, K. A.; Schmidt, S. J.; Chai, D.; Colón, M.;

Zimmerman, M. N.; Lad, L.; Sakowicz, R.; Schauer, S.; Belmont, L.; Baliga, R.; Pierce, D. W.; Finer, J. T.; Wang, Z.; Morgan, B. P.; Morgans, D. J.; Auger, K. R.; Sung, C.-M.; Carson, J. D.; Luo, L.; Hugger, E. D.; Copeland, R. A.; Sutton, D.; Elliott, J. D.; Jackson, J. R.; Wood, K. W.; Dhanak, D.; Bergnes, G.; Knight, S. D. Discovery of the First Potent and Selective Inhibitor of Centromere-Associated Protein E: GSK923295. *ACS Med Chem Lett* **2010**, *1* (1), 30–34. https://doi.org/10.1021/ml900018m.

(51) Lock, R. B.; Carol, H.; Morton, C. L.; Keir, S. T.; Reynolds, C. P.; Kang, M. H.; Maris, J. M.; Wozniak, A. W.; Gorlick, R.; Kolb, E. A.; Houghton, P. J.; Smith, M. A. Initial Testing of the CENP-E Inhibitor GSK923295A by the Pediatric Preclinical Testing Program. *Pediatr Blood Cancer* **2012**, *58* (6), 916–923. https://doi.org/10.1002/pbc.23176.

(52) Wojcik, E. J.; Buckley, R. S.; Richard, J.; Liu, L.; Huckaba, T. M.; Kim, S. Kinesin-5: Cross-Bridging Mechanism to Targeted Clinical Therapy. *Gene* **2013**, *531* (2), 133–149. https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.08.004.

(53) Sarli, V.; Giannis, A. Targeting the Kinesin Spindle Protein: Basic Principles and Clinical Implications. *Clinical Cancer Research* **2008**, *14* (23), 7583–7587. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-0120.

(54) Shahin, R.; Aljamal, S. Kinesin Spindle Protein Inhibitors in Cancer: From High Throughput Screening to Novel Therapeutic Strategies. *Future Sci OA* **2022**, *8* (3). https://doi.org/10.2144/fsoa-2021-0116.

(55) Holen, K. D.; Belani, C. P.; Wilding, G.; Ramalingam, S.; Volkman, J. L.; Ramanathan, R. K.; Vasist, L. S.; Bowen, C. J.; Hodge, J. P.; Dar, M. M.; Ho, P. T. C. A First in Human Study of SB-743921, a Kinesin Spindle Protein Inhibitor, to Determine Pharmacokinetics, Biologic Effects and Establish a Recommended Phase II Dose. *Cancer Chemother Pharmacol* **2011**, *67* (2), 447–454. https://doi.org/10.1007/s00280-010-1346-5.

(56) Shah, J. J.; Kaufman, J. L.; Zonder, J. A.; Cohen, A. D.; Bensinger, W. I.; Hilder, B. W.; Rush, S. A.; Walker, D. H.; Tunquist, B. J.; Litwiler, K. S.; Ptaszynski, M.; Orlowski, R. Z.; Lonial, S. A Phase 1 and 2 Study of Filanesib Alone and in Combination with Low-dose Dexamethasone in Relapsed/Refractory Multiple Myeloma. *Cancer* **2017**, *123* (23), 4617–4630. https://doi.org/10.1002/cncr.30892.

(57) Gottesman, M. M. Mechanisms of Cancer Drug Resistance. *Annu Rev Med* **2002**, *53* (1), 615–627. https://doi.org/10.1146/annurev.med.53.082901.103929.

(58) Szakács, G.; Paterson, J. K.; Ludwig, J. A.; Booth-Genthe, C.; Gottesman, M. M. Targeting Multidrug Resistance in Cancer. *Nat Rev Drug Discov* **2006**, *5* (3), 219–234. https://doi.org/10.1038/nrd1984.

(59) Mansoori, B.; Mohammadi, A.; Davudian, S.; Shirjang, S.; Baradaran, B. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Adv Pharm Bull* **2017**, *7* (3), 339–348. https://doi.org/10.15171/apb.2017.041.

(60) Rath, O.; Kozielski, F. Kinesins and Cancer. *Nat Rev Cancer* **2012**, *12* (8), 527–539. https://doi.org/10.1038/nrc3310.

(61) Komlodi-Pasztor, E.; Sackett, D.; Wilkerson, J.; Fojo, T. Mitosis Is Not a Key Target of Microtubule Agents in Patient Tumors. *Nat Rev Clin Oncol* **2011**, *8* (4), 244–250. https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.228.

(62) Chiarella, A. M.; Ryu, Y. K.; Manji, G. A.; Rustgi, A. K. Extracellular ATP and Adenosine in Cancer Pathogenesis and Treatment. *Trends Cancer* **2021**, *7* (8), 731–750. https://doi.org/10.1016/j.trecan.2021.04.008.

(63) Cunha, R. A. How Does Adenosine Control Neuronal Dysfunction and Neurodegeneration? *J Neurochem* **2016**, *139* (6), 1019–1055. https://doi.org/10.1111/jnc.13724.

(64) Liu, Y.; Chen, J.; Li, X.; Zhou, X.; Hu, Y.; Chu, S.; Peng, Y.; Chen, N. Research Progress on Adenosine in Central Nervous System Diseases. *CNS Neurosci Ther* **2019**, *25* (9), 899–910. https://doi.org/10.1111/cns.13190.
(65) Huang, Z.-L.; Zhang, Z.; Qu, W.-M. Roles of Adenosine and Its Receptors in Sleep–Wake Regulation; 2014; pp 349–371. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801022-8.00014-3.
(66) Reiss, A. B.; Grossfeld, D.; Kasselman, L. J.; Renna, H. A.; Vernice, N. A.; Drewes, W.; Konig, J.; Carsons, S. E.; DeLeon, J. Adenosine and the Cardiovascular System. *American Journal of Cardiovascular Drugs* **2019**, *19* (5), 449–464. https://doi.org/10.1007/s40256-019-00345-5.
(67) Eltzschig, H. K.; Weissmüller, T.; Mager, A.; Eckle, T. Nucleotide Metabolism and Cell-Cell Interactions. In *Cell-Cell Interactions in Health and Disease*; Humana Press: New Jersey; pp 73–88. https://doi.org/10.1385/1-59745-113-4:73.
(68) Boison, D.; Yegutkin, G. G. Adenosine Metabolism: Emerging Concepts for Cancer Therapy. *Cancer Cell* **2019**, *36* (6), 582–596. https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.10.007.
(69) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **2000**, *100* (1), 57–70. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
(70) De Palma M, Hanahan D. The biology of personalized cancer medicine: facing individual complexities underlying hallmark capabilities. *Mol Oncol*. 2012;6(2):111-127. doi:10.1016/j.molonc.2012.01.011.
(71) Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* **2022**, *12* (1), 31–46. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
(72) Campos-Contreras, A. del R.; Díaz-Muñoz, M.; Vázquez-Cuevas, F. G. Purinergic Signaling in the Hallmarks of Cancer. *Cells* **2020**, *9* (7), 1612. https://doi.org/10.3390/cells9071612.
(73) Di Virgilio, F.; Adinolfi, E. Extracellular Purines, Purinergic Receptors and Tumor Growth. *Oncogene* **2017**, *36* (3), 293–303. https://doi.org/10.1038/onc.2016.206.
(74) Yi, Y.; Zhou, Y.; Chu, X.; Zheng, X.; Fei, D.; Lei, J.; Qi, H.; Dai, Y. Blockade of Adenosine A2b Receptor Reduces Tumor Growth and Migration in Renal Cell Carcinoma. *J Cancer* **2020**, *11* (2), 421–431. https://doi.org/10.7150/jca.31245.
(75) Soleimani, A.; Bahreyni, A.; Roshan, M. K.; Soltani, A.; Ryzhikov, M.; Shafiee, M.; Soukhtanloo, M.; Jaafari, M. R.; Mashkani, B.; Hassanian, S. M. Therapeutic Potency of Pharmacological Adenosine Receptors Agonist/Antagonist on Cancer Cell Apoptosis in Tumor Microenvironment, Current Status, and Perspectives. *J Cell Physiol* **2019**, *234* (3), 2329–2336. https://doi.org/10.1002/jcp.27249.
(76) Jafari, S. M.; Joshaghani, H. R.; Panjehpour, M.; Aghaei, M.; Zargar Balajam, N. Apoptosis and Cell Cycle Regulatory Effects of Adenosine by Modulation of GLI -1 and ERK 1/2 Pathways in CD 44 + and CD 24 − Breast Cancer Stem Cells. *Cell Prolif* **2017**, *50* (4). https://doi.org/10.1111/cpr.12345.
(77) Du, X.; Ou, X.; Song, T.; Zhang, W.; Cong, F.; Zhang, S.; Xiong, Y. Adenosine A $_{2B}$ Receptor Stimulates Angiogenesis by Inducing VEGF and ENOS in Human Microvascular Endothelial Cells. *Exp Biol Med* **2015**, *240* (11), 1472–1479. https://doi.org/10.1177/1535370215584939.
(78) Erices, J. I.; Niechi, I.; Uribe-Ojeda, A.; Toro, M. de los Á.; García-Romero, N.; Carrión-Navarro, J.; Monago-Sánchez, Á.; Ayuso-Sacido, Á.; Martin, R. S.; Quezada-Monrás, C. The Low Affinity A2B Adenosine Receptor Enhances Migratory and Invasive Capacity in Vitro and Angiogenesis in Vivo of Glioblastoma Stem-like Cells. *Front Oncol* **2022**, *12*. https://doi.org/10.3389/fonc.2022.969993.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

(79) Fernandez-Gallardo, M.; González-Ramírez, R.; Sandoval, A.; Felix, R.; Monjaraz, E. Adenosine Stimulate Proliferation and Migration in Triple Negative Breast Cancer Cells. *PLoS One* **2016**, *11* (12), e0167445. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167445.
(80) Corona, S. P.; Sobhani, N.; Generali, D. Adenosine A2B Receptor: Novel Anti-Cancer Therapeutic Implications. *J Cancer Metastasis Treat* **2017**, *3* (9), 206. https://doi.org/10.20517/2394-4722.2017.50.
(81) Mittal, D.; Sinha, D.; Barkauskas, D.; Young, A.; Kalimutho, M.; Stannard, K.; Caramia, F.; Haibe-Kains, B.; Stagg, J.; Khanna, K. K.; Loi, S.; Smyth, M. J. Adenosine 2B Receptor Expression on Cancer Cells Promotes Metastasis. *Cancer Res* **2016**, *76* (15), 4372–4382. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0544.
(82) Gao, Z.-G.; Jacobson, K. A. A2B Adenosine Receptor and Cancer. *Int J Mol Sci* **2019**, *20* (20), 5139. https://doi.org/10.3390/ijms20205139.
(83) Gorain, B.; Choudhury, H.; Yee, G. S.; Bhattamisra, S. K. Adenosine Receptors as Novel Targets for the Treatment of Various Cancers. *Curr Pharm Des* **2019**, *25* (26), 2828–2841. https://doi.org/10.2174/1381612825666190716102037.
(84) Adams, J. L.; Duffy, K. J.; Moore, M. L.; Yang, J. Cancer Immunotherapy—An Emerging Field That Bridges Oncology and Immunology Research. In *Comprehensive Medicinal Chemistry III*; Elsevier, 2017; pp 357–394. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.12400-X.
(85) Churov, A.; Zhulai, G. Targeting Adenosine and Regulatory T Cells in Cancer Immunotherapy. *Hum Immunol* **2021**, *82* (4), 270–278. https://doi.org/10.1016/j.humimm.2020.12.005.
(86) Hammami, A.; Allard, D.; Allard, B.; Stagg, J. Targeting the Adenosine Pathway for Cancer Immunotherapy. *Semin Immunol* **2019**, *42*, 101304. https://doi.org/10.1016/j.smim.2019.101304.
(87) Shi, L.; Yang, L.; Wu, Z.; Xu, W.; Song, J.; Guan, W. Adenosine Signaling: Next Checkpoint for Gastric Cancer Immunotherapy? *Int Immunopharmacol* **2018**, *63*, 58–65. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.07.023.
(88) Yu, F.; Zhu, C.; Xie, Q.; Wang, Y. Adenosine A $_{2A}$ Receptor Antagonists for Cancer Immunotherapy. *J Med Chem* **2020**, *63* (21), 12196–12212. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00237.
(89) Jacob, F.; Novo, C. P.; Bachert, C.; Van Crombruggen, K. Purinergic Signaling in Inflammatory Cells: P2 Receptor Expression, Functional Effects, and Modulation of Inflammatory Responses. *Purinergic Signal* **2013**, *9* (3), 285–306. https://doi.org/10.1007/s11302-013-9357-4.
(90) Kumar, V. Adenosine as an Endogenous Immunoregulator in Cancer Pathogenesis: Where to Go? *Purinergic Signal* **2013**, *9* (2), 145–165. https://doi.org/10.1007/s11302-012-9349-9.
(91) Huang, Y.; Gu, Z.; Fan, Y.; Zhai, G.; Zhao, X.; Sun, Q.; Shi, Y.; Lin, G. Inhibition of the Adenosinergic Pathway: The Indispensable Part of Oncological Therapy in the Future. *Purinergic Signal* **2019**, *15* (1), 53–67. https://doi.org/10.1007/s11302-018-9641-4.
(92) Leone, R. D.; Lo, Y.-C.; Powell, J. D. A2aR Antagonists: Next Generation Checkpoint Blockade for Cancer Immunotherapy. *Comput Struct Biotechnol J* **2015**, *13*, 265–272. https://doi.org/10.1016/j.csbj.2015.03.008.
(93) PAGINA BORRADA - NOT FOUND First in Human Study of M1069 in Advanced Solid Tumors.
(94) Borodovsky, A.; Barbon, C. M.; Wang, Y.; Ye, M.; Prickett, L.; Chandra, D.; Shaw, J.; Deng, N.; Sachsenmeier, K.; Clarke, J. D.; Linghu, B.; Brown, G. A.; Brown, J.; Congreve, M.; Cheng, R. K.; Dore, A. S.; Hurrell, E.; Shao, W.; Woessner, R.; Reimer, C.; Drew, L.; Fawell, S.; Schuller, A. G.; Mele, D. A. Small Molecule AZD4635 Inhibitor

of A $_{2A}$ R Signaling Rescues Immune Cell Function Including CD103 $^{+}$ Dendritic Cells Enhancing Anti-Tumor Immunity. *J Immunother Cancer* **2020**, *8* (2), e000417. https://doi.org/10.1136/jitc-2019-000417.

(95) Núñez, F.; Taura, J.; Camacho, J.; López-Cano, M.; Fernández-Dueñas, V.; Castro, N.; Castro, J.; Ciruela, F. PBF509, an Adenosine A2A Receptor Antagonist With Efficacy in Rodent Models of Movement Disorders. *Front Pharmacol* **2018**, *9*. https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01200.

(96) Powderly, J. D.; de Souza, P. L.; Gutierrez, R.; Horvath, L.; Seitz, L.; Ashok, D.; Park, A.; Walters, M. J.; Karakunnel, J. J.; Berry, W.; Rieger, A.; Garofalo, A.; Lai, D. W.; Chaudhry, A. AB928, a Novel Dual Adenosine Receptor Antagonist, Combined with Chemotherapy or AB122 (Anti-PD-1) in Patients (Pts) with Advanced Tumors: Preliminary Results from Ongoing Phase I Studies. *Journal of Clinical Oncology* **2019**, *37* (15_suppl), 2604–2604. https://doi.org/10.1200/JCO.2019.37.15_suppl.2604.

(97) Müller, C. E.; Baqi, Y.; Hinz, S.; Namasivayam, V. Medicinal Chemistry of A2B Adenosine Receptors. In *The Adenosine Receptors*; Springer International Publishing: Cham, 2018; pp 137–168. https://doi.org/10.1007/978-3-319-90808-3_6.

(98) Fredholm, B. B.; IJzerman, A. P.; Jacobson, K. A.; Linden, J.; Müller, C. E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors—An Update. *Pharmacol Rev* **2011**, *63* (1), 1–34. https://doi.org/10.1124/pr.110.003285.

(99) Jiang, J.; Seel, C. J.; Temirak, A.; Namasivayam, V.; Arridu, A.; Schabikowski, J.; Baqi, Y.; Hinz, S.; Hockemeyer, J.; Müller, C. E. A $_{2B}$ Adenosine Receptor Antagonists with Picomolar Potency. *J Med Chem* **2019**, *62* (8), 4032–4055. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00071.

(100) Williams, M.; Francis, J.; Ghai, G.; Braunwalder, A.; Psychoyos, S.; Stone, G. A.; Cash, W. D. Biochemical Characterization of the Triazoloquinazoline, CGS 15943, a Novel, Non-Xanthine Adenosine Antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* **1987**, *241* (2), 415–420.

(101) Majellaro, M.; Jespers, W.; Crespo, A.; Núñez, M. J.; Novio, S.; Azuaje, J.; Prieto-Díaz, R.; Gioé, C.; Alispahic, B.; Brea, J.; Loza, M. I.; Freire-Garabal, M.; Garcia-Santiago, C.; Rodríguez-García, C.; García-Mera, X.; Caamaño, O.; Fernandez-Masaguer, C.; Sardina, J. F.; Stefanachi, A.; El Maatougui, A.; Mallo-Abreu, A.; Åqvist, J.; Gutiérrez-de-Terán, H.; Sotelo, E. 3,4-Dihydropyrimidin-2(1 *H*)-Ones as Antagonists of the Human A $_{2B}$ Adenosine Receptor: Optimization, Structure–Activity Relationship Studies, and Enantiospecific Recognition. *J Med Chem* **2021**, *64* (1), 458–480. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c01431.

(102) Crespo, A.; El Maatougui, A.; Biagini, P.; Azuaje, J.; Coelho, A.; Brea, J.; Loza, M. I.; Cadavid, M. I.; García-Mera, X.; Gutiérrez-de-Terán, H.; Sotelo, E. Discovery of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1 *H*)-Ones As a Novel Class of Potent and Selective A $_{2B}$ Adenosine Receptor Antagonists. *ACS Med Chem Lett* **2013**, *4* (11), 1031–1036. https://doi.org/10.1021/ml400185v.

(103) El Maatougui, A.; Azuaje, J.; González-Gómez, M.; Miguez, G.; Crespo, A.; Carbajales, C.; Escalante, L.; García-Mera, X.; Gutiérrez-de-Terán, H.; Sotelo, E. Discovery of Potent and Highly Selective A $_{2B}$ Adenosine Receptor Antagonist Chemotypes. *J Med Chem* **2016**, *59* (5), 1967–1983. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01586.

(104) Prieto-Díaz, R.; González-Gómez, M.; Fojo-Carballo, H.; Azuaje, J.; El Maatougui, A.; Majellaro, M.; Loza, M. I.; Brea, J.; Fernández-Dueñas, V.; Paleo, M. R.; Díaz-Holguín, A.; Garcia-Pinel, B.; Mallo-Abreu, A.; Estévez, J. C.; Andújar-Arias, A.; García-Mera, X.; Gomez-Tourino, I.; Ciruela, F.; Salas, C. O.; Gutiérrez-de-Terán, H.; Sotelo, E. Exploring the Effect of Halogenation in a Series of Potent and Selective A $_{2B}$ Adenosine

USC DE COMPOSTELA

Receptor Antagonists. *J Med Chem* **2023**, *66* (1), 890–912. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c01768.
(105) Mallo-Abreu, A.; Prieto-Díaz, R.; Jespers, W.; Azuaje, J.; Majellaro, M.; Velando, C.; García-Mera, X.; Caamaño, O.; Brea, J.; Loza, M. I.; Gutiérrez-de-Terán, H.; Sotelo, E. Nitrogen-Walk Approach to Explore Bioisosteric Replacements in a Series of Potent A_{2B} Adenosine Receptor Antagonists. *J Med Chem* **2020**, *63* (14), 7721–7739. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c00564.
(106) Mallo-Abreu, A.; Majellaro, M.; Jespers, W.; Azuaje, J.; Caamaño, O.; García-Mera, X.; Brea, J. M.; Loza, M. I.; Gutiérrez-de-Terán, H.; Sotelo, E. Trifluorinated Pyrimidine-Based A_{2B} Antagonists: Optimization and Evidence of Stereospecific Recognition. *J Med Chem* **2019**, *62* (20), 9315–9330. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b01340.
(107) Medina-Franco J.L., Chávez-Hernández A.L., López-López E., Saldívar-González F.I. Chemical Multiverse: An Expanded View of Chemical Space. *Mol Inform*. 2022;41(11):e2200116. doi:10.1002/minf.202200116
(108) Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew Chem Int Ed Engl* **2001**, *40* (11), 2004–2021. https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010601)40:11<2004:AID-ANIE2004>3.0.CO;2-5.
(109) Cores, Á.; Clerigué, J.; Orocio-Rodríguez, E.; Menéndez, J.C. Multicomponent Reactions for the Synthesis of Active Pharmaceutical Ingredients. *Pharmaceuticals* **2022**, *15*, 1009. https://doi.org/10.3390/ph15081009
(110) Azuaje, J.; Coelho, A.; Maatougui, A. El; Blanco, J. M.; Sotelo, E. Supported *p* -Toluenesulfonic Acid as a Highly Robust and Eco-Friendly Isocyanide Scavenger. *ACS Comb Sci* **2011**, *13* (1), 89–95. https://doi.org/10.1021/co100035z.
(111) Stanzione, F.; Giangreco, I.; Cole, J. C. Use of Molecular Docking Computational Tools in Drug Discovery; 2021; pp 273–343. https://doi.org/10.1016/bs.pmch.2021.01.004.
(112) Druker, B. J.; Talpaz, M.; Resta, D. J.; Peng, B.; Buchdunger, E.; Ford, J. M.; Lydon, N. B.; Kantarjian, H.; Capdeville, R.; Ohno-Jones, S.; Sawyers, C. L. Efficacy and Safety of a Specific Inhibitor of the BCR-ABL Tyrosine Kinase in Chronic Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* **2001**, *344* (14), 1031–1037. https://doi.org/10.1056/NEJM200104053441401.
(113) Protein Data Bank - PDB. *3GVU: The crystal structure of human ABL2 in complex with GLEEVEC*. https://doi.org/10.2210/pdb3GVU/pdb. (accessed 2023-11-02).
(114) National Institutes of Health. *PUBMED*. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/ (accessed 2023-11-02).
(115) American Chemical Society. *ACS*. https://www.cas.org/solutions/cas-scifinder-discovery-platform (accessed 2023-11-02).
(116) PROTEIN DATA BANK. *PDB*.
(117) Protein Data Bank. *Crystal structure of the motor protein KSP in complex with ADP and monastrol*.
(118) Protein Data Bank. *Intermediate and final states of human kinesin Eg5 in complex with S-trityl-L-cysteine*.
(119) PBD Protein Data Bank. *Eg5-inhibitor complex*.
(120) Protein Data Bank. *2GM1: Crystal structure of the mitotic kinesin eg5 in complex with mg-adp and n-(3-aminopropyl)-n-((3-benzyl-5-chloro-4-oxo-3,4-dihydropyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-2-yl)(cyclopropyl)methyl)-4-methylbenzamide*.
(121) Chemical Computing Group. *MOLECULAR OPERATING ENVIRONMENT*. https://www.chemcomp.com/Products.htm (accessed 2023-11-02).
(122) Cox, C. D.; Breslin, M. J.; Whitman, D. B.; Coleman, P. J.; Garbaccio, R. M.; Fraley, M. E.; Zrada, M. M.; Buser, C. A.; Walsh, E. S.; Hamilton, K.; Lobell, R. B.; Tao, W.; Abrams, M. T.; South, V. J.; Huber, H. E.; Kohl, N. E.; Hartman, G. D. Kinesin Spindle

Protein (KSP) Inhibitors. Part V: Discovery of 2-Propylamino-2,4-Diaryl-2,5-Dihydropyrroles as Potent, Water-Soluble KSP Inhibitors, and Modulation of Their Basicity by β-Fluorination to Overcome Cellular Efflux by P-Glycoprotein. *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, *17* (10), 2697–2702. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.03.006.

(123) Kim, K. S.; Lu, S.; Cornelius, L. A.; Lombardo, L. J.; Borzilleri, R. M.; Schroeder, G. M.; Sheng, C.; Rovnyak, G.; Crews, D.; Schmidt, R. J.; Williams, D. K.; Bhide, R. S.; Traeger, S. C.; McDonnell, P. A.; Mueller, L.; Sheriff, S.; Newitt, J. A.; Pudzianowski, A. T.; Yang, Z.; Wild, R.; Lee, F. Y.; Batorsky, R.; Ryder, J. S.; Ortega-Nanos, M.; Shen, H.; Gottardis, M.; Roussell, D. L. Synthesis and SAR of Pyrrolotriazine-4-One Based Eg5 Inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2006**, *16* (15), 3937–3942. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2006.05.037.

(124) Murase, Y.; Ono, H.; Ogawa, K.; Yoshioka, R.; Ishikawa, Y.; Ueda, H.; Akahoshi, K.; Ban, D.; Kudo, A.; Tanaka, S.; Tanabe, M. Inhibitor Library Screening Identifies Ispinesib as a New Potential Chemotherapeutic Agent for Pancreatic Cancers. *Cancer Sci* **2021**, *112* (11), 4641–4654. https://doi.org/10.1111/cas.15134.

(125) Talapatra, S. K.; Schüttelkopf, A. W.; Kozielski, F. The Structure of the Ternary Eg5–ADP–Ispinesib Complex. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **2012**, *68* (10), 1311–1319. https://doi.org/10.1107/S0907444912027965.

(126) Finer Jeffrey t; Bergnes Gustave; Smith Whitney w; Chabala John c; Feng Bainian. Methods and Compositions Utilizing Quinazolinones, September 19, 2009.

(127) Jiang, C.; Yang, L.; Wu, W.-T.; Guo, Q.-L.; You, Q.-D. CPUYJ039, a Newly Synthesized Benzimidazole-Based Compound, Is Proved to Be a Novel Inducer of Apoptosis in HCT116 Cells with Potent KSP Inhibitory Activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **2011**, *63* (11), 1462–1469. https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2011.01350.x.

(128) Protein Data Bank. *4A5Y crystal structure: Intermediate state of human kinesin Eg5 in complex with Ispinesib (2012). PDB: https://doi.org/10.2210/pdb4A5Y/pdb created with NGL (A.S. Rose, A.R. Bradley, Y. Valasatava, J.D. Duarte, A. Prlić, P.W. Rose NGL viewer: web-based molecular graphics for large complexes* .

(129) Protein Data Bank. *2FKY crystal structure of KSP in complex with inhibitor 13*.

(130) Rose, A. S.; Bradley, A. R.; Valasatava, Y.; Duarte, J. M.; Prlić, A.; Rose, P. W. NGL Viewer: Web-Based Molecular Graphics for Large Complexes. *Bioinformatics* **2018**, *34* (21), 3755–3758. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty419.

(131) Protein Data Bank. *2GM1 Crystal structure of the mitotic kinesin eg5 in complex with mg-adp and n-(3-aminopropyl)-n-((3-benzyl-5-chloro-4-oxo-3,4-dihydropyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazin-2-yl)(cyclopropyl)methyl)-4-methylbenzamide* .

(132) Sakowicz, R.; Finer, J. T.; Beraud, C.; Crompton, A.; Lewis, E.; Fritsch, A.; Lee, Y.; Mak, J.; Moody, R.; Turincio, R.; Chabala, J. C.; Gonzales, P.; Roth, S.; Weitman, S.; Wood, K. W. Antitumor Activity of a Kinesin Inhibitor. *Cancer Res* **2004**, *64* (9), 3276–3280. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3839.

(133) Rustum S. Boyce; Yi Xia Hongyan Guo; Kris G. Mendenhall; Annette O. Walter; Weibo Wang. Indole and Benzimidazole Derivatives. US20080317744A1. Chiron Corp.

(134) Eddy Sotelo Pérez; Azuaje Guerrero; Jhonny Alberto; Jose Coelho Coton. Proceso Para Capturar Isonitrilos. https://investigacion.usc.gal/patentes/P201031508 (accessed 2023-11-02).

(135) Fredholm, B. B.; Arslan, G.; Halldner, L.; Kull, B.; Schulte, G.; Wasserman, W. Structure and Function of Adenosine Receptors and Their Genes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **2000**, *362* (4–5), 364–374. https://doi.org/10.1007/s002100000313.

(136) William J. Lennarz, M. D. L. *Encyclopedia of Biological Chemistry*; 2013.

USC DE COMPOSTELA

(137) Fredholm, B. B.; IJzerman, A. P.; Jacobson, K. A.; Linden, J.; Müller, C. E. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors—An Update. *Pharmacol Rev* **2011**, *63* (1), 1–34. https://doi.org/10.1124/pr.110.003285.
(138) Wilson, C. N.; Mustafa, S. J. Adenosine Receptors in Health and Disease. Preface. *Handb Exp Pharmacol* **2009**, No. 193, v–vi.
(139) Baraldi, P. G.; Tabrizi, M. A.; Gessi, S.; Borea, P. A. Adenosine Receptor Antagonists: Translating Medicinal Chemistry and Pharmacology into Clinical Utility. *Chem Rev* **2008**, *108* (1), 238–263. https://doi.org/10.1021/cr0682195.
(140) Jacobson, K. A.; Gao, Z.-G. Adenosine Receptors as Therapeutic Targets. *Nat Rev Drug Discov* **2006**, *5* (3), 247–264. https://doi.org/10.1038/nrd1983.
(141) Müller, C. E.; Jacobson, K. A. Recent Developments in Adenosine Receptor Ligands and Their Potential as Novel Drugs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2011**, *1808* (5), 1290–1308. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.12.017.
(142) Pierce, K. D.; Furlong, T. J.; Selbie, L. A.; Shine, J. Molecular Cloning and Expression of an Adenosine A2b Receptor from Human Brain. *Biochem Biophys Res Commun* **1992**, *187* (1), 86–93. https://doi.org/10.1016/S0006-291X(05)81462-7.
(143) Gessi, S.; Varani, K.; Merighi, S.; Cattabriga, E.; Pancaldi, C.; Szabadkai, Y.; Rizzuto, R.; Klotz, K.-N.; Leung, E.; Mac Lennan, S.; Baraldi, P. G.; Borea, P. A. Expression, Pharmacological Profile, and Functional Coupling of A_{2B} Receptors in a Recombinant System and in Peripheral Blood Cells Using a Novel Selective Antagonist Radioligand, [^{3}H]MRE 2029-F20. *Mol Pharmacol* **2005**, *67* (6), 2137–2147. https://doi.org/10.1124/mol.104.009225.
(144) Feoktistov, I.; Biaggioni, I. Adenosine A2B Receptors. *Pharmacol Rev* **1997**, *49* (4), 381–402.
(145) Popoli, P.; Pepponi, R. Potential Therapeutic Relevance of Adenosine A2B and A2A Receptors in the Central Nervous System. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **2012**, *11* (6), 664–674. https://doi.org/10.2174/187152712803581100.
(146) Aherne, C. M.; Kewley, E. M.; Eltzschig, H. K. The Resurgence of A2B Adenosine Receptor Signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2011**, *1808* (5), 1329–1339. https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2010.05.016.
(147) Kalla, R. V.; Zablocki, J. Progress in the Discovery of Selective, High Affinity A2B Adenosine Receptor Antagonists as Clinical Candidates. *Purinergic Signal* **2009**, *5* (1), 21–29. https://doi.org/10.1007/s11302-008-9119-x.
(148) Jiang, J.; Li, A.-H.; Jang, S.-Y.; Chang, L.; Melman, N.; Moro, S.; Ji, X.; Lobkovsky, E. B.; Clardy, J. C.; Jacobson, K. A. Chiral Resolution and Stereospecificity of 6-Phenyl-4-Phenylethynyl- 1,4-Dihydropyridines as Selective A_{3} Adenosine Receptor Antagonists. *J Med Chem* **1999**, *42* (16), 3055–3065. https://doi.org/10.1021/jm980688e.
(149) Robeva, A. S.; Woodard, R. L.; Jin, X.; Gao, Z.; Bhattacharya, S.; Taylor, H. E.; Rosin, D. L.; Linden, J. Molecular Characterization of Recombinant Human Adenosine Receptors. *Drug Dev Res* **1996**, *39* (3–4), 243–252. https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2299(199611/12)39:3/4<243::AID-DDR3>3.0.CO;2-R.
(150) Hayallah, A. M.; Sandoval-Ramírez, J.; Reith, U.; Schobert, U.; Preiss, B.; Schumacher, B.; Daly, J. W.; Müller, C. E. 1,8-Disubstituted Xanthine Derivatives: Synthesis of Potent A_{2B} -Selective Adenosine Receptor Antagonists. *J Med Chem* **2002**, *45* (7), 1500–1510. https://doi.org/10.1021/jm011049y.
(151) Kim, Y.-C.; Ji, X.; Melman, N.; Linden, J.; Jacobson, K. A. Anilide Derivatives of an 8-Phenylxanthine Carboxylic Congener Are Highly Potent and Selective Antagonists at Human A_{2B} Adenosine Receptors. *J Med Chem* **2000**, *43* (6), 1165–1172. https://doi.org/10.1021/jm990421v.

(152) Kalla, R. V.; Elzein, E.; Perry, T.; Li, X.; Gimbel, A.; Yang, M.; Zeng, D.; Zablocki, J. Selective, High Affinity A2B Adenosine Receptor Antagonists: N-1 Monosubstituted 8-(Pyrazol-4-Yl)Xanthines. *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, *18* (4), 1397–1401. https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.01.008.

(153) Stefanachi, A.; Brea, J. M.; Cadavid, M. I.; Centeno, N. B.; Esteve, C.; Loza, M. I.; Martinez, A.; Nieto, R.; Raviña, E.; Sanz, F. 1-, 3- and 8-Substituted-9-Deazaxanthines as Potent and Selective Antagonists at the Human A2B Adenosine Receptor. *Bioorg Med Chem* **2008**, *16* (6), 2852–2869. https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.01.002.

(154) Carotti, A.; Cadavid, M. I.; Centeno, N. B.; Esteve, C.; Loza, M. I.; Martinez, A.; Nieto, R.; Raviña, E.; Sanz, F.; Segarra, V.; Sotelo, E.; Stefanachi, A.; Vidal, B. Design, Synthesis, and Structure−Activity Relationships of 1-,3-,8-, and 9-Substituted-9-Deazaxanthines at the Human A $_{2B}$ Adenosine Receptor. *J Med Chem* **2006**, *49* (1), 282–299. https://doi.org/10.1021/jm0506221.

(155) Vidal, B.; Nueda, A.; Esteve, C.; Domenech, T.; Benito, S.; Reinoso, R. F.; Pont, M.; Calbet, M.; López, R.; Cadavid, M. I.; Loza, M. I.; Cárdenas, Á.; Godessart, N.; Beleta, J.; Warrellow, G.; Ryder, H. Discovery and Characterization of 4‘-(2-Furyl)- *N* -Pyridin-3-Yl-4,5‘-Bipyrimidin-2‘-Amine (LAS38096), a Potent, Selective, and Efficacious A $_{2B}$ Adenosine Receptor Antagonist. *J Med Chem* **2007**, *50* (11), 2732–2736. https://doi.org/10.1021/jm061333v.

(156) Stewart, M.; Steinig, A. G.; Ma, C.; Song, J.-P.; McKibben, B.; Castelhano, A. L.; MacLennan, S. J. [3H]OSIP339391, a Selective, Novel, and High Affinity Antagonist Radioligand for Adenosine A2B Receptors. *Biochem Pharmacol* **2004**, *68* (2), 305–312. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.03.026.

(157) Pastorin, G.; Da Ros, T.; Spalluto, G.; Deflorian, F.; Moro, S.; Cacciari, B.; Baraldi, P. G.; Gessi, S.; Varani, K.; Borea, P. A. Pyrazolo[4,3- *e*]-1,2,4-Triazolo[1,5- *c*]Pyrimidine Derivatives as Adenosine Receptor Antagonists. Influence of the N5 Substituent on the Affinity at the Human A $_{3}$ and A $_{2B}$ Adenosine Receptor Subtypes: A Molecular Modeling Investigation. *J Med Chem* **2003**, *46* (20), 4287–4296. https://doi.org/10.1021/jm030852k.

(158) Crespo, A.; El Maatougui, A.; Biagini, P.; Azuaje, J.; Coelho, A.; Brea, J.; Loza, M. I.; Cadavid, M. I.; García-Mera, X.; Gutiérrez-de-Terán, H.; Sotelo, E. Discovery of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1 *H*)-Ones As a Novel Class of Potent and Selective A $_{2B}$ Adenosine Receptor Antagonists. *ACS Med Chem Lett* **2013**, *4* (11), 1031–1036. https://doi.org/10.1021/ml400185v.

(159) El Maatougui, A.; Azuaje, J.; González-Gómez, M.; Miguez, G.; Crespo, A.; Carbajales, C.; Escalante, L.; García-Mera, X.; Gutiérrez-de-Terán, H.; Sotelo, E. Discovery of Potent and Highly Selective A $_{2B}$ Adenosine Receptor Antagonist Chemotypes. *J Med Chem* **2016**, *59* (5), 1967–1983. https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01586.

(160) Suresh; Sandhu, J. S. Past, Present and Future of the Biginelli Reaction: A Critical Perspective. *Arkivoc* **2011**, *2012* (1), 66–133. https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0013.103.

(161) Hulme, R.; Zamora, O. D. P.; Mota, E. J.; Pastén, M. A.; Contreras-Rojas, R.; Miranda, R.; Valencia-Hernández, I.; Correa-Basurto, J.; Trujillo-Ferrara, J.; Delgado, F. Cyanamide: A Convenient Building Block to Synthesize 4-Aryl-2-Cyanoimino-3,4-Dihydro-1H-Pyrimidine Systems via a Multicomponent Reaction. *Tetrahedron* **2008**, *64* (15), 3372–3380. https://doi.org/10.1016/j.tet.2008.01.087.

(162) Lacotte, P.; Buisson, D.-A.; Ambroise, Y. Synthesis, Evaluation and Absolute Configuration Assignment of Novel Dihydropyrimidin-2-Ones as Picomolar Sodium Iodide Symporter Inhibitors. *Eur J Med Chem* **2013**, *62*, 722–727. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.01.043.

(163) Uray, G.; Verdino, P.; Belaj, F.; Kappe, C. O.; Fabian, W. M. F. Absolute Configuration in 4-Alkyl- and 4-Aryl-3,4-Dihydro-2(1 *H*)-Pyrimidones: A Combined Theoretical and Experimental Investigation. *J Org Chem* **2001**, *66* (20), 6685–6694. https://doi.org/10.1021/jo0104911.
(164) Krenn, W.; Verdino, P.; Uray, G.; Faber, K.; Kappe, C. O. Determination of Absolute Configuration in 4-Aryl-3,4-Dihydro-2(1H)-Pyrimidones by High Performance Liquid Chromatography and CD Spectroscopy. *Chirality* **1999**, *11* (8), 659–662. https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-636X(1999)11:8<659::AID-CHIR8>3.0.CO;2-V.
(165) Yung-Chi, C.; Prusoff, W. H. Relationship between the Inhibition Constant (KI) and the Concentration of Inhibitor Which Causes 50 per Cent Inhibition (I50) of an Enzymatic Reaction. *Biochem Pharmacol* **1973**, *22* (23), 3099–3108. https://doi.org/10.1016/0006-2952(73)90196-2.
(166) Leff, P.; Dougall, I. G. Further Concerns over Cheng-Prusoff Analysis. *Trends Pharmacol Sci* **1993**, *14* (4), 110–112. https://doi.org/10.1016/0165-6147(93)90080-4.
(167) Jaakola, V.-P.; Griffith, M. T.; Hanson, M. A.; Cherezov, V.; Chien, E. Y. T.; Lane, J. R.; IJzerman, A. P.; Stevens, R. C. The 2.6 Angstrom Crystal Structure of a Human A $_{2A}$ Adenosine Receptor Bound to an Antagonist. *Science (1979)* **2008**, *322* (5905), 1211–1217. https://doi.org/10.1126/science.1164772.
(168) Šali, A.; Blundell, T. L. Comparative Protein Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints. *J Mol Biol* **1993**, *234* (3), 779–815. https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1626.
(169) (Schrodinger). *MAESTRO*. https://www.schrodinger.com/products/maestro (accessed 2023-11-02).
(170) Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Taylor, R. D. Improved Protein–Ligand Docking Using GOLD. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **2003**, *52* (4), 609–623. https://doi.org/10.1002/prot.10465.
(171) Azuaje, J.; Carbajales, C.; González-Gómez, M.; Coelho, A.; Caamaño, O.; Gutiérrez-de-Terán, H.; Sotelo, E. Pyrazin-2(1 *H*)-Ones as a Novel Class of Selective A3 Adenosine Receptor Antagonists. *Future Med Chem* **2015**, *7* (11), 1373–1380. https://doi.org/10.4155/fmc.15.69.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

8. ANEXOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

8.1 PERMISOS DE PUBLICACIÓN DE LOS ARTÍCULOS RECOGIDOS EN ESTA TESIS

PUBLICACIÓN 1:

Multicomponent reactions in antimitotic drug discovery

Cores, A.[1] Carbajales, C.[1] Coelho, A.*[1,2]

[1]Center for Research in Biological Chemistry and Molecular Materials, University of Santiago de Compostela, Spain.

[2]Department of Organic Chemistry, University of Santiago de Compostela, Spain.

Revista: *Current Topics in Medicinal Chemistry*

DOI: 10.2174/1568026614666141127115130.

ISSN: 1873-4294. Año de publicación: 2014 Volumen: 14 Número: 20

Páginas: 2209-2230

Autorización de la revista:

La revista perteneciente a la editorial Bentham, donde se ha publicado el Capítulo 1, permite la reutilización del artículo por parte del autor como parte de su tesis:

30/10/23, 9:07 marketplace.copyright.com/rs-ui-web/mp/license/95c3d00e-2b4e-4865-9b47-8fdfab10d577/ad114263-0e18-471c-9595-23f8b05...

CCC Marketplace

This is a License Agreement between Carlos Carbajales Pérez-Universidade de Santiago de Compostela ("User") and Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC") on behalf of the Rightsholder identified in the order details below. The license consists of the order details, the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below, and any Rightsholder Terms and Conditions which are included below.

All payments must be made in full to CCC in accordance with the Marketplace Permissions General Terms and Conditions below.

Order Date	29-Apr-2023	Type of Use	Republish in a thesis/dissertation
Order License ID	1350051-1	Publisher	Bentham Science Publishers Ltd.
ISSN	1873-4294	Portion	Chapter/article

LICENSED CONTENT

Publication Title	Current topics in medicinal chemistry	Publication Type	e-Journal
Article Title	Multicomponent reactions in antimitotic drug discovery.	Start Page	2209
		End Page	2230
		Issue	20
Date	01/01/2001	Volume	14
Language	English		
Country	Netherlands		
Rightsholder	EUREKA SCIENCE (FZC)		

REQUEST DETAILS

Portion Type	Chapter/article	Rights Requested	Main product
Page Range(s)	2209-2230	Distribution	Worldwide
Total Number of Pages	22	Translation	Original language plus two translations
Format (select all that apply)	Print, Electronic	Copies for the Disabled?	Yes
Who Will Republish the Content?	Academic Institution	Minor Editing Privileges?	No
Duration of Use	Life of current edition	Incidental Promotional Use?	Yes
Lifetime Unit Quantity	Up to 99,999	Currency	EUR

NEW WORK DETAILS

Title	DESCUBRIMIENTO Y OPTIMIZACIÓN DE NUEVOS AGENTES ANTITUMORALES EMPLEANDO REACCIONES MULTICOMPONENTE.	Institution Name	UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
		Expected Presentation Date	2023-07-16
Instructor Name	ALBERTO COELHO/ EDDY SOTELO		

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PUBLICACIÓN 2:

Structure-based design of new KSP-Eg5 inhibitors assisted by a targeted multicomponent reaction

Carlos Carbajales, [a] Miguel Ángel Prado,[c] Hugo Gutiérrez-de-Terán,[b] Ángel Cores,[a] Jhonny Azuaje,[a] Silvia Novio,[e] María Jesús Nuñez,[e] Belén Fernández-García,[d] Eddy Sotelo,[a, f] Xerardo García-Mera,[f] Pedro Sánchez-Lazo,[d] Manuel Freire-Garabal,[e] Alberto Coelho*[a, f]

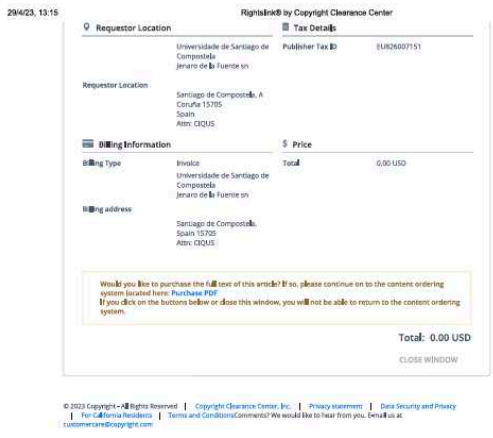
Revista: *ChemBioChem*

DOI: 10.1002/cbic.201402089

ISSN: 1439-7633 Año de publicación: 2014 Volumen: 15 Número: 10 Páginas: 1471-1480.

Autorización de la revista:

La revista perteneciente a la editorial Wiley, donde se ha publicado el Capítulo 2, permite la reutilización del artículo por parte del autor como parte de su tesis:



USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

PUBLICACIÓN 3:

Multicomponent Assembly of the Kinesin Spindle Protein Inhibitor CPUYJ039 and Analogues as Antimitotic Agents

Carlos Carbajales,[†] Junichi Sawada,[‡] Giovanni Marzaro,[§] Eddy Sotelo,[†,∥] Luz Escalante,[†], Antonio Sánchez-Díaz Marta,[†] Xerardo García-Mera,[∥] Akira Asai,[‡] and Alberto Coelho*[,†,∥]

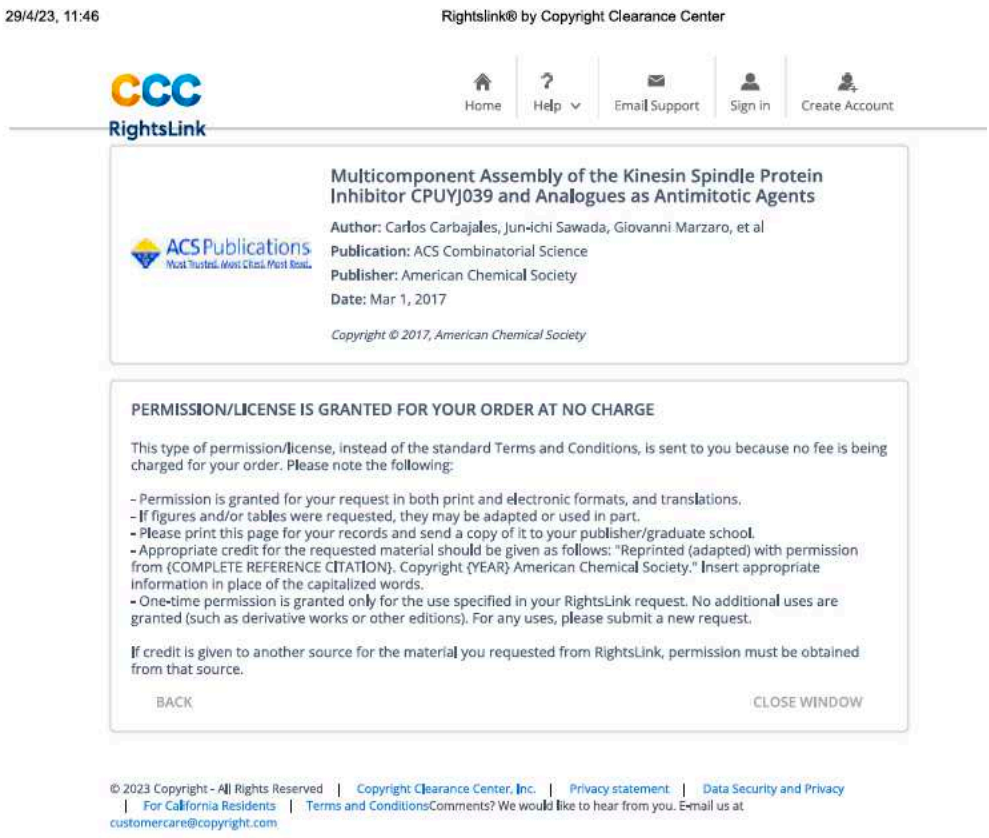
Revista: *ACS Combinatorial Science*

https://doi.org/10.1021/acscombsci.6b00166

ISSN: 2156-8944 Año de publicación: 2017 Volumen: 19 Número: 3 Páginas: 153-160

Autorización de la revista:

La revista perteneciente a la editorial ACS, donde se ha publicado el Capítulo 3, permite la reutilización del artículo por parte del autor como parte de su tesis:



PUBLICACIÓN 4:

Enantiospecific Recognition at the A2B Adenosine Receptor by Alkyl 2-Cyanoimino-4-substituted-6-methyl-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine-5-carboxylates

Carbajales, C. Azuaje, J. Oliveira, A. Loza, M.I. Brea, J. Cadavid, M.I. Masaguer, C.F. García-Mera, X. Gutiérrez-De-Terán, H. Sotelo, E.

Revista: *Journal of Medicinal Chemistry*

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00138

ISSN: 1520-4804 Año de publicación: 2017 Volumen: 60 Número: 8 Páginas: 3372-3382.

Autorización de la revista:

La revista perteneciente a la editorial ACS, donde se ha publicado el Capítulo 1, permite la reutilización del artículo por parte del autor como parte de su tesis:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

8.2 PERMISOS DE REPRODUCCIÓN DE FIGURAS RECOGIDOS EN ESTA TESIS.

(22) Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646-674.

(52) Wojcik, E. J.; Buckley, R. S.; Richard, J.; Liu, L.; Huckaba, T. M.; Kim, S. Kinesin-5: Cross-bridging mechanism to targeted clinical therapy. Gene **2013**, *531*(2), 133-149.

Permisos de revistas MDPI: No se requiere ningún permiso especial para reutilizar todo o parte del artículo publicado por MDPI, incluidas figuras y tablas. Para los artículos publicados bajo una licencia Creative Common CC BY de acceso abierto, cualquier parte del artículo puede reutilizarse sin permiso siempre que se cite claramente el artículo original. La reutilización de un artículo no implica respaldo por parte de los autores ni de MDPI.

(12) Graziano, G.; Stefanachi, A.; Contino, M.; Prieto-Díaz, R.; Ligresti, A.; Kumar, P.; Scilimati, A.; Sotelo, E.; Leonetti, F. Multicomponent Reaction-Assisted Drug Discovery: A Time- and Cost-Effective Green Approach Speeding Up Identification and Optimization of Anticancer Drugs. Int. J. Mol. Sci. 2023, 24 (7), 6581.
(26) Škubník, J.; Jurášek, M.; Ruml, T.; Rimpelová, S. Mitotic Poisons in Research and Medicine. Molecules 2020, 25, 4632. doi: 10.3390/molecules25204632.
(50) Cores, A; Clerigué, J.; Orocio-Rodríguez, E.; Menéndez, C. Pharmaceuticals 2022, 15, 1009.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Sep 18, 2023

This Agreement between Universidade de Santiago de Compostela -- Carlos Carbajales Pérez ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	5631981179863
License date	Sep 18, 2023
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Cell
Licensed Content Title	Hallmarks of Cancer: The Next Generation
Licensed Content Author	Douglas Hanahan,Robert A. Weinberg
Licensed Content Date	Mar 4, 2011
Licensed Content Volume	144
Licensed Content Issue	5
Licensed Content Pages	29
Start Page	646
End Page	674
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, including English rights
Number of languages	1
Title	DESCUBRIMIENTO Y OPTIMIZACIÓN DE NUEVOS AGENTES ANTITUMORALES EMPLEANDO REACCIONES MULTICOMPONENTE
Institution name	Universidade de Santiago de Compostela
Expected presentation date	Dec 2023
Portions	figure 6
Specific Languages	Spanish
Requestor Location	Universidade de Santiago de Compostela Jenaro de la Fuente sn Santiago de Compostela, A Coruña 15705 Spain Attn: CIQUS
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 EUR

Terms and Conditions

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions

established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your RightsLink account and that are available at any time at https://myaccount.copyright.com).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given. The material may not be reproduced or used in any other way, including use in combination with an artificial intelligence tool (including to train an algorithm, test, process, analyse, generate output and/or develop any form of artificial intelligence tool), or to create any derivative work and/or service (including resulting from the use of artificial intelligence tools).

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier's permissions helpdesk here). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation**: This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. **Posting licensed content on any Website**: The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx or the Elsevier homepage for books at http://www.elsevier.com; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at http://www.elsevier.com . All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
    - via their non-commercial person homepage or blog
    - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
    - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
    - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
    - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
    - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
    - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

Published journal article (JPA): A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

Gold Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a CrossMark logo, the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's posting policy for further information.

18. **For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. **Thesis/Dissertation**: If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our open access license policy for more information.

Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant

DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at http://creativecommons.org/licenses/by/4.0.

CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0.

CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

20. **Other Conditions**:

v1.10

Questions? customercare@copyright.com.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Sep 18, 2023

This Agreement between Universidade de Santiago de Compostela -- Carlos Carbajales Pérez ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number 5631980341382

License date Sep 18, 2023

Licensed Content Publisher Elsevier

Licensed Content Publication Gene

Licensed Content Title Kinesin-5: Cross-bridging mechanism to targeted clinical therapy

Licensed Content Author Edward J. Wojcik,Rebecca S. Buckley,Jessica Richard,Liqiong Liu,Thomas M. Huckaba,Sunyoung Kim

Licensed Content Date Dec 1, 2013

Licensed Content Volume 531

Licensed Content Issue 2

Licensed Content Pages 17

Start Page 133

End Page 149

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Type of Use reuse in a thesis/dissertation

Portion figures/tables/illustrations

Number of figures/tables/illustrations 1

Format both print and electronic

Are you the author of this Elsevier article? No

Will you be translating? Yes, including English rights

Number of languages 1

Title	DESCUBRIMIENTO Y OPTIMIZACIÓN DE NUEVOS AGENTES ANTITUMORALES EMPLEANDO REACCIONES MULTICOMPONENTE
Institution name	Universidade de Santiago de Compostela
Expected presentation date	Dec 2023
Portions	figure 2
Specific Languages	Spanish, English
Requestor Location	Universidade de Santiago de Compostela Jenaro de la Fuente sn Santiago de Compostela, A Coruña 15705 Spain Attn: CIQUS
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 EUR

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Terms and Conditions

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions

established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your RightsLink account and that are available at any time at https://myaccount.copyright.com).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given. The material may not be reproduced or used in any other way, including use in combination with an artificial intelligence tool (including to train an algorithm, test, process, analyse, generate output and/or develop any form of artificial intelligence tool), or to create any derivative work and/or service (including resulting from the use of artificial intelligence tools).

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier's permissions helpdesk here). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the

scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation**: This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. **Posting licensed content on any Website**: The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx or the Elsevier homepage for books at http://www.elsevier.com; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at http://www.elsevier.com . All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
  - via their non-commercial person homepage or blog
  - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
  - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
  - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
  - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
  - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be

shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

Published journal article (JPA): A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

Gold Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a CrossMark logo, the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's posting policy for further information.

18. **For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. **Thesis/Dissertation**: If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our open access license policy for more information.

Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant

DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at http://creativecommons.org/licenses/by/4.0.

CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0.

CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

USC UNIVERSIDADE

20. **Other Conditions**:

Questions? customercare@copyright.com.

USC
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Esta Tesis Doctoral aborda la aplicación de diversas reacciones multicomponente como herramientas de diversificación estructural para la síntesis de fármacos con perfil antitumoral. El trabajo estudia asimismo, la evaluación farmacológica de las moléculas sintetizadas, el establecimiento de las relaciones estructura-actividad preliminares y el análisis computacional que establece el modo de unión fármaco-diana.
En la primera parte de la Tesis, se investiga el diseño, síntesis y evaluación de prototipos directamente diseñados para la inhibición de la diana antimitótica KSP (Kinesin Spindle Protein) y que están basados en la estructura de tipo bencimidazol.
En la segunda parte, se introduce una línea de investigación basada en la búsqueda de antagonistas de los receptores A_2B de adenosina como agentes anticancerígenos.