



UNIVERSITÀ DI PISA

FACOLTÀ DI FARMACIA

Corso di Laurea specialistica in Farmacia

TESI DI LAUREA

**Le proteine motrici chinesine come target per la
terapia del cancro**

Relatori:

Dott.ssa Silvia Salerno

Dott.ssa Sabrina Taliani

Candidato:

Marco Alessandro Paolini

Anno Accademico 2013-2014

Indice

Introduzione	1
1 - I microtubuli e la terapia del cancro.....	5
2 - La chinesina mitotica come target per farmaci.....	6
3 - Assemblaggio del fuso	10
4 - Meccanismi di funzionamento dei filamenti scorrevoli	13
4.1 - Flusso del microtubulo verso il polo.....	16
4.2 - Formazione del polo all'estremità negativa.....	17
4.3 - Antagonismo motore e lunghezza del fuso.....	18
5 - Struttura della chinesina-5.....	21
6 - Funzione e inibizione della chinesina mitotica KSP (Eg5).....	25
7 - Inibitori della kinesina mitotica	30
Diidropirimidine (DHPM)	30
S-trifenilmetil-L-cisteina (STLC)	36
β-carboline e carbazoli.....	42
Chinazoline	45
Tiazolopirimidine	52
Esaidro-2H-pirano[3,2-c]chinoline (HHPQs)	54
Tiadiazoli.....	55
4,5-Diidropirazoli.....	58
2,4-Diaril-2,5-diidropirroli.....	61

Diidropirazolobenzossazine	64
Isochinoline	64
Imidazoli.....	66
Bifenili	66
Benzimidazoli.....	68
Inibitori naturali di Eg5	70
8 - Studi computazionali.....	74
8.1 - Modello farmacoforico	74
8.2 - Studi di docking	75
9 - Conclusioni	77
Bibliografia	79

Introduzione

La mitosi è risultata un valido target per lo sviluppo di terapie anticancro e molti farmaci antimitotici sono stati utilizzati con successo nella pratica clinica. Tutti gli antimitotici approvati finora hanno come target il fuso dei microtubuli, interferendo così con la dinamica del fuso e portando all'arresto della mitosi e all'apoptosi. Anche se efficaci, questi farmaci hanno vari effetti secondari, compresa la neurotossicità.

Per una cellula che entri in fase M l'obiettivo principale consiste nel separare accuratamente e distribuire i cromosomi, già replicati nella precedente fase S, facendo in modo che ogni cellula figlia riceva una copia identica del genoma [1]. Per produrre due cellule figlie geneticamente identiche, la cellula eucariotica deve svolgere la delicata operazione di separare i cromosomi duplicati e farne pervenire una copia di ciascuno a ogni cellula figlia. Questo compito è sempre affidato a una complessa macchina citoscheletrica, detta fuso mitotico. Il fuso è composto da microtubuli e dalle varie proteine che interagiscono con essi, tra cui le proteine motrici microtubulo dipendenti.

La fase M viene generalmente suddivisa in sei stadi. I primi cinque, che prendono il nome di profase, prometafase, metafase, anafase e telofase, costituiscono la mitosi propriamente detta; nel sesto stadio avviene la citochinesi, che si sovrappone alla fine della mitosi (Figura 1).

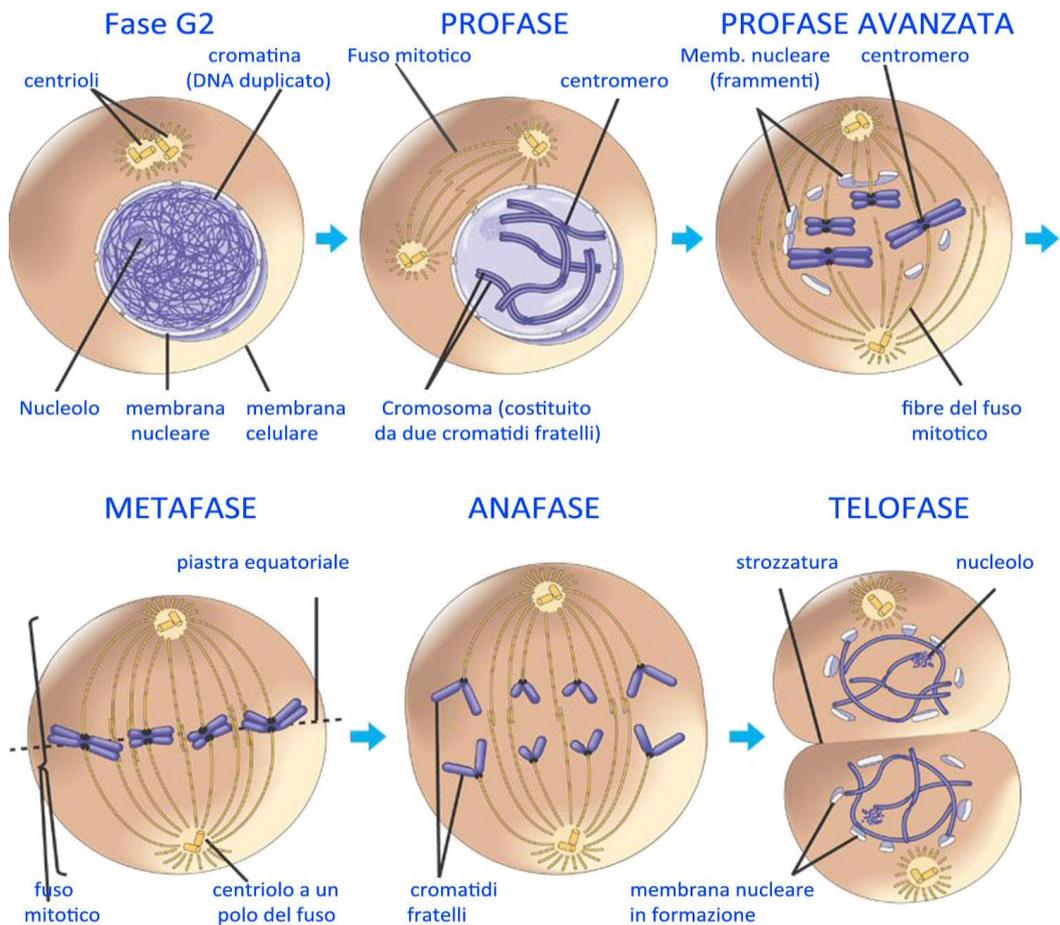


Figura 1 - Fasi della mitosi.

Durante l'interfase del ciclo cellulare, il centrosoma della cellula si duplica e le due copie restano insieme in un unico agglomerato da una parte del nucleo. Esse si staccano poi all'inizio della profase; a questo punto cominciano ad organizzare ciascuno il proprio gruppo di microtubuli e migrano ai poli opposti della cellula sospinti, tra l'altro, da proteine motrici associate al centrosoma, che usano l'energia di idrolisi dell'ATP per muoversi lungo i microtubuli. I microtubuli polimerizzano e depolimerizzano continuamente per aggiunta e perdita delle subunità

tubuliniche che li formano, per cui si ha un fenomeno altalenante di accorciamento e allungamento, detto “instabilità dinamica” (Figura 2).

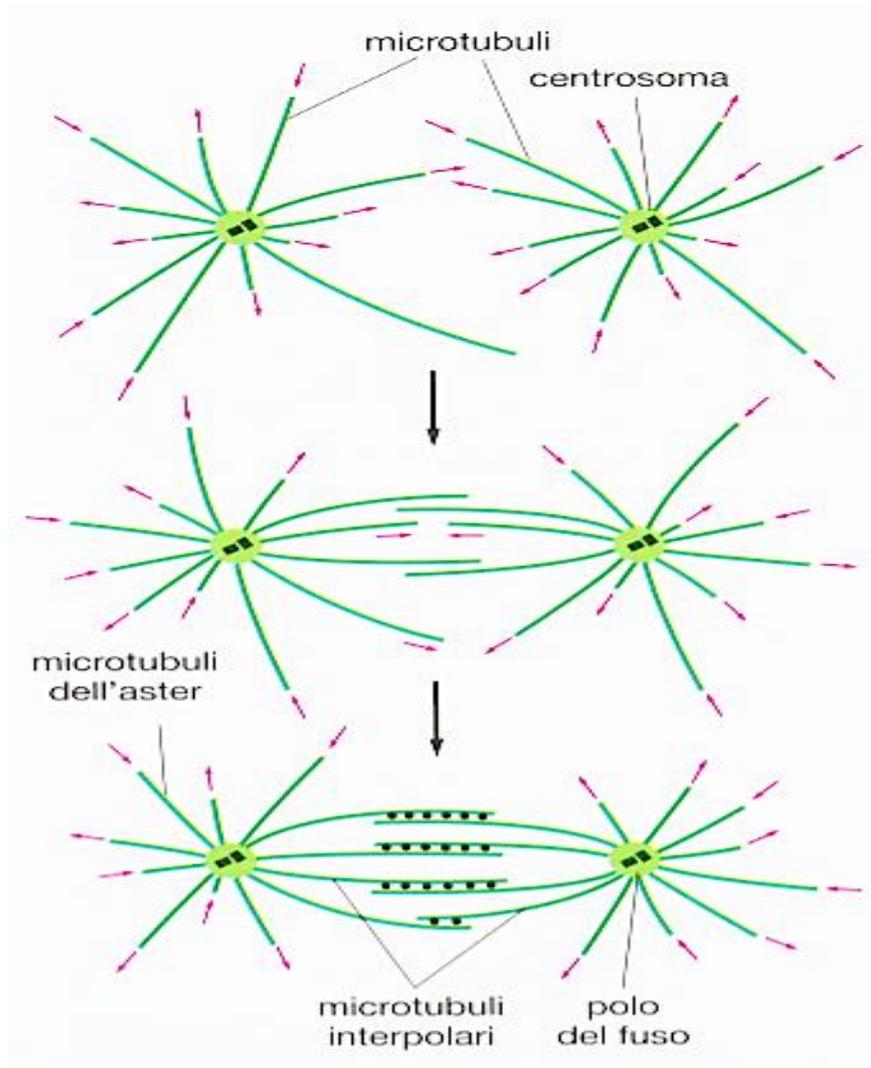


Figura 2 - Formazione fuso mitotico bipolare. Dai due centrosomi nascono nuovi microtubuli disposti a raggiera in tutte le direzioni. Le due estremità del microtubulo, positiva e negativa, hanno proprietà diverse e quella negativa resta ancorata al centrosoma. Le estremità positive sono “instabili dinamicamente” e passano da uno stato di crescita uniforme (freccie rosse dirette verso l'esterno) a uno stato di accorciamento rapido (freccie rosse dirette verso l'interno). Quando due microtubuli connessi a centrosomi opposti interagiscono tra loro in una zona di sovrapposizione, proteine a loro associate li uniscono con legami trasversali (punti neri) e stabilizzano le loro estremità positive, riducendo le probabilità che depolarizzino.

Durante la profase alcuni dei microtubuli che nascono da un centrosoma interagiscono con i microtubuli che nascono dall'altro. Questa interazione li stabilizza, per cui smettono di accorciarsi, e permette la connessione tra i due gruppi costituendo la struttura base del fuso mitotico, con la sua forma bipolare caratteristica. I due centrosomi da cui nascono i microtubuli prendono a questo punto il nome di poli del fuso e i microtubuli interconnessi si chiamano microtubuli interpolari. L'assemblaggio del fuso è promosso anche da proteine motrici associate ai tubuli interpolari, che stabiliscono legami trasversali tra i microtubuli di un polo e quelli dell'altro.

Durante la prometafase la membrana nucleare si dissolve, in modo che i microtubuli possano prendere contatto con i cromosomi e legarvisi. A questo punto i cromosomi, attaccati al fuso mitotico, cominciano a spostarsi, come stratonati da una parte e dall'altra, finendo poi per allinearsi all'equatore del fuso, dove formano la piastra metafasica. A questo punto si ha l'inizio della metafase. Le forze che agiscono sui cromosomi portandoli all'equatore dipendono dall'allungamento e dall'accorciamento dei microtubuli, oltre all'azione delle proteine motrici.

L'interesse per le proteine motrici come target per la terapia del cancro deriva dal loro ruolo durante la mitosi. In particolare, l'attenzione di molti ricercatori si è focalizzata su una proteina appartenente alla famiglia delle chinesine, la chinesina-5 (Eg5), un motore omotetramerico che lega i microtubuli in modo antiparallelo e, attraverso l'idrolisi dell'ATP, si muove verso le loro estremità positive producendo uno scorrimento verso l'esterno dei microtubuli stessi. Eg5 gioca un ruolo importante nelle prime

fasi della mitosi: essa partecipa alla separazione dei centrosomi che avviene durante la profase. La sua inibizione porta alla formazione di fusi monopolari chiamati “monoastrali” e all’attivazione delle proteine del *checkpoint* che arrestano la mitosi. L’arresto prolungato della mitosi può portare alla morte cellulare per apoptosi. Eg5 è iperespressa in molti tessuti proliferativi, tra i quali le cellule staminali emopoietiche nella leucemia e i tumori solidi di mammella, polmone, ovaio, vescica e pancreas, mentre non è stata praticamente rilevata nei tessuti non proliferativi. Gli inibitori di Eg5 non hanno pertanto i gravi effetti collaterali associati agli agenti tradizionali antimitotici, come i taxani e gli alcaloidi della vinca, che prendono di mira i microtubuli e colpiscono sia le cellule normali che proliferanti.

1 - I microtubuli e la terapia del cancro

La mitosi è un processo fondamentale della divisione cellulare che assicura la giusta collocazione dei cromatidi replicati rispetto alle cellule figlie nuove. Il ruolo chiave di questo processo è giocato dal fuso mitotico, che è costituito dalle fibre dei microtubuli che emergono dai poli del fuso e si attaccano al centromero dei cromosomi condensati tramite una struttura specializzata, il *cinetocore* [2, 3]. I microtubuli sono polimeri dinamici costituiti da dimeri di tubulina α/β . I farmaci che hanno come target la tubulina o i microtubuli sono attualmente fra i più efficaci nella terapia del

cancro. Gli alcaloidi della vinca, che promuovono la depolimerizzazione del microtubulo e i taxani (paclitaxel e taxotere) che stabilizzano i microtubuli, inibiscono la funzione del fuso interrompendo le dinamiche del microtubulo [4, 5]. L'arresto della mitosi indotto da questi farmaci è generalmente seguito dall'induzione all'apoptosi [2, 6].

Oltre che essere essenziali per la mitosi, i microtubuli sono necessari anche per varie altre funzioni fisiologiche. Sono una componente del citoscheletro e regolano la motilità ed il trasporto degli organelli. È possibile che alcuni degli effetti terapeutici dei farmaci che bersagliano i microtubuli possano derivare da queste attività, piuttosto che solamente dalle interferenze con il fuso mitotico. I microtubuli sono anche necessari per il trasporto delle proteine e delle vescicole lungo le fibre dell'assone che è alla base della neurotossicità che si è spesso osservata con questi composti. Inoltre, le cellule tumorali possono diventare resistenti a questi farmaci attraverso vari meccanismi, come le mutazioni della tubulina, la sovraespressione delle pompe di efflusso *multi-drug resistance* (MDR) e l'espressione alterata dei sottotipi di tubulina [4]. Quindi, vi è un grande interesse nel generare nuovi agenti antimitotici, che siano privi di alcuni degli effetti tossici e dei meccanismi di resistenza visti con altri farmaci.

2 - La chinesina mitotica come target per farmaci

Negli ultimi anni, le chinesine mitotiche hanno ricevuto una grande

attenzione quali nuovi target per la terapia del cancro. Le chinesine sono delle proteine motrici del microtubulo che mediano diverse funzioni all'interno della cellula, come il trasporto di vescicole, organelli, cromosomi e complessi di proteine, ma mediano anche il movimento dei microtubuli [7]. Ad oggi sono state identificate, in differenti specie animali, 623 chinesine, che sono state suddivise in 14 diverse famiglie (Tabella 1). L'analisi filogenetica sistematica della superfamiglia delle chinesine effettuate da Miki e colleghi fornisce una panoramica di tutte le famiglie e descrive le funzioni chiave delle varie famiglie che sono state caratterizzate più nel dettaglio. Tutte le chinesine sono caratterizzate da un dominio motore di circa 340 amminoacidi, che contiene un sito di legame per l'ATP e l'interfaccia per il legame col microtubulo. Accanto al dominio motore (*head* o testa), la chinesina contiene una regione detta *stalk* (gambo), seguita dalla regione del *tail* (coda). Mentre il dominio motore idrolizza l'ATP per generare l'energia necessaria per il movimento lungo le fibre del microtubulo, le regioni dello stalk e del tail sono necessarie per la dimerizzazione o l'oligomerizzazione. Le chinesine che contengono il dominio motore nella regione N-terminale generalmente si muovono verso l'estremità positiva dei microtubuli, cioè l'estremità che cresce più velocemente, mentre quelle che contengono il dominio motore nella regione C-terminale si dirigono verso l'estremità negativa. Sono state individuate altre chinesine con un dominio motore centrale che regolano la dinamica del microtubulo facilitando la depolimerizzazione delle fibre [7, 8].

Tabella 1 - Motilità e funzioni delle famiglie della chinesina [9].

Famiglia	Nomi comuni	Struttura	Motilità in vitro	Funzione nella mitosi
Chinesina-1	UKHC, Kif5, UNC-116	Eterotetramero: 2 HC e 2 LC	Diretta verso l'estremità positiva, processiva, motilità hand-over-hand	Funzione sconosciuta nella mitosi, ma media la traslocazione del fuso meiotico alla corteccia dell'ocita nella meiosi di <i>Caenorhabditis elegans</i>
Chinesina-2	Kif3A/B/C	Etero e omotetramero	Diretta verso l'estremità positiva, veloce, processiva, variabile in base alla composizione dell'eterodimero	Mutazioni dominanti negative portano all'aneuploidia e a fusi multipolari
Chinesina-3	Kif14, Kif13B/Gakin	Dimero	Diretta verso l'estremità positiva, veloce.	Interagisce con PRC1, implicata nell'ultima fase della citochinesi.
Chinesina-4	Kif4, Xklp1, Klp38B	Non confermato, dimero?	Diretta verso l'estremità positiva, inibisce dinamiche	Congressione, assemblaggio del fuso, citochinesi
Chinesina-5	Eg5, BimC, Cin8, KSP	Tetramero bipolare	Impacchettamento, scorrimento parallelo e antiparallelo	Allungamento del fuso, assemblaggio, congressione
Chinesina-6	MKLP1, MKLP2, Pavarotti, Subito, Klp9p, Cho1, Kif12, Rab6Kinesin, Kif20, Kif23	Dimero o tetramero	Diretta verso l'estremità positiva, scorrimento antiparallelo del microtubulo	Assemblaggio del fuso, allungamento del fuso, posizionamento solco di scissione, regolazione dell'assemblaggio nella zona centrale del fuso, citochinesi
Chinesina-7	Cenp-E	Dimero	Diretta verso l'estremità positiva, processiva	Congressione
Chinesina-8	Kip3, Kif18A, Klp5/6, Klp67A	Non confermato, dimero	Depolarizzazione lunghezza-dipendente, incrementa la catastrofe e l'uscita, dinamicità diminuita	Congressione, dinamiche delle fibre del cinetocore, dinamiche centrali del fuso mitotico
Chinesina-9	Kif6, Kif9, Klp1	Sconosciuta	Sconosciuta	Soppressore tumorale, flagellare
Chinesina-10	Kif22, Kid, Nod	Monomero	Debole, diretta verso l'estremità positiva, oppure non mobile	Congressione, compattazione del cromosoma, posizionamento del cromosoma meiotico
Chinesina-11	Smy1, Kif26A, Vab-8	Sconosciuta	Sconosciuta	Non identificata
Chinesina-12	Krp180, Klp-10, Xklp2, Hklp2, Kif12, Kif15	Sconosciuta	Lenta, diretta verso l'estremità positiva	Separazione del centrosoma, posizionamento del fuso, interazione con Ki-67
Chinesina-13	Kif2A,B,C, MCAK, Klp10A, Klp57C, XKCM1, Dsk1	Omodimero	Depolimerizzatore, promuove la catastrofe	Congressione, correzione errore, incremento turnover di fibre-K
Chinesina-14	Ncd, CHO2, Xctk2, Kar3, KlpA, KifC2, KifC2, Kata	Dimero	Diretta verso l'estremità negativa, non processiva, scorrimento di microtubuli antiparalleli, impacchettamento, depolarizzatore	Assemblaggio fuso bipolare, focalizzazione del polo, regolazione della lunghezza e del numero dei microtubuli

I diversi membri della famiglia delle chinesine svolgono funzioni molto specifiche. Alcuni di essi sono coinvolti nel trasporto assonale, mentre altri vengono attivati esclusivamente durante la mitosi [10, 11]. Delle 45 chinesine umane, almeno 12 svolgono varie funzioni durante la mitosi, compreso l'assemblaggio del fuso bipolare, l'allineamento dei cromosomi, la loro segregazione e la citocinesi (Figura 3).

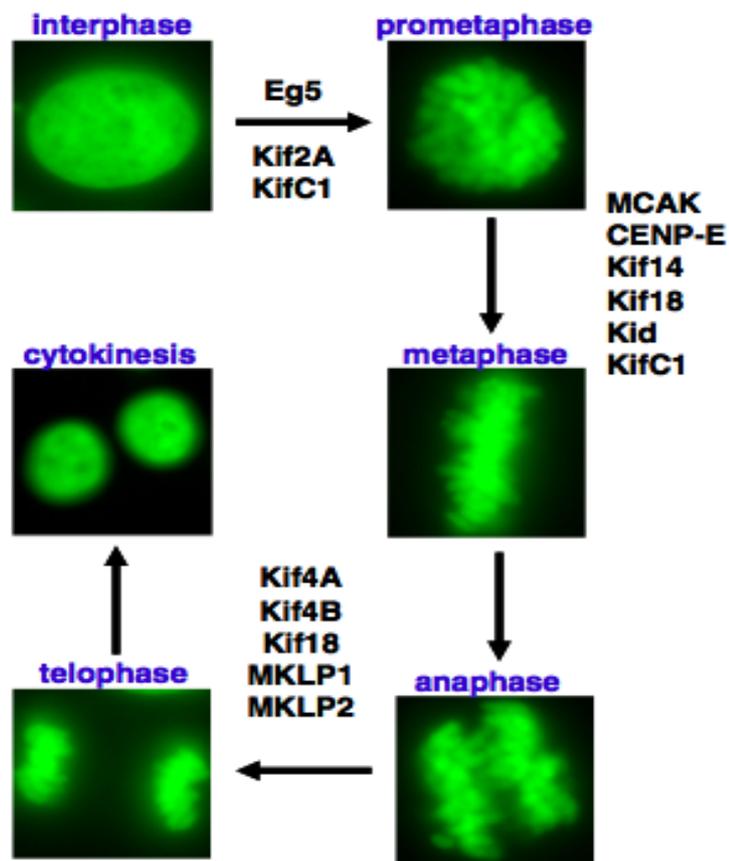


Figura 3 - Le proteine motrici chinesine nelle varie fasi della mitosi. Le immagini mostrano il DNA cromosomico delle cellule HeLa che esprimono una proteina di fusione dell'istone-GFP.

3 - Assemblaggio del fuso

Per garantire l'assemblaggio di un fuso funzionale, la cellula deve costruire un singolo schieramento bipolare di microtubuli che richiede in genere l'integrazione dei microtubuli generati in siti spazialmente distanti. Negli eucarioti superiori, i microtubuli del fuso sono nucleati da *centri di organizzazione del microtubulo* (MTOCs o *centrosomi*) o attraverso la via mediata dalla cromatina. Nella crescita e nella divisione del lievito, i corpi dei poli del fuso (SPBs), incorporati nella membrana nucleare, nucleano i microtubuli del fuso. Nelle cellule che hanno i centrosomi, le fasi iniziali dell'assemblaggio del fuso sono segnate dalla separazione *motore-dipendente* e dal movimento dei centrosomi ai poli opposti del nucleo profasico (Figura 4A). La successiva degradazione della membrana nucleare permette ai microtubuli nucleati nei centrosomi di entrare nello spazio nucleare. Le estremità di crescita (positive) del microtubulo esibiscono una *instabilità dinamica*, caratterizzata da rapide transizioni fra allungamento e accorciamento [12]. Questa caratteristica permette loro di farsi spazio efficacemente e di stabilire legami con i cromosomi, con la corteccia cellulare e altri microtubuli [13-15]. Studi di mitosi in cellule animali suggeriscono che la via di formazione del fuso *chromosome-directed* contribuisca all'assemblaggio del fuso anche in cellule che contengono i centrosomi [16, 17]. L'insieme di questi processi determina la formazione di un unico fuso.

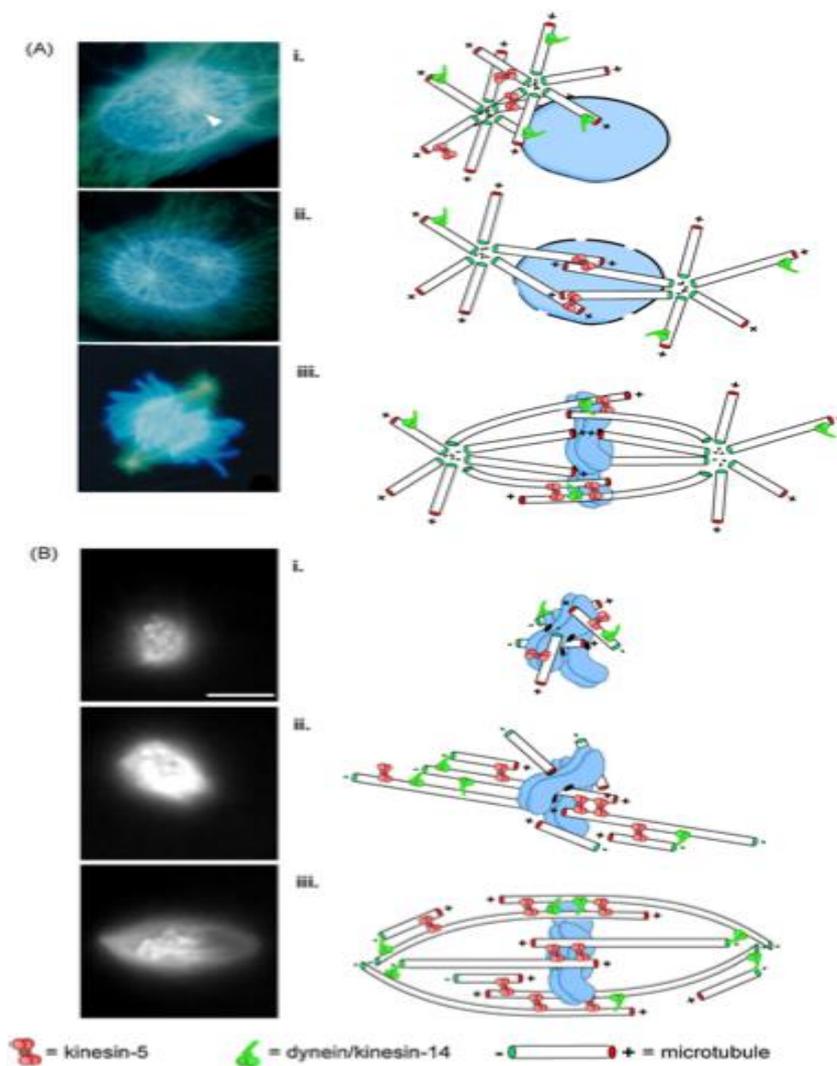


Figura 4 - Via di assemblaggio del fuso negli eucarioti. Le vie di assemblaggio del fuso sono tipicamente definite dalla fonte dei microtubuli utilizzati per costruire il fuso. Alcuni sistemi mitotici si affidano maggiormente ad una delle due vie, ma l'assemblaggio del fuso probabilmente coinvolge entrambi i microtubuli centrosoma- e cromosoma-nucleati. (A) – L'assemblaggio del fuso nelle cellule polmonari di tritone è dominato da microtubuli centrosoma-derivati. Le immagini sono tratte da campioni fissati in momenti diversi dell'assemblaggio. Negli stadi iniziali della profase, i microtubuli astrali (verdi) provengono da un paio di centrosomi (freccia bianca) che sono raggruppati in un singolo locus, su un lato del nucleo che contiene i cromosomi condensati, marcati in blu (i). I centrosomi sono successivamente separati dallo scorrimento motore-dipendente microtubulo-microtubulo (es.: chinesina-5 in siti di sovrapposizione antiparalleli) (ii). Dopo la dissoluzione della membrana nucleare, i microtubuli divisi dai centrosomi possono cercare e catturare strutture come i cinetocori e altri microtubuli adottando una forma simile al fuso (iii). L'assemblaggio acentrosomico del fuso, mostrato in (B), è caratterizzato da una intensa nucleazione del microtubulo intorno alla cromatina (o "filo a collana di perle" nell'esempio mostrato). I microtubuli nucleati sono arrangiati da meccanismi di filamenti scorrevoli fino a formare due loci prominenti di estremità negative focalizzate, i precursori dei poli del fuso (ii). Infine, la densità del polimero microtubulo si equilibra e i motori continuano a tenere sotto controllo gli schieramenti di microtubulo fino a quando non si forma una conformazione bipolare fusiforme tipica del fuso (iii).

Al contrario delle cellule che possiedono i centrosomi, quelle che ne sono sprovviste si affidano esclusivamente alla via *chromosome-directed*, nella quale i microtubuli sono nucleati e stabilizzati rispettivamente vicino ai cromosomi e ai cinetocori attraverso Ran GTPasi [18, 19] e al *complesso dei passeggeri cromosomici* (CPC) [20, 21]. Nelle cellule animali, l'assemblaggio del fuso *chromosome-mediated* comincia dopo la dissoluzione della membrana nucleare con una intensa polimerizzazione del microtubulo vicino ai cromosomi. Questi microtubuli si estendono in tutte le direzioni verso l'esterno del raggruppamento di cromosomi (Figura 4B). Rispetto all'assemblaggio *centrosome-directed*, è meno chiaro come venga risolta questa iniziale asimmetria e stabilita la bipolarità. Tuttavia, col tempo, questi microtubuli orientati casualmente vengono organizzati e legati in schieramenti simmetrici e antiparalleli, con le estremità negative ai lati opposti dei cromosomi; questo avviene per mezzo delle proteine motrici e non motrici del microtubulo [22, 23]. L'intero assemblaggio infine assume una conformazione fusiforme, con le estremità positive interdigitate vicino ai cromosomi e quelle negative focalizzate ai poli [24, 25].

La costruzione di una qualsiasi struttura con blocchi dinamici presenta una sfida unica, in particolare se la durata della sua vita deve essere superiore a quella dei suoi componenti. Questo è il caso del fuso e dei relativi microtubuli dinamici che lo compongono. Ciò richiede che una volta che un fuso bipolare è stato costruito, la sua forma deve essere mantenuta. Come questa stabilità sia realizzata con polimeri instabili è una questione

fondamentale nel campo dei meccanismi del fuso. Anche se siamo molto lontani da una comprensione concettuale completa, è chiaro che i motori del microtubulo svolgono un ruolo estremamente importante.

4 - Meccanismi di funzionamento dei filamenti scorrevoli

I motori del microtubulo sono macchine proteiche che convertono l'energia liberata dall'idrolisi dell'ATP in un graduale movimento lungo i microtubuli. Un determinato tipo di motore presenta in genere una velocità massima caratteristica (quando non è carico) e un orientamento preferito del movimento lungo il microtubulo, cioè si muove prevalentemente verso l'estremità positiva che si accresce più velocemente (*plus-end directed*) o verso l'estremità negativa relativamente stabile (*minus-end directed*) del polimero polare. Diversi tipi di carichi sono trasportati lungo i microtubuli. I motori possono agire tramite legami crociati dinamici, muovendo i microtubuli uno verso l'altro. Questa è la base del funzionamento dei filamenti scorrevoli dell'assemblaggio del fuso [26].

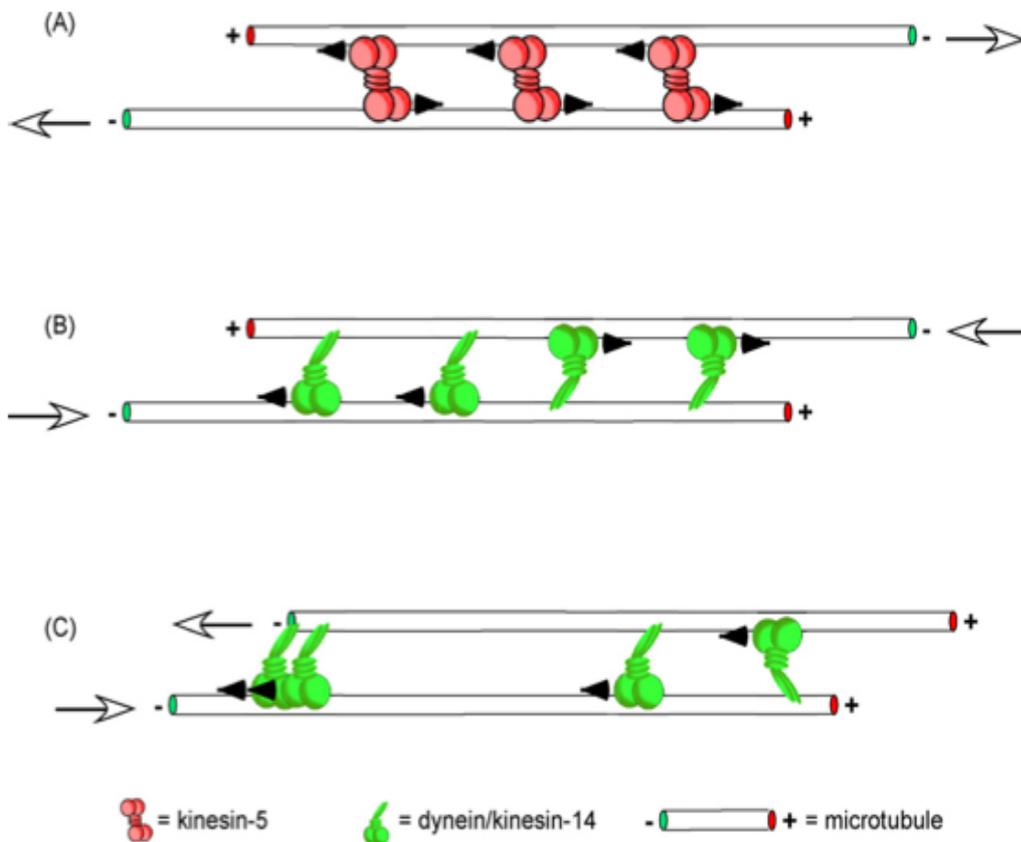


Figura 5 - Basi dei meccanismi di scorrimento dei filamenti. L'orientamento dei microtubuli legati con legami crociati e la direzionalità preferenziale dei motori determinano come i meccanismi di scorrimento dei filamenti contribuiscano all'assemblaggio e al mantenimento del fuso. In (A), i microtubuli che sono sovrapposti alle estremità positive con un'orientamento antiparallelo, che si verifica comunemente nei pressi della zona mediana del fuso, sono spinti verso l'esterno (verso i poli) per mezzo di motori chinesine-5 con direzionalità positiva. Le frecce bianche indicano la direzione risultante dello scorrimento del microtubulo. Al contrario, i motori con direzionalità negativa, come la dineina e i membri della famiglia chinesina-14, agirebbero per ravvicinare le estremità negative degli stessi microtubuli (B). Si pensa che il bilanciamento di queste forze opposte contribuisca a realizzare la lunghezza dello stato stazionario del fuso. L'altra estremità degli orientamenti del microtubulo è allineata in modo parallelo (C). In questa geometria l'effetto del motore sullo scorrimento del microtubulo dipende dal fatto che il motore "si blocca" una volta raggiunta una estremità del microtubulo. Un motore con simmetria bipolare come la chinesina-5 si potrebbe legare e muoversi in modo processivo, lungo entrambi i microtubuli che lega con legami crociati, senza produrre uno scorrimento relativo. In questo modo il motore potrebbe agire per impacchettare microtubuli paralleli legandoli assieme a "cerniera". Per un motore asimmetrico come la dineina, la quale si lega ai microtubuli in modo statico non-motore, l'effetto del legame della sua estremità non-motrice a qualsiasi microtubulo porta ad una forza netta pari a zero (ad esempio, i due motori sul lato destro dei microtubuli legati in modo crociato hanno effetti uguali ed opposti sullo scorrimento del microtubulo, non producendo nessuno scorrimento o forza). Tuttavia, una maggiore affinità di legame del motore all'estremità negativa del microtubulo, permetterebbe lo scorrimento e la fine dell'allineamento.

L'“unità” di scorrimento fondamentale di uno schieramento interconnesso di microtubuli, come il fuso, è una coppia di microtubuli legati in modo crociato da un singolo tipo di motore (Figura 5). In questo semplice sistema, la direzionalità preferita del motore e l'orientamento dei microtubuli determinano la disposizione spaziale finale. Consideriamo due microtubuli giustapposti di lunghezza equivalente e inizialmente orientati in una configurazione antiparallela, cioè con l'estremità positiva di un microtubulo allineata con quella negativa di un altro (Figura 5A; [27]). L'azione di un motore con direzionalità positiva (ad esempio la chinesina-5), funzionerebbe per allineare l'estremità positiva, spingendo quella negativa in senso opposto. Al contrario, il motore con orientamento negativo (es. dineina o un membro della famiglia di chinesina-14) farebbe scorrere l'estremità negativa verso un'altra e spingerebbe quella positiva in senso opposto (Figura 5B). Se gli stessi microtubuli fossero inizialmente allineati, ma con orientamenti paralleli (Figura 5C), non si verificherebbe alcuno scorrimento reciproco, indipendentemente dalla direzionalità del motore coinvolto. Tuttavia, lo scorrimento parallelo, rilevato nel *trasporto dineina-dipendente* dalle origini del microtubulo polare verso i poli [28], è stato osservato all'interno del fuso. Questa motilità è similmente prodotta dai motori con direzionalità negativa legati alle estremità negative dei microtubuli paralleli dove le estremità non sono allineate. Questo suggerisce implicitamente che le cinetiche di legame dei motori all'estremità del microtubulo possono differire da quelli collocati lungo il microtubulo.

4.1 - Flusso del microtubulo verso il polo

Una delle due manifestazioni più evidenti dei meccanismi di scorrimento dei filamenti all'interno del fuso è il flusso del microtubulo. Il flusso, lento movimento ($\sim 1-4 \mu\text{m}/\text{min}$) diretto verso il polo dei microtubuli, è guidato prevalentemente dai motori del microtubulo della famiglia delle chinesine-5 (Eg5 in *Xenopus* [29], Klp61F in *Drosophila* [28, 30]). I motori chinesine-5 formano complessi omotetramerici con un dominio astiforme centrale fiancheggiato da una coppia di domini di legame globulari [31]. Questi complessi motori legano in modo crociato microtubuli antiparalleli con terminali sovrapposti e sono in grado di muoversi allo stesso tempo lungo ciascun microtubulo crociato (Figura 5A), spingendo le estremità negative in senso opposto [32]. L'attività dei motori chinesine-5 nello scorrimento antiparallelo dei microtubuli è legata sia allo stabilirsi della bipolarità, sia alla regolazione della lunghezza del fuso dello stato stazionario. La perturbazione della funzione del motore chinesina-5 impedisce la separazione del centrosoma nelle cellule animali che ne sono provviste, causando la formazione di astri anormali del microtubulo con singoli poli (monopoli; [33, 34]). La funzione della chinesina-5 è importante anche nello stabilirsi della simmetria bipolare dei sistemi che non hanno i centrosomi, dove l'inibizione del motore durante l'assemblaggio del fuso causa la formazione di monopoli [35, 36]. Il motore svolge un ruolo cruciale anche nel mantenimento della morfologia del fuso una volta che è stato costituito: l'inibizione del motore dopo l'assemblaggio del fuso ne

causa l'accorciamento e, se sufficientemente efficace, determina il collasso del fuso in monopoli [37].

4.2 - Formazione del polo all'estremità negativa

L'altro importante meccanismo di scorrimento dei filamenti all'interno del fuso è la formazione del polo attraverso l'allineamento e la focalizzazione dell'estremità negativa del microtubulo [19, 25, 38-40]. Questo processo è mediato dai motori con direzionalità negativa della famiglia delle chinesine-14 (HSET negli umani [41], XCTK2 in *Xenopus* [39], non-clared disjunction (Ncd) nella *Drosophila* [42]) e anche dalle dineine citoplasmatiche [19, 43]. Al contrario di quanto avviene per la chinesina-5, la struttura di questi complessi motori non è bipolare o tetramerica. Esse possiedono tipicamente due domini per il legame attivo col microtubulo ad un'estremità, che scorre lungo un singolo microtubulo, mentre l'altra estremità è passivamente legata ad un microtubulo adiacente (Figura 5B, C). La valenza richiesta per i legami crociati del microtubulo e lo scorrimento, è ottenuta da ulteriori domini di legame per il microtubulo all'interno della stessa proteina motrice [44], oppure attraverso proteine accessorie (come la dinactina [45] o NuMA nel caso della dineina [43]). Non è chiaro se i meccanismi di focalizzazione del polo si basino esclusivamente sullo scorrimento parallelo del microtubulo o se i motori responsabili agiscano anche in regioni di sovrapposizioni antiparallele [46-

48]. Tuttavia, come menzionato in precedenza, lo scorrimento parallelo microtubulo-microtubulo attraverso motori con direzionalità negativa richiede differenti cinetiche di legame alle estremità del microtubulo, specialmente alla relativamente stabile estremità negativa [19, 27]. La base molecolare per queste differenze rimane un mistero, in parte a causa della mancanza di un marcatore molecolare specifico per le estremità negative, le quali si pensa siano rivestite dai complessi di nucleazione γ -Tur del microtubulo [49] e possano anche essere associate con membri del *complesso augmin* recentemente caratterizzato, il quale svolge un ruolo chiave nella nucleazione dei microtubuli mediata dal fuso [50-52]. Perciò, non siamo ancora in grado di comprendere come le proteine motrici con direzionalità negativa, attraverso i propri domini o quelli di proteine accessorie, interagiscano con le estremità negative del microtubulo.

4.3 - Antagonismo motore e lunghezza del fuso

Vi è una sostanziale evidenza sperimentale, in una varietà di organismi eucariotici, che supporta l'antagonismo motore come un mezzo per regolare lo stato stazionario della lunghezza del fuso. In generale, si pensa che la funzione della chinesina-5 sia quella di allungare il fuso (forze dirette verso l'esterno), mentre i motori con direzionalità negativa, come la dineina e la chinesina-14, funzionino per promuoverne

l'accorciamento (forze dirette verso l'interno) [37, 53-55]. Tuttavia, la base meccanicistica di questo antagonismo non è molto chiara. Alcuni modelli ipotizzano che motori con polarità opposte si antagonizzino a vicenda direttamente ai siti di sovrapposizione antiparallela [47, 48, 53]. Sono stati utilizzati test in vitro di motilità competitiva per studiare come le azioni di due motori con polarità opposte possano influire sullo scorrimento del microtubulo [56, 57]. Nel lavoro di Tao e colleghi [56], la chinesina-5 (Klp61f) e Ncd sono stati disposti su vetrini ed è stato variato il numero di un motore rispetto all'altro. In un ampio intervallo di rapporti molari, la velocità di scorrimento e la direzionalità sono state dominate da un motore. Quando la quantità relativa del motore opposto meno abbondante è stata incrementata, la velocità di scorrimento è rallentata, coerentemente all'idea che motori opposti agiscano come "freni" molecolari [58]. Solo in una piccola serie di rapporti molari la velocità di scorrimento oscilla intorno a zero. Alla luce di questi risultati, è interessante il fatto che i microtubuli di fusi estratti da *Xenopus* possano fluire a velocità simili a quelle osservate per il motore non carico in vitro, almeno vicino alla zona centrale del fuso [32, 59], suggerendo che l'antagonismo antiparallelo mediato dai motori con direzionalità negativa abbia un effetto minimo sulla velocità dello scorrimento, oppure che altri meccanismi contribuiscano a generare la forza richiesta per lo scorrimento.

Altri modelli per la lunghezza del fuso suggeriscono un diverso tipo di meccanismo di scorrimento dei filamenti per spiegare l'antagonismo dei

motori, nei quali le forze di focalizzazione del polo alle estremità negative del microtubulo oppongono forze di flusso prodotte da chinesina-5 ai siti sovrapposti con estremità positive [60]. Questi modelli di “scorrimento e accorciamento” sono basati su osservazioni di fusi estratti da *Xenopus* e necessitano delle estremità negative del microtubulo per essere ripartiti lungo tutto il fuso [61], una condizione che può essere specifica nell’architettura dei fusi meiotici che si basano fortemente sulla via di assemblaggio *chromatine-directed*. Qui le forze della chinesina-5 dominano vicino alla zona centrale del fuso, dove la disposizione dei microtubuli offre la più grande opportunità di sovrapposizione antiparallela delle estremità positive del microtubulo. Vicino ai poli, dove sono prevalenti gli orientamenti paralleli del microtubulo, dominano le forze di accorciamento delle estremità negative mediate dalla dineina. Gli autori sostengono che questo spieghi le differenze regionali delle velocità di flusso, le quali rallentano in prossimità dei poli. Tuttavia, il modello richiede che la velocità di flusso si riduca a zero vicino al polo e a tal proposito vi è qualche discrepanza in letteratura.

Le velocità di flusso più lente vicino al polo possono anche derivare da differenze della funzione del motore a causa di cambiamenti di orientamento del microtubulo o alternativamente a regolazioni spaziali delle attività del motore all’interno del fuso [62, 63].

5 - Struttura della chinesina-5

La chinesina-5 è una proteina omotetramericata, con ciascuna subunità contenente un dominio motore N-terminale detto “*head*”, un dominio centrale detto “*stalk*” e un “*tail*” C-terminale. Si pensa che queste subunità si dispongano in omotetrameri bipolari, con un paio di domini motore su entrambe le estremità [64].

Il dominio motore N-terminale della chinesina-5 è costituito da circa 350 residui ed ha tutti gli elementi strutturali conservati che formano il motore di ogni chinesina. Tutti i domini motori delle chinesine hanno una struttura *beta-sheet* affiancata da alfaeliche. Queste proteine condividono anche alcuni elementi strutturali critici che portano a cambiamenti conformazionali a partire dall'idrolisi del nucleotide. Molte di queste caratteristiche strutturali sono di particolare interesse per le chinesine-5 e sono descritte qui di seguito (Figura 6).

- *Cover strand*: è un breve segmento di ~5-10 residui situato nella regione N-terminale del dominio motore. Questo elemento non sempre è visualizzato nelle strutture cristalline della chinesina, ma ha dimostrato di essere fondamentale per il movimento dei motori della kinesina-1. Il *cover strand* forma un breve segmento *beta-sheet*, denominato “*cover-neck bundle*”, con il *neck linker* durante il movimento in avanti sia della chinesina-1 che della chinesina-5 umana, Eg5.
- *Loop 5*: l'alfaelica 2 di tutti i motori chinesine si interrompe con un corto loop, chiamato loop 5, vicino alla tasca per il nucleotide. La sequenza

di questo loop è specifica per le diverse famiglie di chinesine, e non è chiaro se il loop 5 abbia una funzione conservata per tutte le chinesine. Nel motore chinesina-5, il loop 5 è implicato nel rilascio dell'ADP, nella comunicazione dei cambiamenti di stato del nucleotide al neck linker e nel legame del microtubulo con le regioni del dominio motore.

- *Switch I e Switch II*: sono elementi conservati *nucleotide-sensing* che si ritrovano in tutte le chinesine, miosine e piccole GTPasi. Si è visto che questi elementi svolgono un ruolo nei cambiamenti conformazionali indotti dal nucleotide. Switch I è importante per mediare la liberazione del nucleotide, che in questi enzimi è stimolata da fattori di scambio. Molti inibitori allosterici di Eg5, come S-trifenilmetil-L-cisteina (STLC) (Figura 6B), si legano in una tasca fra il loop 5, le eliche $\alpha 2$, $\alpha 3$, e switch I e incidono fortemente sul rilascio di ADP microtubulo-stimolato. Switch II comunica i cambiamenti di stato del nucleotide del motore all'elica relay all'interno del sito di legame per il microtubulo e al neck linker, che spinge in avanti la motilità.
- *Neck linker*. Il neck linker subisce cambiamenti conformazionali nucleotide- e microtubulo-dipendenti che portano al movimento diretto di tutti i motori chinesine. Si pensa che questo movimento diretto sia coordinato "passo per passo" dai domini motore sia per la chinesina-1 che per la chinesina-5, Eg5, e che il neck linker sia cruciale per questa coordinazione fra le teste dei motori.

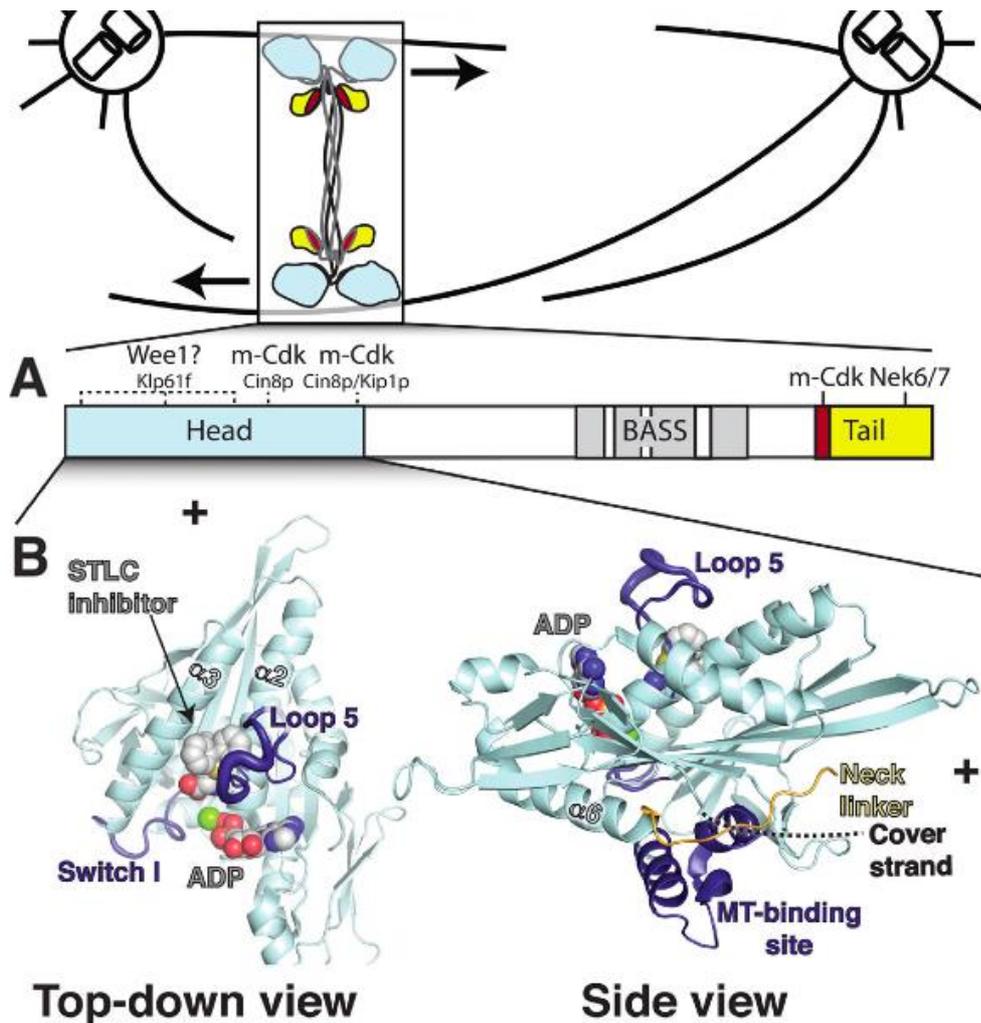


Figura 6 - (A) Diagramma a barre della chinesina-5, sono mostrati i domini conservati e i siti di fosforilazione noti. BimC Box in rosso. Il dominio BASS è stato identificato solo nell'omologo di *D. melanogaster* Klp61F ed è mostrato in grigio e bianco. I siti di fosforilazione delle teste sono stati ritrovati solo negli omologhi della chinesina-5 di animali diversi dai mammiferi. Questi sono indicati con linee tratteggiate insieme al relativo omologo. I siti di fosforilazione dello stalk sono conservati nei motori chinesine-5 dei metazoi e sono mostrati in linee continue. (B) A sinistra, la struttura della head di Eg5 mostra il loop 5 e il sito di legame per gli inibitori allosterici. Questo punto di vista sarebbe top-down per il sito di legame col microtubulo della head di Eg5, con l'estremità positiva del microtubulo al di sopra, come indicato. A destra, vista laterale, con l'estremità positiva del microtubulo verso destra. Il sito di legame per il microtubulo è nel fondo della molecola. Il neck linker è contrassegnato in arancione. Il cover strand non è ordinato in questa struttura, ma la sua posizione approssimativa è mostrata con linee tratteggiate.

La chinesina-5 non richiede solo le head enzimatiche per formare legami crociati e far scorrere i microtubuli, ma ha bisogno anche dei domini non motori stalk e tail. Il dominio centrale stalk della chinesina-5 orienta le subunità del motore di un'altra proteina motrice. Dimeri dei domini motori possono essere formati utilizzando il dominio motore N-terminale e metà dello stalk (residui 1-513 nella chinesina umana Eg5; Figura 6A). Utilizzando la microscopia elettronica e la risonanza paramagnetica elettronica del Klp61F di *Drosophila*, è stato individuato un gruppo bipolare ('BASS') verso la fine del dominio C-terminale dello stalk (residui 671-791) che consente a due dimeri di associarsi in modo anti-parallelo per formare omotetrameri bipolari.

Il tail C-terminale della chinesina-5 sembra avere due funzioni importanti: quella di aiutare la localizzazione del motore nella mitosi e di aumentare l'affinità del motore per i microtubuli. Questa localizzazione dipende dal BimC box, un tratto di 20 residui nel tail C-terminale del motore, che contiene un sito per la chinasi M-CDK al residuo Thr926 di Eg5 umana/Thr937 di Eg5 di *Xenopus*. I tails di tutti i motori chinesine-5 note ad eccezione di *S. pombe* Cut7 sembrano essere fosforegolate da M-CDK.

6 - Funzione e inibizione della chinesina mitotica KSP (Eg5)

L'interesse nelle chinesine mitotiche come target per i farmaci antitumorali è iniziato con l'identificazione di una piccola molecola, il monastrolo, un inibitore selettivo della proteina motrice chinesina-5 (KSP, chiamata anche Eg5). Il monastrolo è stato isolato in uno screening fenotipico mirato a identificare composti antimitotici che non interferiscono direttamente con la dinamica del microtubulo [65]. Il trattamento delle cellule con il monastrolo blocca la separazione del centrosoma, dal quale deriva un fuso a forma monoastrale che è circondato dai cromosomi condensati in una configurazione a rosetta (Figura 7).

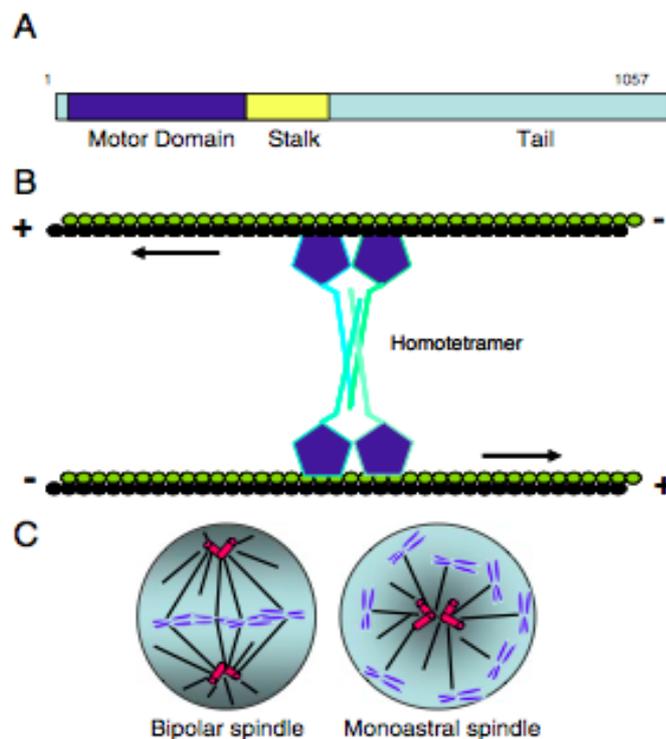


Figura 7 - (A) Rappresentazione schematica della chinesina motrice-5 KSP. (B) Modello della funzione di KSP. (C) Rappresentazione schematica di un fuso bipolare normale in metafase e di un fuso astrale causato tramite inibizione di KSP.

La *Kinesin Spindle Protein* (KSP) è un motore omotetramericico del microtubulo diretto verso l'estremità positiva [66, 67]. Attraverso la sua struttura tetramericica, KSP può formare legami crociati con i microtubuli antiparalleli attraverso due domini motori che interagiscono con ciascuno dei filamenti (Figura 7). Dal movimento verso il polo positivo di KSP deriva lo scivolamento delle fibre legate con legami crociati in direzioni opposte [68]. Nella mitosi, lo scivolamento KSP-mediato dei microtubuli che emergono dai centrosomi duplicati è essenziale per l'instaurarsi di un fuso bipolare. Gli studi iniziali nella *Drosophila* e nello *Xenopus* hanno dimostrato che l'inattivazione dei rispettivi omologhi di KSP, KLP61F e Eg5, attraverso una mutazione o mediante iniezione di anticorpo, impedisce la separazione del centrosoma e conduce all'arresto della mitosi con formazione di un fuso monoastrale [69, 70]. Allo stesso modo, l'inibizione selettiva di KSP attraverso l'iniezione dell'anticorpo nelle cellule umane provoca un arresto mitotico con fenotipo monoastrale [71]. Il ruolo funzionale di KSP si riflette anche nel suo profilo di espressione. KSP non è rilevabile nel tessuto adulto di non-proliferazione, mentre l'espressione è elevata durante lo sviluppo nel tessuto di proliferazione. Dalla perdita della funzionalità di KLP61F di *Drosophila*, per mezzo di mutazione, deriva la mortalità embrionale. Più recentemente sono state studiate le conseguenze del silenziamento del gene nel topo. Mentre i topi mutanti eterozigoti hanno fenotipo normale, gli embrioni omozigoti per una perdita di un allele funzionale muoiono presto durante l'embriogenesi prima della fase di impianto [72, 73]. Questi risultati dimostrano chiaramente che la

funzione di KSP è essenziale per la proliferazione delle cellule. Il ruolo di KSP nelle fasi iniziali della mitosi rende questa chinesina un obiettivo molto attraente per l'inibizione farmacologica. Inoltre, una sovraespressione di KSP è stata riscontrata in varie leucemie e tumori solidi umani; tuttavia è importante notare che questo è stato visto spesso nel contesto di un alto indice mitotico, con un conseguente aumento nell'espressione di altri indicatori mitotici, e può riflettere semplicemente un tasso proliferativo più alto [74, 75]. Castillo e colleghi hanno dimostrato il ruolo principale che la sovraespressione di Eg5 ha nella genesi tumorale, mostrando che i topi transgenici con una sovraespressione del KSP sono inclini allo sviluppo di vari tumori [76]. Gli elevati livelli di KSP nei topi transgenici interferiscono con la normale funzione del fuso e da questo deriva una mancata separazione del cromosoma e l'aneuploidia, un elemento caratteristico del cancro umano. È stata osservata una significativa sovraespressione di Eg5 nei topi transgenici, ma il suo ruolo fisiologico nella regolazione del tumore non è chiara. Saijo e colleghi hanno notato una correlazione fra l'espressione di Eg5 nei tumori del polmone e la risposta alla chemioterapia, e l'espressione di Eg5 è stata correlata con quella dell'indicatore mitotico cyclin B1 [77]. I pazienti con i tumori Eg5-positivi hanno risposto significativamente meglio ad un regime terapeutico che associa farmaci antimitotici alla chemioterapia del platino. Dalla scoperta del monastrol si è sviluppata una varietà di inibitori di KSP potenti e selettivi. Questi si sono dimostrati efficaci in una grande varietà di cellule tumorali, sia nelle colture cellulari che nei modelli di topi

xenograft [78-83]. Risultati recenti hanno anche dimostrato che gli inibitori di KSP sono efficaci nelle cellule tumorali resistenti al paclitaxel [80].

Anche se è ancora in fase di studio, è evidente che l'attivazione della via apoptica intrinseca svolge un ruolo importante. L'inibizione continua di KSP conduce all'attivazione della proteina proapoptotica Bax, alla depolarizzazione della membrana mitocondriale e all'attivazione di caspasi [84-86]. Tao e colleghi hanno suggerito che l'induzione dell'apoptosi richiedesse l'attivazione del checkpoint del fuso insieme all'arresto della mitosi [85]. Tuttavia, gli studi successivi eseguiti utilizzando *time-lapse video microscopy*, indicano chiaramente che le cellule tumorali possono andare in apoptosi direttamente dall'arresto mitotico [81, 87, 88]. Per le cellule HeLa questo è chiaramente il risultato predominante dell'inibizione di KSP e il co-trattamento con un inibitore delle caspasi provoca un arresto della mitosi. Tuttavia molte linee cellulari mostrano una considerevole variazione della loro risposta, esibendo sia la morte per mitosi, sia il blocco della mitosi seguita da senescenza, dalla morte delle cellule, o dalla ciclizzazione interna. Nelle cellule con mitosi bloccata i centrosomi non separati bloccheranno la citocinesi, di modo che la cellula emergente avrà un contenuto cromosomico 4N. Questa variazione nella risposta può essere collegata alle differenze nell'espressione di fattori pro-oppure anti-apoptici nelle varie cellule tumorali testate. Per esempio nello studio di Shi e colleghi [87], la sensibilità all'apoptosi sembra correlata alla perdita della proteina anti-apoptica XIAP, e Gascoigne e Taylor [88] hanno proposto un modello in cui il destino delle cellule in mitosi, in risposta agli

agenti antimitotici, è determinato dall'equilibrio fra due vie che concorrono tra loro: una coinvolta nell'induzione dell'apoptosi e l'altra nella degradazione di ciclina B1. La sovraespressione di Bcl-XL è capace di proteggere le cellule A549 dall'apoptosi e dall'uscita anormale delle cellule dalla fase G1 dopo un arresto prolungato. È importante notare che la risposta apoptica delle cellule A549 all'inibizione di KSP può ripristinare lo svuotamento RNAi-mediato del Bcl-XL.

7 - Inibitori della kinesina mitotica

Nella letteratura scientifica e brevettale sono stati riportati molti inibitori di KSP (Eg5), e la maggior parte di essi, ha in comune un sito di legame allosterico.

Diidropirimidine (DHPM)

L'(S)-monastrolo (**1**, Figura 8) è stato il primo inibitore specifico di Eg5 ad essere stato scoperto ($IC_{50} = 30 \mu M$) [33]. L'(S)-monastrolo è un inibitore allosterico non competitivo dell'ATP che si lega in una regione distante 12 \AA dal sito di legame per l'ATP, fra l'elica $\alpha 3$ ed il loop di inserzione L5 dell'elica $\alpha 2$ [89]. Gli inibitori che si legano in questa regione sono altamente selettivi per Eg5 dal momento che questo è un sito di legame che non sembra essere presente in altre chinesine.

Il monastrolo è stato identificato da Mayer e colleghi mediante uno screening fenotipico, progettato per trovare agenti antimitotici che non interferissero col microtubulo. Si è visto che (S)-monastrol è un inibitore più potente (potenza 15 volte maggiore) dell'enantiomero-(R) [90].

A partire dalla sua scoperta nel 1999, sono emersi molti articoli scientifici che ne hanno descritto la sintesi e la separazione enantiomerica [91-95]. Nel 2010, Blasco e colleghi hanno descritto la prima sintesi biocatalitica enantioselettiva di (S)-monastrolo per via enzimatica. Il metodo si basa sull'utilizzo di una lipasi di *Candida rugosa*, la quale ha mostrato

un'elevata efficacia, ma una bassa enantioselettività, per la risoluzione di rac-O-butanoil monastrol. Con questo metodo, (S)-monastrol è stato ottenuto con una resa del 98% e con un eccesso enantiomerico del 96% [95]. La sua risoluzione è stata anche ottenuta mediante l'utilizzo di diastereoisomeri N-3 ribofuranosil amidici [96]. È stata applicata per la sua sintesi anche la condensazione enantioselettiva multicomponente Biginelli, utilizzando un chirale riciclabile Yb triflato con un nuovo ligando chirale esadentato [97].

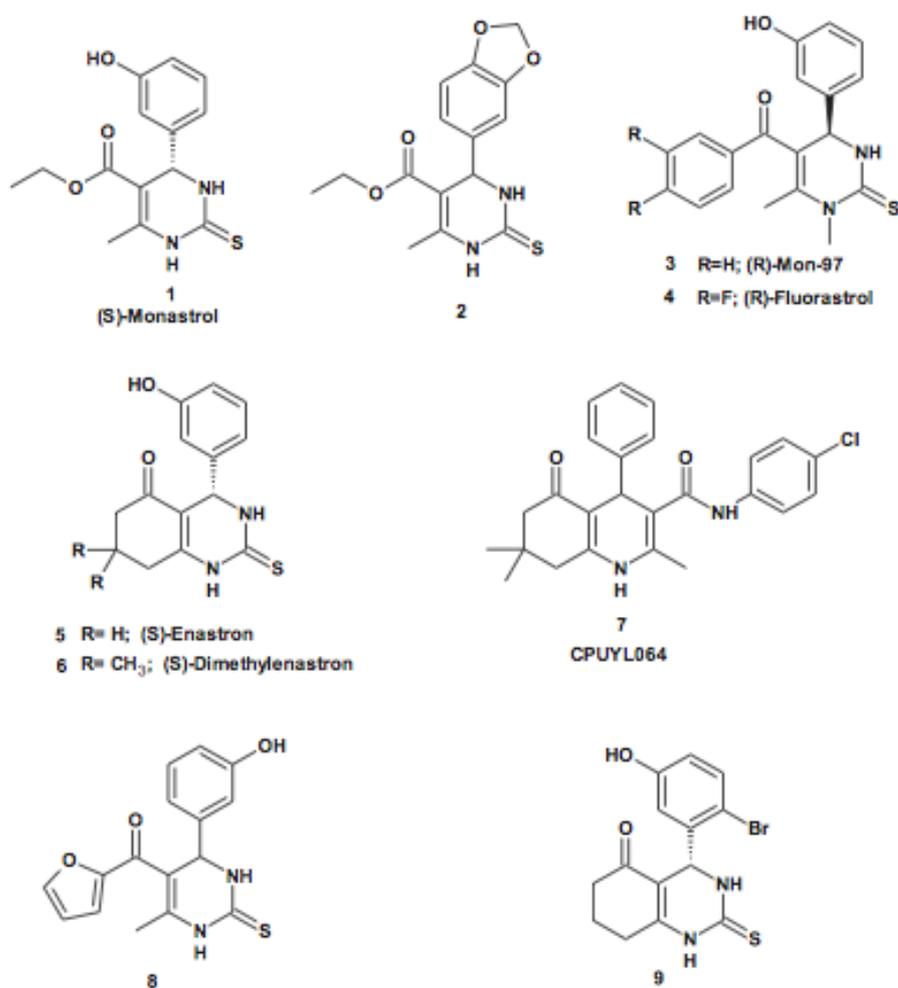


Figura 8 - Inibitori diidropirimidinici di Eg5.

Il monastrol inibisce l'attività ATPasica basale e microtubulo-mediata di Eg5. Esercita questa attività legandosi ad un sito allosterico del dominio motore e quindi non compete col legame per l'ATP. La cristallografia ai raggi X ha rivelato che la molecola si lega ad una tasca idrofobica fra il loop L5 e l'alfa-elica 3 ($\alpha 3$) (Figura 9) [98]. In seguito al legame con L5, il monastrol chiude il loop in una conformazione legata ad ADP, rallentandone il rilascio e inibendo il turnover dell'ATP [98, 99].

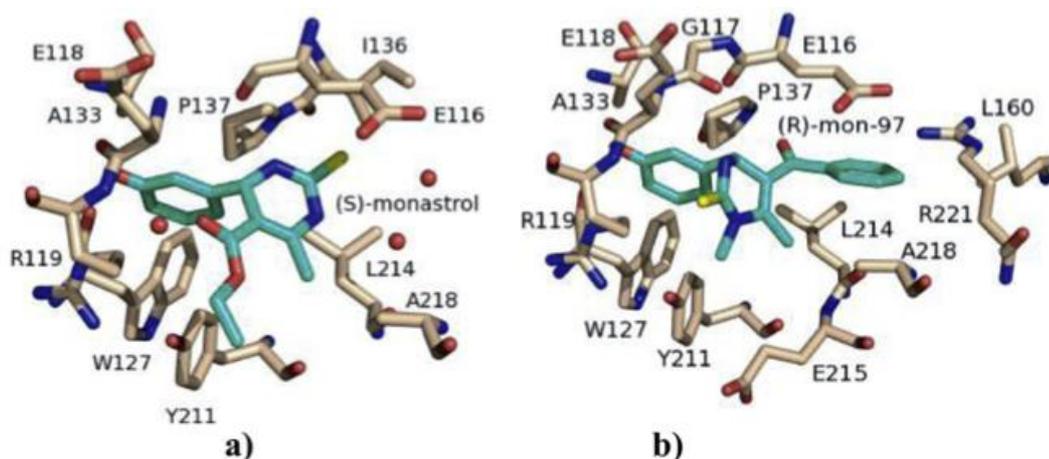


Figura 9 - Strutture stereoisomere coinvolte nelle interazioni inibitorie. a) Eg5-(S)-monastrol. b) complesso EG5-(R)-mon-97. Garcia-Saez e colleghi [101].

Il monastrol ha mostrato una potente attività antitumorale nei confronti di molte linee cellulari, con l'analogo tiocarbonilico più attivo di quello carbonilico; questo indica la relativa importanza dell'atomo di zolfo per l'attività antiproliferativa [100]. È stato riportato che l'analogo DHPM (3,4-metilendioksi derivato) (Figura 8; **2**) ha un'attività citotossica più marcata del monastrol nei confronti delle linee cellulari cancerose di melanoma

(UACC-62), rene (786-0), mammella (MCF-7), ovaio (OVCAR-3) e colon (HT-29) [100].

Inoltre, un cheto derivato del monastrololo, chiamato mon-97 (Figura 8; **3**), si è rivelato un potente inibitore antimitotico. Al contrario del monastrololo, si è visto che solo l'enantiomero-(R) di mon-97 si lega al sito attivo di Eg5, mentre l'enantiomero-(S) non si lega [101]. In realtà, entrambi gli enantiomeri (R) e (S) di mon-97 inibiscono l'Eg5 basale e microtubulo-mediata con IC_{50} di 110 nM e 150 nM per l'enantiomero-(R) e di 150 nM e 520 nM per l'enantiomero-(S). Tuttavia, questa differenza è sufficiente per la proteina Eg5 per selezionare l'enantiomero R rispetto all'enantiomero S [101].

Si è visto che il gruppo fenilico di mon-97, che sostituisce il gruppo etilico del monastrololo, si lega ad una tasca idrofobica nel sito allosterico di Eg5 e forma interazioni idrofobiche con i residui Glu116, Leu160, Leu214, Glu215, e Arg221; questa tasca nel caso del monastrololo rimane vuota.

Gli analoghi di DHPM fluorastrololo (**4**, Figura 8), enastrone (**5**) e dimetilenastrone (**6**) sono stati sviluppati da Gartner e colleghi come potenti inibitori di Eg5 [102]. Dimetilenastrone si è dimostrato un inibitore 6 volte più potente di enastrone. Inoltre si è visto che il fluorastrololo è 5 volte più potente di mon-97 e l'enantiomero-(R) mostra una potenza 30 volte superiore a quella di (S)-fluorastrololo. Enastrone (IC_{50} =200 nM dell'ATPasi di Eg5) si è dimostrato essere da 10 a 100 volte più potente del monastrololo (IC_{50} = 30 μ M) [102]. Dimetilenastrone mostra un'attività

antitumorale sia *in vitro* sia *in vivo* nei confronti delle cellule cancerose del pancreas.

Dalla ciclizzazione dei residui estereo e metilico del monastrolo nel chetone ciclico di enastrone e dimetilenastrone deriva una conformazione rigida, che porta ad una migliore occupazione della sottotasca di Eg5 esposta al solvente. L'introduzione di due gruppi metilici in dimetilenastrone migliora l'attività inibitoria di 6 volte rispetto ad enastrone. Si è visto che sia enastrone, sia dimetilenastrone si legano ad Eg5 preferenzialmente nella configurazione (S). D'altronde, l'esame della struttura cristallina del complesso Eg5-fluorastrolo mostra che (R)-fluorastrolo è più attivo dell'enantiomero (S).

Di conseguenza, monastrolo, enastrone, e dimetilenastrone costituiscono la I classe di inibitori DHPM, nella quale la configurazione (S) predomina su quella R. Mentre, mon-97 e fluorastrolo rappresentano la II classe di inibitori DHPM, dove la conformazione (R) è più attiva di quella (S).

CPUYL064 (**7**) è stato sintetizzato come analogo diidropiranicico di monastrolo e dimetilenastrone. Questo composto si è dimostrato un potente inibitore di Eg5 con IC_{50} di 100 nM. Ha una forte attività antitumorale dose- e tempo-dipendente sulla linea cellulare HepG2 del carcinoma epatocellulare del fegato [103].

Tentativi di modifiche del gruppo tioureico della struttura di monastrol, attraverso la fusione di un altro anello come il piperazolo, il tetrazolo o il benzimidazolo, hanno portato alla completa perdita di attività inibitoria nei confronti di Eg5 [104].

L'ottimizzazione chimica del monastrolo ha portato alla sintesi di **8**, con una potenza 5 volte maggiore del monastrolo nel bloccare le cellule in mitosi [105]. D'altra parte, dall'ottimizzazione chimica dell'inibitore diidropirimidinico enastrone, attraverso l'introduzione di un atomo di bromo nella posizione 2 del fenile, deriva il composto **9** con IC_{50} di 0.35 μ M.

Il monastrolo ha dimostrato una limitata efficacia clinica a causa della sua debole attività inibitoria nei confronti di Eg5, e all'elevato dosaggio richiesto per ottenere la morte cellulare desiderata; questo può causare degli effetti collaterali, tra cui la neurotossicità.

Tuttavia, si è visto che la "catastrofe mitotica" indotta dalle radiazioni ionizzanti (IR) e un inibitore di CHK1 (UCN-01) è stata rafforzata dalla combinazione con il monastrolo. In questo studio, l'inibitore di Eg5 è stato utilizzato ad un dosaggio relativamente basso (100 nmol/L), insufficiente a provocare da solo l'arresto mitotico. Tuttavia, la sua combinazione con IR e UCN-01 è stata sufficiente a causare la "catastrofe mitotica". Lo studio ha dimostrato che è possibile utilizzare bassi dosaggi di inibitori di Eg5 in combinazione all'abolizione del checkpoint in G2 quale efficace terapia combinata, soprattutto per cellule resistenti alle radiazioni (IR) e UCN-01 [106].

S-trifenilmetil-L-cisteina (STLC)

La S-trifenilmetil-L-cisteina (STLC) (**10**, Figura 10) è un amminoacido non naturale, economico ed enantiomericamente puro. È stato identificato nel 1970 come potente agente antitumorale nella leucemia murina *in vivo* [107, 108]. Due decenni più tardi, STLC è stato anche segnalato come agente antimitotico, nonostante non fosse stato identificato il suo target. STLC è stato anche descritto come potente agente anticancro in uno screening sulla linea cellulare tumorale NCL 60 (GI_{50} di 1.3 μ M). È stato indicato come una delle 171 molecole con un “grado particolarmente alto di interesse” nel database del *National Cancer Institute* [109]. In seguito si è scoperto che questo composto inibisce l'enzima Eg5, impedendo così la separazione dei cromosomi duplicati e la formazione del fuso bipolare; questi eventi bloccano il ciclo cellulare nella fase M con fusi mitotici monoastrali, senza interferire con le fasi S e G2. STLC inibisce sia l'attività basale che quella microtubulo-mediata dell'ATPasi di Eg5 con un IC_{50} rispettivamente di 1 μ M e 140 nM. STLC si lega ad un sito allosterico formato dall'elica α 3-strand β 5 e loop L5-elica α 2 distante approssimativamente 7 Å dal sito nucleotidico di Eg5 [110].

STLC non ha stereospecificità, gli enantiomeri S e R sono equipotenti, questo potrebbe essere spiegato dal fatto che il gruppo carbossilico si dirige all'esterno della tasca di legame.

Esaminando la SAR di STLC è stato evidenziato che la presenza del gruppo triarilmetilico è essenziale sia per l'inibizione di Eg5, sia per l'attività citotossica [111]. Inoltre, la presenza del gruppo amminico libero è

risultata essere fondamentale per l'attività inibitoria e la sua protezione tramite alchilazione o acilazione provoca la perdita dell'attività.

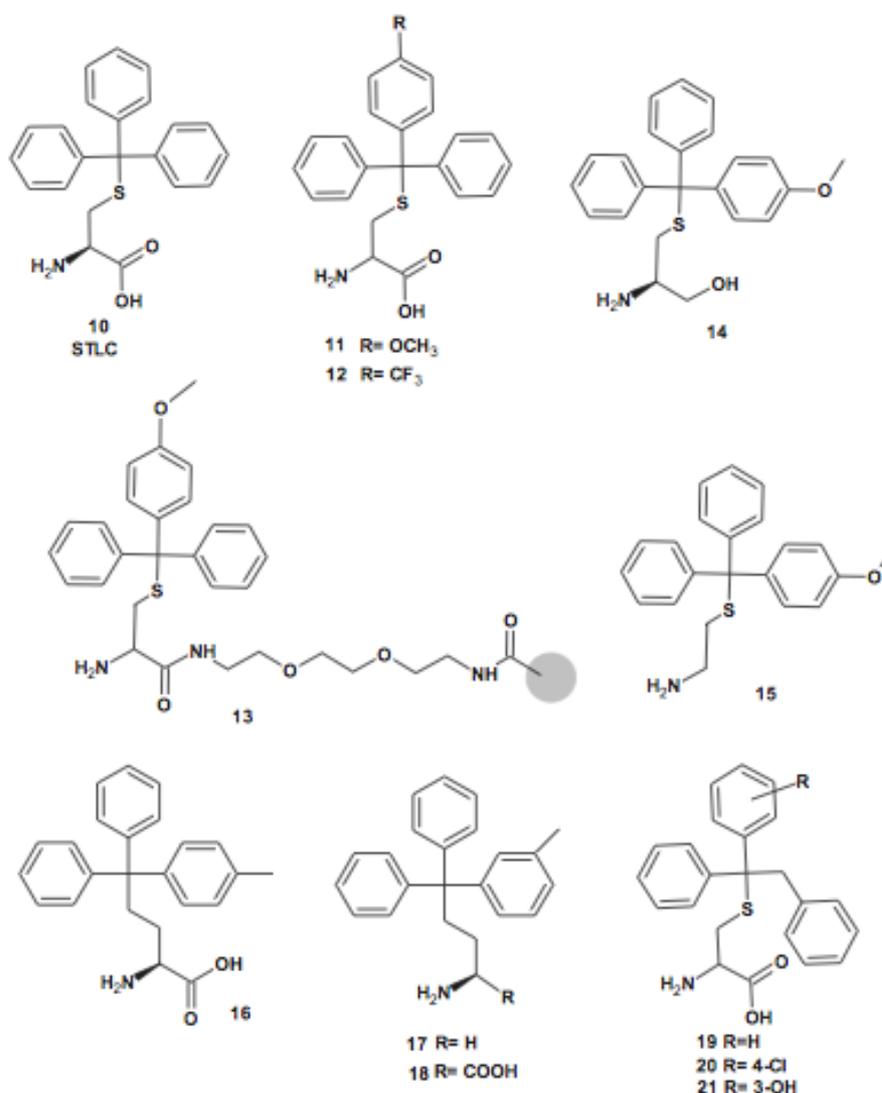


Figura 10 - Inibitori S-trifenilmetil-L-cisteinici di Eg5.

I composti in cui il gruppo carbossilico è stato convertito nei gruppi ammidico o estereo, mantengono l'attività inibitoria nei confronti di Eg5 e mostrano una migliore attività citotossica, probabilmente dovuta ad una

maggiore permeabilità cellulare. La sostituzione del fenile, soprattutto nella posizione para, con un alchile, un alcossile o un alogeno, migliora notevolmente l'attività inibitoria dell'ATPasi di Eg5 e quella citotossica [111, 112]. Nel p-metossifenil derivato **11** l'attività inibitoria dell'ATPasi ($IC_{50} = 0.15 \mu M$) e citotossica sono 10 volte maggiori rispetto al **10**. Inoltre, il p-trifluorometil derivato **12** ha dimostrato un incremento dell'attività ATPasica di Eg5 ($IC_{50} = 0,22 \mu M$) di 7 volte rispetto a **10** con una potente attività anticancro nei confronti di molte linee cellulari tumorali [113]. Per quanto riguarda il sostituente in posizione para dell'anello fenilico, si è constatato che piccoli gruppi, meno impediti stericamente, risultano più favorevoli rispetto a quelli più ingombranti. Inoltre, il gruppo sostituente più piccolo mostra un'affinità più bassa nei confronti di MDR, suggerendo che essi possano avere un potenziale maggiore per superare la suscettibilità della pompa di efflusso Pgp. Il derivato **11** si è rivelato capace di prolungare la sopravvivenza di topi nudi con tumori *xenograft* alla vescica e alla prostata [114, 115].

Nel 2010, Shimizu e colleghi hanno riportato la sintesi di **11** immobilizzata su *Sepharose perline* (**13**) per dimostrare il legame diretto dei derivati di **10** all'Eg5 delle cellule cancerose [116]. L'acido carbossilico terminale è stato identificato come gruppo essenziale per preservare l'attività inibitoria di Eg5. Il linker utilizzato è il polietilenglicole (PEG), solubile in acqua. L'introduzione di questo linker di PEG ha mantenuto l'attività inibitoria di Eg5 ($IC_{50} = 0.29 \mu M$). Il composto **13** è risultato capace di legare efficacemente Eg5 dell'estratto proteico citoplasmatico della linea cellulare

del carcinoma del colon HCT116. Questa è stata la prima evidenza dell'interazione dei derivati di **10** con Eg5 in cellula [116].

Nonostante la comprovata attività citotossica di STLC, le sue scarse proprietà fisico-chimiche hanno limitato l'uso di questo composto come agente antitumorale. Questo potrebbe essere attribuito al carattere anfifilico di STLC che provoca scarsa solubilità in acqua e quindi ridotta permeabilità e biodisponibilità.

Le modifiche dei gruppi trifenilmetilico e cisteinico di STLC hanno portato alla conformazione flessibile dei derivati cisteinico (**14**) e cisteaminico (**15**). In entrambi i composti manca la struttura zwitterionica di STLC, e quindi hanno mostrato una migliore solubilità in acqua, una maggiore attività inibitoria ($IC_{50} = 0.127 \mu M$ per **14**, e $IC_{50} = 0.136 \mu M$ per **15**) e una maggiore potenza contro le linee cellulari tumorali NCI (con un incremento medio di 35 volte).

Recentemente è stata studiata la sostituzione dell'eteroatomo (zolfo) con atomi o gruppi isosteri (N, O, CH_2) [117]. I risultati hanno mostrato solo una debole attività inibitoria per i derivati N- e O-trifenilmetilici. Mentre, gli analoghi carboniosi (4,4,4-trifenilbutan-1-ammine) **16**, **17** e **18** hanno esibito un'attività paragonabile a **10** nei confronti di Eg5. Inoltre, si sono dimostrati stabili a pH 1,0 per 5 giorni. Per di più, gli analoghi C-trifenilmetilici hanno sviluppato una potente attività antitumorale verso la linea cellulare della leucemia umana K562.

Nel 2009, Kaan e colleghi hanno evidenziato che **10** si legava mediante due interazioni principali al sito allosterico di Eg5 (Figura 11). Il gruppo

idrofobico trifenilmetilico è inserito nel sito allosterico e forma interazioni idrofobiche con le catene alchiliche laterali di Glu215, Glu116 e Arg119, mentre la frazione idrofila della cisteina è esposta al solvente e forma legami a idrogeno con Glu117, Glu116 e Arg221 [118].

Nel 2012 è stata riportata una valutazione quantitativa delle interazioni di **10** nel sito di legame per gli inibitori di Eg5 [119]. La quantificazione è stata fatta a livello molecolare utilizzando simulazioni MM/PBSA sulla struttura cristallina del complesso ligando-proteina riportato in precedenza da Kaan e colleghi. Sulla base del risultato ottenuto, si è arrivati ad una migliore comprensione delle SAR del gruppo trifenilmetilico di **10**. Si è visto che sostituendo un anello fenilico con una porzione benzilica, l'attività inibitoria aumenta (il composto **19** ha una IC₅₀ di 138 nM nei confronti dell'ATPasi di Eg₅₀). È stato ottenuto un ulteriore miglioramento mediante la sostituzione di un anello fenilico con 4-Cl o 3-OH a dare i composti **20** e **21**, con IC₅₀ dell'ATPasi di Eg5 rispettivamente di 58 nM e 67 nM. Il gruppo benzilico incorporato potrebbe occupare una tasca idrofobica nel sito di legame e questo permetterebbe un corretto orientamento e un miglior legame dell'analogo di STLC. Lo studio ha anche fornito evidenza del fatto che l'alto tasso di MDR per STLC è dovuto al gruppo carbossilico e non a quello trimetilfenilico.

Nel 2010 è stata riportata una mutazione della tasca di legame di Eg5 da parte di Tcherniuk e colleghi [120]. Questa mutazione può causare resistenza agli inibitori come STLC che agiscono legandosi ad essa. Si è scoperto che il residuo D130, localizzato nel loop L5, è il responsabile di

questa resistenza. Uno studio precedente sulla variazione dell'attività di STLC, prodotta dalla mutazione del loop L5 di Eg5, ha mostrato che la mutazione in L214A conferisce resistenza alle cellule nei confronti di questa molecola. [121]. D'altra parte, mutazioni in cinque punti del loop L5 di Eg5 (L214A, R119A, D130A, V210A, Y211A) aboliscono l'attività inibitoria di monastolo.

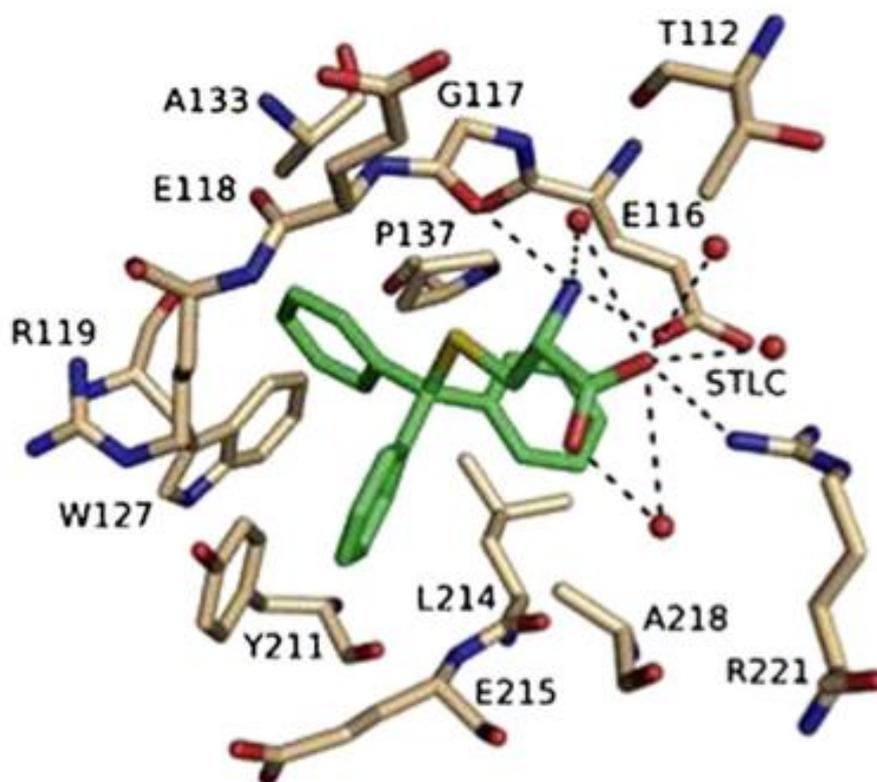


Figura 11 - Configurazione stereoisomera che mostra STLC nella tasca di legame inibitoria. Kaan e colleghi [118].

β -carboline e carbazoli

Il derivato esaidro-imidazo[1,5-b]- β -carbolin-1,3-dionico HR22C16 (**22**, Figura 12) è stato identificato tramite lo screening di una libreria composta da 16000 *small molecules*, come potente inibitore di Eg5 (IC_{50} = 800 nM) [122, 123]. HR22C16 è stato riportato come agente antimitotico che induce la morte cellulare sia nelle cellule sensibili al taxolo, sia in quelle resistenti [80].

Studi SAR degli analoghi di HR22C16 hanno indicato che alcune caratteristiche strutturali sono necessarie per avere una potente attività inibitoria. Le tetraidro- β -carboline sintetizzate contengono due centri chirali e generalmente gli isomeri *trans* sono più attivi di quelli *cis*. Inoltre, il carbonio 11 (C11) dovrebbe avere la configurazione S. In aggiunta, il gruppo 3-idrossifenilico sul carbonio 5 (C5) è essenziale per l'attività e diversi sostituenti sono tollerati sul carbonio 2 (C2) (gruppi alchilici, benzilici, fenilici e o-trifluorometossifenilico). A partire da questi dati, modifiche strutturali hanno portato all'identificazione del composto **23** (isomero *trans*) come potente e specifico inibitore di Eg5 (IC_{50} = 0.65 μ M). Questa molecola ha indotto un fenotipo monoastrale nelle cellule HeLa.

I derivati tetraidro- β -carbolinici **24** e **25** sono stati identificati da *Novartis Institutes for Biomedical Research*, attraverso l'ottimizzazione di uno screening *high-throughput* di batteri, come potenti inibitori di Eg5 (IC_{50} rispettivamente di 58 nM e 0.175 μ M) con forte attività citotossica [124]. Si è scoperto che la sostituzione del gruppo 3-idrossifenilico sul C1 (**25**) con un gruppo fenilico (**24**) migliora notevolmente le proprietà

farmacocinetiche. Inoltre, l'introduzione di un gruppo idrofobico al C5 (gruppo metilico o etilico) accresce l'attività inibitoria.

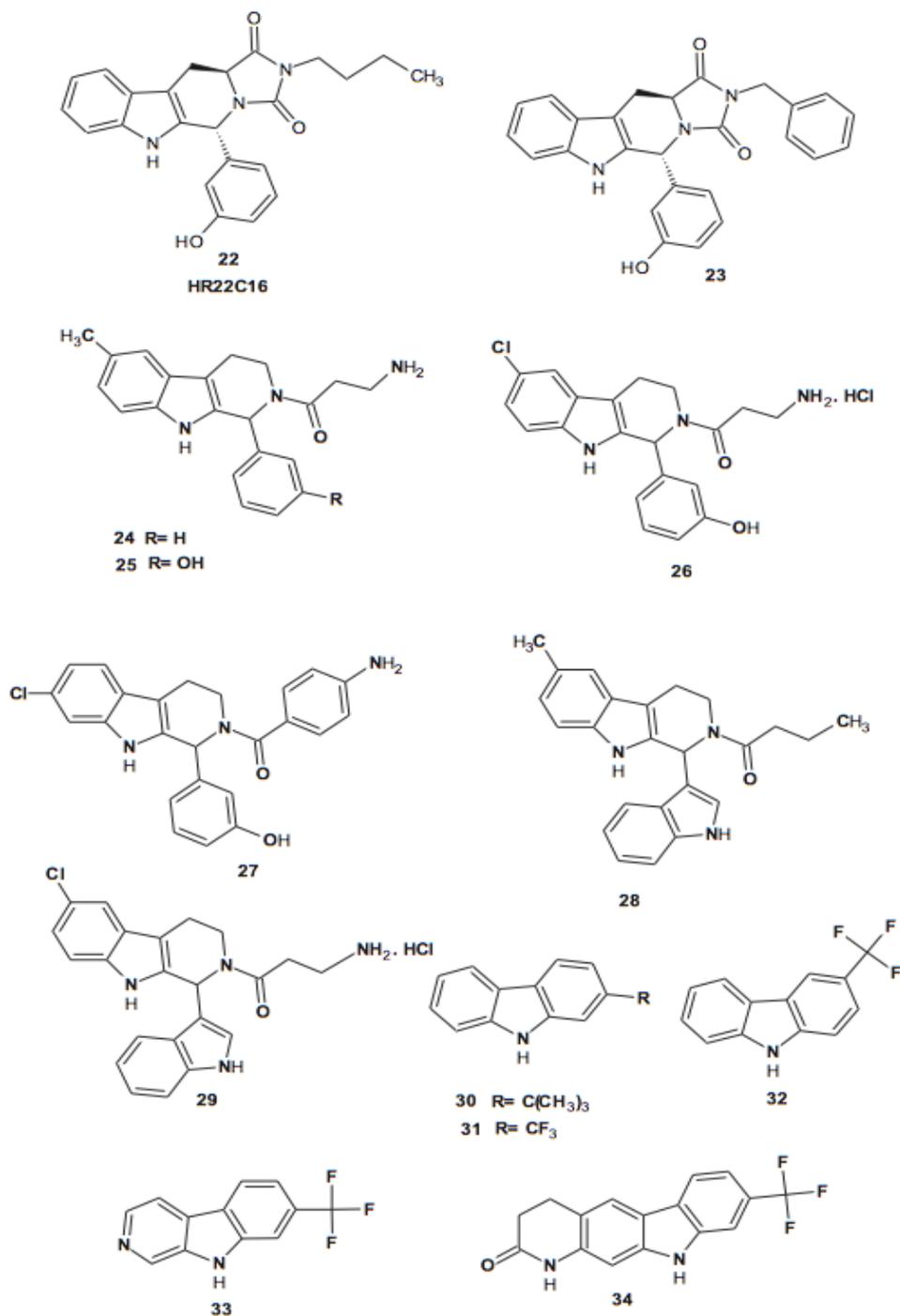


Figura 12 - Inibitori carbolinici e carbazolicci di Eg5.

La catena laterale amminica dovrebbe contenere non più di due atomi di carbonio ed il gruppo amminico libero. I composti **24** e **25** possono essere considerati come le forme ad anello aperto del gruppo idantoinico di HR22C16.

Le modifiche strutturali di HR22C16 hanno portato anche alla scoperta dei composti **26-29**, che hanno tutti una potente attività inibitoria nei confronti di Eg5 (IC_{50} = 0.04 μ M; 0.076 μ M; 0.216 μ M e 0.043 μ M, rispettivamente) ed elevata attività antiproliferativa contro la linea cellulare A549 di cancro polmonare [125]. Poiché la catena laterale alchilica e l'anello idantoinico sono diretti verso le aree esposte al solvente della tasca di legame, la rimozione dell'anello idantoinico può mantenere l'attività biologica dell'inibitore di Eg5. Infatti, la rimozione dell'anello idantoinico di HR22C16 non ha influenzato né l'attività inibitoria, né quella antiproliferativa. Inoltre, si è constatato che l'OH fenolico forma un forte legame idrogeno con Glu118. La sostituzione del gruppo 3-idrossifenilico con il gruppo 3-indolico mantiene l'attività inibitoria.

I derivati carbazolici **30-32** caratterizzati da gruppi alchilici ingombranti (gruppo t-Bu o CF_3 nelle posizioni 2 o 3) sono potenti e selettivi inibitori di Eg5 (IC_{50} = 0.03 μ M; 0.26 μ M e 0.95 μ M, rispettivamente) [126].

Nel 2011, Takeuchi e colleghi hanno esaminato l'ipotesi che i derivati carbolinici o carbazolici potessero essere considerati come composti con un ponte di azoto fra i carboni 2 e 2' di un anello bifenilico con rotazione ristretta, e che quindi potessero agire da inibitori ATP-competitivi di Eg5 come i bifenil derivati. Infatti, si è osservato che i derivati

carbolinici/carbazolici planari, come le molecole **33** e **34**, agiscono attraverso l'inibizione ATP-competitiva legandosi allo stesso sito e nello stesso modo dei derivati bifenilici. Al contrario, i derivati tetraidrocarbolinici come HR22C16 agiscono con un'inibizione ATP-non competitiva attraverso il legame ad un sito allosterico di Eg5 [127].

I risultati hanno mostrato che le conformazioni coplanari dei gruppi fenilici, e la presenza di gruppi idrofilici come quello lattamico, migliorano l'attività inibitoria. I composti **33** e **34** sono gli inibitori di Eg5 più potenti di questo studio con IC_{50} dell'ATPasi rispettivamente di 0.052 μ M e 0.031 μ M. Tutti i composti hanno mostrato una forte attività citotossica nei confronti delle cellule HeLa.

Chinazoline

Il derivato chinazolinico ispinesib (N-(3-ammino-propil)-n-[R-1-(3-benzil-7-cloro-4-osso-3,4-diidrochinazolin-2-il)-2-metil-propil]-4-metil-benzamide metansolfato, CK0238 273, SB-715992; *cytokinetics*/GSK, (**35**, Figura 13) è stato identificato da Johnson e colleghi [128]. Ispinesib ha mostrato una potente e selettiva attività inibitoria di Eg5 (all'incirca 40000 volte più selettiva nei confronti di Eg5 rispetto alle altre chinesine). È stato rilevato che ispinesib influenza la capacità di Eg5 di legarsi ai microtubuli e ne impedisce il movimento attraverso l'inibizione del rilascio di ADP [129].

La struttura cristallina di ispinesib complessato con Eg5 è stata riportata nel 2008 [130]. Il risultato di questo studio ha indicato che ispinesib si lega al sito di legame allosterico di Eg5. Rispetto al monastrol, ispinesib ha mostrato un incremento del 65% nelle interazioni idrofobiche. Inoltre, l'anello fenilico e il gruppo 8-cloro del chinazolinone formano interazioni idrofiliche con i residui Arg221 e Gly217 del sito di legame. Queste interazioni non sono state viste con monastrol e possono spiegare la maggiore potenza e specificità di ispinesib [130].

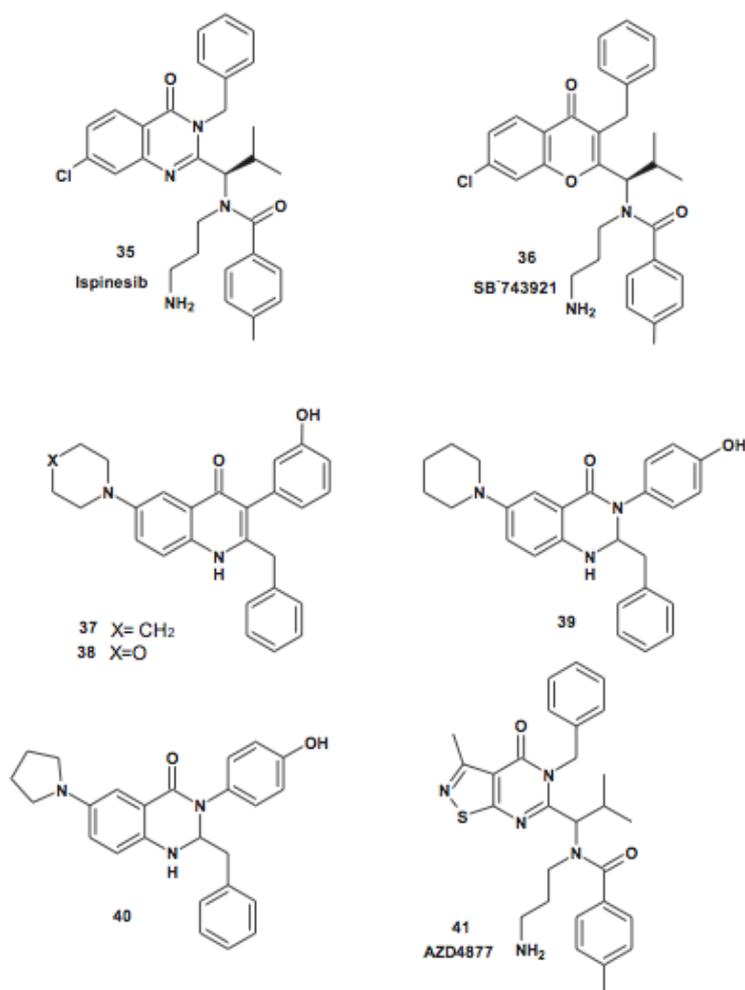


Figura 13 - Inibitori chinazolinici e tiazopirimidinici di Eg5.

Ispinesib ha mostrato una potente attività anticancro nei confronti di molte linee cellulari *in vitro* con IC_{50} = 1.2-9.5 nM, e una potente attività citotossica in modelli tumorali *xenograft*. Pertanto, questo composto è stato il primo inibitore di Eg5 che è entrato in sperimentazione clinica ed è stato testato per la sua attività citotossica in pazienti con differenti tipi di tumori.

Ispinesib ha mostrato una significativa attività antiproliferativa *in vitro* nei confronti della linea cellulare PC-3 del tumore prostatico [131]. Questa attività antitumorale, come l'induzione di apoptosi, è stata migliorata dalla combinazione di ispinesib con l'isoflavone naturale genisteina. Ispinesib ha mostrato di esercitare la sua azione antitumorale attraverso diversi processi cellulari, tra cui la stimolazione dell'espressione di inibitori della chinasi ciclina-dipendente, la diminuzione dell'espressione dei geni per il fattore di crescita dei fibroblasti (FGF) e per il fattore di crescita epidermico (EGFR). Questo studio ha indicato la possibilità di utilizzare gli inibitori di Eg5 in terapie di combinazione.

Infatti, è stata condotta una sperimentazione clinica di fase I di ispinesib combinato con docetaxel, in pazienti con tumori solidi avanzati [132]. Docetaxel è stato somministrato come infusione endovenosa di 50-75 mg/m² per 1 h, seguita da infusione per 1 h di ispinesib a 6-12 mg/m² nel giorno 1, in un programma di 21 giorni. I principali effetti tossici dose-limitanti (DLT) sono stati prolungata neutropenia e neutropenia febbrile. La dose massima tollerata (MTD) è stata di 10 mg/m² per ispinesib e 60

mg/m² per docetaxel. La stabilizzazione della malattia (4,5 mesi) è stata la migliore risposta registrata.

Lo studio clinico di fase II è stato condotto su ispinesib quale possibile trattamento per il carcinoma a cellule squamose della testa o del collo, recidivante o metastatico (RMHNSC). Il composto è stato somministrato per infusione endovenosa di 18 mg/m² per un'ora per 21 giorni. La migliore risposta osservata è stata la prolungata stabilizzazione della malattia (3.5 mesi). Gli effetti avversi più comuni riportati sono stati neutropenia di grado 3-4 e leucopenia [133].

È stato anche condotto uno studio clinico di fase II somministrando 18 mg/m² di ispinesib per infusione endovenosa a pazienti con carcinoma epatocellulare (HCC) localmente avanzato, metastatico o ricorrente (questi pazienti non avevano alcuna terapia disponibile). Lo studio ha mostrato che il farmaco è stato ben tollerato e la migliore risposta è stata la stabilizzazione della malattia (per 3.9 mesi). Gli effetti tossici più comuni osservati sono stati granulocitopenia di grado 3, leucocitopenia e diarrea [134].

Lo studio clinico di fase II di SB-715992 in pazienti con cancro cellulare renale (RCC) avanzato non ha mostrato una significativa attività antitumorale e la stabilizzazione della malattia è stata la migliore risposta ottenuta. Gli effetti tossici più comuni osservati sono stati anemia, elevata creatinina, linfopenia, stanchezza, iperglicemia e dispnea. I più comuni effetti tossici riportati in questo studio sono stati dispnea di grado 3-4,

stanchezza, neutropenia con infezioni della cute, vertigini, iperuricemia, e ipertensione [135].

Lo studio clinico di fase II di ispinesib in pazienti con uno stato avanzato di cancro alla prostata, resistente al docetaxel, non ha rivelato una risposta significativa al composto in esame. Questo potrebbe essere dovuto al basso indice mitotico dei tumori prostatici primari, dal momento che ispinesib agisce solo sulle cellule in mitosi. Ispinesib è stato somministrato a dosi di 18 mg/m^2 ogni 3 settimane. La MTD in questo studio è stata di 18 mg/m^2 e la neutropenia è stata la tossicità dose-limitante [136].

Ispinesib non ha mostrato alcun effetto nel melanoma metastatico e la stabilizzazione della malattia è stata la migliore risposta osservata (2.8 mesi). Ispinesib è stato somministrato come infusione endovenosa di 1 h alla dose di 18 mg/m^2 una volta ogni 3 settimane. La neutropenia e la linfopenia sono stati gli effetti collaterali più frequentemente osservati.

Ispinesib ha mostrato una buona attività *in vitro* e *in vivo* nei *Pediatric Preclinical Testing Program* (PPTP) [137]. Il composto ha inibito la crescita di molte linee cellulari a concentrazioni nanomolari, incluse la leucemia linfoblastica acuta e il neuroblastoma. Pertanto, nel 2010 è stata condotta una sperimentazione clinica di fase I di ispinesib in pazienti pediatrici con tumori solidi ricorrenti o refrattari [138]. Ispinesib è stato somministrato per infusione endovenosa di 1 h a dosi di 9 mg/m^2 per 3 volte la settimana, ogni 28 giorni. Il composto è stato ben tollerato, ma non è stata osservata nessuna significativa risposta clinica.

Il composto ha anche dimostrato un'ampia attività antiproliferativa nei confronti di 53 linee cellulari della mammella *in vitro* e di 5 modelli di cancro della mammella *in vivo*. Inoltre, si è visto che ispinesib migliora l'attività antitumorale di lapatinib, doxorubicin, trastuzumab e capecitabine. L'attività di ispinesib è risultata paragonabile a quella di paclitaxel e ixabepilone [139].

Nel 2012 è stato pubblicato uno studio clinico di fase I eseguito somministrando ispinesib a pazienti che non avevano ricevuto un precedente trattamento per il carcinoma mammario avanzato. Il farmaco è stato somministrato per infusione endovenosa di 1 h nei giorni 1 e 15 di un programma di 28 giorni. La MTD osservata è stata di 12 mg/m² e la DLT è stata un aumento di grado 3 di aspartato aminotransferasi e di alanina aminotransferasi. Le tossicità più comuni riportate sono state neutropenia di grado 3-4, anemia e diarrea, ma nessuna neuropatia; inoltre sono state segnalate anche mucosite e alopecia. Lo studio ha mostrato solo un basso tasso di risposta del tumore (circa il 9%) [140].

È stato condotto uno studio clinico di fase I somministrando ispinesib a dosi di 7 mg/m² come infusione endovenosa di 1 h una volta alla settimana per tre settimane consecutive, in un programma di 28 giorni per i pazienti con tumori solidi avanzati. Il composto si è dimostrato sicuro, ben tollerato e ha portato ad una stabilizzazione della malattia, ma senza risposte tumorali. La media dell'emivita nelle somministrazioni di 7 mg/m² è stata di 33 h. Gli effetti collaterali osservati con gli agenti antimitotici, come l'alopecia, la mucosite e la neuropatia, non si sono manifestati con

ispinesib. La DLT registrata in questo studio è stata la neutropenia di grado 3. Questa neutropenia è stata di breve durata e si è risolta in 3-7 giorni. I principali effetti avversi riportati sono stati nausea, vomito, stanchezza, diarrea, anoressia e costipazione.

Il cromen-4-one derivato SB-743921 (**36**) rappresenta uno degli inibitori di Eg5 di seconda generazione. Il nucleo cromen-4-onico rappresenta un isostero dell'anello chinazolinico. SB-743921 ha mostrato una potenza 5 volte superiore rispetto ad ispinesib, con una selettività 40000 volte maggiore nei confronti di Eg5 rispetto alle altre chinesine. SB-743921 ha esibito anche una forte attività citotossica *in vitro* e *in vivo* [141]. Nel 2011 è stato condotto uno studio clinico di fase I di SB-743921 in pazienti con tumori solidi refrattari e linfoma. La MTD è stata determinata con infusione endovenosa di 4 mg/m² per 1 h ogni 21 giorni. La risposta migliore è stata la stabilizzazione della malattia in 6 pazienti. La principale DLT registrata è stata la soppressione del midollo, in particolare la neutropenia [142].

Recentemente, due serie di 1,4-diidrochinolin-4-oni (**37** e **38**) e 1,2,3,4-tetraidrochinazolin-4-oni (**39** e **40**) sono stati identificati come nuovi inibitori di KSP utilizzando il programma per la scoperta di nuovi farmaci LUDI (Accelrys) [143]. Le serie di 1,4-diidrochinolin-4-oni hanno mostrato attività inibitoria nei confronti di KSP più potenti del monastrololo. I composti **37** e **38** hanno esibito attività inibitoria con IC₅₀ rispettivamente di 0.02 e 0.023 µM. Purtroppo, tutte le serie hanno mostrato una bassa citotossicità nei confronti di A549 e AGS (IC₅₀> 10 µM); ciò è stato attribuito dagli autori alle loro basse idrosolubilità [143]. Al fine di aumentare la solubilità

in acqua sono state progettate le serie di 1,2,3,4-tetraidro-chinazolin-4-oni. Tra i composti sintetizzati, le molecole **39** e **40** hanno mostrato una potente attività inibitoria di Eg5 con IC₅₀ rispettivamente di 0.011 e 0.025 µM. Inoltre, entrambi i composti hanno manifestato una potente attività antiproliferativa *in vitro* verso le linee cellulari A549 e AGS. Il composto **39** ha indotto la morte cellulare per apoptosi e ha causato l'arresto mitotico nelle cellule A549 inducendo la formazione di un fuso con morfologia monopolare, come mostrato dagli inibitori di Eg5.

Tiazolopirimidine

La (+)-N-(3-amminopropil)-N-(5-benzil-3-metil-4-osso-tiazolo[5,4-d]pirimidin-6-il)-2-metilpropil]-4-metilbenzamide (AZD4877, **41**, Figura 13) è stata descritta nel 2011 come specifico e potente inibitore di Eg5. AZD4877 ha mostrato un IC₅₀ per l'attività ATPasica di Eg5 di 0.002 µM, con buone proprietà farmacocinetiche [144]. AZD4877 può essere considerato come un isostero di ispinesib, dove l'anello fenilico della chinazolina è sostituito dall'anello tiazolico.

AZD4877 blocca le cellule in mitosi con la formazione di un fuso con fenotipo monopolare, un tipico comportamento di tutti gli inibitori di Eg5. Inoltre, ha mostrato una buona attività antitumorale *in vivo* e questo lo rende un interessante candidato a farmaco antitumorale [144].

Le caratteristiche farmacocinetiche, di efficacia e sicurezza di AZD4877 sono state valutate in studi clinici di fase I e II in tumori sia del sangue che solidi.

È stato condotto uno studio clinico di fase I per valutare il profilo di sicurezza, la farmacocinetica (PK), la MTD e l'efficacia di AZD4877 in pazienti giapponesi con tumori solidi. Anche se non ne è stata definita la MTD, il risultato ha mostrato che AZD4877 è stato ben tollerato in pazienti giapponesi se usato in dosi fino a 25 mg, ma con scarsa evidenza di efficacia clinica. La più comune DLT riportata è la neutropenia. Nessun paziente ha mostrato una risposta completa o parziale e la migliore risposta per AZD4877 è stata la stabilizzazione della malattia per circa 2 mesi. Lo studio ha anche mostrato che il profilo farmacocinetico nei pazienti giapponesi è paragonabile a quella dei pazienti occidentali [145, 146]. Inoltre, la migliore risposta clinica raggiunta in questi ultimi, somministrando AZD4877 su base settimanale, è stata la stabilizzazione della malattia per circa 3 mesi.

Nel 2012 sono stati sostenuti studi di fase I e II su AZD4877 in pazienti con leucemia mieloide acuta refrattaria, al fine di definirne la MTD e di valutarne l'efficacia sulla base del tasso di remissione completo (CR) e il profilo farmacocinetico [147]. Il risultato dello studio mostra che la MTD è stata di 16 mg/die. Le DLT riscontrate sono state: stomatite, iperbilirubinemia ed eritrodissiestesia palmo-plantare. Il profilo farmacocinetico di AZD4877 è stato accettabile con un'emivita di circa 17 h. Tuttavia, non è stata notata nessuna remissione completa o parziale e

questo ne ha indicato la mancanza di efficacia. Per questo motivo tale studio è stato interrotto.

Nel 2012 è stato sostenuto un altro studio di fase I di AZD4877 nei pazienti con tumori solidi in fase avanzata. I risultati mostrano che AZD4877 è stato ben tollerato, con un buon profilo farmacocinetico e un profilo di sicurezza accettabile. La MTD determinata è stata di 30 mg somministrati per infusione endovenosa per 1 h nei giorni 1, 8 e 15 di un ciclo di 28 giorni. La neutropenia è stata la DLT più comune segnalata e non è stata registrata nessuna neuropatia. L'emivita di AZD4877 è stata di circa 16 ore. Nessuno dei pazienti che hanno partecipato allo studio ha però manifestato una risposta completa o parziale [148].

Nel 2012 inoltre, è stato pubblicato uno studio di fase I di AZD4877 in pazienti con tumori solidi recidivi/refrattari e linfoma. La MTD è stata di 11 mg e la neutropenia di grado 4 è stata l'unica DLT notata a un dosaggio di 15 mg. Purtroppo, lo studio non ha mostrato alcun chiaro beneficio clinico e nessun paziente ha manifestato una risposta completa o parziale dopo il trattamento con AZD4877 [149].

Esaidro-2H-pirano[3,2-c]chinoline (HHPQs)

Le esaidro-2H-pirano[3,2-c]chinoline (HHPQs) sono state sviluppate da *Merck Serono* in uno screening *high-throughput* (HTS) come inibitori potenti e selettivi di Eg5. Gli analoghi sintetizzati hanno arrestato le cellule

in mitosi e hanno indotto l'apoptosi [150, 151]. Si è visto che questi inibitori si legano ad una tasca allosterica della chinesina-5, distante dai siti di legame per il nucleotide e il microtubulo. EMD534085 (**42**, Figura 14) ha mostrato attività nei confronti dell'ATPasi di Eg5 (IC_{50} = 8 nM) e ha inibito modelli tumorali umani *xenograft* ottenuti utilizzando cellule Colo-205 del carcinoma del colon-retto. Le dosi utilizzate sono state inferiori ai 30 mg/kg, somministrate 2 volte alla settimana e non hanno portato ad effetti collaterali tossici. Pertanto, EMD534085 è stato selezionato per la sperimentazione clinica. In un recente studio, questo composto ha provocato una rapida morte della linea cellulare di leucemia promielocitica umana (HL60) durante l'arresto mitotico. Questo risultato potrebbe spiegare la constatazione clinica che il trattamento con gli inibitori di Eg5 solitamente causa neutropenia o perdita di neutrofili come tossicità dose-limitante.

Tiadiazoli

Il derivato tiadiazolico K858 (**43**, Figura 14) è stato scoperto attraverso uno screening *phenotype-based forward chemical genetics* come agente antimitotico. K858 agisce inibendo l'enzima Eg5 (IC_{50} = 1.3 μ mol/L) in modo ATP-non competitivo, portando all'arresto mitotico. Questo composto ha mostrato potenti effetti antitumorali sia *in vitro* nei confronti della linea cellulare HCT116, sia *in vivo* in molti modelli di cancro

xenograft. Inoltre, K858 esercita attività antitumorale sulle cellule neoplastiche senza alcun effetto su quelle normali e quindi potrebbe avere una minore incidenza di effetti collaterali. La molecola non ha mostrato alcun effetto sull'organizzazione dei microtubuli e non ha indotto danni al DNA. Inoltre, K858 ha indotto la morte cellulare in cellule cancerose resistenti al paclitaxel. Pertanto, K858 può essere considerato un composto sicuro ed efficace per il trattamento del cancro.

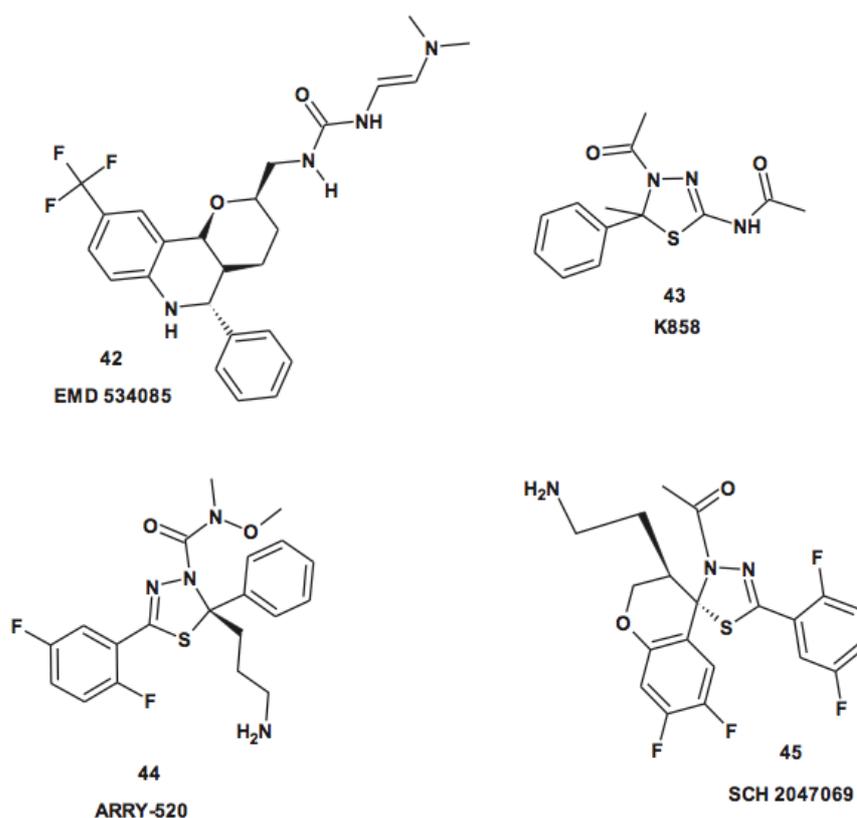


Figura 14 - Inibitori HHPQs e tiadiazolici di Eg5.

Anche il derivato tiadiazolico ARRY-520 (**44**) ha mostrato una potente attività inibitoria nei confronti di Eg5 (IC_{50} = 6 nM). L'attività cellulare di

ARRY-520 è stata caratterizzata da una prolungata inibizione della mitosi. Pertanto, linee cellulari tumorali quali leucemie e mieloma multiplo, che richiedono un blocco mitotico più breve prima di entrare in apoptosi, sarebbero più sensibili e quindi fortemente colpite da ARRY-520 [152]. Questo composto ha mostrato attività antitumorale nei confronti di diverse linee cellulari (HT-29, HCT-116, A2780, K562, e HCT15). Tuttavia, uno studio clinico di fase I su ARRY-520, somministrato come infusione endovenosa a pazienti con leucemie mieloidi avanzate o refrattarie, ha mostrato solo una risposta limitata. La molecola ha mostrato anche un'attività antiproliferativa nei confronti delle cellule del cancro ovarico epiteliale EOC paragonabile a quella del paclitaxel [153]. Gli studi preclinici hanno indicato che ARRY-520 blocca il ciclo cellulare in mitosi, portando all'apoptosi, nelle linee cellulari di leucemia acuta mieloide AML. ARRY-520 ha esercitato attività antitumorale sulle cellule che esprimono e dipendono dalla proteina antiapoptotica *myeloid cell leukemia 1* (Mcl-1) per la loro sopravvivenza. Mcl-1 è considerata una proteina antiapoptotica chiave presente in molti tumori ematologici, come ad esempio il mieloma multiplo, la leucemia, e il linfoma. Tale proteina è responsabile della resistenza di queste cellule agli agenti chemioterapici antimitotici. Pertanto, ARRY-520 potrebbe essere utilizzato nelle neoplasie ematologiche.

Il derivato tiadiazolico SCH 2047069 (**45**) è stato segnalato nel 2010 come potente inibitore di Eg5; esso può essere utilizzato in formulazione orale e ha la capacità di attraversare la barriera ematoencefalica [154]. SCH

2047069 ha mostrato una potente attività antitumorale sia *in vitro*, sia *in vivo* nei confronti di leucemia, linfoma, tumori ovarici e del colon. Inoltre, SCH 2047069 è stato segnalato per potenziare l'attività antitumorale degli agenti chemioterapici noti, come gemcitabina, vincristina e paclitaxel in modelli *xenograft* di A2780.

4,5-Diidropirazoli

I 3,5-diaril-4,5-diidropirazoli (Figura 15) sono stati scoperti attraverso un'ottimizzazione di screening *high-throughput* (HTS) avviato dalla società *Merck* nel 2005, come inibitori potenti e selettivi di Eg5. Si è visto che il composto **46**, inibendo Eg5, induce l'apoptosi e genera fusi mitotici aberranti nel range del basso concentrazioni nanomolari ($IC_{50} = 15$ nM) in cellule di carcinoma ovarico umano A2780 [155]. La cristallografia a raggi X ha dimostrato che il diidropirazolo **46** non è competitivo con l'ATP o con i microtubuli, ma si lega ad una tasca allosterica di Eg5 lontana dai siti di legame per il nucleotide e i microtubuli. Inoltre, il composto **46** non ha alcun effetto sulla polimerizzazione della tubulina *in vitro* a 20 μ M, e perciò ha un meccanismo d'azione diverso dai taxani. La cristallografia a raggi X ha anche mostrato che il gruppo acilico è esposto al solvente e questo potrebbe spiegare la maggiore diversità strutturale tollerata in questa posizione dell'anello. L'unico inconveniente riscontrato nel composto **46** è stata la sua scarsa solubilità, che ne ha impedito la

formulazione acquosa per iniezione endovenosa. Quando le cellule A2780 sono state incubate in presenza di 100 nM del composto **46** hanno mostrato il caratteristico fenotipo monoastrale, dimostrando che l'apoptosi si verifica a causa dell'inibizione di Eg5.

L'anno successivo, i *Merck Research Laboratories* hanno utilizzato i dati di modellistica molecolare e della cristallografia a raggi X per sviluppare lo scaffold 3,5-diaryl-4,5-diidropirazolonico introducendo la catena laterale alchilamminica sul carbonio 5 (C5) dell'anello pirazolico (**47**) [156].

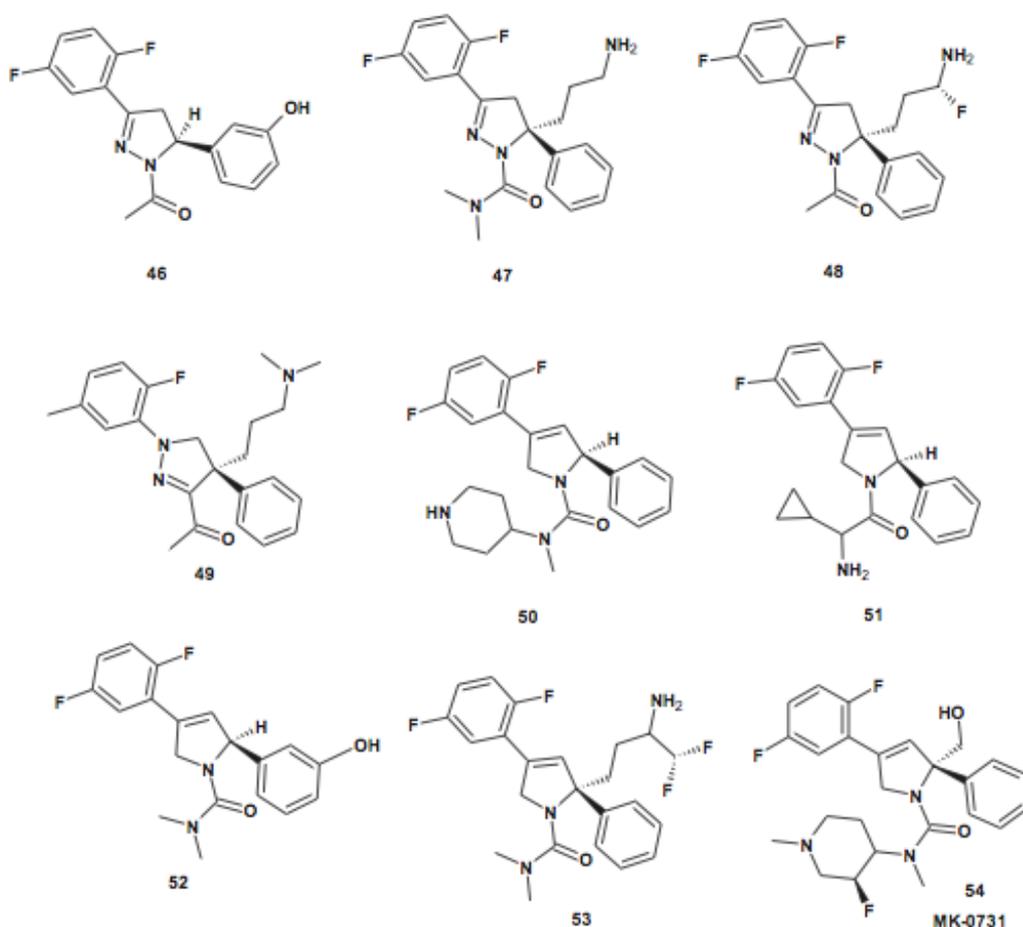


Figura 15 - Inibitori pirazolici e pirrolici di Eg5.

Questo sostituente in posizione 5 è stato inserito per riempire una regione del sito di legame di Eg5 non occupata prima dai 3,5-diaril-4,5-diidropirazoli e quindi per formare una ulteriore interazione di legame a idrogeno con l'enzima. Questa piccola modifica nella struttura è stata effettuata per aumentare la potenza, per migliorare notevolmente la solubilità in acqua a pH 4 (circa 400 volte maggiore) e anche per migliorare il profilo farmacocinetico. Questo ha portato ad un composto di seconda generazione con potenza, proprietà farmacocinetiche e solubilità in acqua migliorate rispetto ai composti di prima generazione. È interessante notare che l'introduzione di un residuo amminico nel composto **47** non comporta un significativo aumento dell'affinità di legame per il canale del potassio hERG (*Ether-a-go-go Related Gene* umano).

Modulando la basicità dell'ammina, i ricercatori dei *Merck Research Laboratories* sono stati in grado di sintetizzare potenti inibitori di Eg5, i quali hanno mostrato una forte attività citotossica verso le linee cellulari resistenti ai farmaci e allo stesso tempo hanno mantenuto una buona solubilità in acqua [157]. Il composto **48** è il più potente inibitore di Eg5 scoperto in questo studio con IC₅₀ per l'ATPasi di 0.82 nM e una buona solubilità in acqua (>4 mg/mL a pH 4). Il composto **48** mostra una bassa sensibilità intrinseca per l'efflusso Pgp con una MDR *ratio* di 5.2 [157].

Nel 2007, una serie di derivati 1,4-diaril-4,5-diidropirazolici è stata sviluppata da *Merck Research Laboratories* alla ricerca di nuovi inibitori di Eg5. Il composto **49** è stato sintetizzato in forma enantiopura (configurazione R) e ha mostrato una buona solubilità in acqua a pH

moderato. Il composto **49** inibisce l'ATPasi di Eg5 con $IC_{50} = 0,2$ nM. Inoltre, questo composto ha esibito una buona potenza nelle cellule con sovraespressione di Pgp e ha mostrato la capacità di provocare un arresto mitotico completo in un modello tumorale *xenograft* murino.

Si pensa che il composto **49** si leghi al sito di legame allosterico dell'enzima Eg5. I due anelli arilici formano interazioni idrofobiche con l'enzima, il gruppo metilchetonico è esposto al solvente e il gruppo alchilamminico occupa una superficie libera nel sito di legame al di sopra del piano dell'anello pirazolinico. La MDR *ratio* del composto **49** è di 1.6. Il composto **49** ha mostrato un incremento dell'affinità per il legame con hERG, cosa che ne aumenta la cardiotossicità; fortunatamente, la maggiore potenza nei confronti di Eg5 ha comportato un ampliamento della finestra off-target ($hERG IC_{50} / Eg5 IC_{50}$).

2,4-Diaril-2,5-diidropirroli

L'anello 2,4-diaril-2,5-diidropirrolico è stato sviluppato dalla società *Merck* come isostero del 3,5-diaril-4,5-diidropirazolo (Figura 15) [158]. L'ottimizzazione del nucleo pirrolico è stata effettuata tramite l'introduzione di gruppi basici amidici o ureici. Ciò ha portato ad un significativo aumento dell'attività inibitoria di Eg5, nonché della solubilità in acqua.

Tra i derivati dell'urea, il 4-piperidinil derivato **50** ha mostrato una forte attività inibitoria nei confronti di Eg5 ($IC_{50} = 2.6$ nM), una forte attività

citotossica verso le cellule di carcinoma ovarico umano A2780 (EC_{50} = 6.8 nM) e una solubilità in acqua ottimale (>10 mg/ml a pH 5).

Anche le serie ammidiche hanno fornito una varietà di potenti inibitori di Eg5. Ad esempio, il composto **51** ha esibito una elevata potenza nei confronti di Eg5 (IC_{50} = 2.0 nM), con una forte attività citotossica verso le cellule del carcinoma ovarico umano A2780 (EC_{50} = 8.6 nM) e con una buona solubilità in acqua che ne ha permesso la somministrazione endovenosa. Nelle α -ammino ammidi, la configurazione (S) dell' α -stereocentro conferisce una potenza maggiore rispetto alla configurazione (R).

Nonostante il miglioramento della potenza nei confronti di Eg5 e della solubilità in acqua, l'introduzione di una ammido o di una urea nel nucleo diidropirrolico ha potenziato anche il legame con il canale del potassio (Ikr) hERG (causando un allungamento dell'intervallo QT che si traduce in un aumentato rischio di aritmie).

Nel tentativo di ridurre questo grave effetto collaterale, si è riscontrato che l'introduzione di un gruppo fenolico in C2, assieme a catene laterali neutre in N1 (soppressione o acilazione del gruppo amminico), riduce il legame con hERG e minimizza l'effetto collaterale di questi derivati sul cuore, e allo stesso tempo mantiene la potenza inibitoria di Eg5, ma diminuisce la solubilità in acqua. Pertanto, è stata adottata come strategia per ripristinare la solubilità in acqua l'utilizzo di un profarmaco fosfato. Il composto **52** rappresenta un inibitore di Eg5 potente e idrosolubile (IC_{50} =

7.0 nM), che potrebbe essere utilizzato per la somministrazione endovenosa.

L'introduzione della catena laterale C2-amminopropilica sul nucleo 2,4-diaril-2,5-diidropirrolico ha migliorato l'attività inibitoria di Eg5 e la solubilità in acqua. Tuttavia, il gruppo amminopropilico ha aumentato la suscettibilità per l'efflusso cellulare da parte della glicoproteina-P (Pgp). La presenza dell'atomo β -fluoro sul gruppo amminopropilico ha ridotto la sua basicità e ne ha migliorato l'efficacia in una linea cellulare con sovraespressione di Pgp, mantenendo l'attività inibitoria di Eg5. Ad esempio, l'ammina primaria α -difluorometil sostituita **53** ha IC₅₀ dell'ATPasi di Eg5 di 5,2 nM, solubilità in acqua a pH 4 >10 mg/mL, hERG= 15.9 μ M e MDR *ratio*= 5.

Il derivato pirrolico MK-0731 (**54**) è stato riportato da Cox e colleghi nel 2008 come inibitore potente e selettivo di Eg5 (IC₅₀= 2.2 nM) [159]. Questa molecola ha mostrato una potente attività antiproliferativa in studi su topi *xenograft* paragonabile a quella del paclitaxel. Inoltre, ha inibito la crescita di linee cellulari tumorali che sono resistenti al paclitaxel. Studi clinici di fase I hanno rilevato che la somministrazione di MK-0731 per infusione endovenosa per 24 ore, in pazienti con tumori solidi, ha comportato la stabilizzazione della malattia per più di 5 mesi [160]. MK-0731 è risultato essere ben tollerato quando somministrato ad una dose di 17 mg/m² e la neutropenia è stata la principale tossicità dose-limitante registrata.

Diidropirazolobenzossazine

Le diidropirazolobenzossazine (Figura 16) sono state sviluppate come isosteri dei derivati diidropirazolici e diidropirrollici. In questo modo è stato scoperto il composto **55**, che ha esibito una forte attività inibitoria di Eg5 (IC_{50} dell'ATPasi= 1.6 nM), una forte potenza verso una linea cellulare con sovraespressione di Pgp, e una buona solubilità in acqua. Inoltre, il composto **55** ha mostrato una bassa interazione con il canale hERG [161].

Isochinoline

Il derivato tetraidroisochinolinico **56** (Figura 16), è stato identificato in uno screening *high-throughput* come modesto inibitore di Eg5.

Il composto **56** ha mostrato un'attività micromolare sia nel saggio con l'ATPasi di Eg5 (IC_{50} = 9.7 μ M), sia nel saggio di antiproliferazione nelle cellule di carcinoma ovarico A2780 (IC_{50} = 2.4 μ M). L'ottimizzazione *modeling-guided* del ponte tetraidroisochinolinico ha portato all'identificazione della R-4-(3-idrossifenil)-N,N-7,8-tetrametil-3,4-diidroisochinolin-2(1H)-carbossamide (**57**), un potente inibitore di Eg5 umano (IC_{50} = 0.104 μ M) con buone proprietà antiproliferative in cellule A2780 (IC_{50} = 0.234 μ M) [162]. Si è visto che questi derivati si legano nel sito allosterico della proteina Eg5. Il composto **57** ha mostrato una potente attività antiproliferativa nei confronti di molte linee cellulari tumorali (polmone, colon-retto, mammella, ovaio e prostata).

Utilizzando i dati sul farmacoforo di Eg5 precedentemente riportati, i derivati 1-(3'-idrossifenil)-tetraidroisochinolinici **58-60** sono stati sviluppati come potenti inibitori di Eg5 (oltre 100 volte più potenti di monastrol) (IC_{50} dell'ATPasi= 0.02 μ M; 0.04 μ M; 0.06 μ M, rispettivamente). Questi composti hanno mostrato una potente attività citotossica nei confronti delle cellule HepG2. Questi risultati hanno suggerito che la sostituzione del gruppo 3'-idrossifenilico nella posizione 1 dell'anello tetraidroisochinolinico migliora l'attività inibitoria di Eg5. Inoltre, la presenza del gruppo idrofilo (amminopropionilico in **58**) o del gruppo arilico (4'-idrossibenzoilico e 4'-metilbenzoilico, rispettivamente in **59** e **60**) in N-2 ha aumentato l'attività inibitoria.

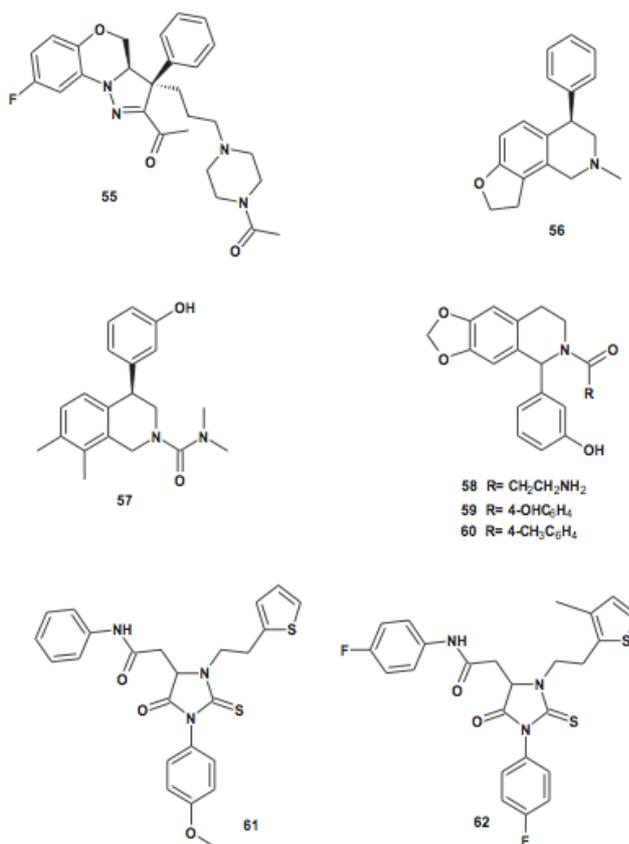


Figura 16 - Inibitori pirazolobenzossazinici, isochinolinici e imidazolici di Eg5.

Imidazoli

I derivati tiossoidimidazolidinici **61** e **62** (Figura 16) sono stati identificati attraverso uno screening virtuale basato sull'interazione receptore-ligando come potenti inibitori di Eg5 (IC_{50} = 0.58 μ M e 1.0 μ M, rispettivamente). Entrambi i composti mostrano una forte attività antitumorale soprattutto nei confronti delle linee cellulari tumorali di prostata e colon [163].

Bifenili

I derivati bifenilici (Figura 17) sono stati i primi inibitori di Eg5 ATP-competitivi segnalati [164, 165]. Il bifenil metilsolfonamide **63** è stato scoperto da *GlaxoSmithKline* come potente inibitore di Eg5 (Eg5 K_i = 120 nM), è risultato un inibitore competitivo di ATP e quindi potrebbe superare la resistenza agli inibitori del loop L5, come il monastrololo. Il composto **63** ha manifestato una modesta attività antiproliferativa *in vitro* nei confronti delle cellule tumorali ovariche umane (SKOV3) con IC_{50} = 6 μ M.

Si è constatato che l'introduzione di uno spaziatore (da uno fino a tre atomi) tra i due anelli fenilici abolisce l'attività; la conformazione lineare è quindi essenziale per l'efficacia. La sostituzione del gruppo metilsolfonammidico con un gruppo ureico **64** o tioureico **65** aumenta sia l'attività inibitoria di Eg5, che l'attività antitumorale rispettivamente di circa 4 e 8 volte, (IC_{50} = 39 nM e 11 nM, rispettivamente).

L'ulteriore ottimizzazione del nucleo bifenilico ha portato all'identificazione delle solfonammidi **66** e **67** con IC₅₀ dell'ATPasi di Eg5 rispettivamente di 18 e 5 nM. Entrambi i composti mostrano attività antiproliferativa *in vitro* nei confronti di KSP *wild-type* (HCT116) e KSP mutante (HCT116 D130V). Inoltre, la molecola **66** mostra una significativa attività antitumorale *in vivo* verso i tumori HCT116 D130V e questo ha provato l'efficacia degli inibitori ATP-competitivi nei confronti dei tumori resistenti ad altri inibitori di Eg5.

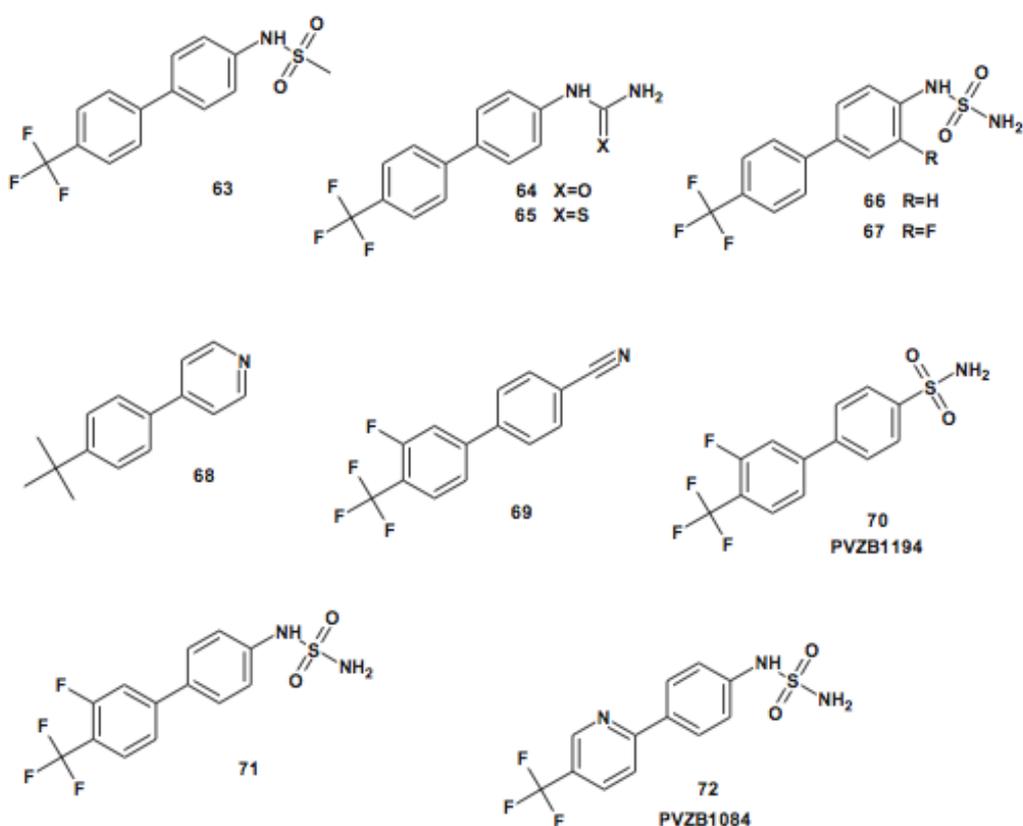


Figura 17 - Inibitori bifenilici di Eg5.

Sono stati esaminati come inibitori di Eg5 anche gli analoghi bis(etero)arilici. Il derivato 4-(4-terz-butilfenil)piridinico **68** è stato identificato come potente inibitore di Eg5 con $IC_{50} = 1.00 \mu M$ e come composto citotossico della linea cellulare HeLa con $IC_{50} = 88 \mu M$.

La modifica della struttura del composto **68** ha portato all'identificazione della molecola **69** [3'-fluoro-4'-(trifluorometil)bifenil-4-carbonitrile] con attività inibitoria di Eg5 a $1.4 \mu M$.

Inoltre, l'introduzione del gruppo 4-SO₂NH₂ ha portato alla sintesi di PVZB1194 (**70**) con maggiore attività inibitoria dell'ATPasi di KSP ($IC_{50} = 0,12$) e citotossicità ($IC_{50} = 5.5 \mu M$). Il derivato solfonamidico **71** presenta una forte attività inibitoria di Eg5 con $IC_{50} = 0.02 \mu M$. Purtroppo, il composto **71** mostra una diminuzione di più di 30 volte della citotossicità, e questo può essere attribuito alla sua elevata lipofilia. La sostituzione di uno degli anelli fenilici con un anello piridinico ha portato alla scoperta del composto **72** (PVZB1084) con una inibizione dell'ATPasi di Eg5 a concentrazioni di $0.70 \mu M$ e una citotossicità a $1.89 \mu M$.

Benzimidazoli

I 2-amminobenzimidazoli **73-76** (Figura 18) sono stati sviluppati da Lahue e colleghi nel 2009 come inibitori potenti e selettivi di Eg5 ($IC_{50} = 7.4 \mu M$; $1.3 \mu M$; $0.52 \mu M$; $4.8 \mu M$, rispettivamente) [166]. Lo studio delle SAR dei derivati benzimidazolici ha dimostrato che la presenza della porzione 1-

benzilica è essenziale per l'attività inibitoria e la sostituzione del metilene benzilico la riduce [167]. Inoltre, la presenza di un sostituito in orto sull'anello benzilico, in particolare del gruppo trifluorometilico, migliora l'attività inibitoria di Eg5.

Anche se i composti **74** e **76** inibiscono l'attività ATPasica in modo non competitivo, si è visto che si legano ad un nuovo e distinto sito di legame, diverso da quello utilizzato da tutti gli inibitori noti (inibitori del loop L5).

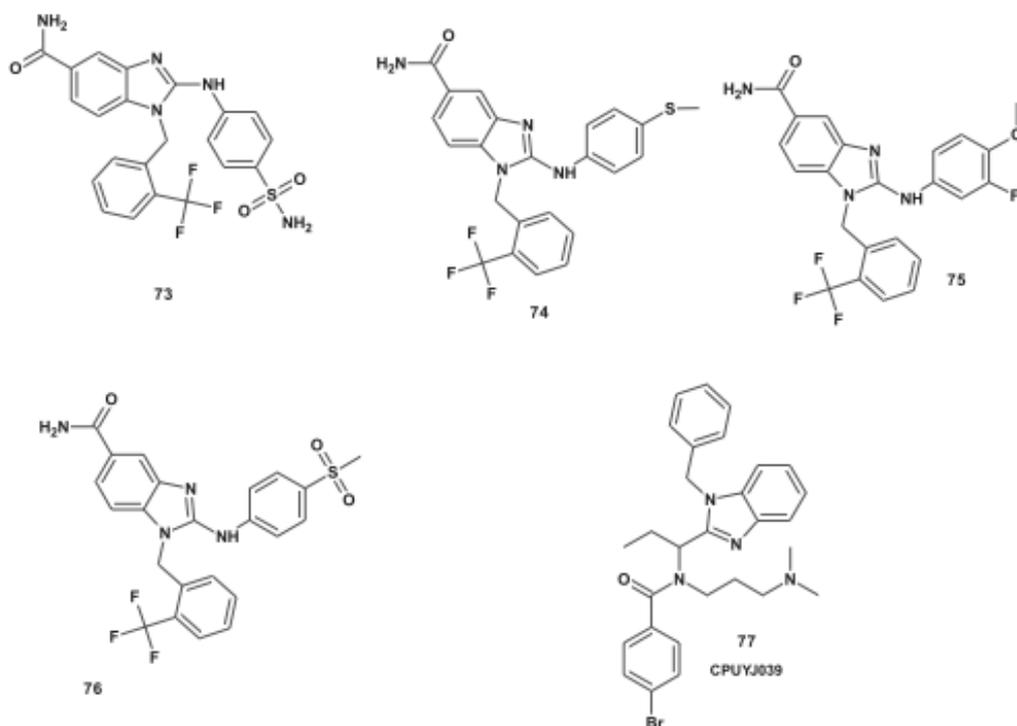


Figura 18 - Inibitori benzimidazolici di Eg5.

Il derivato benzimidazolico CUPYJ039 (**77**) è stato identificato nel 2011 come nuovo e potente inibitore di Eg5 ($IC_{50} = 0.04 \mu M$) [168]. CUPYJ039 arresta il ciclo cellulare in fase G2/M e induce l'apoptosi con il

caratteristico fenotipo monoastrale del fuso nella linea cellulare HCT116. Tuttavia, la sua attività antiproliferativa è significativamente bassa; e ciò può essere attribuito alla sua bassa permeabilità cellulare.

Inibitori naturali di Eg5

Sebbene la maggior parte degli inibitori di Eg5 siano di origine sintetica, sono stati descritti alcuni composti naturali dotati di una potente attività inibitoria di Eg5 (Figura 19).

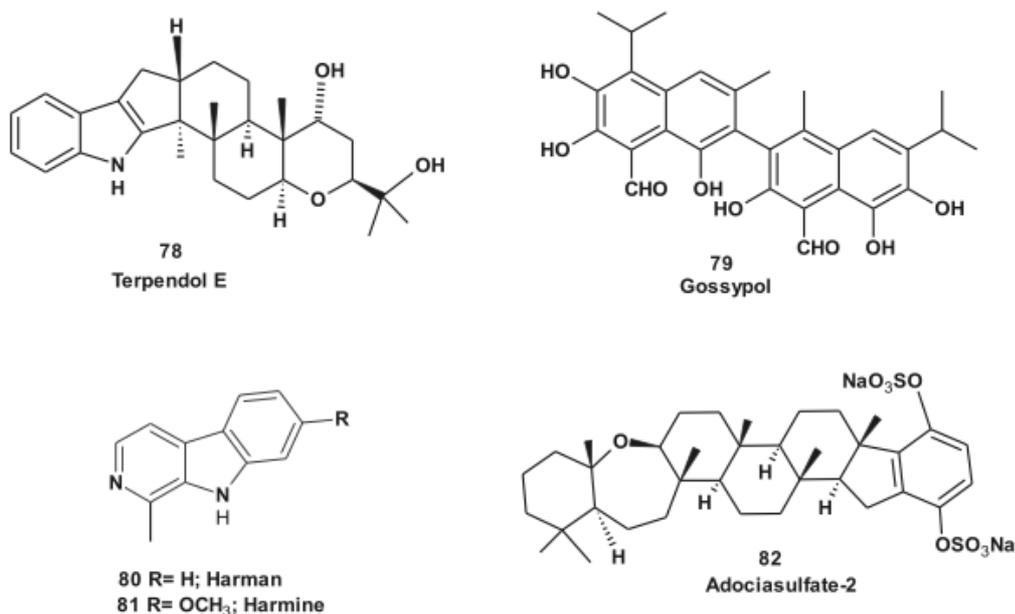


Figura 19 - Inibitori di origine naturale di Eg5.

Il terpendolo E (Ter E, **78**), un indoloditerpene fungino, è stato il primo inibitore di Eg5 di origine naturale ad essere stato identificato. Originariamente, il terpendolo E è stato estratto dal brodo di cultura di un

terreno fungino isolato di *Albophoma yamanashiensis*, come un inibitore di acil-CoA: colesterolo-aciltransferasi (ACAT). Nel 2003 è stata riportata la sua inibizione specifica nei confronti di Eg5. Si è visto che il terpendolo E inibisce la segregazione dei cromosomi, portando alla formazione di fusi monopolari in fase M, caratteristica tipica degli inibitori di Eg5. Il Ter E è stato descritto come inibitore dell'attività ATPasica motrice e microtubulo-stimolata di Eg5 umano ($IC_{50}= 23 \mu M$). Recentemente, Churruca e colleghi hanno suggerito che la corretta configurazione del C16 di Ter E sia essenziale per l'attività inibitoria, dal momento che la sua epimerizzazione o la conversione in derivati carbonilici la abolisce [169].

Il gossipolo (AT-101, **79**) è un altro inibitore naturale di Eg5. Si tratta di una piccola molecola isolata dai semi di cotone. In preclinica mostra una potente attività antitumorale, soprattutto nei confronti delle cellule cancerose di prostata e mammella. Il gossipolo ha una buona attività clinica sia come terapia singola che combinata in studi di fase I/II per il trattamento del cancro di prostata e polmone. Il gossipolo mostra una chiralità assiale ed esiste sotto forma di due enantiomeri con il (-)-gossipolo che è più potente del racemo nei confronti del cancro della mammella. Il gossipolo inibisce molti enzimi cellulari, come topoisomerasi II e calcineurina. Inoltre, AT-101 antagonizza molte proteine anti-apoptotiche Bcl-2 [170]. Nel 2004 è stata descritta per la prima volta l'attività inibitoria di Eg5 del gossipolo ($IC_{50}= 10.8 \mu mol/L$) [171].

Harman **80** e harmine **81** sono alcaloidi β -carbolinici presenti in natura. Entrambi i composti mostrano una moderata attività inibitoria di Eg5 ($IC_{50}=$

32 μM e IC_{50} = 38 μM , rispettivamente). Harman e harmine sono stati originariamente identificati come agenti citotossici e neurotossici che agiscono inibendo le topoisomerasi I/II o legandosi al DNA [172, 173]. L'inibizione di Eg5 può essere considerata come un meccanismo d'azione secondario della loro attività citotossica.

L'adociasulfato-2 (AS-2, **82**) è un prodotto naturale marino. È stato isolato dalla spugna marina, specie *Haliclona* (nota anche come *Adocia*). AS-2 mostra una attività inibitoria non specifica delle chinesine. Per questo motivo è stato descritto come inibitore di alcuni membri della superfamiglia delle chinesine quali KHC, RabK6, KIFC1, KIFC3, MPP1, MKLP1, CENP-E, e Eg5. Adociasulfato-2 (AS-2) è capace di inibire l'attività basale e microtubulo-mediata dell'ATPasi di Eg5 (IC_{50} di 3.5 e 5.3 μM , rispettivamente). Reddie e colleghi hanno suggerito che AS-2 non fosse un classico inibitore 1:1. Tuttavia, AS-2 forma un aggregato a forma di bastoncino che assomiglia al microtubulo (i gruppi solfato sono esposti al solvente acquoso, imitando la superficie carica negativamente dei microtubuli) e quindi si complessa con la chinesina impedendo ai microtubuli di legarsi ad essa. AS-2 è considerata una molecola unica, in quanto è il solo inibitore noto delle chinesine ad interferire con il legame dei microtubuli e ad agire attraverso una inibizione MT-competitiva. Questo composto è stato utilizzato per determinare le regioni di legame delle chinesine CENP-E e Eg5 nel microtubulo. Purtroppo, AS-2 non ha nessun effetto sulla linea cellulare HeLa; ciò può essere attribuito al suo

elevato peso molecolare (PM= 738) e ai suoi gruppi solfato carichi che ostacolano la permeabilità nella membrana cellulare.

8 - Studi computazionali

8.1 - Modello farmacoforico

Nel 2007, Liu e colleghi hanno riportato lo sviluppo e la validazione di un modello farmacoforico tridimensionale degli inibitori di Eg5, basato su 25 inibitori noti, elaborato utilizzando il software *Catalyst*. Il modello proposto è costituito da quattro siti fondamentali di interazione (un sito accettore di legame idrogeno HBA, un sito donatore di legame idrogeno HBD, un anello aromatico Ar e un gruppo idrofobico Hp) (Figura 20) [162].

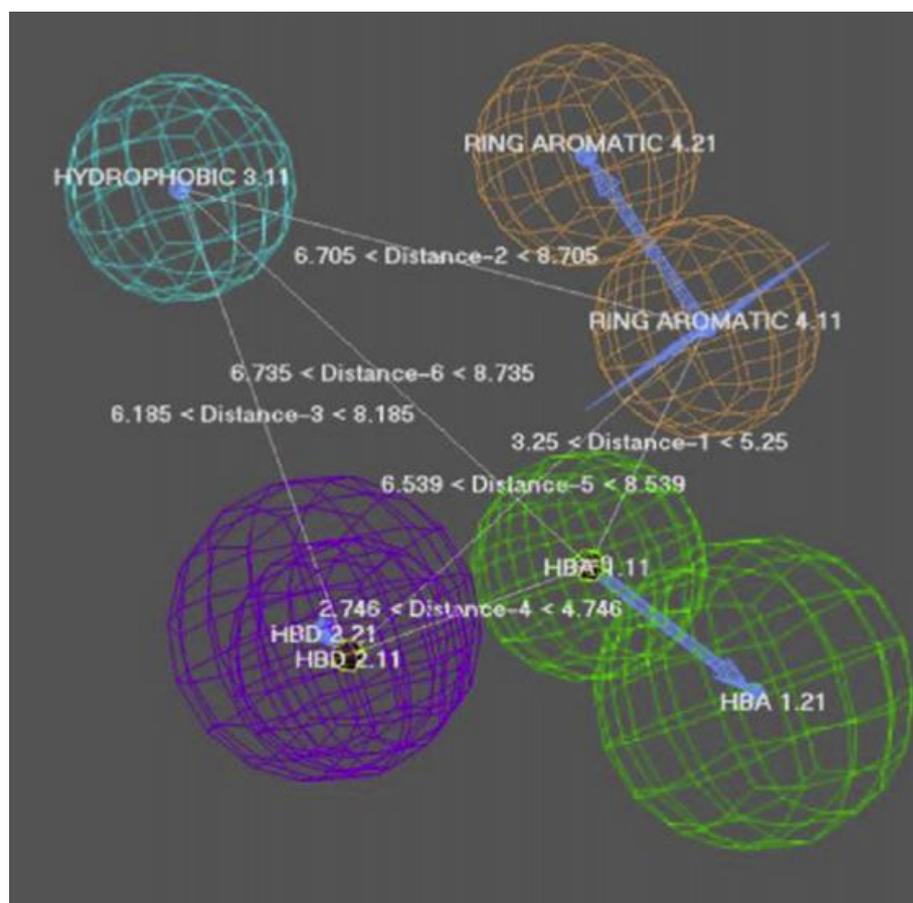


Figura 20 - Top-scoring Hypogen pharmacophore Hypo1. Le caratteristiche sono codificate in base al colore, come segue: anello aromatico, arancio; accettore di legame idrogeno, verde; gruppo idrofobico, blu; donatore di legame idrogeno, viola. Liu e colleghi [162].

8.2 - Studi di docking

Nel 2007, Jiang e colleghi hanno pubblicato il primo studio di docking degli inibitori di Eg5 nel sito di legame allosterico dell'enzima [174]. È stata determinata la modalità di legame di 15 inibitori di Eg5 (compresi monastrololo, STLC, Ter E e ispinesib). Tutti i composti testati hanno mostrato interazioni idrofobiche o di legame idrogeno con una tasca formata da Glu116, Gly117, Glu118, Trp127, Ala133, Ile136, Pro137, Tyr211, Leu214 e Glu215. Si sono rivelate essenziali per l'attività inibitoria anche le interazioni idrofobiche con Trp127, Ala133, Tyr211 e le interazioni di legame idrogeno con Glu116, Glu118 e Tyr211. Inoltre, lo studio ha dimostrato che accanto alla tasca di legame principale, dove si legano tutti gli inibitori, c'è una tasca accessoria più piccola delimitata da Ala218 e Arg221. L'interazione delle molecole con quest'ultima tasca migliora l'affinità di legame; per esempio, (R)-mon-97, che si lega a questa tasca ha mostrato un aumento di dieci volte dell'attività inibitoria di Eg5 rispetto a (S)-monastrololo che non si lega (Figura 21) [175]. Lo studio ha anche rivelato la presenza di una relazione lineare tra l'energia libera di legame calcolata e l'attività inibitoria di Eg5.

Due anni più tardi, Oguievetskaia e i suoi collaboratori hanno riportato uno studio di design molecolare *fragment-based*, allo scopo di investigare questa tasca di legame accessoria. Il risultato dello studio ha permesso di identificare nuove molecole capaci di legarsi sia a questa tasca idrofobica, sia alla principale tasca di legame allosterica e che quindi potrebbero presentare una promettente attività inibitoria di Eg5. I composti proposti

hanno delle caratteristiche generali comuni, infatti contengono tutti un anello aromatico per legare la tasca L5/ α 2. Inoltre, come la maggior parte degli inibitori di Eg5, formano interazioni con Glu116, Glu118 e Arg119. Infine, la maggior parte di essi formano interazioni idrofobiche con Leu160, e Ile136 [175].

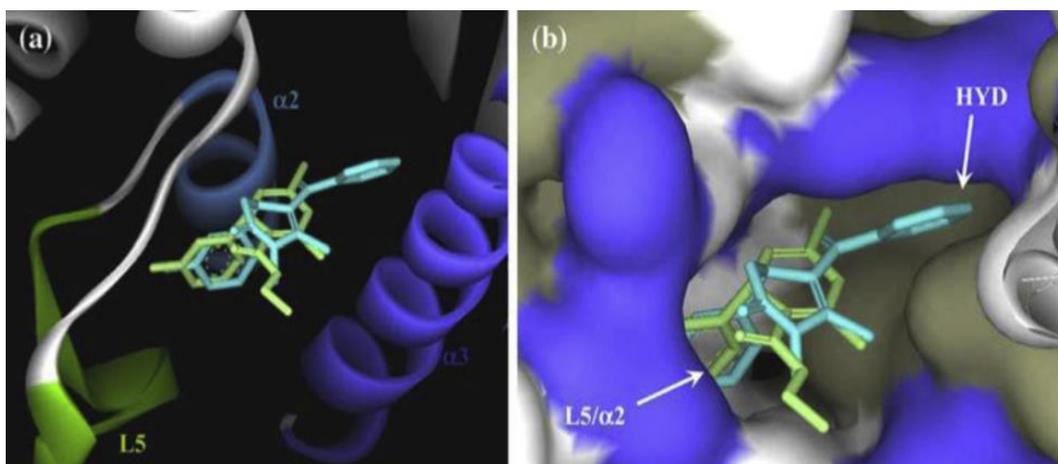


Figura 21 - (a) Vista della superficie del sito di legame di Eg5, a partire dalla struttura 1x88 PDB che mostra il monastrol co-cristallizzato (verde) e il mon-97 (azzurro chiaro) dalla struttura 2IEH PDB, ricavato dalla sovrapposizione delle due strutture proteiche con MED-SuMo. Entrambi i ligandi occupano la tasca formata dal loop 5 (L5) e dall'elica α 2 (α 2). Il mon-97 occupa anche la tasca idrofobica HYD mostrata in (b) (grigio: idrofobico, blu: idrofilo) [175].

8.3 - Studi tridimensionali della relazione quantitativa struttura-attività (3D-QSAR)

Nel 2012, Luo e colleghi hanno riportato uno studio 3D-QSAR degli inibitori di Eg5 diidropirazolici e diidropirrollici, utilizzando metodi di analisi comparativa del campo molecolare (CoMFA, *Comparative Molecular Field Analysis*) e di analisi comparativa degli indici di similarità molecolare (CoMSIA, *Comparative Molecular Similarity Indices Analysis*). I risultati

dello studio hanno indicato che il legame idrofobico è una caratteristica importante per la potenza e la selettività degli inibitori [176].

9 - Conclusioni

Riassumendo, sono stati scoperti molti inibitori di Eg5, i quali agiscono inibendo in modo competitivo il legame con l'ATP, oppure legandosi in uno specifico sito allosterico di Eg5. Questi inibitori bloccano le funzioni cellulari, arrestano la mitosi e inducono la morte cellulare nei tessuti proliferanti. La loro specificità nell'inibire l'enzima con un effetto quasi nullo sulla tubulina, insieme al loro effetto sui tumori resistenti al taxolo, fanno degli inibitori di Eg5 dei composti promettenti per la terapia del cancro. Inoltre, questi composti non presentano i tipici effetti collaterali neuropatici diffusi negli agenti antimitotici come il taxolo e gli alcaloidi della vinca. Molti inibitori di Eg5 sono attualmente in fase di sperimentazione clinica I e II, come ispinesib e SB-743921 della *Cytokinetics*, AZD4877 di *AstraZeneca*, ARRY-520 di *Array Pharmaceuticals*, MK-0731 e EMD534085 della *Merck*. I risultati degli esami di fase I hanno dimostrato che quasi tutti gli inibitori di Eg5 testati sono ben tollerati e mostrano dei profili farmacocinetici accettabili. La principale tossicità dose-limitante (DLT) riportata è stata la neutropenia, ma sono stati anche segnalati altri effetti quali nausea, stanchezza, anemia, leucopenia, trombocitopenia e diarrea. Come previsto, non è stata segnalata neurotossicità con nessuno

dei composti testati. Anche se per quasi tutti gli inibitori di Eg5 esaminati per un'eventuale monoterapia è stata segnalata una limitata risposta clinica, molti di questi derivati sono in grado di potenziare l'attività di agenti antitumorali noti e hanno mostrato attività antineoplastica in linee cellulari mutanti. Pertanto, l'uso degli inibitori di Eg5 in una chemioterapia di combinazione sembra essere più promettente rispetto al loro utilizzo come monoterapia. Inoltre, questi composti potrebbero essere utilizzati per il trattamento di altre malattie proliferative, quali le fibrosi polmonare ed epatica e la retinopatia diabetica.

Bibliografia

- [1] Alberts B, Bray D, Hopkin K, *et al.* L'essenziale di biologia molecolare della cellula. Zanichelli **2005**, 2, 622-632.
- [2] Compton D A. Spindle assembly in animal cells. Annual Review of Biochemistry **2000**, 69, 95–114.
- [3] Cheesman I M, Desai A. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interphase. Nature Reviews Molecular and Cellular Biology **2008**, 9, 33–46.
- [4] Jordan M A, Wilson L. Microtubules as target for anticancer drugs. Nature Reviews Cancer **2004**, 4, 253–265.
- [5] Wood K W, Cornwell W D, Jackson, J R. Past and future of the mitotic spindle as an oncology target. Current Opinion in Pharmacology **2001**, 1, 370–377.
- [6] Musacchio A, Hardwick K G. The spindle checkpoint: Structural insights into dynamic signalling. Nature Reviews Molecular and Cellular Biology **2002**, 3, 731–741.
- [7] Miki H, Okada Y, Hirokawa N. Analysis of the kinesin superfamily: Insights into structure and function. Trends in Cell Biology **2005**, 15, 467–476.
- [8] Mountain V, Compton D A. Dissecting the role of molecular motors in the mitotic spindle. Anatomical Record (New Anat) **2000**, 261, 14–24.
- [9] Wordeman L. How kinesin motor proteins drive mitotic spindle function: Lessons from molecular assays, Seminars in Cell & Developmental Biology **2010**, 21, 260–268.
- [10] Hirokawa N, Takemura R. Kinesin superfamily proteins and their various functions and dynamics. Experimental Cell Research **2004**, 301, 50–59.
- [11] Heck M M S. Dr Dolittle and the making of the mitotic spindle. BioEssays **1999**, 21, 985–990.

- [12] Mitchison T, Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **1984**, *312*, 237–242.
- [13] Kirschner M, Mitchison T. Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell* **1986**, *45*, 329–342.
- [14] Holy T E, Leibler S. Dynamic instability of microtubules as an efficient way to search in space. *Proc Natl Acad Sci USA* **1994**, *91*, 5682–5685.
- [15] Wollman R, Cytrynbaum E N, Jones J T, Meyer T, Scholey J M, Mogilner A. Efficient chromosome capture requires a bias in the ‘search-and-capture’ process during mitotic-spindle assembly. *Curr Biol* **2005**, *15*, 828–832.
- [16] Khodjakov A, Cole R W, Oakley B R, Rieder C L. Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates. *Curr Biol* **2000**, *10*, 59–67.
- [17] Maiato H, Rieder C L, Khodjakov A. Kinetochore-driven formation of kinetochore fibers contributes to spindle assembly during animal mitosis. *J Cell Biol* **2004**, *167*, 831–840.
- [18] Kalab P, Pu R T, Dasso M. The ran GTPase regulates mitotic spindle assembly. *Curr Biol* **1999**, *9*, 481–484.
- [19] Heald R, Tournebise R, Blank T, Sandaltzopoulos R, Becker P, Hyman A, *et al.* Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Nature* **1996**, *382*, 420–425.
- [20] Sampath S C, Ohi R, Leisemann O, Salic A, Pozniakovski A, Funabiki H. The chromosomal passenger complex is required for chromatin-induced microtubule stabilization and spindle assembly. *Cell* **2004**, *118*, 187–202.
- [21] Maresca T J, Groen A C, Gatlin J C, Ohi R, Mitchison T J, Salmon E D. Spindle assembly in the absence of a RanGTP gradient requires localized CPC activity. *Curr Biol* **2009**, *19(14)*, 1210–1215.
- [22] Walczak C E. CLASP fluxes its mitotic muscles. *Nat Cell Biol* **2005**, *7*, 5–7.

- [23] Kwok B H, Yang J G, Kapoor T M. The rate of bipolar spindle assembly depends on the microtubule-gliding velocity of the mitotic kinesin Eg5. *Curr Biol* **2004**, *14*, 1783–1788.
- [24] Gaglio T, Dionne M A, Compton D A. Mitotic spindle poles are organized by structural and motor proteins in addition to centrosomes. *J Cell Biol* **1997**, *138*, 1055–1066.
- [25] Heald R, Tournebize R, Habermann A, Karsenti E, Hyman A. Spindle assembly in *Xenopus* egg extracts: respective roles of centrosomes and microtubule self-organization. *J Cell Biol* **1997**, *138*, 615–628.
- [26] Mcintosh J R, Hepler P K, Van Wie D G. Model for mitosis. *Nature* **1969**, *224*, 659–663.
- [27] Nedelec F. Computer simulations reveal motor properties generating stable antiparallel microtubule interactions. *J Cell Biol* **2002**, *158*, 1005–1015.
- [28] Scholey J M. Kinesin-5 in *Drosophila* embryo mitosis: sliding filament or spindle matrix mechanism? *Cell Motil Cytoskeleton* **2009**, *66*(8), 500–508.
- [29] Miyamoto D T, Perlman Z E, Burbank K S, Groen A C, Mitchison T J. The kinesin Eg5 drives poleward microtubule flux in *Xenopus laevis* egg extract spindles. *J Cell Biol* **2004**, *167*, 813–818.
- [30] Sharp D J, Yu K R, Sisson J C, Sullivan W, Scholey J M. Antagonistic microtubule-sliding motors position mitotic centrosomes in *Drosophila* early embryos. *Nat Cell Biol* **1999**, *1*, 51–54.
- [31] Kashina A S, Baskin R J, Cole D G, Wedaman K P, Saxton W M, Scholey J M. A bipolar kinesin. *Nature* **1996**, *379*, 270–272.
- [32] Kapitein L C, Peterman E J, Kwok B H, Kim J H, Kapoor T M, Schmidt C F. The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks. *Nature* **2005**, *435*, 114–118.
- [33] 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.

- [34] Cameron L A, Yang G, Cimini D, Canman J C, Kisurina-Evgenieva O, Khodjakov A, *et al.* Kinesin 5-independent poleward flux of kinetochore microtubules in PtK1 cells. *J Cell Biol* **2006**, *173*, 173–179.
- [35] Sawin K E, LeGuellec K, Philippe M, Mitchison T J. Mitotic spindle organization by a plus-end-directed microtubule motor. *Nature* **1992**, *359*, 540–543.
- [36] 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.
- [37] Mitchison T J, Maddox P, Gaetz J, Groen A, Shirasu M, Desai A, *et al.* Roles of polymerization dynamics, opposed motors, and a tensile element in governing the length of *Xenopus* extract meiotic spindles. *Mol Biol Cell* **2005**, *16*, 3064–3076.
- [38] Verde F, Berrez J M, Antony C, Karsenti E. Taxol-induced microtubule asters in mitotic extracts of *Xenopus* eggs: requirement for phosphorylated factors and cytoplasmic dynein. *J Cell Biol* **1991**, *112*, 1177–1187.
- [39] Walczak C E, Vernos I, Mitchison T J, Karsenti E, Heald R. A model for the proposed roles of different microtubule-based motor proteins in establishing spindle bipolarity. *Curr Biol* **1998**, *8*, 903–913.
- [40] Merdes A, Cleveland D W. Pathways of spindle pole formation: different mechanisms; conserved components. *J Cell Biol* **1997**, *138*, 953–956.
- [41] Mountain V, Simerly C, Howard L, Ando A, Schatten G, Compton D A. The kinesin-related protein, HSET, opposes the activity of Eg5 and cross-links microtubules in the mammalian mitotic spindle. *J Cell Biol* **1999**, *147*, 351–366.
- [42] Goshima G, Nedelec F, Vale R D. Mechanisms for focusing mitotic spindle poles by minus end-directed motor proteins. *J Cell Biol* **2005**, *171*, 229–40.
- [43] Merdes A, Ramyar K, Vechio J D, Cleveland D W. A complex of

- NuMA and cytoplasmic dynein is essential for mitotic spindle assembly. *Cell* **1996**, *87*, 447–458.
- [44] Furuta K, Toyoshima Y Y. Minus-end-directed motor Ncd exhibits processive movement that is enhanced by microtubule bundling in vitro. *Curr Biol* **2008**, *18*, 152–157.
- [45] Schroer T A. Dynactin. *Annu Rev Cell Dev Biol* **2004**, *20*, 759–779.
- [46] Faruki S, Cole R W, Rieder C L. Separating centrosomes interact in the absence of associated chromosomes during mitosis in cultured vertebrate cells. *Cell Motil Cytoskeleton* **2002**, *52*, 107–121.
- [47] Gatlin J C, Matov A, Groen A C, Needleman D J, Maresca T J, Danuser G, *et al.* Spindle fusion requires dynein-mediated sliding of oppositely oriented microtubules. *Curr Biol* **2009**, *19*, 287–296.
- [48] Tanenbaum M E, Macurek L, Galjart N, Medema R H. Dynein, Lis1 and CLIP-170 counteract Eg5-dependent centrosome separation during bipolar spindle assembly. *EMBO J* **2008**, *27*, 3235–3245.
- [49] Wiese C, Zheng Y. A new function for the gamma-tubulin ring complex as a microtubule minus-end cap. *Nat Cell Biol* **2000**, *2*, 358–364.
- [50] Mahoney N M, Goshima G, Douglass A D, Vale R D. Making microtubules and mitotic spindles in cells without functional centrosomes. *Curr Biol* **2006**, *16*, 564–569.
- [51] Goshima G, Mayer M, Zhang N, Stuurman N, Vale R D. Augmin: a protein complex required for centrosome-independent microtubule generation within the spindle. *J Cell Biol* **2008**, *181*, 421–429.
- [52] Lawo S, Bashkurov M, Mullin M, Ferreria M G, Kittler R, Habermann B, *et al.* HAUS, the 8-subunit human Augmin complex, regulates centrosome and spindle integrity. *Curr Biol* **2009**, *19*, 816–826.
- [53] Sharp D J, Brown H M, Kwon M, Rogers G C, Holland G, Scholey J M. Functional coordination of three mitotic motors in *Drosophila* embryos. *Mol Biol Cell* **2000**, *11*, 241–253.
- [54] Goshima G, Wollman R, Stuurman N, Scholey J M, Vale R D. Length control of the metaphase spindle. *Curr Biol* **2005**, *15*, 1979–1988.

- [55] Saunders W, Lengyel V, Hoyt M A. Mitotic spindle function in *Saccharomyces cerevisiae* requires a balance between different types of kinesin-related motors. *Mol Biol Cell* **1997**, *8*, 1025–1033.
- [56] Tao L, Mogilner A, Civelekoglu-Scholey G, Wollman R, Evans J, Stahlberg H, *et al.* A homotetrameric kinesin-5, KLP61F, bundles microtubules and antagonizes Ncd in motility assays. *Curr Biol* **2006**, *16*, 2293–2302.
- [57] Vale R D, Malik F, Brown D. Directional instability of microtubule transport in the presence of kinesin and dynein, two opposite polarity motor proteins. *J Cell Biol* **1992**, *119*, 1589–1596.
- [58] Tawada K, Sekimoto K. Protein friction exerted by motor enzymes through a weak-binding interaction. *J Theor Biol* **1991**, *150*, 193–200.
- [59] Yang G, Cameron L A, Maddox P S, Salmon ED, Danuser G. Regional variation of microtubule flux reveals microtubule organization in the metaphase meiotic spindle. *J Cell Biol* **2008**, *182*, 631–639.
- [60] Burbank K S, Mitchison T J, Fisher D S. Slide-and-cluster models for spindle assembly. *Curr Biol* **2007**, *17*, 1373–1383.
- [61] Burbank K S, Groen A C, Perlman Z E, Fisher D S, Mitchison T J. A new method reveals microtubule minus ends throughout the meiotic spindle. *J Cell Biol* **2006**, *175*, 369–375.
- [62] Sawin K E, Mitchison T J. Mutations in the kinesin-like protein Eg5 disrupting localization to the mitotic spindle. *Proc Natl Acad Sci USA* **1995**, *92*, 4289–4293.
- [63] Wilde A, Lizarraga S B, Zhang L, Wiese C, Gliksman N R, Walczak C E, *et al.* Ran stimulates spindle assembly by altering microtubule dynamics and the balance of motor activities. *Nat Cell Biol* **2001**, *3*, 221–227.
- [64] Waitzman J S, Rice S E. Mechanism and regulation of kinesin-5, an essential motor for the mitotic spindle. *Biol. Cell* **2014**, *106*, 2-4.
- [65] 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.
- [66] LeGuellec R, Paris J, Couturier A, Roghi C, Philippe M. Cloning by differential screening of a *Xenopus* cDNA that encodes a kinesin-related protein. *Molecular and Cellular Biology* **1991**, 11, 3395–3398.
- [67] Valentine M T, Fordyce P M, Block S M. Eg5 steps it up! *Cell Division* **2006**, 1, 31.
- [68] Kapitein L C, Peterman E J G, Kwok B H, Kim J H, Kapoor T M, Schmidt C F. The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks. *Nature* **2005**, 435, 114–118.
- [69] Sawin K E, LeGuellec K, Philippe M, Mitchison T J. Mitotic spindle organization by a plus-end-directed microtubule motor. *Nature* **1992**, 359, 540–543.
- [70] Heck M M S, Pereira A, Pesavento P, Yannoni Y, Spradling A C, Goldstein L S B. The kinesin-like protein KLP61F is essential for mitosis in *Drosophila*. *Journal of Cell Biology* **1993**, 123, 665–679.
- [71] Blangy A, Lane H A, d’Herin P, Harper M, Kress M, Nigg E A. Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell* **1995**, 83, 1159–1169.
- [72] Castillo A, Justice M J. The kinesin related motor protein, Eg5, is essential for maintenance of pre-implantation embryogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2007**, 357, 694–699.
- [73] Chauviere M, Kress C, Kress M. Disruption of the mitotic kinesin Eg5 gene (*Knsl1*) results in early embryonic lethality. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2008**, 372, 513–519.
- [74] Carter B Z, Mak D H, Shi Y, Schoeber W D, Wang R Y, Konopleva M, *et al.* Regulation and targeting of Eg5, a mitotic motor protein in blast crisis CML: Overcoming imatinib resistance. *Cell Cycle* **2006**, 5, 2223–2229.

- [75] Hegde P S, Cogswell J, Carrick K, Jackson J, Wood K W, Eng W K, *et al.* Differential gene expression analysis of kinesin spindle protein in human solid tumors. *Proceedings of the American Society of Clinical Oncology* **2003**, 22, abstract 535.
- [76] Castillo A, Morse H C, Godfrey V L, Naeem R, Justice M J. Overexpression of Eg5 causes genomic instability and tumor formation in mice. *Cancer Research* **2007**, 67, 10138–10147.
- [77] Saijo T, Ishii G, Ochiai A, Yoh K, Goto K, Nagai K, *et al.* Eg5 expression is closely correlated with the response of advanced non-small cell lung cancer to antimitotic agents combined with platinum chemotherapy. *Lung Cancer* **2006**, 54, 217–225.
- [78] DeBonis S, Skoufias D A, Lebeau L, Lopez R, Robin G, Margolis R L., *et al.* In vitro screening for inhibitors of the human mitotic kinesin Eg5 with antimitotic and antitumor activities. *Molecular Cancer Therapeutics* **2004**, 3, 1079–1090.
- [79] Sakowicz R, Finer J T, Beraud C, Crompton A, Lewis E, Fritsch A, *et al.* Antitumor activity of a kinesin inhibitor. *Cancer Research* **2004**, 64, 3276–3280.
- [80] Marcus A I, Peters U, Thomas S L, Garrett S, Zelnak A, Kapoor T M, *et al.* Mitotic kinesin inhibitors induce mitotic arrest and cell death in taxol-resistant and -sensitive cancer cells. *Journal of Biological Chemistry* **2005**, 280, 11569–11577.
- [81] Chin G M, & Herbst R. Induction of apoptosis by monastrol, an inhibitor of the mitotic kinesin Eg5, is independent of the spindle checkpoint. *Molecular Cancer Therapeutics* **2006**, 5, 2580–2591.
- [82] Lemieux C, DeWolf W, Voegtli W, DeLisle R K, Laird E, Wallace E, *et al.* ARRY-520: A novel, highly selective KSP inhibitor with potent antiproliferative activity. *AACR Annual Meeting* **2007**.
- [83] Woessner R, Corrette C, Allen S, Hans J, Zhao Q, Aicher T, *et al.* ARRY-520: A KSP inhibitor with efficacy and pharmacodynamic activity in animal models of solid tumors. *AACR Annual Meeting* **2007**.

- [84] Tao W, South V J, Zhang Y, Davide J P, Farrell L, Kohl N E, *et al.* Induction of apoptosis by an inhibitor of the mitotic kinesin KSP requires both activation of the spindle assembly checkpoint and mitotic slippage. *Cancer Cell* **2005**, 8, 49–59.
- [85] Tao W, Sout V. J, Diehl R E, Davide J P, Sepp-Lorenzino L, Fraley M E, *et al.* An inhibitor of the kinesin spindle protein activates the intrinsic apoptotic pathway independently of p53 and de novo protein synthesis. *Molecular and Cellular Biology* **2007**, 27, 689–698.
- [86] Vijapurkar U, Wang W, & Herbst R. Potentiation of kinesin spindle protein inhibitor-induced cell death by modulation of mitochondrial and death receptor apoptotic pathways. *Cancer Research* **2007**, 67, 237–245.
- [87] Shi J, Orth J D, & Mitchison T. Cell type variation in responses to antimetabolic drugs that target microtubules and kinesin-5. *Cancer Research* **2008**, 68, 3269–3276.
- [88] Gascoigne K E, & Taylor S S. Cancer cells display profound intra- and interline variation following prolonged exposure to antimetabolic drugs. *Cancer Cell* **2008**, 14, 111–122.
- [89] Szakacs G, Paterson J K, Ludwig J A, Booth-Genthe C, Gottesman M M. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **2006**, 5, 219–234.
- [90] 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.
- [91] Kappe C O. Biologically active dihydropyrimidones of the Biginelli-type e a literature survey, *Eur J Med Chem* **2000**, 35, 1043–1052.
- [92] Dallinger D, Kappe C O Rapid preparation of the mitotic kinesin Eg5 inhibitor monastrol using controlled microwave-assisted synthesis. *Nat Protoc* **2007**, 2, 317–321.
- [93] Glasnov T N, Tye H, Kappe C O. Integration of high speed microwave chemistry and a statistical ‘design of experiment’ approach for the synthesis of the mitotic kinesin Eg5 inhibitor

- monastrol. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 2035–2041.
- [94] Kappe C O, Shishkin O V, Uray G, Verdino P. X-ray structure, conformational analysis, enantioseparation, and determination of absolute configuration of the mitotic kinesin Eg5 inhibitor monastrol. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 1859–1862.
- [95] Blasco M A, Thumann S, Wittmann J, Giannis A, Groger H. Enantioselective biocatalytic synthesis of (S)-monastrol. *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, *20*, 4679–4682.
- [96] Dondoni A, Massi A, Sabbatini S. Improved synthesis and preparative scale resolution of racemic monastrol. *Tetrahedron Lett* **2002**, *43*, 5913–5916.
- [97] Huang Y, Yang F, Zhu C. Highly enantioselective Biginelli reaction using a new chiral ytterbium catalyst: asymmetric synthesis of dihydropyrimidines. *J Am Chem Soc* **2005**, *127*, 16386–16387.
- [98] Maliga Z, Mitchison T J. Small-molecule and mutational analysis of allosteric Eg5 inhibition by monastrol. *BMC Chem Biol* **2006**, *6*, 2–9.
- [99] Maliga Z, Xing J, Cheung H, Juszczak L J, Friedman J M, Rosenfeld S S, A pathway of structural changes produced by monastrol binding to Eg5. *J Biol Chem* **2006**, *281*, 7977–7982.
- [100] Russowsky D, Canto R F S, Sanches S A A, D'Oca M G M, Fatima A, Pilli R A, Kohn L K, Antonio M A, Carvalho J E. Synthesis and differential antiproliferative activity of Biginelli compounds against cancer cell lines: monastrol, oxo-monastrol and oxygenated analogues. *Bioorg Chem* **2006**, *34*, 173–182.
- [101] Garcia-Saez I, DeBonis S, Lopez R, Trucco F, Rousseau B, Thuery P, Kozielsk F. Structure of human Eg5 in complex with a new monastrol-based inhibitor bound in the R configuration. *J Biol Chem* **2007**, *282*, 9740–9747.
- [102] Gartner M, Sunder-Plassmann N, Seiler J, Utz M, Vernos I, Surrey T, Giannis A. Development and biological evaluation of potent and specific inhibitors of mitotic kinesin Eg5. *ChemBioChem* **2005**, *6*, 1173–1177.

- [103] Yang L, Jiang C, Liu F, You Q, Wu W. Cloning, enzyme characterization of recombinant human Eg5 and the development of a new Inhibitor. *Biol Pharm Bull* **2008**, *31*, 1397–1402.
- [104] Svetlik J, Veizerov L, Mayer T U, Catarinella M. Monastrol analogs: a synthesis of pyrazolopyridine, benzopyranopyrazolopyridine, and oxygen-bridged azolopyrimidine derivatives and their biological screening. *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, *20*, 4073–4076.
- [105] Klein E, DeBonis S, Thiede B, Skoufias D A, Kozielski F, Lebeau L. New chemical tools for investigating human mitotic kinesin Eg5. *Bioorg Med Chem* **2007**, *15*, 6474–6488.
- [106] Chen Y, Chow J P H, Poon R Y C. Inhibition of Eg5 acts synergistically with checkpoint abrogation in promoting mitotic catastrophe. *Mol Cancer Res* **2012**, *10*, 626–635.
- [107] Zee-Cheng K Y, Cheng C C. Experimental antileukemic agents. Preparation and structure-activity study of S-tritylcysteine and related compounds. *J Med Chem* **1970**, *13*, 414–418.
- [108] Kessel D, Smith G, Blahnik J. Effects of S-(trityl)-L-cysteine and its analogs on cell surface properties of leukemia L1210 cells. *Biochem Pharmacol* **1976**, *25*, 1893–1897.
- [109] Boyd M R, Paull K D. Some practical considerations and applications of the National Cancer Institute in vitro anticancer drug discovery screen. *Drug Dev Res* **1995**, *34*, 91–109.
- [110] Brier S, Lemaire D, Debonis S, Forest E, Kozielski F. Identification of the protein binding region of S-trityl-L-cysteine, a new potent inhibitor of the mitotic kinesin Eg5. *Biochemistry* **2004**, *43*, 13072–13082.
- [111] 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*, 3921–3924.
- [112] DeBonis S, Skoufias D A, Indorato R, Liger F, Marquet B, Laggner C, Joseph B, Kozielski F. Structure-activity relationship of S-trityl-L-cysteine analogues as inhibitors of the human mitotic kinesin Eg5. *J Med Chem* **2008**, *51*, 1115–1125.

- [113] Shimizu M, Ishii H, Ogo N, Unno Y, Matsuno K, Sawada J, Akiyama Y, Asai A. S-Trityl-L-cysteine derivative induces caspase-independent cell death in K562 human chronic myeloid leukemia cell line. *Cancer Lett* **2010**, 298, 99–106.
- [114] Ding S, Nishizawa K, Kobayashi T, Oishi S, Lv J J, Fujii N, Ogawa O, Nishiyama H. A potent chemotherapeutic strategy for bladder cancer: (S)-methoxy-trityl-L-cysteine, a novel Eg5 inhibitor. *J Urol* **2010**, 184, 1175–1181.
- [115] Xing N D, Ding S T, Saito R, Nishizawa K, Kobayashi T, Inoue T, Oishi S, Fujii N, Lv J J, Ogawa O, Nishiyama H. A potent chemotherapeutic strategy in prostate cancer: S-(methoxytrityl)-L-cysteine, a novel Eg5 inhibitor. *Asian J Androl* **2011**, 13, 236–241.
- [116] Shimizu M, Ishii H, Ogo N, Matsuno K, Asai A. Biochemical analysis of cellular target of S-trityl-L-cysteine derivatives using affinity matrix. *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, 20, 1578–1580.
- [117] Wang F, Good J A D, Rath O, Kaan H Y K, Sutcliffe O B, Mackay S P, Kozielski F. Triphenylbutanamines: kinesin spindle protein inhibitors with in vivo antitumor activity. *J Med Chem* **2012**, 55, 1511–1525.
- [118] 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* **2009**, 425, 55–60.
- [119] Abualhasan M N, Good J A D, Wittayanarakul K, Anthony N G, Berretta G, Rath O, Kozielski F, Sutcliffe O B, Mackay S P. Doing the methylene shuffle further insights into the inhibition of mitotic kinesin Eg5 with S-trityl L-cysteine. *Eur J Med Chem* **2012**, 54, 483–498.
- [120] Tcherniuk S, Van Lis R, Kozielski F, Skoufias D A. Mutations in the human kinesin Eg5 that confer resistance to monastrol and S-trityl-L-cysteine in tumor derived cell lines. *Biochem Pharmacol* **2010**, 79, 864–872.
- [121] Brier S, Lemaire D, DeBonis S, Forest E, Kozielski F. Molecular dissection of the inhibitor binding pocket of mitotic kinesin Eg5

- reveals mutants that confer resistance to antimetabolic agents. *J Mol Biol* **2006**, *360*, 360–376.
- [122] Hotha S, Yarrow J C, Yang J G, Garrett S, Renduchintala K V, Mayer T U, Kapoor T M. HR22C16: a potent small-molecule probe for the dynamics of cell division. *Angew Chem Int* **2003**, *42*, 2379–2382.
- [123] Xiao S, Shi X. The first highly stereoselective approach to the mitotic kinesin Eg5 inhibitor HR22C16 and its analogues. *Tetrahedron: Asymmetry* **2010**, *21*, 226–231.
- [124] 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. *Bioorg Med Chem Lett* **2005**, *15*, 2041–2045.
- [125] Liu S F, Yu L, Jiang C, Yang L, Wu W, You Q. Discovery of tetrahydro-*b*-carbolines as inhibitors of the mitotic kinesin KSP. *Bioorg Med Chem* **2010**, *18*, 4167–4177.
- [126] Oishi S, Watanabe T, Sawada J, Asai A, Ohno H, Fujii N. Kinesin spindle protein (KSP) inhibitors with 2,3-fused indole scaffolds. *J Med Chem* **2010**, *53*, 5054–5058.
- [127] 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*, 4839–4846.
- [128] Johnson R K, McCabe F L, Cauder E, Inlow-Porter L, Whitacre M, Winkler J D, Bergnes G, Feng B, Morgans D, Wood K W, Jackson J R. SB-715992, a potent and selective inhibitor of KSP mitotic kinesin, demonstrates broad-spectrum activity in advanced murine tumors and human tumor xenografts. *Proc Annu Meet Am Assoc Cancer Res* **2002**, *43*, 269.
- [129] 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.
- [130]Zhang B, Liu J, Xu Y, Ng S. Crystal structure of HsEg5 in complex with clinical candidate CK0238273 provides insight into inhibitory mechanism, potency, and specificity. *Biochem Biophys Res Commun* **2008**, *372*, 565–570.
- [131]Davis D A, Sarkar S H, Hussain M, Li Y, Sarkar F H. Increased therapeutic potential of an experimental anti-mitotic inhibitor SB715992 by genistein in PC-3 human prostate cancer cell line. *BMC Cancer* **2006**, *6*, 22–30.
- [132]Blagden S P, Molife L R, Seebaran A, Payne M, Reid A H M, Protheroe A S, Vasist L S, Williams D D, *et al.* A phase I trial of ispinesib, a kinesin spindle protein inhibitor, with docetaxel in patients with advanced solid tumours. *Br. J. Cancer* **2008**, *98*, 894–899.
- [133]Tang P A, Siu L L, Chen E X, Hotte S J, Chia S, Schwarz J K, Pond G R, Johnson C, Colevas A D, Synold T W, Vasist L S, Winquist E. Phase II study of ispinesib in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Invest New Drugs* **2008**, *26*, 257–264.
- [134]Knox J J, Gill S, Synold T W, Biagi J J, Major P, Feld R, Cripps C, Wainman N, Eisenhauer E, Seymour L. A phase II and pharmacokinetic study of SB-715992, in patients with metastatic hepatocellular carcinoma: a study of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (NCIC CTG IND.168). *Invest New Drugs* **2008**, *26*, 265–272.
- [135]Lee R T, Beekman K E, Hussain M, Davis N B, Clark J I, Thomas S P, Nichols K F, Stadler W M. A university of chicago consortium phase II trial of SB-715992 in advanced renal cell cancer. *Clin Genitourin Cancer* **2008**, *6*, 21–24.
- [136]Beer T M, Goldman B, Synold T W, Ryan C W, Vasist L S, Van Veldhuizen P J, Dakhil S R, Lara P N, Drelichman A, Hussain M H A,

- Crawford E D. Southwest oncology group phase II study of ispinesib in androgen-independent prostate cancer previously treated with taxanes. *Clin Genitourin Cancer* **2008**, 6, 103–109.
- [137] Carol H, Lock R, Houghton P J, Morton C L, *et al.* Initial testing (stage 1) of the kinesin spindle protein inhibitor ispinesib by the pediatric preclinical testing program. *Pediatr Blood Cancer* **2009**, 53, 1255–1263.
- [138] Souid A, Dubowy R L, Ingle A M, Conlan M G, Sun J, Blaney S M, Adamson P C. A pediatric phase 1 trial and pharmacokinetic study of ispinesib: a children's oncology group phase I consortium study. *Pediatr Blood Cancer* **2010**, 55, 1323–1328.
- [139] Purcell J W, Davis J, Reddy M, Martin S, Samayoa K, Vo H, Thomsen K, Bean P, *et al.* Activity of the kinesin spindle protein inhibitor ispinesib (SB-715992) in models of breast Cancer. *Clin Cancer Res* **2010**, 16, 566–576.
- [140] Gomez H L, Philco M, Pimentel P, Kiyon M, Monsalvo M L, Conlan M G, Saikali K G, Chen M M, Seroogy J J, Wolff A A, Escandon R D. Phase I dose-escalation and pharmacokinetic study of ispinesib, a kinesin spindle protein inhibitor, administered on days 1 and 15 of a 28-day schedule in patients with no prior treatment for advanced breast cancer. *Anti-cancer Drugs* **2012**, 23, 335–341.
- [141] Jackson J R, Gilmartin A, Dhanak D, Gilmartin A, Dhanak D, Knight S, Parrish C, Luo L, Sutton D, *et al.* A second generation KSP inhibitor, SB-743921, is a highly potent and active therapeutic in preclinical models of cancer. *Proc Am Assoc Cancer Res* **2006**, B1.
- [142] 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, 447–454.
- [143] Jiang C, Yang L, Wu W T, Guo Q L, You Q D. De novo design,

synthesis and biological evaluation of 1,4-dihydroquinolin-4-ones and 1,2,3,4-tetrahydroquinazolin-4-ones as potent kinesin spindle protein (KSP) inhibitors. *Bioorg Med Chem* **2011**, *19*, 5612–5627.

- [144] Theoclitou M E, Aquila B, Block M H, Brassil P J, Castriotta L, Code E, Collins M P, Davies A M, Deegan T, *et al.* Discovery of (p)-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*, 6734–6750.
- [145] Esaki T, Seto T, Ariyama H, Arita S, Fujimoto S, Tsukasa K, Kometani T, Nosaki K, Hirai F, Yagawa K. Phase I study to assess the safety, tolerability and pharmacokinetics of AZD4877 in Japanese patients with solid tumors. *Arch Drug Inf* **2011**, *4*, 23–31.
- [146] Infante J R, Spratlin J L, Kurzrock R, Eckhardt S G, Burris H A, Pulchalski T A, Li J, Wu K, Ochs J, Herbst R S. Clinical, pharmacokinetic (PK), pharmacodynamic findings in a phase I trial of weekly (wkly) intravenous AZD4877 in patients with refractory solid tumors. *J Clin Oncol* **2008**, *26* (15S), Abstract 2501.
- [147] Kantarjian H M, Padmanabhan S, Stock W, Tallman M S, Curt G A, Li J, Osmukhina A, Wu K, *et al.* Phase I/II multicenter study to assess the safety, tolerability, pharmacokinetics and pharmacodynamics of AZD4877 in patients with refractory acute myeloid leukemia. *Invest New Drugs* **2012**, *30*, 1107–1115.
- [148] Infante J R, Kurzrock R, Spratlin J, Burris H A, Eckhardt S G, Li J, Wu K, Skolnik J M, Hylander-Gans L, Osmukhina A, Huszar D, Herbst R S. A phase I study to assess the safety, tolerability, and pharmacokinetics of AZD4877, an intravenous Eg5 inhibitor in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* **2012**, *69*, 165–172.
- [149] 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. Phase I trial of the kinesin spindle protein (Eg5) inhibitor AZD4877 in patients with solid

and lymphoid malignancies. Invest New Drugs, in press.

- [150] Schiemann K, Finsinger D, Zenke F, Amendt C, *et al.* The discovery and optimization of hexahydro-2H-pyrano[3,2-c]quinolones (HHPQs) as potent and selective inhibitors of the mitotic kinesin-5. *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, *20*, 1491–1495.
- [151] Orth J D, Loewer A, Lahav G, Mitchison T J. Prolonged mitotic arrest triggers partial activation of apoptosis, resulting in DNA damage and p53 induction. *Mol Biol Cell* **2012**, *23*, 567–576.
- [152] Woessner R, Tunquist B, Lemieux C, Chlipala E, *et al.* ARRY-520, a novel KSP inhibitor with potent activity in hematological and taxane-resistant tumor models. *Anticancer Res* **2009**, *29*, 4373–4380.
- [153] Kim K H, Xie Y, Tytler E M, Woessner R, Mor G, Alvero A B. KSP inhibitor ARRY-520 as a substitute for paclitaxel in type I ovarian cancer cells. *J Trans Med* **2009**, *7*, 63–71.
- [154] Basso A D, Liu M, Dai C, Gray K, Nale L, Tevar S, Lee S, Liang L, Ponery A, Yaremko B, Smith E, Tang H, Sheth P R, Siddiqui M A, Hicklin D J, Kirschmeier P. SCH 2047069, a novel oral kinesin spindle protein inhibitor, shows single-agent antitumor activity and enhances the efficacy of chemotherapeutics. *Mol Cancer Ther* **2010**, *9*, 2993–3002.
- [155] 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. *Bioorg Med Chem Lett* **2005**, *15*, 2041–2045.
- [156] Cox C D, Torrent M, Breslin M J, Mariano B J, Whitman D B, Coleman P J, Buser C A, Walsh E S, Hamilton K, Schaber M D. Kinesin spindle protein (KSP) inhibitors. Part 4: structure-based design of 5-alkylamino-3,5-diaryl-4,5-dihydropyrazoles as potent, water-soluble inhibitors of the mitotic kinesin KSP. *Bioorg Med Chem Lett* **2006**, *16*, 3175–3179.

- [157] Coleman P J, Schreier J D, Cox C D, Fraley M E, Garbaccio R M, Buser C A, Walsh E S, Hamilton K, Lobell R B, Rickert K, Tao W, *et al.* Kinesin spindle protein (KSP) inhibitors. Part 6: design and synthesis of 3,5-diaryl-4,5-dihydropyrazole amides as potent inhibitors of the mitotic kinesin KSP. *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, *17*, 5390–5395.
- [158] Fraley M E, Garbaccio R M, Arrington K L, Hoffman W F, Tasber E S, Coleman P J, *et al.* 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.
- [159] Cox C D, Coleman P J, Breslin M J, Whitman D B, Garbaccio R M, Fraley M E, Buser C A, Walsh E S, *et al.* Kinesin spindle protein (KSP) inhibitors. 9. Discovery of (2S)-4-(2,5-difluorophenyl)-n-[(3R,4S)-3-fluoro-1-methylpiperidin-4-yl]-2-(hydroxymethyl)-N-methyl-2-phenyl-2,5-dihydro-1H-pyrrole-1-carboxamide (MK-0731) for the treatment of taxane refractory cancer. *J Med Chem* **2008**, *51*, 4239–4252.
- [160] Holen K, DiPaola R, Liu G, Tan A R, Wilding G, Hsu K, Agrawal N, Chen C, Xue L, Rosenberg E, Stein M. A phase I trial of MK-0731, a kinesin spindle protein (KSP) inhibitor, in patients with solid tumors. *Invest New Drugs* **2012**, *30*, 1088–1095.
- [161] Garbaccio R M, Tasber E S, Neilson L A, Coleman P J, Fraley M E, Olson C, Bergman J, Torrent M, *et al.* Kinesin spindle protein (KSP) inhibitors. Part 7: design and synthesis of 3,3-disubstituted dihydropyrazolobenzoxazines as potent inhibitors of the mitotic kinesin KSP. *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, *17*, 5671–5676.
- [162] Liu F, You Q D, Chen Y D. Pharmacophore identification of KSP inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, *17*, 722–726.
- [163] Nagarajan S, Skoufias D A, Kozielski F, Pae A N. Receptoreligand interaction-based virtual screening for novel Eg5/kinesin spindle protein inhibitors. *J Med Chem* **2012**, *55*, 2561–2573.

- [164] Parrish C A, Adams N D, Auger K R, Burgess J L, Carson J D, Chaudhari A M, Copeland R A, *et al.* Novel ATP-competitive kinesin spindle protein inhibitors. *J Med Chem* **2007**, *50*, 4939–4952.
- [165] Luo L, Parrish C A, Nevins N, McNulty D E, *et al.* ATP-competitive inhibitors of the mitotic kinesin KSP that function via an allosteric mechanism. *Nat Chem Biol* **2007**, *33*, 722–726.
- [166] Lahue B R, Ma Y, Shipps G W, Seghezzi W, Herbst R. Substituted benzimidazoles: a novel chemotype for small molecule hKSP inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2009**, *19*, 3405–3409.
- [167] Lahue B R, Ma Y, Shipps G W, Seghezzi W, Herbst R. Substituted benzimidazoles: a novel chemotype for small molecule hKSP inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* **2009**, *19*, 3405–3409.
- [168] Jiang C, Yang L, Wu W, Guo Q, 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*, 1462–1469.
- [169] Churruca F, Fousteris M, Ishikawa Y, Rekowski M W, Hounsou C, Surrey T, Giannis A. A novel approach to indoloditerpenes by nazarov photo-cyclization: synthesis and biological investigations of terpendole E analogues. *Org Lett* **2010**, *12*, 2096–2099.
- [170] Azmi A S, Mohammad R M. Non-peptidic small molecule inhibitors against Bcl-2 for cancer therapy. *J Cell Physiol* **2009**, *218*, 13–21.
- [171] 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 antimetabolic and antitumor activities. *Mol Cancer Ther* **2004**, *3*, 1079–1090.
- [172] Funayama Y, Nishio K, Wakabayashi K, Nagao M, Shimoi K, Ohira T, Hasegawa S, Saijo N Effects of b- and g-carboline derivatives of DNA topoisomerase activities. *Mutat Res* **1996**, *349*, 183–191.
- [173] Cao R, Peng W, Chen H, Ma Y, Liu X, Hou X, Guan H, Xu A. DNA binding properties of 9-substituted harmine derivatives. *Biochem Biophys Res Commun* **2005**, *338*, 1557–1563.

- [174] 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*, 987–992.
- [175] Oguievetskaia K, Martin-Chanas L, Vorotyntsev A, Doppelt-Azeroual O, Brotel X, Adcock S A, de Brevern A G, Delfaud F, Moriaud F. Computational fragment-based drug design to explore the hydrophobic sub-pocket of the mitotic kinesin Eg5 allosteric binding site. *J Comput Aided Mol Des* **2009**, *23*, 571–582.
- [176] Luo X, Shu M, Wang Y, Liu J, Yang W, Lin Z. 3D-QSAR studies of dihydropyrazole and dihydropyrrole derivatives as inhibitors of human mitotic kinesin Eg5 based on molecular docking. *Molecules* **2012**, *17*, 2015–2029.