

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS
Área de Química Farmacéutica



SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE NUEVAS BENCENOSULFONAMIDAS ANTIMITÓTICAS

Memoria para optar al Grado de Doctor

Raúl Fuentes Martín

Bajo la dirección de

Dra. Raquel Álvarez, Dr. Rafael Peláez

Salamanca, 2024

SYNTHESIS AND EVALUATION OF NEW ANTIMITOTIC BENZENESULFONAMIDES



Memoria presentada por Raúl Fuentes Martín para optar al grado de Doctor en Farmacia con Mención Internacional por la Universidad de Salamanca.

D. Raúl Fuentes Martín



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**



La **Dra. Raquel Álvarez Lozano**, Profesora Titular del Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca y el **Dr. Rafael Peláez Lamamié de Clairac Arroyo**, Profesor Titular del Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICAN

Que la memoria de Tesis Doctoral titulada “**SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DE NUEVAS BENCENOSULFONAMIDAS ANTIMITÓTICAS**” presentada por el Graduado en Farmacia por la Universidad de Salamanca **D. Raúl Fuentes Martín** para optar al Grado de Doctor en Farmacia con Mención Internacional por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección en el Laboratorio de Química Farmacéutica del Departamento de Ciencias Farmacéuticas, área de Química Farmacéutica, de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Salamanca. Considerando que cumple con las condiciones necesarias, autorizan su presentación a fin de que pueda ser defendido ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a efectos oportunos, expiden y firman el presente certificado en Salamanca, a 2 de julio de 2024.

Fdo. Dr. Rafael Peláez

Fdo. Dra. Raquel Álvarez

El doctorando ha disfrutado, durante la realización de esta Tesis Doctoral, de un contrato predoctoral de personal investigador de la Universidad de Salamanca, cofinanciados por el Banco de Santander. Durante la estancia predoctoral en el laboratorio del Dr. Jorrit Enserink en el “*Department of Molecular Cell Biology*” del *Institute for Cancer Research* (Oslo, Noruega) el doctorando disfrutó de una EMBO Scientific Exchange Grant (number 9763).

El desarrollo del trabajo experimental ha sido financiado en parte con cargo a los siguientes proyectos:

- Junta de Castilla y León (SA0116P20), and “ERDF A way of making Europe” by the “European Union”
- Híbridos de inhibidores de tubulina y desacetilasas para el tratamiento y control de trematodos y nematodos. MCIN/AEI/10.13039/501100011033 (Ministerio de Ciencia e Innovación) and “ERDF A way of making Europe” by the “European Union”.
- Inversión del puente de sulfonamida en ligandos de la tubulina con actividad antitumoral. PIC2-2022-01 (Universidad de Salamanca).
- Alternativas terapéuticas a los benzimidazoles para las zoonosis parasitarias mediante diseño basado en la diana. RTI2018-099474-B-I00 (Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades).
- Hibridación de antimitóticos y alquilfosfolípidos para el tratamiento de estrongiloidiasis. Diseño, síntesis y evaluación. PIC2-2020-01 (Universidad de Salamanca).

Parte del trabajo recogido en esta Tesis Doctoral se encuentra publicado en el siguiente artículo científico:

R. Fuentes-Martín, P. Ayuda-Durán, R. Hanes, L. Gallego-Yerga, L. Wolterinck, J.M Enserink, R. Álvarez, R. Peláez, Promising anti-proliferative indolic benzenesulfonamides alter mechanisms with sulfonamide nitrogen substituents., *European Journal of Medicinal Chemistry*, Available online 27 June 2024, 116617
DOI: 10.1016/j.ejmech.2024.116617

A

a.C.	antes de cristo
AcOEt	acetato de etilo
ADN	ácido desoxirribonucleico
AGI	absorción gastrointestinal
Ar	anillo aromático
ASPT	área de superficie polar topológica
ATP	adenosín trifosfato (del inglés <i>Adenosine TriPhosphate</i>)
AV	anexina-V

B

Bn	bencilo
BSA	suero bovino de albúmina (del inglés <i>Bovine Serum Albumin</i>)
Bu	butilo

C

c	cuartete
CA4	combretastatina A-4
CC	cromatografía en columna
CCF	cromatografía en capa fina
cel	células
CF	citometría de flujo
CG/EM	cromatografía gases acoplada a espectrometría de masas
Comp	compuesto
COSY	del inglés <i>CO</i> relation <i>Spectroscopy</i>
CPA/C	complejo promotor de la anafase/ciclosoma

D

<i>d</i>	doblete
DCM	diclorometano
<i>dd</i>	doble doblete
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DT	docetaxel
DTT	ditiotreitól

E

EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	ácido etilenglicol-bis(diaminoetiléter)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraacético
eq	equivalente(s)
Et	etilo
Et ₃ N	trietilamina

F

FBS	suero fetal bobino (del inglés <i>Fetal Bovine Serum</i>)
FDA	administración de alimentos y medicamentos de los estados unidos (del inglés <i>Food and Drug Administration</i>)

G

GpP	sustrato de la glicoproteína-P
-----	--------------------------------

H

h	hora(s)
Hex	<i>n</i> -hexano
HMBC	del inglés <i>heteronuclear multiple bond correlation</i>
HRMS	espectrometría de masa de alta resolución (del inglés <i>High-Resolution Mass Spectrometry</i>)
HSQC	del inglés <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence spectroscopy</i>

I

IC ₅₀	concentración inhibitoria 50% (del inglés <i>Inhibitory Concentration 50%</i>)
Ig	inmunoglobulina
IP	ioduro de propidio
IS	índice de selectividad

J

<i>J</i>	constante de acoplamiento
----------	---------------------------

L

LD	reactivo <i>Live/Dead fixable orange</i>
LSD1	histona demetilasa específica de lisinas (del inglés Lysine-Specific Demethylase 1A)

M

<i>m</i>	multiplete
M+	ión molecular
MC	microscopía confocal
MDR	resistencia a múltiples fármacos (del inglés <i>MultiDrug Resistance</i>)
Me	metil
MeOH	metanol
min	minuto(s)
Morf	morfolina

N

nd	no determinado
----	----------------

P

PBS	tampón fosfato (del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
P.f.	punto de fusión
Pd/C	paladio sobre carbón activado
PIPES	ácido piperazina- <i>N,N'</i> -bis(2-etanesulfónico)
Pipz	piperazina
PH3	fosfohistona-H3 (del inglés Phosphohistone H3)
ppm	partes por millón
PT	paclitaxel
Pyr	piridina

Q

QSAR	relación cuantitativa estructura-actividad (del inglés <i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i>)
------	--

R

rcf	fuerza centrífuga relativa (del inglés <i>Relative Centrifugal Force</i>)
REA	relación estructura-actividad
RMN	resonancia magnética nuclear
Rpm	revoluciones por minuto

S

<i>s</i>	singlete
<i>sa</i>	singlete ancho
SN2	sustitución nucleofílica tipo 2

T

<i>t</i>	tripleto
t.a.	temperatura ambiente
^t Bu	<i>terc</i> -butil
TMS	trimetilsilano
TMSCI	trimetilclorosilano

U

USAL	universidad de salamanca
UV	ultravioleta

V

VB	vinorelbina
VC	vincristina
vs.	versus, frente a

Símbolo

Δ	incremento
°C	grado Celsius
δ	desplazamiento químico

RESUMEN

La tubulina, la proteína fundamental que forma los microtúbulos, es una de las dianas más estudiadas en la búsqueda de nuevos tratamientos contra el cáncer. Los compuestos antimetabólicos, como el paclitaxel o los alcaloides de la vinca, son utilizados en la terapéutica actual. No obstante, estos tratamientos a menudo muestran resistencias, lo que conduce al fracaso terapéutico.

Como alternativa, los ligandos de tubulina que se unen al dominio de la colchicina, presentan estructuras más sencillas que facilitan su síntesis. Además, en muchos casos no son sustratos de las bombas de eflujo que causan las resistencias. La combretastatina A-4 (CA4), ligando de referencia formado por dos anillos aromáticos A y B unidos por un puente olefínico, presenta inconvenientes en cuanto a sus propiedades fisicoquímicas y su inestabilidad configuracional.

El reemplazo del puente olefínico de la CA4 por un grupo sulfonamida mantiene la configuración *Z* necesaria para la interacción con la diana a la vez que se aumenta la polaridad de la molécula. Hasta el momento, la inmensa mayoría de las sulfonamidas antimetabólicas que mantienen como anillo A un 3,4,5-trimetoxifenilo presentan sobre éste el nitrógeno de la sulfonamida. En este trabajo de Tesis Doctoral se han sintetizado 77 nuevas sulfonamidas basadas en la CA4 con la dirección reversa del grupo sulfonamida con el fin de explorar la diferente disposición que pueden adoptar estos ligandos en el sitio de la colchicina. Además, se busca explorar los efectos que pueden tener los sustituyentes en el nitrógeno de la sulfonamida introduciendo una amplia variedad de grupos de diferente polaridad y volumen.

Los compuestos sintetizados se clasifican en tres familias en función del anillo aromático B que presentan: fenilo (familia 1), naftilo (familia 2) e indolilo (familia 3). Todas las nuevas sulfonamidas reversas fueron evaluadas *in vitro* frente a diferentes líneas tumorales humanas. 25 de las nuevas sulfonamidas presentaron actividad antitumoral con valores de IC₅₀ inferiores a 1 micromolar frente a la línea celular tumoral HeLa. La familia 3, con un anillo indólico como anillo B, es la familia más prometedora con 17 de estos 25 compuestos activos.

Los ligandos de las familias 2 y 3 fueron evaluados adicionalmente frente a nueve líneas celulares tumorales y 3 líneas no tumorigénicas usando una metodología semiautomática durante la estancia predoctoral realizada en el *Radiumhospitalet* de Oslo. Las líneas MDA-MB468 paclitaxel resistente (PR) y BT474 mostraron cierta resistencia a los tratamientos antimetabólicos usados como referencia (paclitaxel, docetaxel, vincristina and vinblastina). Sin embargo, las sulfonamidas indólicas **65**, **97**, **100**, y **102**, las cuales portan un grupo

cianometilo sobre el nitrógeno de la sulfonamida, no pierden actividad frente a la línea MDA-MB468-PR. Por otro lado, la introducción de un grupo metilo sobre esta posición, sumado a la funcionalización de la posición 3' del indol (**96**, **101**, y **104**) parece conferir cierta protección frente a la resistencia de BT474.

La afinidad por las proteínas MDR fue evaluada, demostrando que la mayoría de los compuestos sintetizados no son sustrato de estas bombas. Además, se realizaron estudios del mecanismo de acción sobre una selección de los compuestos más potentes de cada familia.

Los compuestos antimitóticos alteran la dinámica microtubular, evitando el correcto funcionamiento de la mitosis y generando una acumulación de células en esta fase del ciclo. Este efecto fue evaluado por citometría de flujo, al mismo tiempo que se estudiaba la muerte celular mediada por apoptosis. Esta apoptosis también se evaluó midiendo la activación de las caspasas 3 y 7. Por último, la integridad de la red microtubular fue analizada por medio de inmunofluorescencia frente a diferentes líneas celulares.

Todos los compuestos evaluados indujeron acumulación de células en la fase G₂/M del ciclo celular, seguido de muerte celular mediada por apoptosis. Estos efectos, sumados a la alteración de la red de microtúbulos tras el tratamiento, sugiere que las nuevas sulfonamidas siguen un mecanismo de acción antimitótico.

Las propiedades farmacocinéticas de los compuestos activos también fueron estudiadas. La solubilidad acuosa de los compuestos de la familia 1 se midió empíricamente. Todos los compuestos estudiados mejoraron la solubilidad acuosa de la CA4, y muchos de ellos la de ABT-751. Por último, resultados *in silico* de estudios farmacocinéticos y de mutagenicidad demostraron las características favorables de los nuevos ligandos para ser futuros candidatos a nuevos estudios preclínicos.

ABSTRACT

Tubulin is a crucial component of the mitotic spindle and is commonly targeted in cancer therapy. Antimitotic drugs such as paclitaxel and vinca alkaloids are currently employed against various tumours. However, these treatments often involve resistance, leading to therapeutic failure.

As an alternative, many tubulin ligands that bind to the colchicine domain are not substrates for the efflux pumps that cause resistance. Additionally, these ligands have simpler structures that make their synthesis easier.

Combretastatin A-4 (CA4), a reference ligand of this domain composed of two aromatic rings (A and B) connected by an olefinic bridge, has drawbacks due to its physicochemical properties and configurational instability. Replacing the olefinic bridge in CA4 by a sulfonamide group preserves the *Z* configuration necessary for interacting with the binding site and increases the molecule's polarity.

Nowadays, most antimitotic sulfonamides with a 3,4,5-trimethoxyphenyl group as A ring have the sulfonamide nitrogen attached to this ring. In this doctoral thesis, 77 new sulfonamides based on CA4 have been synthesized with the sulfonamide group oriented in reverse. This project aims to evaluate the impact of this new orientation at the colchicine binding site and investigate the effects of various substituents on sulfonamide nitrogen.

Three families of new reversed sulfonamides emerged from this work, classified by the aromatic B ring: phenyl (family 1), naphthyl (family 2), and indolyl (family 3). All of them were evaluated *in vitro* against different human tumour cell lines. 25 of the new sulfonamides exhibited antitumor activity with an IC₅₀ lower than 1 micromolar against HeLa cancer cell line. Family 3, with an indole as B ring, is the most promising family with 17 out of these 25 active compounds.

The active compounds of families 2 and 3 were evaluated against nine cancer cell lines and three non-tumoral cell lines using a semiautomatic methodology during a short stay in the *Radiumhospitalet* of Oslo. MDA-MB468-paclitaxel resistant (PR) and BT474 exhibit resistance against the antimitotic drugs used as reference (paclitaxel, docetaxel, vincristine and vinblastine). However, the indole sulfonamides **65**, **97**, **100**, and **102**, which feature a cyanomethyl group on the sulfonamide bridge, do not lose activity against MDA-MB468-PR. On the other hand, the introduction of a methyl group on the sulfonamide nitrogen in this family, combined with the functionalization of the 3' position of the indole (**96**, **101**, and **104**), results in compounds that are not affected by resistance against BT474.

Their affinity for MDR proteins was evaluated, and most of them were not substrates of those proteins. Additionally, the mechanism of action of selected compounds from each family was assessed.

Antimitotic drugs interfere with tubulin dynamics, preventing chromosome segregation and arresting cells in mitosis. This effect was evaluated by flow cytometry, as well as the evaluation of apoptotic cell death. Apoptosis was also studied by measuring the activation of caspases 3 and 7. Finally, the integrity of the microtubular network was examined using immunofluorescence against different cell lines.

All the tested compounds induced cell cycle arrest at G₂/M stage, leading to apoptosis-mediated cell death. These effects, along with the disruption of the microtubular network caused by the treatment, suggest that the new sulfonamides operate via an antimitotic mechanism of action.

The pharmacokinetic properties of the active compounds were also studied. The aqueous solubility of the compounds from family 1 was empirically measured. All the compounds studied improved the aqueous solubility of CA4, and many of them also enhanced the solubility of ABT-751. Finally, *in silico* results from pharmacokinetic and mutagenicity studies demonstrated the favourable characteristics of the new ligands to be potential candidates for future preclinical studies.

ÍNDICE

Resumen.....	6
Abstract	8
1. Introducción	13
1.1 Tratamientos antimitóticos frente a la división celular	16
1.2 Tubulina como diana antitumoral	20
1.3 Dominio de la colchicina y combretastatina-A4	24
1.4 Vasculatura como diana antitumoral	27
1.5 Sulfonamidas como alternativa al puente olefínico	28
2. Planteamiento y objetivos.....	38
2.1 Diseño	39
2.2 Planteamiento sintético	42
2.3 Evaluación biológica	44
2.4 Objetivos	45
3. Resultados: síntesis química.....	46
3.1 Procedimiento general	47
3.2 Compuestos sintetizados.....	49
3.3 Síntesis de cloruro de 3,4,5-trimetoxibencenosulfonilo.....	51
3.4 Síntesis de aminas aromáticas.....	54
3.5 Síntesis de las sulfonamidas	57
3.6 Modificaciones sobre el puente sulfonamida	58
3.7 Modificaciones sobre la cadena del puente sulfonamida	60
3.8 Modificaciones en el fenilo del anillo B (familia 1).....	63
3.9 Modificaciones en el naftaleno (familia 2)	65
3.10 Modificaciones en el indol (familia 3)	66
4. Resultados: evaluación biológica	70
4.1 Estudios de proliferación celular	71
4.2 Evaluación de la actividad antiproliferativa	73
4.3 Efecto sobre el ciclo celular	94
4.4 Efecto directo sobre los microtúbulos.....	102
4.5 Estudios de muerte celular.....	106

4.6 Estudios de solubilidad.....	110
4.7 Predicción de mutagenicidad in silico	111
4.8 Predicciones ADME in silico	112
5. Conclusiones	117
6. Materiales y métodos	120
6.1 Reactivos y disolventes orgánicos	121
6.2 Técnicas instrumentales generales.....	121
6.3 Procedimientos generales de síntesis	122
6.4 Síntesis de materiales de partida (1-15).....	127
6.5 Síntesis de compuestos con fenilo en el anillo B (16-39)	135
6.6 Síntesis de compuestos con naftaleno en el anillo B (40-60)	150
6.7 Síntesis de compuestos con indol en el anillo B (61-106)	167
6.8 Métodos biológicos	199
7. Bibliografía	210
8. Apéndice	228

1. INTRODUCCIÓN

Desde el papiro de Edwin Smith, donde se registró el primer caso de cáncer alrededor del año 3000 a.C.¹, hasta los anticuerpos monoclonales, el conocimiento de la sociedad acerca del cáncer ha aumentado de manera exponencial. Pese al incesante avance, el cáncer sigue siendo una de las principales causas de muerte a nivel mundial.² En los últimos años se ha avanzado considerablemente en el conocimiento del cáncer y sus tratamientos, mejorando la supervivencia en muchos de ellos. Esto pone de manifiesto la relevancia de la ciencia y de la investigación en nuestra sociedad.

Lo que comúnmente se conoce como cáncer engloba un conjunto de más de 100 enfermedades que presentan como factor común un crecimiento celular descontrolado. Esta situación ocurre debido a alteraciones genéticas que generan un desequilibrio entre los procesos de división celular (mitosis) y de muerte celular.³ El desarrollo del cáncer puede dividirse en tres etapas. El primer estadio es la iniciación, en la cual una célula sufre una alteración genética favorable que transmitirá a sus clones tras la replicación. La célula que porta dicha mutación puede seguir sufriendo nuevas mutaciones, lo que da lugar a la fase de promoción. Cuando por selección natural se alcanza un conjunto de alteraciones que decantan la balanza a favor de la proliferación celular, se inicia la fase progresión. En esta fase se produce un crecimiento descontrolado que da lugar a la masa celular que comúnmente conocemos como tumor.^{4,5} Además, las células tumorales pueden diseminarse a otros tejidos, donde forman nuevos tumores en el proceso de metástasis (Figura 1).⁶

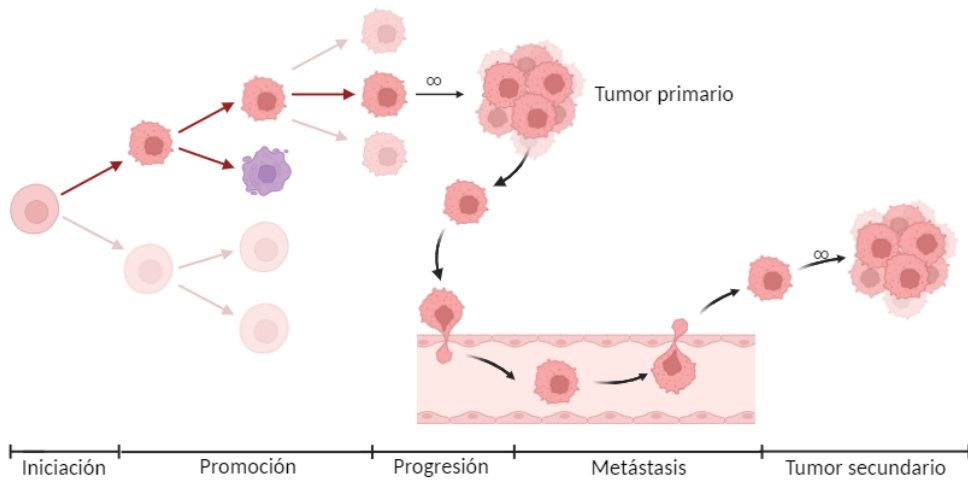


Figura 1. Esquema de la progresión del cáncer. Las células redondeadas representan células sanas, las que tienen el borde irregular simbolizan la presencia de mutaciones y la célula morada una célula muerta debido a una mutación desfavorable. Creado con BioRender.com

Junto a la cirugía, las estrategias clásicas empleadas para el tratamiento del cáncer son la radioterapia y la quimioterapia. Esta última presenta una demostrada efectividad, siendo el tratamiento de primera línea en múltiples tipos de cáncer.⁷ Hay una amplia variedad de estrategias quimioterapéuticas. Estas incluyen fármacos que inducen la muerte celular a través de mecanismos de apoptosis o autofagia, que actúan sobre el ADN provocando su ruptura o alquilación, que inhiben enzimas esenciales como la topoisomerasa, o que dificultan la división celular, como es el caso de los compuestos antimitóticos. Sin embargo, los efectos adversos asociados a los tratamientos quimioterápicos, junto con la constante aparición de resistencias, hacen necesaria la búsqueda de nuevas moléculas y estrategias.⁸

En los últimos años está cobrando protagonismo una nueva familia de tratamientos englobados bajo el término de inmunoterapia. Su fundamento se basa en el refuerzo del sistema inmune para hacer frente al cáncer. Estos avances han marcado una era, acercando los tratamientos hacia una medicina personalizada más específica y con menos efectos adversos. Sin embargo, hoy en día presentan también grandes limitaciones como el elevado coste o los fuertes efectos adversos inespecíficos que sufren determinados pacientes. En muchas ocasiones, especialmente en el caso de los tumores sólidos, los tratamientos de inmunoterapia no son lo suficientemente eficaces para hacer frente por sí solos a la enfermedad debido a la heterogeneidad y al complejo microambiente que los rodea. A todo esto, se suma la aparición de resistencias y las barreras físicas y fisiológicas que tienen que superar para acceder a ellos. Estas limitaciones hacen que sea necesario su uso en combinación con otros tratamientos quimioterápicos, poniendo de manifiesto la necesidad

de seguir avanzando hacia nuevas moléculas que mejoren las formulaciones actuales, evitando la aparición de resistencias.^{9,10}

Mirvetuximab soravtansine-gynx (Elahere™) es un ejemplo de ello, aprobado por la FDA en 2024 para el tratamiento del cáncer de ovario resistente. Se trata de un anticuerpo monoclonal conjugado con un fármaco quimioterápico. En concreto, se trata de un compuesto antimitótico derivado de maitansina que ejerce su acción sobre la tubulina.¹¹ Este ligando, al igual que otros antimitóticos utilizados en la terapéutica actual, interfiere con la dinámica de los microtúbulos, provocando un bloqueo de la mitosis y reduciendo la división celular. Es sobre esta diana donde centraremos nuestra atención a lo largo de este trabajo.

1.1 TRATAMIENTOS ANTIMITÓTICOS FRENTE A LA DIVISIÓN CELULAR

El ciclo celular en las células eucariotas se divide en interfase y división celular. En el caso de las células que forman el cuerpo humano, esta división se da por el proceso de mitosis. Este mecanismo se divide a su vez en cuatro fases bien definidas: profase, metafase, anafase y telofase (Figura 2A).

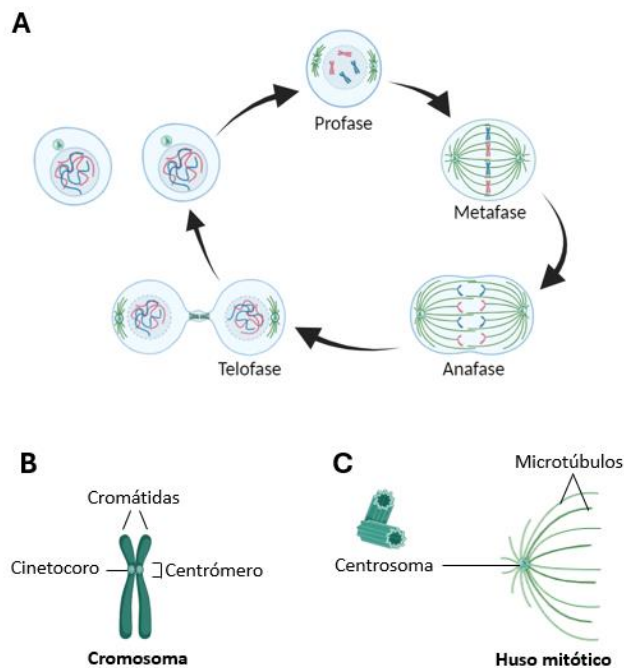


Figura 2. A) Etapas del proceso de mitosis: profase, metafase, anafase y telofase. B) Partes del cromosoma. C) Componentes del huso mitótico. Creado con BioRender.com

Durante la profase, la cromatina se empaqueta haciendo visibles los cromosomas (Figura 2B) y la membrana nuclear que los englobaba se descompone. Además, los centrosomas (Figura 2C) se disponen en polos opuestos de la célula desde donde los microtúbulos empiezan a polimerizar. La red de microtúbulos invade toda la célula, uniéndose algunos de ellos al cinetocoro de los cromosomas. Una vez que cada cromosoma está unido a un microtúbulo de cada polo, comienza la metafase. En esta etapa los cromosomas se alinean en el plano ecuatorial de la célula, conocido como placa metafásica.¹²⁻¹⁴

Acto seguido comienza la anafase, en la cual las cromátidas hermanas se separan por el cinetocoro, quedando cada una unida a un microtúbulo. Estos microtúbulos comienzan a acortarse, acercando las cromátidas al centrosoma. A su vez, los microtúbulos no unidos a ningún cinetocoro se alargan, ejerciendo presión unos contra otros y desplazando los centrosomas a polos opuestos de la célula. Por último, durante la telofase, las cromátidas alcanzan los polos de la célula, descondensan y se forma una nueva membrana nuclear. Los microtúbulos también despolimerizan por completo al final de esta etapa. Tras estas cuatro fases, la célula se divide en dos células hijas por medio de la citocinesis con ayuda de un anillo contráctil.¹²⁻¹⁴

En el balance entre la proliferación y la muerte celular, las células tumorales muestran un desequilibrio a favor de la división celular. Las terapias antimitóticas que se enfocan en frenar la mitosis han sido una de las estrategias más estudiadas en el campo de los quimioterápicos durante las últimas décadas.¹⁵ El grupo más destacado entre ellos es el que actúa contra el microtúbulo, teniendo como diana la tubulina.¹⁶ El microtúbulo es un polímero formado por dímeros de α - y β -tubulina que presenta la capacidad de polimerizar y despolimerizar de forma controlada en el interior celular (Figura 3A).¹⁷

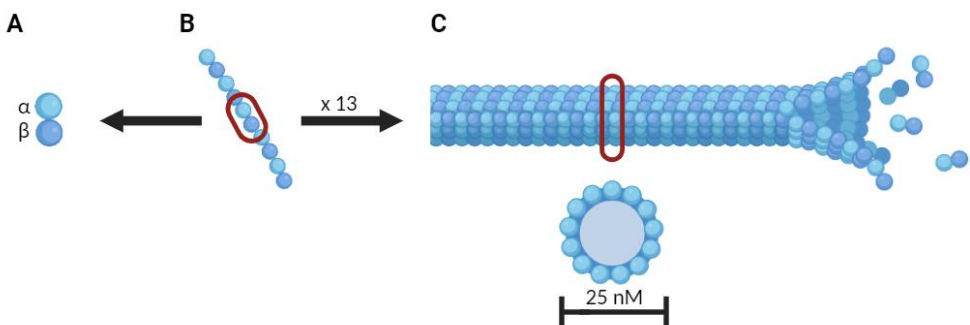


Figura 3. Estructura del microtúbulo. A) Dímery de α - y β -tubulina. B) Protofilamento de tubulina. C) Microtúbulo formado por 13 protofilamentos y su sección transversal. Creado con BioRender.com

Las subunidades de tubulina se encuentran formando dímeros, los cuales se agrupan cabeza-cola en hileras para formar los protofilamentos (Figura 3B). Trece protofilamentos se agrupan de manera lateral para formar un cilindro de aproximadamente 25 nM de diámetro que es lo que conocemos como microtúbulo (Figura 3C).¹⁸

Dada la importancia de los microtúbulos en la mitosis, existe un punto de control dedicado a verificar su correcto funcionamiento. El objetivo es evitar fallos en la replicación, obteniendo dos células hijas genéticamente idénticas.¹⁹ Este punto de control requiere que todos los cromosomas se encuentren unidos a un microtúbulo de cada polo y debidamente alineados en la placa metafásica. Si la célula supera el punto de control, se produce la activación del complejo promotor de la anafase/ciclosoma (CPA/C), un complejo multiproteico con actividad ubiquitina ligasa que permite la separación de las cromátidas durante la anafase.²⁰

El CPA/C se encarga de ubiquitinar a la securina, la cual es un inhibidor de separasa. La separasa es una proteasa encargada de romper las uniones de cohesina que mantienen unidas a las cromátidas hermanas. Por ello, cuando se degrada la securina, la separasa puede realizar su acción permitiendo el inicio de la anafase (Figura 4).²¹

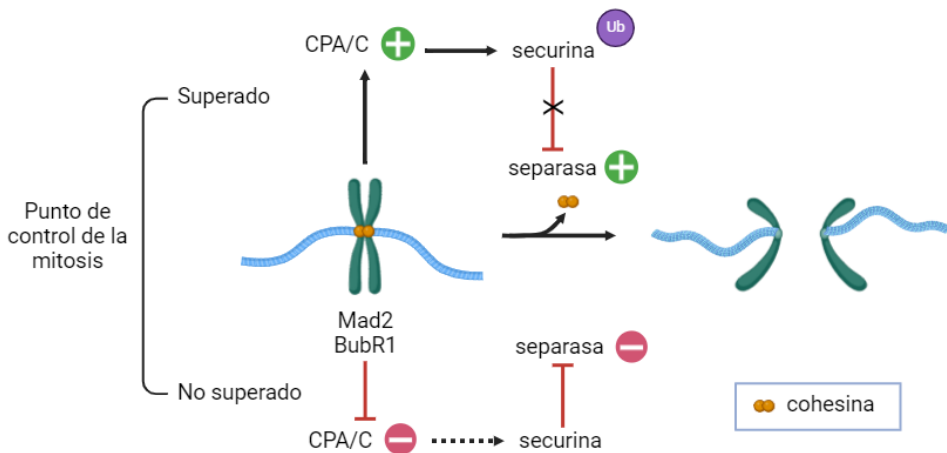


Figura 4. Efecto del complejo promotor de la anafase/ciclosoma como regulador de la mitosis. Creado con BioRender.com

En el caso contrario, si los cromosomas no se unen correctamente a los microtúbulos, el CPA/C no se activa. En este caso, las proteínas del punto de control de la mitosis Mad2 y BubR1 se activan, inhibiendo al CPA/C. De este modo, la securina se mantendría activa, ejerciendo su efecto inhibitorio sobre la separasa. Esto impide a la célula pasar de metafase

a anafase, produciendo un bloqueo del ciclo celular.²⁰ El objetivo de este bloqueo es aportar un tiempo extra a la célula para solventar este fallo en la unión a microtúbulos. En este paso, se abren varias posibilidades.¹⁹

Este bloqueo puede ser persistente, desencadenando la muerte celular desde esta fase de mitosis, o bien solucionarse el problema retomando el ciclo de forma normal. Sin embargo, en algunas ocasiones la célula podría saltarse el proceso de mitosis con las dos copias de ADN, dando lugar a una célula aberrante poliploide. Esta célula podría entrar en senescencia, manteniéndose activa en términos metabólicos, pero sin realizar la división celular. También podría producirse la muerte celular debido a los fallos arrastrados de una mitosis incompleta, o volver a entrar en mitosis con un contenido genético anormal (Figura 5).¹⁹

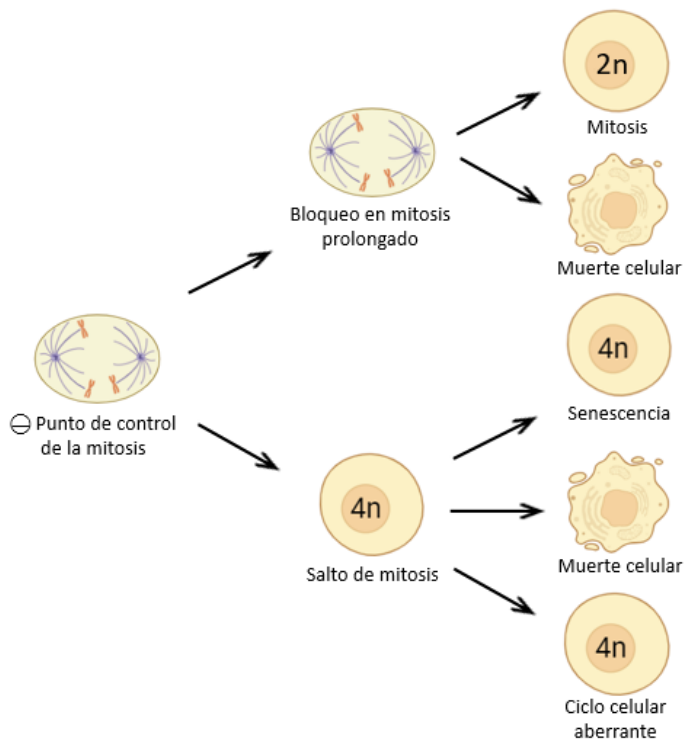


Figura 5. Consecuencias sobre la célula de la exposición a compuestos antimitóticos tras no superar el punto de control de la mitosis. Creado con BioRender.com

Fallos en el punto de control de la mitosis, que permiten la separación de las cromátidas sin cumplirse los requisitos mencionados anteriormente, dan lugar a células con material genético aberrante. Esta inestabilidad aumenta la posibilidad de obtener células

aneuploides, más propensas a desencadenar mutaciones y con ello a generar células tumorales.²²

Los compuestos antimitóticos afectan al microtúbulo y a su dinámica de polimerización. Esto dificulta la unión de los microtúbulos al cinetocoro de los cromosomas y su correcta alineación en la placa metafásica. Este efecto provoca que las células afectadas por compuestos antimitóticos no superen el punto de control, viéndose una acumulación de las mismas en la fase de mitosis. Si este bloqueo en mitosis se prolonga en el tiempo, las células entran en apoptosis, ejerciendo así el efecto citotóxico buscado por estos ligandos antitumorales.²³

Los microtúbulos además participan en el transporte de vesículas en el interior celular, el mantenimiento de su forma y en su movimiento, factores que también podrían estar involucrados en su actividad antitumoral.²⁴

1.2 TUBULINA COMO DIANA ANTITUMORAL

La primera estructura del dímero de tubulina obtenida por cristalografía fue conseguida por Nogales y colaboradores en 1998.²⁵ Desde entonces, su estudio ha dado lugar al descubrimiento de nuevos ligandos y sus correspondientes lugares de acción. Se conocen hasta el momento al menos 9 dominios de acción sobre la tubulina. Estos reciben el nombre del primer ligando que se describió para cada uno y se agrupan en dos grandes grupos en función de su efecto sobre la polimerización (estabilizador o desestabilizador).

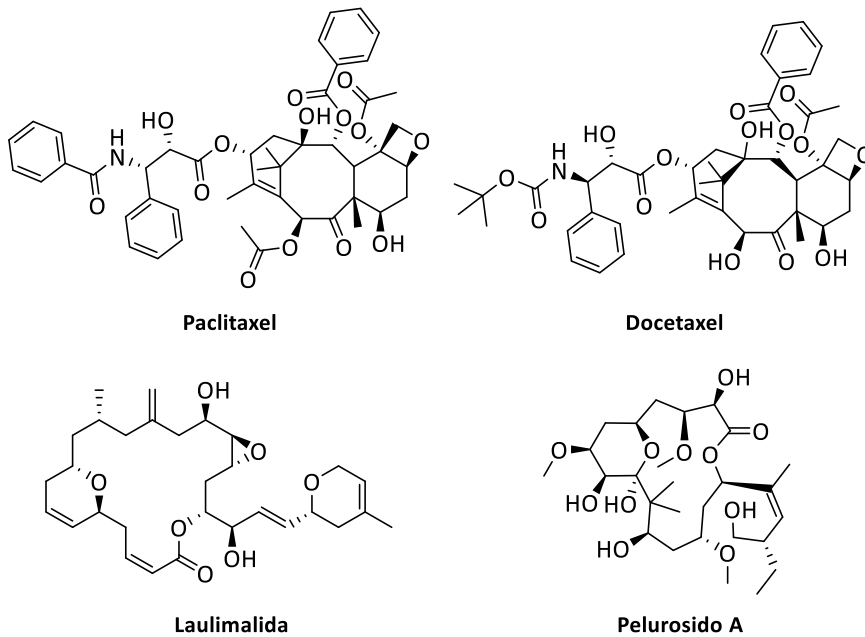


Figura 6. Estructura de los ligandos estabilizadores del microtúbulo más característicos.

Dentro de los lugares de acción con efecto estabilizador del microtúbulo encontramos dos lugares de acción: el sitio de unión de los taxanos²⁶ y el de la laulimalida/pelurosido A²⁷. Los taxanos son el grupo más relevante dentro de los estabilizadores del microtúbulo (Figura 6). La unión de ligandos como paclitaxel (Taxol®), docetaxel o cabazitaxel en el lugar de acción impide la curvatura de los protofilamentos que componen el microtúbulo al estabilizar sus contactos laterales, evitando su despolimerización.²⁶

Actualmente, estos derivados están en uso clínico como tratamiento de elección para diversos tipos de cáncer como mama, pulmón u ovario. Sin embargo, su marcado carácter lipófilo hace necesaria la administración junto a cosolventes, como el Cremophor®, que causan importantes efectos adversos. Esto, unido a la constante aparición de resistencias, hace necesaria la búsqueda de nuevas moléculas antitumorales.^{28,29}

Por otro lado, encontramos los sitios de unión que producen un efecto desestabilizador sobre los microtúbulos. El lugar de acción más destacado de este grupo es la región de los alcaloides de la vinca, siendo los primeros antimitóticos en ser aprobados para su uso en clínica. Ejemplos de estos ligandos con aplicación en el tratamiento del cáncer de mama, pulmón o sarcomas son vincristina, vinblastina o vinorelbina (Figura 7).³⁰

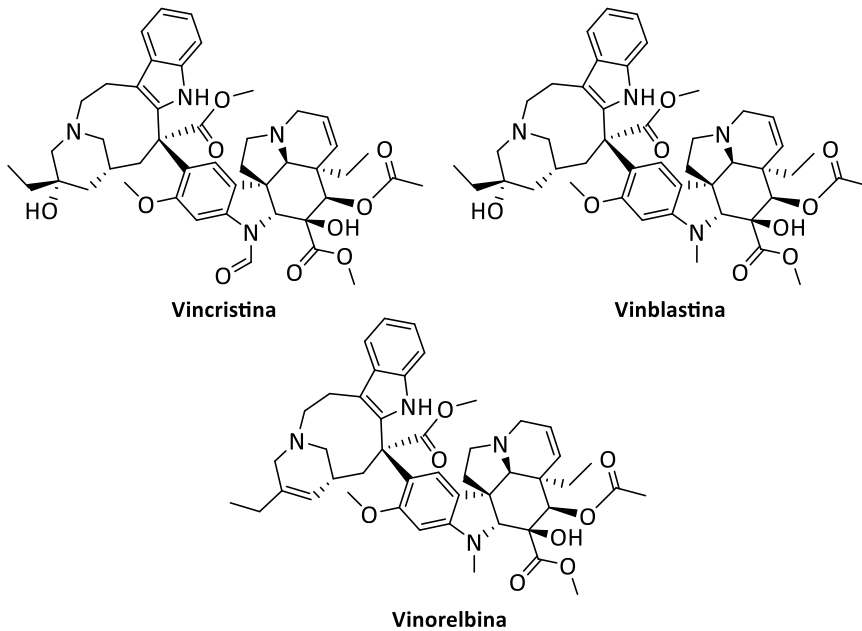


Figura 7. Estructura de alcaloides de la vinca desestabilizadores del microtúbulo.

Otro de los dominios sobre la tubulina con efecto desestabilizador es el lugar de acción de la colchicina. Desde que Ravelli y colaboradores en 2004 caracterizaron el dominio por rayos X, gran cantidad de ligandos se han ido sintetizando y evaluando frente a este lugar de acción.³¹ Entre estas familias se encuentran las combretastatinas, una serie de compuestos con esqueleto de estilbeno en el que se centra el diseño de este trabajo y comentaremos en profundidad más adelante.^{32,33}

Los sitios de acción de la maitansina³⁴, de la pironetina³⁵, de la eribulina³⁶, del totalam³⁷ y el sitio de la gatorbulina-1³⁸ son otros dominios presentes en la tubulina que generan un efecto desestabilizador de los microtúbulos (Figura 8).

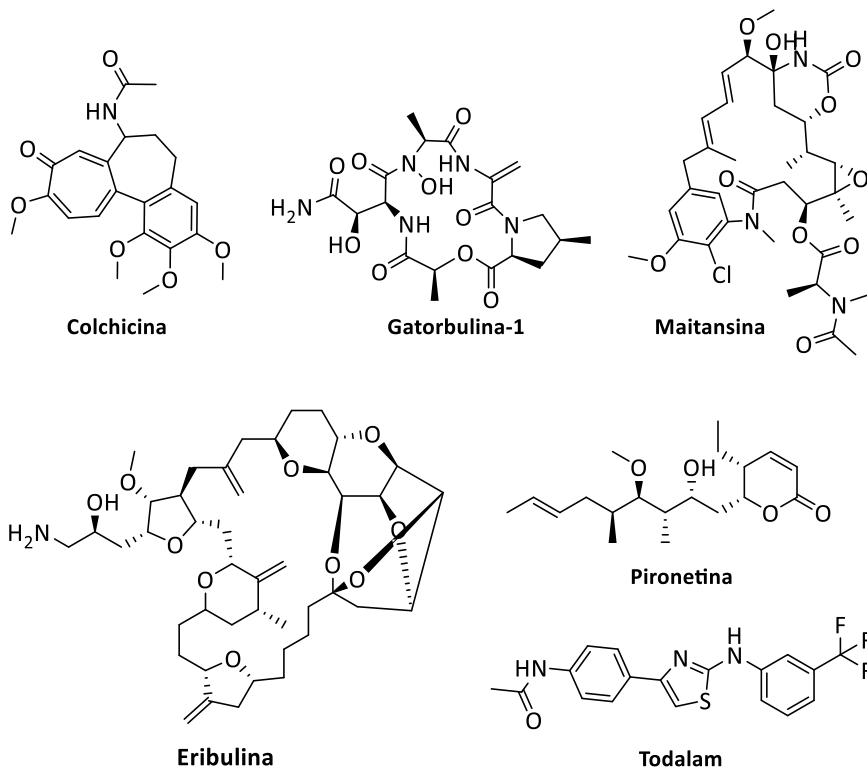


Figura 8. Estructura de ligandos desestabilizadores del microtúbulo.

A pesar de la amplia variedad de sitios de unión y ligandos antimitóticos descritos hasta el momento, su uso en clínica se ve limitado por diversos inconvenientes. Muchos antimitóticos conllevan importantes efectos adversos como neurotoxicidad o neutropenia, lo que genera una ventana terapéutica estrecha y limitaciones en las dosis empleadas.³⁹ A estas desventajas se suma la baja solubilidad de muchos de ellos, lo que requiere su formulación con solventes que pueden aumentar la toxicidad asociada a dichos tratamientos antitumorales.⁴⁰ Estos inconvenientes dificultan la llegada de muchos de los compuestos antimitóticos actuales a la clínica.

Adicionalmente, los tratamientos antimitóticos presentan recurrentes resistencias, que bajan su eficacia dando lugar al fracaso terapéutico. Entre ellas se encuentra la aparición de resistencias mediadas por modificaciones en la diana. Estas resistencias no solo son causadas por mutaciones puntuales, sino también por la existencia de diferentes isoformas para cada subunidad de tubulina.⁴¹ Por ejemplo, se ha comprobado que el aumento en la expresión de la isoforma β III de la β -tubulina conduce a una resistencia a los tratamientos con paclitaxel y vinorelbina.⁴² Otra vía de resistencia es la sobreexpresión de proteínas transportadoras de membrana (MDR) como la glicoproteína-P, las cuales expulsan del

interior celular de manera no específica moléculas entre las que se encuentran las mencionadas anteriormente.⁴³

En este marco cobra importancia el estudio del dominio de la colchicina como alternativa a los tratamientos antimetabólicos actuales. Se ha demostrado que la colchicina no se ve afectada por la sobreexpresión de la isoforma β III, a diferencia de paclitaxel y vinorelbina.⁴⁴ Otra de las ventajas de los ligandos del sitio de colchicina es que muchos de ellos son capaces de evitar las resistencias mediadas por MDR, presentando actividad frente a líneas resistentes a paclitaxel o vincristina.⁴⁵ Además, generalmente son más sencillos a nivel estructural, lo que los hace más abordables sintéticamente. Esto permite modificar los ligandos existentes con el fin de buscar incrementos en su actividad citotóxica o en su solubilidad acuosa para mitigar los inconvenientes mencionados anteriormente.⁴⁶

1.3 DOMINIO DE LA COLCHICINA Y COMBRETASTATINA-A4

El dominio de la colchicina se compone de tres zonas bien definidas (Figura 9).^{47,48} La zona central, alojada en la subunidad β , se denomina zona 2 y es la que ocupan la gran mayoría de los ligandos de este lugar de acción. En el caso de la colchicina, el anillo que posee tres metoxilos (anillo A) es el que se aloja en este bolsillo. Junto a él, en la interfaz de ambas subunidades encontramos la zona 1. La colchicina aloja su anillo de tropolona en esta región (anillo B). Por último, la zona 3 es una región incrustada más profunda en la subunidad β y formada por residuos más polares la cual no se ocupa en la unión de colchicina.⁴⁷

Pocos son los ligandos que interaccionan con las tres zonas del dominio de la colchicina. El más conocido es ABT-751, una sulfonamida de administración oral formada por tres anillos aromáticos.^{49,50} Los ligandos más clásicos se unen a las zonas 1 y 2, presentando generalmente dos anillos aromáticos que se conectan entre sí por un puente. Por su parte, las zonas 2 y 3 se encuentran ligeramente solapadas, lo que hace que los compuestos que se acoplan a ellas presenten estructuras más difíciles de dividir en dos regiones.⁴⁸

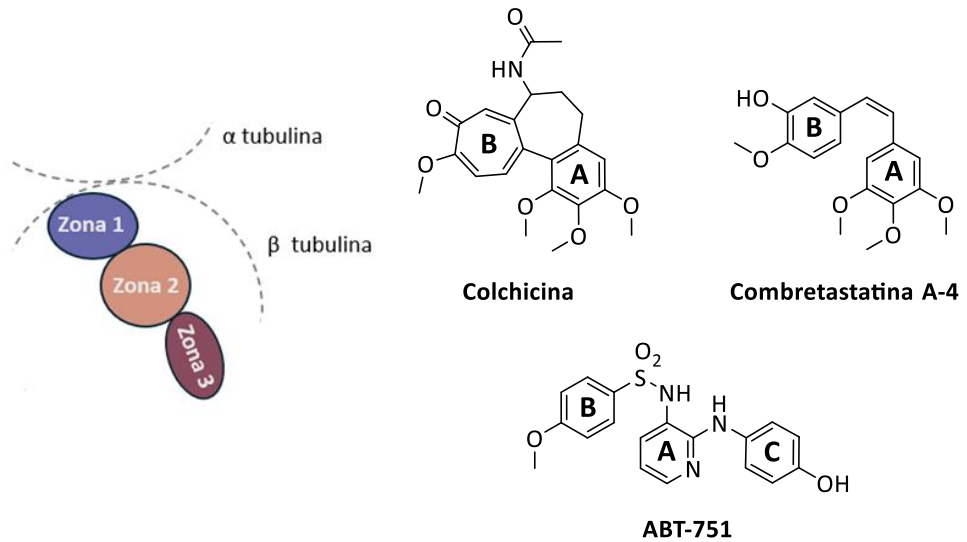


Figura 9. Zonas que componen el dominio de la colchicina y tres ejemplos de ligandos que se unen a este dominio.

La familia de las combretastatinas engloba un conjunto de estructuras que contienen dos anillos aromáticos unidos por un puente, los cuales se unen a las zonas 1 y 2. Estas moléculas interactúan con una gran afinidad con el dominio de la colchicina, generando un efecto desestabilizador del microtúbulo.⁵¹ Su unión impide la correcta estabilización del huso mitótico, dificultando su adhesión al cinetocoro de los cromosomas y deteniendo el ciclo celular en el punto de control. Al igual que otros compuestos antimitóticos, las combretastatinas bloquean la mitosis, lo que resulta en la acumulación de células en esta fase del ciclo y la inducción de la muerte celular.⁵²

Dentro de la familia de las combretastatinas, es la combretastatina A-4 (CA4) la que usaremos como modelo estructural debido a su gran efecto citotóxico. Desafortunadamente, no es posible su aplicación en terapéutica debido a que presenta unas propiedades farmacocinéticas desfavorables.⁵³ Su estructura es relativamente sencilla, formada por dos anillos aromáticos conectados por un puente olefínico. Esto nos permite dividir su estudio en 3 zonas claramente definidas: anillo A, anillo B y puente (Figura 10).⁵⁴

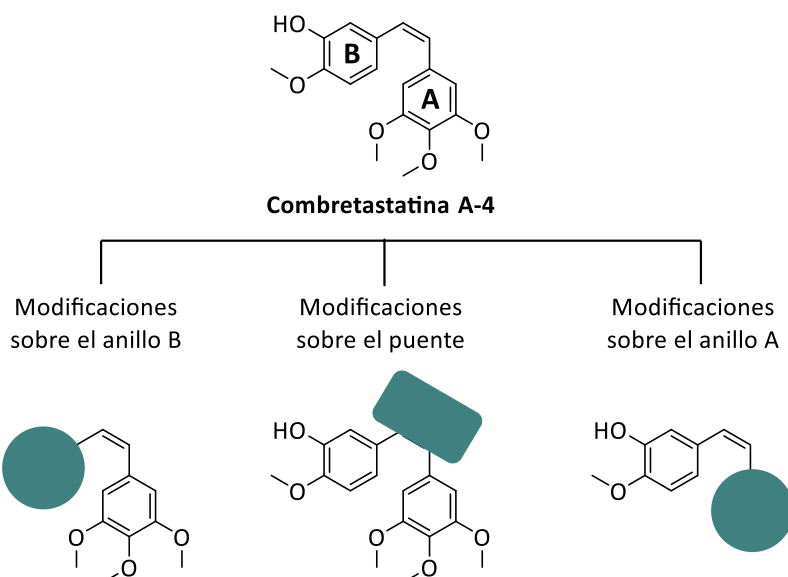


Figura 10. Tres estrategias de modificación sobre la CA4 en la búsqueda de nuevos análogos.

El anillo A, al igual que en la colchicina, cuenta con tres metoxilos como sustituyentes del anillo bencénico. Este anillo se encuentra presente en la mayoría de los análogos de combretastatina que presentan una elevada actividad antiproliferativa. Durante mucho tiempo se creyó que su presencia era indispensable para la interacción con la diana.⁵¹ Sin embargo, este anillo aporta a la estructura una elevada carga hidrofóbica y malas características farmacocinéticas debido a su tamaño. Por ello, se han intentado buscar alternativas realizando ligeras modificaciones que han permitido encontrar análogos que mantienen la actividad citotóxica.⁵⁵⁻⁵⁷ Aun así, muchos de los análogos que se diseñan en base a la CA4 se decantan por mantenerlo debido a la potencia antimetabólica que aporta.

Respecto al anillo aromático B, la CA4 presenta un anillo de 3-hidroxi-4-metoxifenilo. Se ha modificado el patrón de sustitución sobre dicho anillo bencénico, obteniendo resultados especialmente beneficiosos cuando se mantiene en la posición *para* un grupo metoxilo⁵⁵ o metilamina.⁵⁸ Además, se encuentran análogos que sustituyen el fenilo por sistemas aromáticos más voluminosos como por ejemplo indolilos⁵⁹, quinolilos⁶⁰, naftilos⁶¹ y demás sistemas benzofusionados⁶². Esta gran variedad de anillos aromáticos y sustituyentes nos demuestran que esta región es la que mejor acepta las modificaciones sobre la estructura de la CA4.

Los dos anillos aromáticos de la CA4 están unidos por un puente olefínico en una disposición *cisoid*. La región del puente influye en gran medida en la orientación de la molécula que se requiere para la interacción con la diana.⁶³

La configuración *E* en la CA4 es mucho menos favorable que la configuración *Z* a la hora de interactuar con el dominio de la colchicina.⁶⁴ Este es uno de los mayores inconvenientes que presentan las combretastatinas. En disolución, o expuesta a determinadas condiciones como a la luz, temperaturas elevadas o el medio ácido, la CA4 isomeriza a su forma inactiva.⁵¹ Por tanto, se han estudiado varias modificaciones del puente con el fin de fijar la orientación activa y aumentar su solubilidad acuosa, otro de los inconvenientes de la CA4.

Estas variaciones se clasifican en función de la longitud del puente. Análogos con un puente de un átomo de longitud han dado lugar a compuestos con actividad antimetabólica, entre los que encontramos isocombretastatinas⁶⁵, fenstatinas⁶¹, aminas⁶⁶ o éteres⁶⁷. Estos derivados no presentan capacidad de isomerizar, lo que los mantiene siempre en su orientación favorable.

Debido a su similitud con el puente olefínico, se han estudiado un gran número de familias con puentes de dos átomos. Entre ellas, encontramos por ejemplo puentes metilamino⁶⁸, amidas⁶⁸, sulfonatos⁶⁹ o sulfonamidas⁵⁰, entre otras alternativas. Estas aportan flexibilidad y mayor polaridad al puente que conecta los dos anillos aromáticos. Otra estrategia seguida es fijar la disposición *cisoides* utilizando como puente heterociclos aromáticos como pirrol⁷⁰, furano⁷¹, isoxazol⁷², tetrazol⁵⁷ o benzoderivados⁷³ entre otros.

Por último, se encuentran puentes de tres átomos representados especialmente por el grupo de las chalconas.⁷⁴ Además, siguiendo la estrategia de fijar la configuración activa empleando heterociclos como puente, encontramos diferentes anillos con sustituciones 1,3 como por ejemplo oxazoles⁷⁵ o piridinas⁷⁶.

1.4 VASCULATURA COMO DIANA ANTITUMORAL

Cuando un tumor sólido adquiere un tamaño mínimo, este requiere de la formación de nuevos vasos sanguíneos que aporten a las nuevas células los nutrientes y el oxígeno necesarios para su desarrollo y proliferación. El proceso de creación de nueva vasculatura es lo que se conoce como angiogénesis. Estos nuevos vasos sanguíneos se han estudiado como diana en la búsqueda de tratamientos frente al cáncer. El crecimiento celular exponencial que se observa en los tumores aumenta considerablemente la demanda de nutrientes en la zona. Sin el crecimiento de una red vascular que los aporte, la proliferación celular se vería limitada o reducida.⁷⁷

Las células endoteliales son genéticamente estables, produciéndose sobre ellas pocas mutaciones y, por ello, siendo menos propensas a la aparición de resistencias. Tener como diana los vasos vasculares tumorales podría generar un problema de selectividad respecto al resto de vasos sanguíneos. Sin embargo, las redes vasculares tumorales presentan un

estado inmaduro, más desorganizado y permeable respecto al resto de vasos. Esto los hace más sensibles a los tratamientos, aumentando la ventana terapéutica y disminuyendo la toxicidad frente al resto de vasos sanguíneos.⁷⁸

Existen dos estrategias de acción sobre dicha vasculatura. Si el objetivo es evitar la formación de estos vasos, estamos ante una acción antiangiogénica, mientras que si la diana son los vasos inmaduros ya formados hablamos de un efecto disruptor vascular.⁷⁹

Compuestos como CA4, colchicina, vinblastina o ABT-751 generan este efecto disruptor vascular tumoral a dosis inferiores a las citotóxicas.⁸⁰ Varios estudios se han centrado en estudiar no solo su efecto antimetabólico, sino también su actividad disruptora vascular. El citoesqueleto, responsable de la forma celular y las conexiones célula-célula, se ve afectado al alterar la dinámica microtubular. Esto desencadena un incremento en la permeabilidad vascular, una reducción del flujo sanguíneo en la zona afectada, seguido de vasoconstricción para compensar la caída de la presión y, en última instancia, necrosis.⁸¹

Este efecto disruptor vascular de los compuestos antimetabólicos se ha explorado como una opción en el tratamiento de tumores sólidos. Diferentes ensayos clínicos que combinan radioterapia o quimioterapia junto con antimetabólicos con efecto sobre la vasculatura a bajas dosis han explorado esta posible alternativa.⁸²

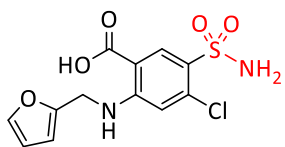
1.5 SULFONAMIDAS COMO ALTERNATIVA AL PUENTE OLEFÍNICO

Las sulfonamidas, cuya fórmula general es $R-SO_2-NR^1R^2$, constan de un grupo sulfona unido a una amina. En función del grado de sustitución del nitrógeno, las sulfonamidas se clasifican en primarias ($R-SO_2-NH_2$), secundarias ($R-SO_2-NHR^1$) y terciarias ($R-SO_2-NR^1R^2$).

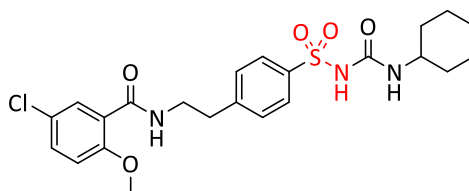
Este grupo sulfonamida ha despertado gran interés debido a su accesibilidad sintética y su presencia en diversas moléculas bioactivas. La furosemida con efecto diurético⁸³, la glibenclamida empleada en el tratamiento de la diabetes⁸⁴, las sulfamidas antibacterianas⁸⁵ o la acetazolamida inhibidora de la anhidrasa carbónica⁸⁶ son ejemplos de fármacos que presentan un grupo sulfonamida en su estructura (Figura 11).

El grupo sulfonamida también se encuentra presente en un gran número de compuestos antimetabólicos. Debido a su polaridad y estabilidad el grupo sulfonamida es una buena alternativa al puente olefínico en la búsqueda de análogos de CA4.⁵⁰

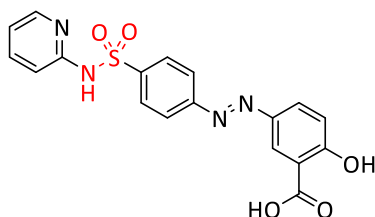
Las sulfonamidas antimetabólicas que se dirigen al dominio de la colchicina se pueden clasificar en dos grandes grupos según las zonas de unión que ocupan. Un grupo incluye a los ligandos que ocupan las tres zonas previamente descritas, mientras que el otro grupo está compuesto por sulfonamidas que se dirigen a las zonas 1 y 2.



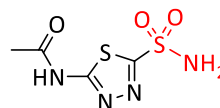
Furosemida
(efecto diurético)



Glibenclamida
(hipoglucemiante)



Sulfasalazina
(antibacteriana)



Acetazolamida
(inhibidor de la enzima
anhidrasa carbónica)

Figura 11. Ejemplos de sulfonamidas con actividad biológica usadas en clínica.

1.5.1 SULFONAMIDAS ANTIMITÓTICAS DIRIGIDAS A LAS ZONAS 1-2-3

Las sulfonamidas diseñadas para ocupar los 3 bolsillos del dominio de la colchicina suelen estar formadas por tres anillos aromáticos. La sulfonamida se encuentra generalmente uniendo el anillo A con el B, siendo el anillo A de menor tamaño respecto al de los análogos dirigidos a las zonas 1-2 que veremos a continuación. La presencia de dicho anillo menos voluminoso habilita la entrada del tercero en la zona 3, más profunda en la proteína.⁴⁸

El cabeza de serie de este grupo de compuestos es ABT-751, el cual ha alcanzado ensayos clínicos en fase II.⁸⁷ También conocido como E7010, es una sulfonamida de administración oral que ocupa las zonas 1 y 2, además de parcialmente la zona 3. ABT-751 presenta actividad frente a líneas celulares resistentes a vincristina, doxorubicina o cisplatino, además de no ser sustrato de los transportadores MDR. Pese a ello, no ha llegado más lejos en su desarrollo por falta de efectividad en los ensayos clínicos.⁸⁸⁻⁹⁰ Se han investigado nuevas sulfonamidas basadas en la estructura de ABT-751, pero ninguna de ellas ha avanzado hasta ensayos clínicos. Ejemplos de sulfonamidas con efecto antimitótico que ocupan las tres zonas del dominio de la colchicina se presentan en la Figura 12.^{91,92} Pese a presentar actividad citotóxica, sus potencias se sitúan lejos de las obtenidas por análogos clásicos de las zonas 1-2.

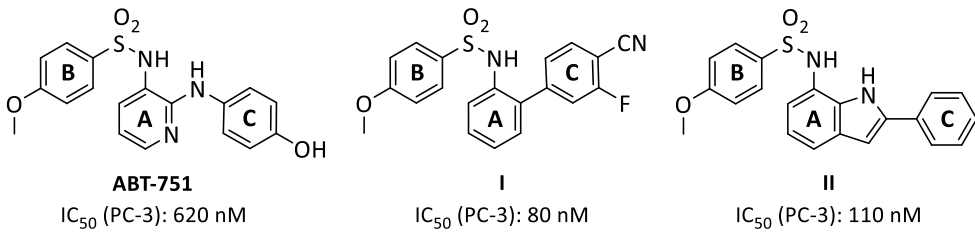


Figura 12. Sulfonamidas dirigidas a las zonas 1, 2, y 3 del dominio de la colchicina.

1.5.2 SULFONAMIDAS ANTIMITÓTICAS DIRIGIDAS A LAS ZONAS 1-2

Dentro de los ligandos de las zonas 1-2, nos centraremos en las sulfonamidas que toman como modelo estructural la CA4. Las sulfonamidas análogas de la CA4 son sulfonamidas secundarias. Por ello, presentan sobre su nitrógeno un punto de anclaje para introducir nuevas modificaciones en busca de mejores potencias o propiedades farmacocinéticas. En función de la dirección del puente sulfonamida, estas modificaciones se dirigen hacia una zona u otra de la diana. Se ha realizado una búsqueda bibliográfica de las sulfonamidas antimitóticas del sitio de la colchicina sintetizadas y evaluadas hasta el momento.

Tras analizar los resultados, se observa un claro desbalance en el número de ligandos descritos con una y otra dirección. Basándonos en esto, clasificaremos como “dirección clásica” al grupo de sulfonamidas más abundante. Estas son las que presentan sobre el anillo A el grupo amino (-NH-), mientras que cuando se encuentre el grupo sulfona (-SO₂-) hablaremos de “dirección reversa” (Figura 13).

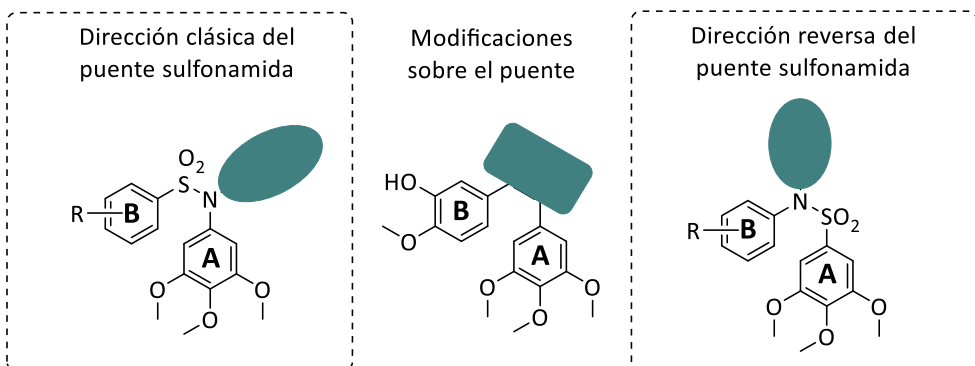


Figura 13. Clasificación de las sulfonamidas dirigidas a las zonas 1-2 en función de las posibles direcciones del puente.

- **Sulfonamidas clásicas**

Existen diferentes combinaciones de anillos sintetizadas y evaluadas que forman parte de las denominadas sulfonamidas clásicas. Para su mejor análisis, centraremos su clasificación en función del anillo A que presentan. Debido a la gran variedad de líneas celulares empleadas a lo largo de las diferentes publicaciones, no es posible comparar sus potencias frente a la misma línea celular. En este capítulo se presentan los valores de IC₅₀ en la línea que más presente esté respecto al resto de publicaciones consultadas.

Sulfonamidas clásicas que mantienen el anillo A de 3,4,5-trimetoxifenilo.

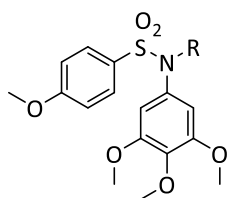
Como hemos mencionado anteriormente, el anillo A en la CA4 es un 3,4,5-trimetoxifenilo, el cual tiene bastante influencia en la actividad citotóxica. Se han sintetizado y evaluado numerosos análogos que mantienen este anillo unido al nitrógeno de la sulfonamida, realizando variaciones sobre el anillo B.

Comenzando por los análogos que presentan un fenilo como anillo B, predominan los que mantienen en la posición *para* un metoxilo (Figura 14). Se trata de un anillo muy similar al 3-hidroxi-4-metoxifenilo de la CA4. En este caso, se elimina el hidroxilo de la posición 3, punto clave para el metabolismo por glucuronidación.⁹³

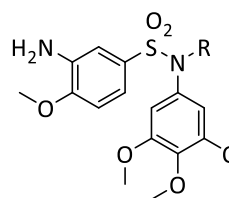
El compuesto sin sustituir **III** presenta una IC₅₀ frente a HeLa en el rango submicromolar (240 nM). Sin embargo, al introducir sobre el nitrógeno de la sulfonamida pequeños sustituyentes como metilo (**IV**), etilo (**V**) o acetonitrilo (**VI**) la potencia aumenta ligeramente (71, 99 y 143 nM, respectivamente).⁹⁴ Incluso se han estudiado sustituyentes voluminosos, siendo el más efectivo de todos ellos un 4-metoxibencilo (**VII**).⁹⁵ Sin embargo, la actividad citotóxica se ve perjudicada con esta modificación, aumentando su IC₅₀ a 870 nM frente a la línea celular MCF7.

Sobre el anillo B también se ha mantenido el patrón de sustitución 3,4 de la CA4, pero con la sustitución del grupo hidroxilo por una amina primaria. Este cambio mejora la potencia en las parejas frente al 4-metoxifenilo como anillo B (**III** vs **VIII**, **IV** vs **IX**, **V** vs **X**, **VI** vs **XI**), pero aún lejos de los valores dados en dicha publicación para la CA4 (2 nM frente a HeLa). También en estos rangos de actividad se mueven los ligandos **XII-XV**, que presentan metilaminas o dimetilaminas en lugar de un metoxilo en la posición 4.⁹⁴

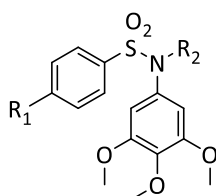
Sobre el anillo B de fenilo se han introducido también grupos más voluminosos como 2-oxoimidazolidina.^{96,97} El mejor compuesto de la serie (**XVII**) presenta una IC₅₀ frente a MCF7 de 18 nM. Sobre su estructura, se han estudiado profármacos (**XVIII**) o sales con el objetivo de mejorar sus propiedades farmacocinéticas, resultando desfavorable para su potencia citotóxica.^{98,99}



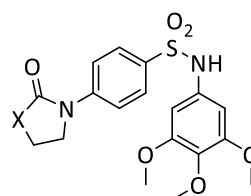
III: R = H	IC ₅₀ (HeLa) = 240 nM
IV: R = Me	IC ₅₀ (HeLa) = 71 nM
V: R = Et	IC ₅₀ (HeLa) = 143 nM
VI: R = CH ₂ CN	IC ₅₀ (HeLa) = 99 nM
VII: R = 4-MeOBn	IC ₅₀ (MCF7) = 870 nM



VIII: R = H	IC ₅₀ (HeLa) = 260 nM
IX: R = Me	IC ₅₀ (HeLa) = 23 nM
X: R = Et	IC ₅₀ (HeLa) = 38 nM
XI: R = CH ₂ CN	IC ₅₀ (HeLa) = 60 nM



XII: R ₁ = NHCH ₃ ; R ₂ = H	IC ₅₀ (HeLa) = 607 nM
XIII: R ₁ = NHCH ₃ ; R ₂ = Me	IC ₅₀ (HeLa) = 44 nM
XIV: R ₁ = N(CH ₃) ₂ ; R ₂ = H	IC ₅₀ (HeLa) = 230 nM
XV: R ₁ = N(CH ₃) ₂ ; R ₂ = Me	IC ₅₀ (HeLa) = 63 nM



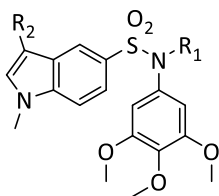
XVI: X = CH ₂	IC ₅₀ (MCF7) = 88 nM
XVII: X = NH	IC ₅₀ (MCF7) = 18 nM
XVIII: X = NBu	IC ₅₀ (MCF7) = 250 nM

Figura 14. Sulfonamidas clásicas más potentes con 3,4,5-trimetoxifenilo como anillo A y un único anillo como anillo B.

Otra estrategia descrita es la ampliación del anillo B a sistemas policíclicos. Los mejores resultados se obtienen generalmente empleando benzofusionados con heterociclos nitrogenados (Figura 15). El uso de un *N*-metil-1*H*-indol como anillo B ha dado lugar a análogos muy interesantes. A-293620 (**XIX**) y su profármaco A-318315 (**XX**) han sido evaluados demostrando efectividad *in vivo* y evitando las resistencias mediadas por MDR.¹⁰⁰ La introducción de un anillo indólico permite realizar nuevas modificaciones sobre el anillo B, habiéndose estudiado únicamente las modificaciones sobre su posición 3. La introducción de grupos polares podría mejorar las propiedades farmacocinéticas desfavorables que aporta la combinación indol-trimetoxifenilo. Aunque los análogos estudiados (**XXI-XXIII**) bajan su potencia al modificar la posición 3 (IC₅₀ frente a HeLa 41 y 12 nM, respectivamente), esta se mantiene en valores aceptables.¹⁰¹ Tomando como punto de partida el 4-metoxifenilo, encontramos la ampliación del anillo B usando un 7-metoxibenzimidazol4-il (**XXIV**) el cual pierde por completo su actividad citotóxica.¹⁰²

Manteniendo el 3,4,5-trimetoxifenilo como anillo A también se han estudiado carbazoles como anillo B (**XXV-XXVII**). Pese a que su actividad se ve reducida respecto a los ligandos

anteriores, que presenten potencias en el rango submicromolar nos da una idea del volumen que acepta el bolsillo del anillo B.¹⁰³



A-293620 (**XIX**): $R_1 = H$; $R_2 = H$

IC_{50} (HeLa) = 11 nM

A-318315 (**XX**): $R_1 = COCH_2N(CH_3)_2$; $R_2 = H$

Profarmaco

XXI: $R_1 = Me$; $R_2 = H$

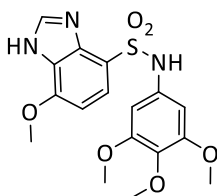
IC_{50} (HeLa) = 2 nM

XXII: $R_1 = Me$; $R_2 = CHO$

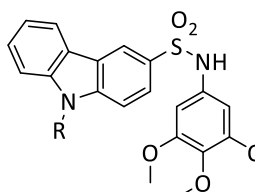
IC_{50} (HeLa) = 41 nM

XXIII: $R_1 = Me$; $R_2 = CN$

IC_{50} (HeLa) = 12 nM



XXIV Inactivo



XXV: $X = H$ IC_{50} (CEM) = 606 nM

XXVI: $X = Me$ IC_{50} (CEM) = 46 nM

XXVII: $X = Et$ IC_{50} (CEM) = 56 nM

Figura 15. Sulfonamidas clásicas con 3,4,5-trimetoxifenilo como anillo A y un anillo aromático benzofusionado como anillo B.

Anillos de quinolina también han demostrado la capacidad de ocupar el lugar del anillo B en sulfonamidas dirigidas a las zonas 1-2. En concreto, formando parte de ligandos híbridos que presentan la capacidad dual de inhibir tanto la polimerización de la tubulina como la acción de la histona demetilasa específica de lisinas (LSD1). Esto se ha conseguido gracias a introducir sobre el puente sulfonamida cadenas alquílicas de diferentes longitudes, terminadas en un ditiocarbamato unido a una piperazina (Figura 16). También se ha estudiado el anillo 4-metoxifenilo como anillo B en estos compuestos híbridos. Sin embargo, sus valores de IC_{50} se encuentran en el rango submicromolar, muy superior a los ligandos comentados anteriormente.^{104,105}

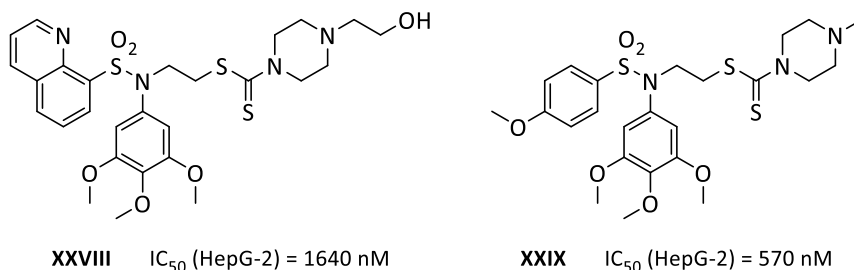


Figura 16. Ligandos híbridos (inhibidores duales de la polimerización de la tubulina y LSD1) con estructura de sulfonamidas clásicas.

Sulfonamidas clásicas que modifican el anillo A.

Pese a que el anillo de 3,4,5-trimetoxifenilo siempre se ha considerado esencial para la actividad citotóxica, se han estudiado alternativas debido a que es un anillo que aporta una fuerte carga hidrofóbica a la molécula. La sustitución de uno de los metoxilos por una amina primaria o secundaria sustituida con grupos voluminosos dio lugar a la pérdida de la actividad. Sin embargo, la introducción de una metilamina sobre la posición *meta* dio lugar a compuestos activos (Figura 17). Estos mantienen o pierden ligeramente potencia, como se observa en la comparación de las parejas **III** vs **XXX** (240 nM vs 411 nM) y **IV** vs **XXXI** (71 nM vs 71 nM).¹⁰⁶

La eliminación o el cambio de posición de los metoxilos sobre el anillo A da lugar a pérdidas considerables en la potencia citotóxica, siendo los compuestos más potentes del rango submicromolar. Un cambio más favorable fue la introducción de un 4-bromo-2,5-dimetoxifenilo, el cual mejoraba incluso los valores de sus análogos con el 3,4,5-trimetoxifenilo (**III** vs **XXXII**, **IV** vs **XXXIII** y **VI** vs **XXXIV**) a valores de IC_{50} en torno a 40 nM frente a la línea celular HeLa.¹⁰⁷

Si nos centramos en los compuestos que presentan un *N*-metil-1*H*-indol como anillo B, se probaron diferentes patrones de sustitución de los metoxilos, resultando siempre desfavorables frente al compuesto **XXII** que mantenía el anillo de 3,4,5-trimetoxifenilo.¹⁰¹

En el caso de los análogos que presentan un anillo de carbazol como anillo B y como anillo A un anillo de 3,5-dimetoxifenilo, la potencia se reduce considerablemente en comparación con **XVII**. Sin embargo, otras de las modificaciones estudiadas sobre este esqueleto mantienen la potencia por debajo de 100 nM. Esto se consigue con fenilos con patrones de metoxilación en 2,4; 2,5 y 2,4,6 o tras la introducción de átomos de cloro en sustitución de alguno de estos metoxilos.¹⁰³

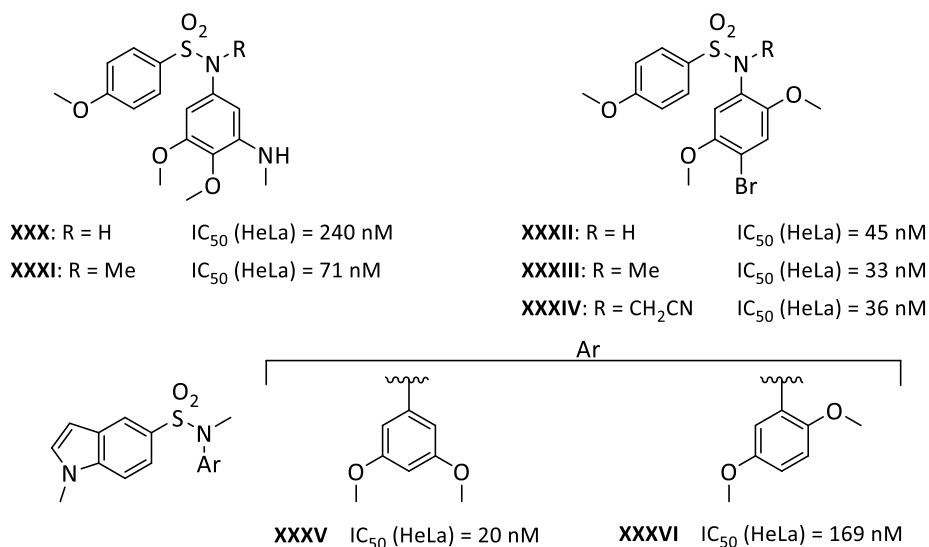


Figura 17. Sulfonamidas clásicas con modificaciones sobre el anillo A.

Por tanto, en el caso de las sulfonamidas clásicas existen múltiples modificaciones sobre el anillo de 3,4,5-trimetoxifenilo que dan lugar a compuestos con actividad citotóxica. No obstante, en muchas de las familias es más favorable cuando este anillo se mantiene, dando lugar a antimitóticos de mayor potencia.

- **Sulfonamidas reversas**

Respecto al grupo de sulfonamidas con dirección reversa, el número de ligandos encontrados es mucho menor (Figura 18A). Especialmente cuando se trata de compuestos que mantengan el anillo A de 3,4,5-trimetoxifenilo.

La sustitución del puente olefínico de la CA4 por un grupo sulfonamida con la sulfona sobre el anillo de trimetoxifenilo ha sido sintetizada y evaluada (**XXXVII**). Frente a las líneas tumorales HeLa (cervix) y MCF7 (mama) esta sulfonamida reversa ha dado valores de IC_{50} en el rango submicromolar (150 nM).¹⁰⁸ Esto demuestra que la sustitución del puente olefínico por una sulfonamida reversa es una alternativa posible, dando lugar a ligandos con actividad citotóxica. Este compuesto se encuentra dentro de una patente y, si bien es cierto que existen estructuras basadas en la sulfonamida reversa incluidas en otras patentes, dichos compuestos no han sido sintetizados o evaluados hasta el momento como compuestos citotóxicos.¹⁰⁹

Con esta característica únicamente se ha encontrado publicado un compuesto, el cual presenta como anillo B un benzimidazol metoxilado (**XXXVIII**). El cambio de dirección del puente sulfonamida parece mejorar la actividad citotóxica, pues su análogo con dirección clásica **XXIV** no mostraba actividad.¹⁰²

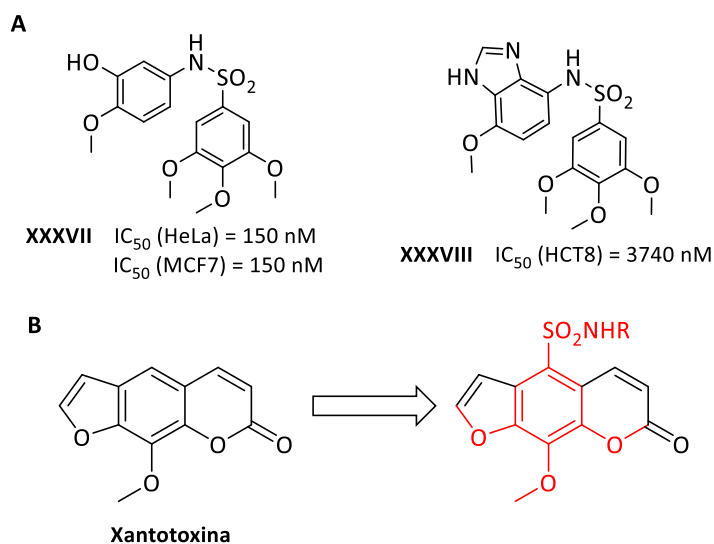


Figura 18. A) Sulfonamidas reversas sintetizadas y evaluadas que mantienen como anillo A un 3,4,5-trimetoxifenilo. **B)** Estructura de la xantotoxina y su derivado sulfonamida con actividad antitumoral.

Sí encontramos este esqueleto como subestructura en furanocumarinas derivadas de xantotoxina con actividad antitumoral (Figura 18B). Sin embargo, estas se diferencian considerablemente de la estructura de CA4 y, por tanto, ejercen su acción frente a otra diana terapéutica (enzima topoisomerasa).^{110,111}

Si nos centramos en las modificaciones realizadas sobre el anillo A, encontramos que el ligando más destacado es T138067 (**XXXIX**), un ligando que presenta un pentafluorofenilo como anillo A (Figura 19). T138067 ha alcanzado ensayos clínicos en fase II/III y ha demostrado actividad *in vivo* frente a tumores resistentes por sobreexpresión de MDR.^{87,112} Su derivado T900607 (**XL**), con la introducción de un grupo urea en la posición 3 del anillo A, también ha alcanzado ensayos clínicos en fase II.⁸⁷

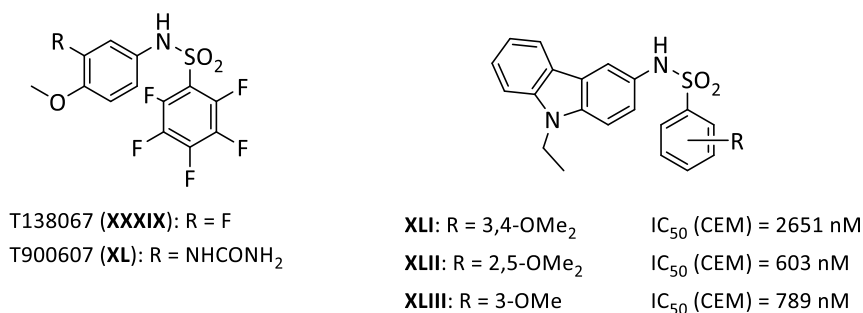


Figura 19. Sulfonamidas reversas con modificaciones sobre el anillo A.

Varios derivados con carbazol como anillo B han sido sintetizados con la dirección reversa. Pese a no evaluarse manteniendo el anillo de 3,4,5-trimetoxifenilo como anillo A, análogos con los metoxilos en otras posiciones sí que se ensayaron. Nuevamente, el patrón de sustitución 2,5 se muestra dentro de los más potentes (**XLII**), aunque con esta dirección su potencia cae hasta valores cercanos a la unidad micromolar. El uso de otros patrones de sustitución en esta familia resulta en la pérdida de potencia citotóxica, siendo siempre menos favorable en comparación con el anillo de 3,4,5-trimetoxifenilo como anillo A.¹⁰³

Cuando se trata de compuestos que modifican el anillo A parece que el cambio de dirección es contraproducente para la actividad citotóxica. Sin embargo, esta nueva disposición podría ser de especial interés, puesto que es la que presentan T138067 y T900607, los cuales han alcanzado ensayos clínicos en fases II y III. Además, en la única pareja que conserva el anillo de 3,4,5-trimetoxifenilo (**XXIV** vs **XXXVIII**), la potencia es mayor con la dirección reversa, lo que sugiere que esta disposición puede ser más favorable.

Los análisis de la relación estructura-actividad (REA) de los compuestos obtenidos hasta el momento con una dirección clásica indican que la potencia citotóxica de los análogos mejora cuando se introducen pequeños sustituyentes sobre el nitrógeno de la sulfonamida. No obstante, estudios computacionales realizados por el grupo revelan que un cambio en la dirección del puente sulfonamida hace que los sustituyentes se orienten hacia un bolsillo más amplio en el lugar de acción. Esto permitiría poder explorar modificaciones de mayor volumen con el fin de mejorar las propiedades farmacocinéticas de los análogos.

La interesante actividad demostrada por las sulfonamidas clásicas anteriores, unidas a la escasez de ensayos que estudien este cambio en la dirección del puente, hacen de este grupo de sulfonamidas del 3,4,5-trimetoxibenceno una interesante familia de compuestos a explorar.

2. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

2.1 DISEÑO

La tubulina es una diana contrastada en la búsqueda de nuevos tratamientos contra el cáncer, ya sea para su empleo en monoterapia o en combinación con otros tratamientos.³² El grupo de investigación en el que se ha desarrollado este trabajo de Tesis Doctoral está especializado en el diseño, la síntesis y la evaluación de nuevos agentes antimitóticos que ejercen su acción a través del sitio de la colchicina, afectando a la dinámica de los microtúbulos.

Los ligandos del dominio de la colchicina son habitualmente moléculas más pequeñas en comparación con los tratamientos antimitóticos empleados en la actualidad, como paclitaxel o vincristina. Esto genera que sus ligandos sean más accesibles sintéticamente y presenten perfiles farmacocinéticos más favorables. A ello se suma una menor sensibilidad a las resistencias mediadas por MDR y la posibilidad de ejercer un efecto disruptor de los vasos sanguíneos inmaduros que irrigan los tumores.

El dominio de la colchicina se encuentra dividido en tres zonas. A la hora de diseñar los ligandos de unión, se puede optar por dirigir el diseño hacia las zonas 1-2 o hacia las zonas 2-3. Hay muy pocos ligandos que interactúan con las tres regiones, ya que esto requiere adaptar los ligandos existentes de las zonas 1 y 2, alargando su longitud sin perder su potencia citotóxica.

Se ha observado que los ligandos de las zonas 1-2 suelen presentar mayor actividad antiproliferativa. Por ello, en este trabajo se diseñan nuevos compuestos que interactúen con estas dos zonas, pudiendo en el futuro alargar hacia la zona 3 los compuestos que presenten mejores propiedades.

Los ligandos de las zonas 1-2 se caracterizan estructuralmente por la presencia de dos anillos aromáticos no coplanares, que requieren una disposición *cisoides* para su interacción con la diana. El modelo estructural empleado como referencia es la CA4. Se considera un buen prototipo al presentar una elevada potencia citotóxica con un tamaño bastante reducido. Sin embargo, la inestabilidad configuracional de su puente olefínico o la presencia de un grupo hidroxilo susceptible de glucuronidación son algunas desventajas que le han impedido avanzar en clínica como tratamiento antitumoral.

A continuación, se detallan las modificaciones seleccionadas para cada región de la CA4, considerando los antecedentes previamente mencionados.

2.1.1 PUENTE: SULFONAMIDA REVERSA

La geometría de las zonas 1-2 requiere que los anillos se dispongan en una disposición similar a los de la CA4. Las sulfonamidas adoptan preferentemente esta conformación en disolución.^{50,101,107} Por ello, se selecciona un grupo sulfonamida como puente que conecte los dos anillos aromáticos de las zonas 1 y 2. De este modo se evita el inconveniente de que el puente olefínico de la CA4 isomerice de su forma *cis* a *trans*, lo que provoca la pérdida de actividad y, al mismo tiempo, mejora sus propiedades farmacocinéticas al aumentar su polaridad.

Cuando el grupo sulfona de la sulfonamida está unido al anillo B, el nitrógeno de ésta se orienta hacia un bolsillo de la diana pequeño e hidrofóbico. La potencia de estas sulfonamidas clásicas se incrementa cuando el nitrógeno se sustituye con grupos alquílicos pequeños como metilos o etilos.⁹⁴ En sulfonatos, los compuestos con el grupo sulfona unido al anillo A conducen a una mayor potencia (Figura 20).¹¹³

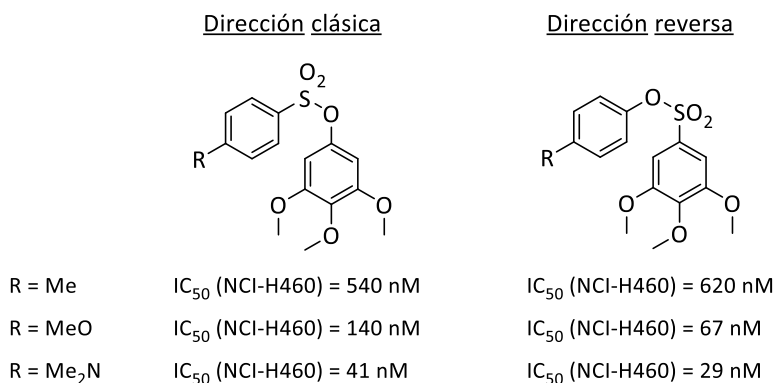


Figura 20. Sulfonatos análogos de CA4 con ambas direcciones del puente y sus IC₅₀.

Este trabajo de Tesis Doctoral busca evaluar el efecto del cambio de dirección del puente sulfonamida en sulfonamidas antimitóticas con un anillo A de 3,4,5-trimetoxibencenosulfonilo. Presumiblemente, el nitrógeno de la sulfonamida se dirigirá en estos derivados hacia una zona diferente del espacio interfacial de los dímeros de tubulina. Este nitrógeno se puede utilizar para introducir sustituyentes que modifiquen las propiedades farmacocinéticas y la interacción con la diana. Estudios computacionales realizados por el grupo de investigación indican que esta zona presenta mayores dimensiones, permitiendo introducir una mayor variedad de grupos.

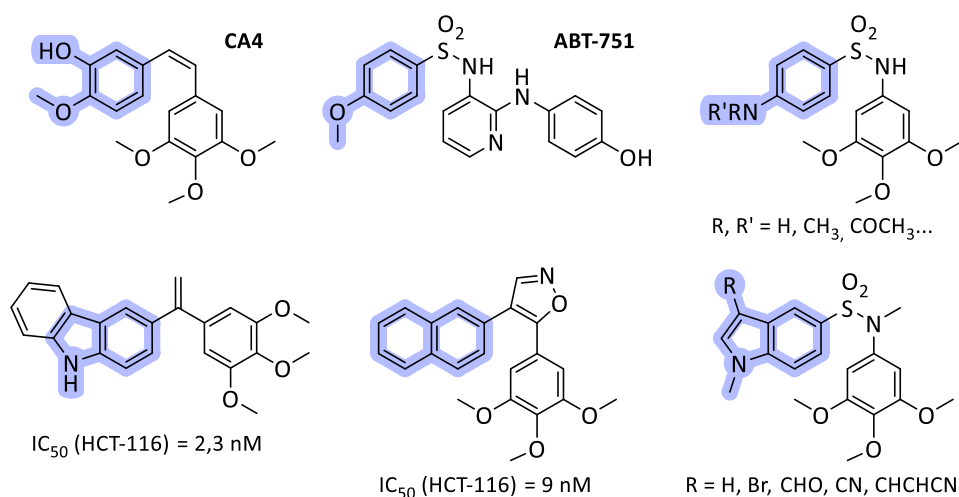
2.1.2 ANILLO A: 3,4,5-TRIMETOXIFENILO

El anillo de 3,4,5-trimetoxifenilo como anillo A en los derivados de CA4 se considera importante para alcanzar una elevada potencia citotóxica. Aunque existen modificaciones que mantienen la actividad citotóxica, están menos extendidas.¹¹⁴ Por ello, mantendremos como anillo A el 3,4,5-trimetoxifenilo en todos los compuestos de este trabajo.

2.1.3 ANILLO B: FENILOS, NAFTALENOS E INDOLES

No hay muchas *N*-aril-3,4,5-trimetoxibencenosulfonamidas inhibidoras de la tubulina descritas, por lo que en este trabajo se plantea explorar las posibilidades estructurales del anillo B (*N*-arilo). En inhibidores de tubulina del sitio de la colchicina es este anillo es el que permite más variaciones de estructura diversa como combretastatinas¹¹⁵, isocombretastatinas¹¹⁶, fenstatinas⁶¹ o sulfonamidas clásicas^{94,101}.

Teniendo en cuenta los anillos B que conducen a una elevada potencia antitubulina se han seleccionado tres opciones: fenilos, naftalenos e indoles. Cada tipo de anillo B da lugar a una familia de potenciales inhibidores de tubulina con propiedades diferentes (Figura 21).



Anillos B propuestos

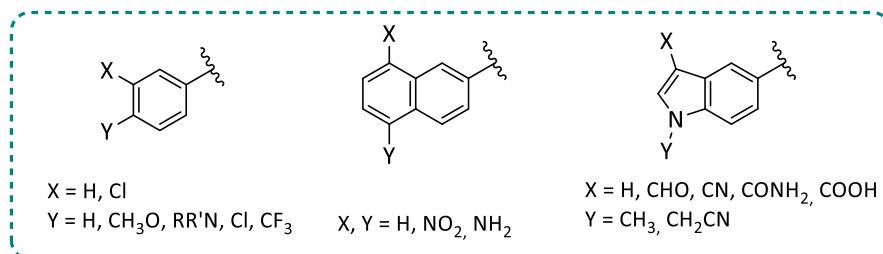


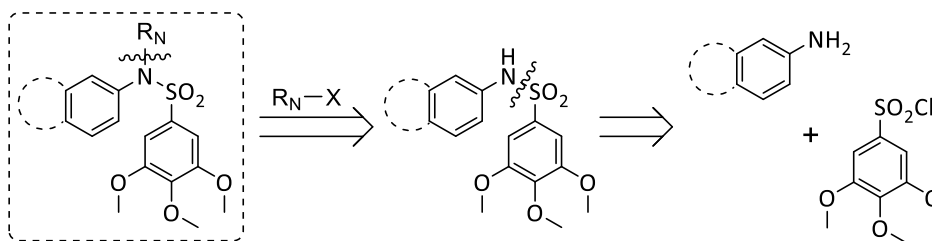
Figura 21. Estructuras tomadas como referencia y modificaciones planteadas como anillo B.

Para la familia con anillos B fenílicos se han seleccionado sustituyentes que conducen a compuestos activos en otros tipos estructurales. Una de las más frecuentes es un metoxilo en 4, acompañado o no de grupos hidroxilo o amino en 3, que suelen incrementar la potencia. También se explorarán grupos amino en lugar del metoxilo, ya que se ha visto que conducen a derivados potentes con propiedades favorables.⁹⁴

Los sistemas benzofusionados como naftalenos, alquilindoles e incluso carbazoles también se encuentran descritos como anillos B en inhibidores de tubulina potentes,^{117,118} por lo que se utilizarán como anillos B en las nuevas bencenosulfonamidas.¹¹⁹ Debido a la alta hidrofobicidad de estos sistemas benzofusionados se plantea la introducción de grupos polares, que también se espera que puedan modificar la interacción con la diana.^{33,120}

2.2 PLANTEAMIENTO SINTÉTICO

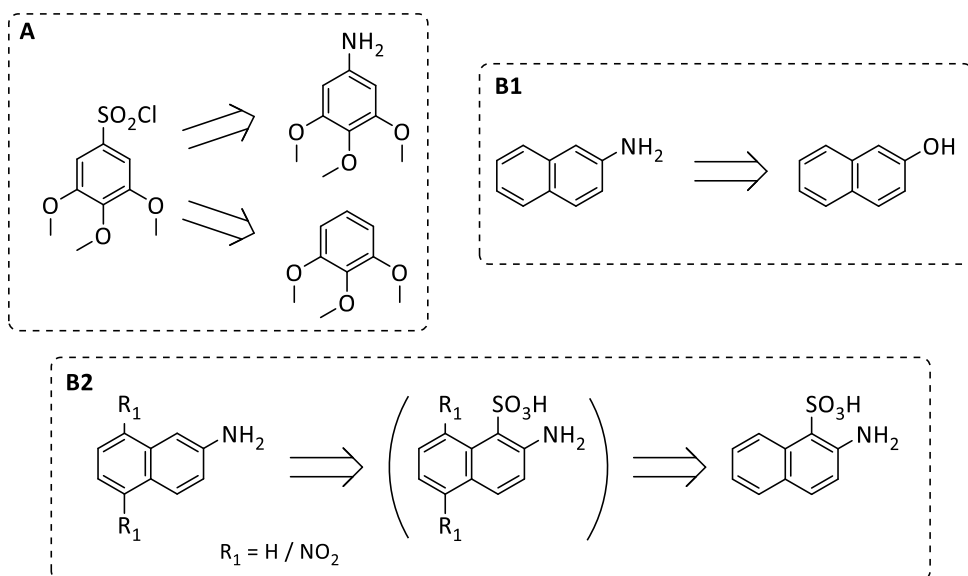
Existen diferentes posibilidades de abordar la síntesis de sulfonamidas. Una de las más empleadas debido a su eficacia es la reacción de cloruros de sulfonilo con aminas. En este caso se hace reaccionar cloruro de 3,4,5-trimetoxibencenosulfonilo (anillo A) con las correspondientes aminas aromáticas (anillo B). Los nitrógenos de las sulfonamidas tienen carácter ácido y pueden alquilarse en medio básico introduciendo nuevas modificaciones (Esquema 1).



Esquema 1. Análisis retrosintético de las *N*-aryl-3,4,5-trimetoxibencenosulfonamidas.

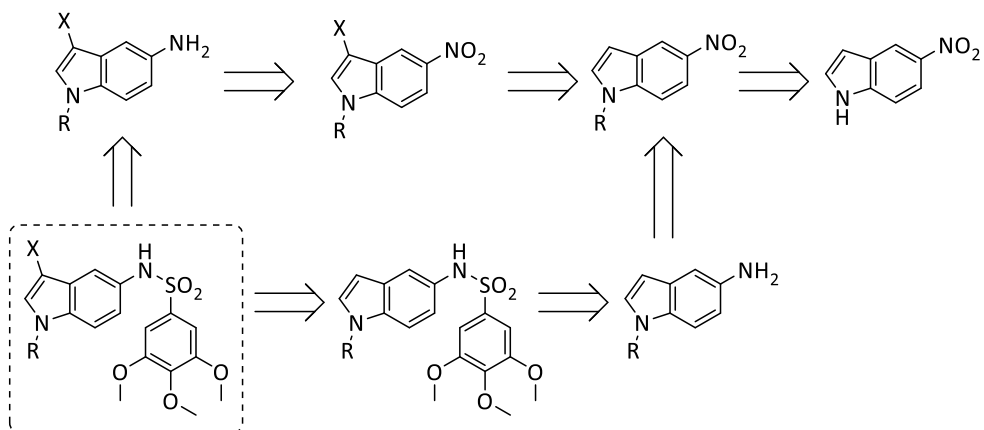
El cloruro de 3,4,5-trimetoxibencenosulfonilo es comercial pero muy caro, lo que podría explicar el bajo número de 3,4,5-trimetoxibencenosulfonamidas descritas. Al tratarse de un material de partida común para todas las familias se requerirían grandes cantidades, por lo que se decidió sintetizarlo. Entre las síntesis descritas se seleccionó la síntesis a partir de la 3,4,5-trimetoxianilina por diazotación, sustitución nucleofílica aromática con xantogenato de etilo¹²¹ y saponificación del xantato para obtener el tiofenol¹²² que por cloración oxidativa da el cloruro de sulfonilo.¹²³ Otra alternativa a la hora de introducir el cloruro de sulfonilo a partir de la sal de diazonio es el uso de dióxido de azufre (SO₂) gas y CuCl, pero el rendimiento es bajo y requiere el manejo de dióxido de azufre, el cual es tóxico. Por último,

el cloruro de 3,4,5-trimetoxibencenosulfonilo puede obtenerse por sulfonación o clorosulfonación de 3,4,5-trimetoxibenceno. No obstante, esta ruta sintética da lugar principalmente al otro regioderivado (Esquema 2A).¹²⁴



Esquema 2. Planteamiento sintético de los materiales de partida. **A)** cloruro de 3,4,5-trimetoxibencenosulfonilo. **B)** 2-naftilaminas.

Las anilinas necesarias para la reacción con el cloruro de sulfonilo son comerciales. La 2-naftilamina también es muy cara, por lo que se prefirió sintetizarla. Se plantea por ello su obtención en el laboratorio a partir del 2-naftol (Esquema 2B1) o por desulfuración del ácido 2-aminonaftalen-1-sulfónico. Además, está descrito que la nitración del ácido 2-aminonaftalen-1-sulfónico tiene lugar en el anillo sin sustituir, lo que permitiría incorporar grupos amina sobre este anillo (Esquema 2B2).



Esquema 3. Planteamiento sintético de las modificaciones realizadas sobre el anillo B indólico.

Para la obtención de las aminas indólicas se parte 5-nitro-1*H*-indol, tras la alquilación del nitrógeno indólico y reducción. Las modificaciones en la posición 3 se pueden realizar mediante reacciones de sustitución electrofílica aromática previas a la reducción, o una vez formada la sulfonamida (Esquema 3).

2.3 EVALUACIÓN BIOLÓGICA

Los compuestos sintetizados en este trabajo han sido diseñados para unirse al sitio de la colchicina en tubulina. Por ello, se espera que tengan un efecto desestabilizador de los microtúbulos que lleva en última instancia a la muerte celular. De cara a la evaluación biológica de los compuestos finales, se plantea una serie de ensayos frente a líneas celulares tumorales y no tumorales para determinar su potencia y selectividad.

La capacidad antiproliferativa de las nuevas sulfonamidas se estudia por medio de experimentos *in vitro*. Con el fin de seleccionar los compuestos que ejerzan este efecto citotóxico, se realiza en primer lugar un cribado a una dosis elevada (1 μ M). Los compuestos que superan este cribado se evalúan frente a una amplia variedad de líneas celulares tumorales humanas calculando su IC₅₀ (concentración a la que el compuesto inhibe al 50 % la proliferación celular). El análisis de una gran diversidad de tejidos puede proporcionar información sobre variaciones en la sensibilidad al tratamiento. Se incluyen además en estos ensayos líneas celulares resistentes a los tratamientos antimitóticos convencionales como los taxanos. Todos los datos obtenidos de estos estudios nos permiten obtener información acerca de la relación estructura-actividad.

Adicionalmente, se plantea la realización de ensayos de mecanismo de acción para los compuestos más potentes. Para ello se plantea estudiar su efecto sobre el ciclo celular por

citometría de flujo, sobre los microtúbulos de las células por microscopía confocal y la inducción de apoptosis, estudiando la translocación de fosfatidilserina y la activación de caspasas.

2.4 OBJETIVOS

En base a este planteamiento y a los antecedentes mencionados, el **objetivo general** de esta Tesis Doctoral se centra en sintetizar, caracterizar y evaluar nuevas moléculas bioactivas con esqueleto de sulfonamida diseñadas para unirse al sitio de la colchicina en tubulina. Estos nuevos ligandos objetivo tienen como denominador común un puente sulfonamida que presente el grupo sulfona sobre un anillo de 3,4,5-trimetoxifenilo. Los **objetivos específicos** se enumeran a continuación.

Por un lado, los objetivos específicos correspondientes a la síntesis de los compuestos planteados:

- Desarrollar y optimizar la metodología sintética para la obtención del cloruro de 3,4,5-trimetoxibencenosulfonilo.
- Sintetizar y purificar una nueva serie de *N*-(fenil)-3,4,5-trimetoxibenceno sulfonamidas en cantidad adecuada para su posterior caracterización y evaluación.
- Sintetizar y purificar nuevas *N*-(naftalen-2-il)-3,4,5-trimetoxi bencenosulfonamidas en cantidad suficiente para su caracterización y evaluación posterior.
- Sintetizar y purificar una nueva familia de *N*-(1-alkil-1*H*-indol-5-il)-3,4,5-trimetoxi bencenosulfonamidas en la cantidad necesaria para su posterior caracterización y evaluación.

En segundo lugar, se presentan los objetivos específicos que hacen referencia a la evaluación de los nuevos ligandos sintetizados:

- Evaluar la actividad antiproliferativa *in vitro* de las nuevas sulfonamidas frente a diversas líneas celulares tumorales y no tumorales humanas.
- Analizar la relación estructura-actividad de las nuevas familias de sulfonamidas evaluadas.
- Estudiar el posible mecanismo de acción antimetabólico de las sulfonamidas con actividad antitumoral.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Síntesis química

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN: Evaluación biológica

5. CONCLUSIONES

In this PhD thesis, we have synthesized and evaluated new antimitotic agents with a sulfonamide structure based on combretastatin A-4. The main characteristic of these compounds is the orientation of their sulfonamide bridge, which is reversed compared to the antimitotic sulfonamides that retain the 3,4,5-trimethoxyphenyl ring as A ring evaluated so far. The previously presented results allow us to draw the following conclusions:

1. The methodology developed for synthesizing 3,4,5-trimethoxybenzenesulfonyl chloride (**1**) leads to the desired compound in acceptable quantities and yields. This synthetic route gathers cost reduction with a relatively simple protocol. Additionally, the synthetic methodologies employed for synthesizing and modifying the sulfonamides are adequate, obtaining most of the compounds with good yields and high purity.
2. 77 new reverse sulfonamides have been synthesized and classified into three families based on their aromatic B ring. All of them have been evaluated *in vitro*, resulting in 25 new antimitotic sulfonamides with submicromolar potency ($<1 \mu\text{M}$) against HeLa cancer cell line.
3. In family 1, with a phenyl B ring, the most favourable substitutions are methoxy, methylamine, or dimethylamine groups at the *para* position. On the contrary, a primary amine leads to the loss of cytotoxic activity. Methylation of the sulfonamide nitrogen increases cytotoxic activity, resulting in the three most potent ligands of family 1 ($\text{IC}_{50} = 0.131 - 0.313 \mu\text{M}$). In this group of compounds, the reversal of the sulfonamide bridge results in a slight decrease in cytotoxic potency compared to their counterparts.
4. Ligands with a naphthyl B ring (family 2) improve their potency when an amino group is introduced at the 8' position (IC_{50} from $1.831 \mu\text{M}$ to $0.544 \mu\text{M}$). As in the previous family, the potency increases after sulfonamide methylation ($\text{IC}_{50} = 0.060 \mu\text{M}$). Additionally, a slight improvement is observed when a cyanomethyl group is introduced on this nitrogen ($\text{IC}_{50} = 0.388 \mu\text{M}$), although it does not reach the values of the methylated sulfonamide.
5. Family 3, with an indole ring, gathers the most potent ligands along this work. Sulfonamide methylation or cyanomethylation improves or maintains potency ($\text{IC}_{50} = 0.050$ and $0.022 \mu\text{M}$) compared to the unsubstituted sulfonamides. Polar groups at the indole 3' position increase cytotoxic potency to the nanomolar range ($\text{IC}_{50} = 0.018 - 0.102 \mu\text{M}$). Bridge reversal results in similar antiproliferative potency as the

classical sulfonamides and modifies the observed structure-activity relationships of indole 3 substituents with respect to other structural families.

6. Most of the cytotoxic ligands avoid resistance mediated by MDR proteins, a recurrent problem in chemotherapies. However, the incorporation of an amide at the 3' position of the indole ring in family 3 compounds seems to make them substrates of these proteins.
7. The target of the synthesized sulfonamides is tubulin, as demonstrated by the mechanism of action experiments conducted with the most promising compounds from each family. These compounds induce cell cycle arrest at the G₂/M phase, a common effect observed with other antimitotic compounds. Additionally, immunofluorescence studies show the loss of the microtubular network in cells treated with the selected compounds.
8. The studied compounds trigger cell death by apoptosis in a time-dependent way. For analogues from families 2 and 3, a progressive activation of caspases 3 and 7 is also observed.
9. Regarding family 3, differences in the biological effects have been observed depending on the substituent of the sulfonamide nitrogen. Methylated sulfonamides (**63**, **101** and **104**) show a higher percentage of cells in the mitosis stage and quickly lead to apoptotic death. In contrast, non-methylated (**61**, **65** and **100**) accumulate more cells in the G₂ and apoptosis takes longer to appear.
10. Analogues from family 1 are more water soluble than CA4 and some of them maintain or even increase the solubility values of the orally absorbable sulfonamide ABT-751.
11. The *in silico* results for pharmacokinetic properties and mutagenicity prediction are favourable, suggesting that the most potent compounds could be good candidates for further preclinical evaluation.
12. The sulfonamides belonging to family 3 constitute the most promising group in this study due to their cytotoxic potency. Among them, compound **96** stands out, displaying an IC₅₀ of less than 20 nM in nine of the cell lines studied in the semi-automatic screenings. Additionally, it is not affected by the decreased sensitivity to antimitotic drugs exhibited by the BT-474 cell line (IC₅₀ = 0.011 μM) and is only slightly affected in the MDA-MB468-paclitaxel resistant (PR) cell line, with the IC₅₀ increasing from 0.017 μM to 0.033 μM.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Hajdu, S. I. Greco-Roman Thought about Cancer. *Cancer* **2004**, *100* (10), 2048–2051. DOI: 10.1002/cncr.20198.
- (2) *World Health Organization*. <https://www.who.int/health-topics/cancer>.
- (3) *National Cancer Institute*. <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>.
- (4) Nowell, P. C. The Clonal Evolution of Tumor Cell Populations Acquired Genetic Lability Permits Stepwise Selection of Variant Sublines and Underlies Tumor Progression. *Science (1979)* **1976**, *194*, 23–28. DOI: 10.1126/science.959840.
- (5) Asadi-Mehregan, F.; Assari, P.; Dehghan, M. Simulation of the Cancer Cell Growth and Their Invasion into Healthy Tissues Using Local Radial Basis Function Method. *Eng Anal Bound Elem* **2024**, *163*, 56–68. DOI: 10.1016/j.enganabound.2024.02.015.
- (6) Sethi, N.; Kang, Y. Unravelling the Complexity of Metastasis-Molecular Understanding and Targeted Therapies. *Nat Rev Cancer* **2011**, *11* (10), 735–748. DOI: 10.1038/nrc3125.
- (7) Anand, U.; Dey, A.; Chandel, A. K. S.; Sanyal, R.; Mishra, A.; Pandey, D. K.; De Falco, V.; Upadhyay, A.; Kandimalla, R.; Chaudhary, A.; Dhanjal, J. K.; Dewanjee, S.; Vallamkondu, J.; Pérez de la Lastra, J. M. Cancer Chemotherapy and beyond: Current Status, Drug Candidates, Associated Risks and Progress in Targeted Therapeutics. *Genes Dis* **2023**, *10* (4), 1367–1401. DOI: 10.1016/j.gendis.2022.02.007.
- (8) Behranvand, N.; Nasri, F.; Zolfaghari Emameh, R.; Khani, P.; Hosseini, A.; Garsen, J.; Falak, R. Chemotherapy: A Double-Edged Sword in Cancer Treatment. *Cancer Immunol Immunother* **2022**, *71* (3), 507–526. DOI: 10.1007/s00262-021-03013-3.
- (9) Tan, S.; Li, D.; Zhu, X. Cancer Immunotherapy: Pros, Cons and Beyond. *Biomed Pharmacother* **2020**, *124*. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.109821.
- (10) Ukidve, A.; Cu, K.; Kumbhojkar, N.; Lahann, J.; Mitragotri, S. Overcoming Biological Barriers to Improve Solid Tumor Immunotherapy. *Drug Deliv Transl Res* **2021**, *11* (6), 2276–2301. DOI: 10.1007/s13346-021-00923-8.
- (11) Bogani, G.; Coleman, R. L.; Vergote, I.; Van Gorp, T.; Ray-Coquard, I.; Oaknin, A.; Matulonis, U.; O'Malley, D.; Raspagliesi, F.; Scambia, G.; Monk, B. J. Mirvetuximab Soravtansine-Gynx: First Antibody/Antigen-Drug Conjugate (ADC) in Advanced or Recurrent Ovarian Cancer. *Int J Gynecol Cancer* **2023**, *34*. DOI: 10.1136/ijgc-2023-004924.
- (12) Prosser, S. L.; Pelletier, L. Mitotic Spindle Assembly in Animal Cells: A Fine Balancing Act. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2017**, *18* (3), 187–201. DOI: 10.1038/nrm.2016.162.

- (13) Choi, J.; Clark, M. A.; Douglas, M. The Cell Cycle. In *Biology Part I*; LOUIS: The Louisiana Library Network, 2022.
- (14) Moreno-Andrés, D.; Holl, K.; Antonin, W. The Second Half of Mitosis and Its Implications in Cancer Biology. *Semin Cancer Biol* **2023**, *88*, 1–17. DOI: 10.1016/j.semcancer.2022.11.013.
- (15) Serrano-del Valle, A.; Reina-Ortiz, C.; Benedi, A.; Anel, A.; Naval, J.; Marzo, I. Future Prospects for Mitosis-Targeted Antitumor Therapies. *Biochem Pharmacol* **2021**, *190* (114655). DOI: 10.1016/j.bcp.2021.114655.
- (16) Henriques, A. C.; Ribeiro, D.; Pedrosa, J.; Sarmiento, B.; Silva, P. M. A.; Bousbaa, H. Mitosis Inhibitors in Anticancer Therapy: When Blocking the Exit Becomes a Solution. *Cancer Lett* **2019**, *440–441*, 64–81. DOI: 10.1016/j.canlet.2018.10.005.
- (17) Janke, C.; Magiera, M. M. The Tubulin Code and Its Role in Controlling Microtubule Properties and Functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2020**, *21* (6), 307–326. DOI: 10.1038/s41580-020-0214-3.
- (18) Nogales, E. An Electron Microscopy Journey in the Study of Microtubule Structure and Dynamics. *Protein Sci* **2015**, *24* (12), 1912–1919. DOI: 10.1002/pro.2808.
- (19) Yamada, H. Y.; Gorbsky, G. J. Spindle Checkpoint Function and Cellular Sensitivity to Antimitotic Drugs. *Mol Cancer Ther* **2006**, *5* (12), 2963–2969. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0319.
- (20) Weaver, B. A. A.; Cleveland, D. W. Decoding the Links between Mitosis, Cancer, and Chemotherapy: The Mitotic Checkpoint, Adaptation, and Cell Death. *Cancer Cell* **2005**, *8* (1), 7–12. DOI: 10.1016/j.ccr.2005.06.011.
- (21) Peters, J. M. The Anaphase Promoting Complex/Cyclosome: A Machine Designed to Destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2006**, *7* (9), 644–656. DOI: 10.1038/nrm1988.
- (22) Schmidt, M.; Bastians, H. Mitotic Drug Targets and the Development of Novel Anti-Mitotic Anticancer Drugs. *Drug Resist Updat* **2007**, *10* (4–5), 162–181. DOI: 10.1016/j.drup.2007.06.003.
- (23) Škubník, J.; Jurášek, M.; Ruml, T.; Rimpelová, S. Mitotic Poisons in Research and Medicine. *Molecules* **2020**, *25* (20). DOI: 10.3390/molecules25204632.
- (24) Jordan, M. A.; Wilson, L. Microtubules as a Target for Anticancer Drugs. *Nat Rev* **2004**, *4*, 253–265. DOI: 10.1038/nr1317.
- (25) Nogales, E.; Wolf, S. G.; Downing, K. H. Structure of the Alpha Beta Tubulin Dimer by Electron Crystallography. *Nature* **1998**, *391*, 199–203. DOI: 10.1038/34465.
- (26) Prota, A. E.; Lucena-Agell, D.; Ma, Y.; Estevez-Gallego, J.; Li, S.; Bargsten, K.; Josa-Prado, F.; Altmann, K. H.; Gaillard, N.; Kamimura, S.; Mühlethaler, T.; Gago, F.; Oliva, M. A.; Steinmetz, M. O.; Fang, W. S.; Díaz, J. F. Structural Insight into the Stabilization of Microtubules by Taxanes. *Elife* **2023**, *12*. DOI: 10.7554/elife.84791.

- (27) Prota, A. E.; Bargsten, K.; Northcote, P. T.; Marsh, M.; Altmann, K. H.; Miller, J. H.; Díaz, J. F.; Steinmetz, M. O. Structural Basis of Microtubule Stabilization by Laulimalide and Peloruside A. *Angew Chem Int Ed Engl* **2014**, *53* (6), 1621–1625. DOI: 10.1002/anie.201307749.
- (28) Yamamoto, Y.; Kawano, I.; Iwase, H. Nab-Paclitaxel for the Treatment of Breast Cancer: Efficacy, Safety, and Approval. *Onco Targets Ther* **2011**, *4*, 123–136. DOI: 10.2147/OTT.S13836.
- (29) Bernabeu, E.; Cagel, M.; Lagomarsino, E.; Moretton, M.; Chiappetta, D. A. Paclitaxel: What Has Been Done and the Challenges Remain Ahead. *Int J Pharm* **2017**, *526* (1–2), 474–495. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2017.05.016.
- (30) Čermák, V.; Dostál, V.; Jelínek, M.; Libusová, L.; Kovář, J.; Rösel, D.; Brábek, J. Microtubule-Targeting Agents and Their Impact on Cancer Treatment. *Eur J Cell Biol* **2020**, *99* (4), 151075. DOI: 10.1016/j.ejcb.2020.151075.
- (31) Ravelli, R. B. G.; Gigant, B.; Curmi, P. A.; Jourdain, I.; Lachkar, S.; Sobel, A.; Knossow, M. Insight into Tubulin regulation from a Complex with colchicine and a Stathmin-like Domain. *Nature* **2004**, *428* (6979), 194–198. DOI: 10.1038/nature02381.
- (32) Hawash, M. Recent Advances of Tubulin Inhibitors Targeting the Colchicine Binding Site for Cancer Therapy. *Biomolecules* **2022**, *12* (1843). DOI: 10.3390/biom12121843.
- (33) Álvarez, R.; Gajate, C.; Puebla, P.; Mollinedo, F.; Medarde, M.; Peláez, R. Substitution at the Indole 3 Position Yields Highly Potent Indolecombretastatins against Human Tumor Cells. *Eur J Med Chem* **2018**, *158*, 167–183. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.08.078.
- (34) Prota, A. E.; Bargsten, K.; Diaz, J. F.; Marsh, M.; Cuevas, C.; Liniger, M.; Neuhaus, C.; Andreu, J. M.; Altmann, K. H.; Steinmetz, M. O. A New Tubulin-Binding Site and Pharmacophore for Microtubule-Destabilizing Anticancer Drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**, *111* (38), 13817–13821. DOI: 10.1073/pnas.1408124111.
- (35) Vilanova, C.; Díaz-Oltra, S.; Murga, J.; Falomir, E.; Carda, M.; Redondo-Horcajo, M.; Díaz, J. F.; Barasoain, I.; Marco, J. A. Design and Synthesis of Pironetin Analogue/Colchicine Hybrids and Study of Their Cytotoxic Activity and Mechanisms of Interaction with Tubulin. *J Med Chem* **2014**, *57* (24), 10391–10403. DOI: 10.1021/jm501112q.
- (36) Dybdal-Hargreaves, N. F.; Risinger, A. L.; Mooberry, S. L. Eribulin Mesylate: Mechanism of Action of a Unique Microtubule-Targeting Agent. *Clin Cancer Res* **2015**, *21* (11), 2445–2452. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-3252.
- (37) Mühlethaler, T.; Milanos, L.; Ortega, J. A.; Blum, T. B.; Gioia, D.; Roy, B.; Prota, A. E.; Cavalli, A.; Steinmetz, M. O. Rational Design of a Novel Tubulin Inhibitor with a

- Unique Mechanism of Action. *Angew Chem Int Ed Engl* **2022**, *61* (25). DOI: 10.1002/anie.202204052.
- (38) Matthew, S.; Chen, Q.-Y.; Ratnayake, R.; Fermaintt, C. S.; Lucena-Agell, D.; Bonato, F.; Prota, A. E.; Ting Lim, S.; Wang, X.; Fernando Díaz, J.; Risinger, A. L.; Paul, V. J.; Ángela Oliva, M.; Luesch, H. Gatorbulin-1, a Distinct Cyclodepsipeptide Chemotype, Targets a Seventh Tubulin Pharmacological Site. *Proc Natl Acad Sci* **2021**, *118* (9), e2021847118. DOI: 10.1073/pnas.2021847118/-/DCSupplemental.
- (39) Dumontet, C.; Jordan, M. A. Microtubule-Binding Agents: A Dynamic Field of Cancer Therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **2010**, *9* (10), 790–803. DOI: 10.1038/nrd3253.
- (40) Gradishar, W. J. Albumin-Bound Paclitaxel: A next-Generation Taxane. *Expert Opin Pharmacother* **2006**, *7* (8), 1041–1053. DOI: 10.1517/14656566.7.8.1041.
- (41) Kavallaris, M. Microtubules and Resistance to Tubulin-Binding Agents. *Nat Rev Cancer* **2010**, *10* (3), 194–204. DOI: 10.1038/nrc2803.
- (42) Sève, P.; Dumontet, C. Is Class III β -Tubulin a Predictive Factor in Patients Receiving Tubulin-Binding Agents? *Lancet Oncol* **2008**, *9*. DOI: 10.1016/S1470-2045(08)70029-9.
- (43) Litman, T.; Druley, T. E.; Stein, W. D.; Bates, S. E. Review From MDR to MXR: New Understanding of Multidrug Resistance Systems, Their Properties and Clinical Significance. *Cell Mol Life Sci* **2001**, *58*, 931–959. DOI: 10.1007/pl00000912.
- (44) Stengel, C.; Newman, S. P.; Leese, M. P.; Potter, B. V. L.; Reed, M. J.; Purohit, A. Class III B-Tubulin Expression and in Vitro Resistance to Microtubule Targeting Agents. *Br J Cancer* **2010**, *102* (2), 316–324. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605489.
- (45) Leonessa, F.; Clarke, R. ATP Binding Cassette Transporters and Drug Resistance in Breast Cancer. *Endocr Relat Cancer* **2003**, *10*, 43–73.
- (46) Wang, J.; Miller, D. D.; Li, W. Molecular Interactions at the Colchicine Binding Site in Tubulin: An X-Ray Crystallography Perspective. *Drug Discov Today* **2022**, *27* (3), 759–776. DOI: 10.1016/j.drudis.2021.12.001.
- (47) Massarotti, A.; Coluccia, A.; Silvestri, R.; Sorba, G.; Brancale, A. The Tubulin Colchicine Domain: A Molecular Modeling Perspective. *ChemMedChem* **2012**, *7* (1), 33–42. DOI: 10.1002/cmdc.201100361.
- (48) Alvarez, R.; Medarde, M.; Pelaez, R. New Ligands of the Tubulin Colchicine Site Based on X-Ray Structures. *Curr Top Med Chem* **2014**, *14* (20), 2231–2252. DOI: 10.2174/1568026614666141130092637.
- (49) Mahgoub, T. M.; Jordan, E. J.; Mahdi, A. F.; Oettl, V.; Huefner, S.; O'Donovan, N.; Crown, J.; Collins, D. M. Evaluation of ABT-751, a Novel Anti-Mitotic Agent Able to

- Overcome Multi-Drug Resistance, in Melanoma Cells. *Cancer Chemother Pharmacol* **2024**. DOI: 10.1007/s00280-023-04624-6.
- (50) Vicente-Blázquez, A.; González, M.; Álvarez, R.; del Mazo, S.; Medarde, M.; Peláez, R. Antitubulin Sulfonamides: The Successful Combination of an Established Drug Class and a Multifaceted Target. *Med Res Rev* **2019**, *39* (3), 775–830. DOI: 10.1002/med.21541.
- (51) Tron, G. C.; Piralì, T.; Sorba, G.; Pagliai, F.; Busacca, S.; Genazzani, A. A. Medicinal Chemistry of Combretastatin A4: Present and Future Directions. *J Med Chem* **2006**, *49* (11), 3033–3044. DOI: 10.1021/jm0512903.
- (52) Vitale, I.; Antocchia, A.; Cenciarelli, C.; Crateri, P.; Meschini, S.; Arancia, G.; Pisano, C.; Tanzarella, C. Combretastatin CA-4 and Combretastatin Derivative Induce Mitotic Catastrophe Dependent on Spindle Checkpoint and Caspase-3 Activation in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Apoptosis* **2007**, *12* (1), 155–166. DOI: 10.1007/s10495-006-0491-0.
- (53) Chen, Z. H.; Xu, R. M.; Zheng, G. H.; Jin, Y. Z.; Li, Y.; Chen, X. Y.; Tian, Y. S. Development of Combretastatin A-4 Analogues as Potential Anticancer Agents with Improved Aqueous Solubility. *Molecules* **2023**, *28* (4). DOI: 10.3390/molecules28041717.
- (54) Pettit, G. R.; Singh, S. B.; Hamel, E.; Lin, C. M.; Alberts, D. S.; Garcia-Kendall, D. Isolation and Structure of the Strong Cell Growth and tubulin Inhibitor Combretastatin A-4. *Experientia* **1989**, *45*, 209–211. DOI: 10.1007/BF01954881.
- (55) Song, J.; Gao, Q. L.; Wu, B. W.; Zhu, T.; Cui, X. X.; Jin, C. J.; Wang, S. Y.; Wang, S. H.; Fu, D. J.; Liu, H. M.; Zhang, S. Y.; Zhang, Y. B.; Li, Y. C. Discovery of Tertiary Amide Derivatives Incorporating Benzothiazole Moiety as Anti-Gastric Cancer Agents in Vitro via Inhibiting Tubulin Polymerization and Activating the Hippo Signaling Pathway. *Eur J Med Chem* **2020**, *203*, 112618. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112618.
- (56) Álvarez, R.; Aramburu, L.; Gajate, C.; Vicente-Blázquez, A.; Mollinedo, F.; Medarde, M.; Peláez, R. Potent Colchicine-Site Ligands with Improved Intrinsic Solubility by Replacement of the 3,4,5-Trimethoxyphenyl Ring with a 2-Methylsulfanyl-6-Methoxypyridine Ring. *Bioorg Chem* **2020**, *98*. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.103755.
- (57) Gallego-Yerga, L.; Chiliquina, A. J.; Peláez, R. Novel Tetrazole Derivatives Targeting Tubulin Endowed with Antiproliferative Activity against Glioblastoma Cells. *Int J Mol Sci* **2023**, *24* (13). DOI: 10.3390/ijms241311093.
- (58) González, M.; Ellahioui, Y.; Álvarez, R.; Gallego-Yerga, L.; Caballero, E.; Vicente-Blázquez, A.; Ramudo, L.; Marín, M.; Sanz, C.; Medarde, M.; Peláez, R. The Masked Polar Group Incorporation (MPGI) Strategy in Drug Design: Effects of Nitrogen Substitutions on Combretastatin and Isocombretastatin Tubulin Inhibitors. *Molecules* **2019**, *24* (23). DOI: 10.3390/molecules24234319.

- (59) Simoni, D.; Romagnoli, R.; Baruchello, R.; Rondanin, R.; Rizzi, M.; Pavani, M. G.; Alloatti, D.; Giannini, G.; Marcellini, M.; Riccioni, T.; Castorina, M.; Guglielmi, M. B.; Bucci, F.; Carminati, P.; Pisano, C. Novel Combretastatin Analogues Endowed with Antitumor Activity. *J Med Chem* **2006**, *49* (11), 3143–3152. DOI: 10.1021/jm0510732.
- (60) Pérez-Melero, C.; Maya, A. B. S.; Del Rey, B.; Peláez, R.; Caballero, E.; Medarde, M. A New Family of Quinoline and Quinoxaline Analogues of Combretastatins. *Bioorg Med Chem Lett* **2004**, *14* (14), 3771–3774. DOI: 10.1016/j.bmcl.2004.04.098.
- (61) Álvarez, C.; Álvarez, R.; Corchete, P.; Pérez-Melero, C.; Peláez, R.; Medarde, M. Synthesis and Biological Activity of Naphthalene Analogues of Phenstatins: Naphthylphenstatins. *Bioorg Med Chem Lett* **2007**, *17* (12), 3417–3420. DOI: 10.1016/j.bmcl.2007.03.082.
- (62) He, J.; Zhang, M.; Tang, L.; Liu, J.; Zhong, J.; Wang, W.; Xu, J. P.; Wang, H. T.; Li, X. F.; Zhou, Z. Z. Synthesis, Biological Evaluation, and Molecular Docking of Arylpyridines as Antiproliferative Agent Targeting Tubulin. *ACS Med Chem Lett* **2020**, *11* (8), 1611–1619. DOI: 10.1021/acsmchemlett.0c00278.
- (63) Wu, X.; Wang, Q.; Li, W. Recent Advances in Heterocyclic Tubulin Inhibitors Targeting the Colchicine Binding Site. *Anticancer Agents Med Chem* **2016**, *16* (10), 1325–1338. DOI: 10.2174/1871520616666160219161921.
- (64) Wranik, M.; Weinert, T.; Slavov, C.; Masini, T.; Furrer, A.; Gaillard, N.; Gioia, D.; Ferrarotti, M.; James, D.; Glover, H.; Carrillo, M.; Kekilli, D.; Stipp, R.; Skopintsev, P.; Brünle, S.; Mühlethaler, T.; Beale, J.; Gashi, D.; Nass, K.; Ozerov, D.; Johnson, P. J. M.; Cirelli, C.; Bacellar, C.; Braun, M.; Wang, M.; Dworkowski, F.; Milne, C.; Cavalli, A.; Wachtveitl, J.; Steinmetz, M. O.; Standfuss, J. Watching the Release of a Photopharmacological Drug from Tubulin Using Time-Resolved Serial Crystallography. *Nat Commun* **2023**, *14* (903). DOI: 10.1038/s41467-023-36481-5.
- (65) Messaoudi, S.; Tréguier, B.; Hamze, A.; Provot, O.; Peyrat, J. F.; De Losada, J. R.; Liu, J. M.; Bignon, J.; Wdzieczak-Bakala, J.; Thoret, S.; Dubois, J.; Brion, J. D.; Alami, M. Isocombretastatins A versus Combretastatins A: The Forgotten IsoCA-4 Isomer as a Highly Promising Cytotoxic and Antitubulin Agent. *J Med Chem* **2009**, *52* (14), 4538–4542. DOI: 10.1021/jm900321u.
- (66) Romagnoli, R.; Baraldi, P. G.; Kimatrai Salvador, M.; Preti, D.; Aghazadeh Tabrizi, M.; Bassetto, M.; Brancale, A.; Hamel, E.; Castagliuolo, I.; Bortolozzi, R.; Basso, G.; Viola, G. Synthesis and Biological Evaluation of 2-(Alkoxy carbonyl)-3-Anilinobenzo[b] Thiophenes and Thieno[2,3-b]Pyridines as New Potent Anticancer Agents. *J Med Chem* **2013**, *56* (6), 2606–2618. DOI: 10.1021/jm400043d.
- (67) Lawrence, N. J.; Rennison, D.; Woo, M.; MCGown, A. T.; Had[®]eld, J. A. Antimitotic and Cell Growth Inhibitory Properties of Combretastatin A-4-like Ethers. *BMCL* **2001**, *11*, 51–54.

- (68) Shirai, R.; Tokuda, K.; Koiso, Y.; Iwasaki, S. Synthesis and Anti-Tubulin Activity of Aza-Combretastatins. *Bioorg Med Chem Lett* **1994**, *4* (5), 699–704. DOI: 10.1016/S0960-894X(01)80183-9.
- (69) Metwally, N. H.; Badawy, M. A.; Okpy, D. S. Synthesis, Biological Evaluation of Novel Thiopyrano[2,3-d]Thiazoles Incorporating Arylsulfonate Moiety as Potential Inhibitors of Tubulin Polymerization, and Molecular Modeling Studies. *J Mol Struct* **2022**, *1258* (132648). DOI: 10.1016/j.molstruc.2022.132648.
- (70) Jung, E. K.; Leung, E.; Barker, D. Synthesis and Biological Activity of Pyrrole Analogues of Combretastatin A-4. *Bioorg Med Chem Lett* **2016**, *26* (13), 3001–3005. DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.05.026.
- (71) Scherbakov, A.; Zakharov, A. V.; Mikhaevich, E. I.; Salnikova, D. I.; Yadykov, A. V.; Kozhevnikova, A. A.; Shirinian, V. Z. Photostability and Antiproliferative Activity of Furan Analogues of Combretastatin A-4. *Chem Res Toxicol* **2022**, *35* (11), 2014–2024. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.2c00204.
- (72) Kostin, R. K.; Marshavin, A. S. Pyrazoles, Isoxazoles, and 1,2,3-Triazoles as Analogs of the Natural Cytostatic Combretastatin A-4: Efficient Routes of Synthesis, Tubulin Inhibition, and Cytotoxicity. *Chem Heterocycl Compd (N Y)* **2021**, *57* (11), 1061–1072. DOI: 10.1007/s10593-021-03025-y.
- (73) Flynn, B. L.; Hamel, E.; Jung, M. K. One-Pot Synthesis of Benzo[b]Furan and Indole Inhibitors of Tubulin Polymerization. *J Med Chem* **2002**, *45* (12), 2670–2673. DOI: 10.1021/jm020077t.
- (74) WalyEldeen, A. A.; Sabet, S.; El-Shorbagy, H. M.; Abdelhamid, I. A.; Ibrahim, S. A. Chalcones: Promising Therapeutic Agents Targeting Key Players and Signaling Pathways Regulating the Hallmarks of Cancer. *Chem Biol Interact* **2023**, *369* (110297). DOI: 10.1016/j.cbi.2022.110297.
- (75) Li, Q.; Woods, K. W.; Claiborne, A.; Gwaltney, S. L.; Barr, K. J.; Liu, G.; Gehrke, L.; Credo, R. B.; Hui, Y. H.; Lee, J.; Warner, R. B.; Kovar, P.; Nukkala, M. A.; Zielinski, N. A.; Tahir, S. K.; Fitzgerald, M.; Kim, K. H.; Marsh, K.; Frost, D.; Ng, S.-C.; Rosenberg, S.; Sham, H. L. Synthesis and Biological Evaluation of 2-Indolyloxazolines as a New Class of Tubulin Polymerization Inhibitors. Discovery of A-289099 as an Orally Active Antitumor Agent. *Bioorg Med Chem Lett* **2002**, *12*, 465–469. DOI: 10.1016/S0960-894X(01)00759-4.
- (76) Zheng, S.; Zhong, Q.; Mottamal, M.; Zhang, Q.; Zhang, C.; Lemelle, E.; McFerrin, H.; Wang, G. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Pyridine-Bridged Analogues of Combretastatin-A4 as Anticancer Agents. *J Med Chem* **2014**, *57* (8), 3369–3381. DOI: 10.1021/jm500002k.
- (77) Porcù, E.; Salvador, A.; Primac, I.; Mitola, S.; Ronca, R.; Ravelli, C.; Bortolozzi, R.; Vedaldi, D.; Romagnoli, R.; Basso, G.; Viola, G. Vascular Disrupting Activity of

- Combretastatin Analogues. *Vascul Pharmacol* **2016**, *83*, 78–89. DOI: 10.1016/j.vph.2016.05.006.
- (78) Segreti, J. A.; Polakowski, J. S.; Koch, K. A.; Marsh, K. C.; Bauch, J. L.; Rosenberg, S. H.; Sham, H. L.; Cox, B. F.; Reinhart, G. A. Tumor Selective Antivasular Effects of the Novel Antimitotic Compound ABT-751: An in Vivo Rat Hemodynamic Study. *Cancer Chemother Pharmacol* **2004**, *54* (3), 273–281. DOI: 10.1007/s00280-004-0807-0.
- (79) Tozer, G. M.; Kanthou, C.; Baguley, B. C. Disrupting Tumour Blood Vessels. *Nat Rev Cancer* **2005**, *5* (6), 423–435. DOI: 10.1038/nrc1628.
- (80) Nihei, Y.; Suzuki, M.; Okano, A.; Tsuji, T.; Akiyama, Y.; Tsuruo, T.; Saito, S.; Hori, K.; Sato, Y. Evaluation of Antivasular and Antimitotic Effects of Tubulin Binding Agents in Solid Tumor Therapy. *Jpn J Cancer Res* **1999**, *90* (12), 1387–1395. DOI: 10.1111/j.1349-7006.1999.tb00724.x.
- (81) Schwartz, E. L. Antivasular Actions of Microtubule-Binding Drugs. *Clin Cancer Res* **2009**, *15* (8), 2594–2601. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2710.
- (82) Kanthou, C.; Tozer, G. M. Microtubule Depolymerizing Vascular Disrupting Agents: Novel Therapeutic Agents for Oncology and Other Pathologies. *Int J Exp Pathol* **2009**, *90* (3), 284–294. DOI: 10.1111/j.1365-2613.2009.00651.x.
- (83) Stason, W. B.; Cannon, P. J.; Heinemann, H. O.; Laragh, J. H. Furosemide A Clinical Evaluation of Its Diuretic Action. *Circulation* **1966**, *34*, 910–920. DOI: 10.1161/01.cir.34.5.910.
- (84) Shuster, D. L.; Shireman, L. M.; Ma, X.; Shen, D. D.; Flood Nichols, S. K.; Ahmed, M. S.; Clark, S.; Caritis, S.; Venkataramanan, R.; Haas, D. M.; Quinney, S. K.; Haneline, L. S.; Tita, A. T.; Manuck, T. A.; Thummel, K. E.; Brown, L. M.; Ren, Z.; Brown, Z.; Easterling, T. R.; Hebert, M. F. Pharmacodynamics of Glyburide, Metformin, and Glyburide/Metformin Combination Therapy in the Treatment of Gestational Diabetes Mellitus. *Clin Pharmacol Ther* **2020**, *107* (6), 1362–1372. DOI: 10.1002/cpt.1749.
- (85) Baran, W.; Adamek, E.; Ziemiańska, J.; Sobczak, A. Effects of the Presence of Sulfonamides in the Environment and Their Influence on Human Health. *J Hazard Mater* **2011**, *196*, 1–15. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2011.08.082.
- (86) Shukralla, A. A.; Dolan, E.; Delanty, N. Acetazolamide: Old Drug, New Evidence? *Epilepsia Open* **2022**, *7* (3), 378–392. DOI: 10.1002/epi4.12619.
- (87) National Library of Medicine. *ClinicalTrials.gov*. <https://clinicaltrials.gov/> (consultado 2024-05-16).
- (88) Yoshimatsu, K.; Yamaguchi, A.; Yoshino, H.; Koyanagi, N.; Kitoh, K. Mechanism of Action of E7010, an Orally Active Antitumor Agent: Inhibition of Mitosis by Binding to the Colchicine Site of Tubulin. *Cancer Res*. **1997**, *57* (15), 3208–3213.

- (89) Mauer, A. M.; Cohen, E. E. W.; Ma, P. C.; Kozloff, M. F.; Schwartzberg, L.; Coates, A. I.; Qian, J.; Hagey, A. E.; Gordon, G. B. A Phase II Study of ABT-751 in Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. *J Thorac Oncol* **2008**, *3* (6), 631–636. DOI: 10.1097/jto.0b013e318174e01f.
- (90) Hande, K. R.; Hagey, A.; Berlin, J.; Cai, Y.; Meek, K.; Kobayashi, H.; Lockhart, A. C.; Medina, D.; Sosman, J.; Gordon, G. B.; Rothenberg, M. L. The Pharmacokinetics and Safety of ABT-751, a Novel, Orally Bioavailable Sulfonamide Antimitotic Agent: Results of a Phase 1 Study. *Clin Cancer Res* **2006**, *12* (9), 2834–2840. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-2159.
- (91) Lai, M. J.; Lee, H. Y.; Chuang, H. Y.; Chang, L. H.; Tsai, A. C.; Chen, M. C.; Huang, H. L.; Wu, Y. W.; Teng, C. M.; Pan, S. L.; Liu, Y. M.; Mehndiratta, S.; Liou, J. P. N-Sulfonyl-Aminobiaryls as Antitubulin Agents and Inhibitors of Signal Transducers and Activators of Transcription 3 (STAT3) Signaling. *J Med Chem* **2015**, *58* (16), 6549–6558. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00659.
- (92) Chiou, C. T.; Chen, G. S.; Chen, M. L.; Li, H.; Shi, L.; Huang, X. H.; Dai, W. M.; Chern, J. W. Synthesis of Anti-Microtubule N-(2-Arylindol-7-Yl)-Benzenesulfonamide Derivatives and Their Antitumor Mechanisms. *ChemMedChem* **2010**, *5* (9), 1489–1497. DOI: 10.1002/cmcd.201000228.
- (93) Aprile, S.; Del Grosso, E. Identification of the Human UDP-Glucuronosyltransferases Involved in the Glucuronidation of Combretastatin A-4. *Drug Metab Dispos* **2010**, *38* (7), 1141–1146. DOI: 10.1124/dmd.109.031435.
- (94) González, M.; Ovejero-Sánchez, M.; Vicente-Blázquez, A.; Álvarez, R.; Herrero, A. B.; Medarde, M.; González-Sarmiento, R.; Peláez, R. Microtubule Destabilizing Sulfonamides as an Alternative to Taxane-Based Chemotherapy. *Int J Mol Sci* **2021**, *22* (4), 1–21. DOI: 10.3390/ijms22041907.
- (95) Wang, G.; Fan, M.; Liu, W.; He, M.; Li, Y.; Peng, Z. Synthesis, Biological Evaluation and Molecular Docking Investigation of New Sulphonamide Derivatives Bearing Naphthalene Moiety as Potent Tubulin Polymerisation Inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem* **2021**, *36* (1), 1402–1410. DOI: 10.1080/14756366.2021.1943378.
- (96) Fortin, S.; Wei, L.; Moreau, E.; Lacroix, J.; Côté, M. F.; Petitclerc, É.; Kotra, L. P.; Gaudreault, R. C. Substituted Phenyl 4-(2-Oxoimidazolidin-1-Yl)Benzenesulfonamides as Antimitotics. Antiproliferative, Antiangiogenic and Antitumoral Activity, and Quantitative Structure-Activity Relationships. *Eur J Med Chem* **2011**, *46* (11), 5327–5342. DOI: 10.1016/j.ejmech.2011.08.034.
- (97) Gagné-Boulet, M.; Bouzriba, C.; Chavez Alvarez, A. C.; Fortin, S. Phenyl 4-(2-Oxopyrrolidin-1-Yl)Benzenesulfonates and Phenyl 4-(2-Oxopyrrolidin-1-Yl)Benzenesulfonamides as New Antimicrotubule Agents Targeting the Colchicine-Binding Site. *Eur J Med Chem* **2021**, *213*. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.113136.

- (98) Chavez Alvarez, A. C.; Zarifi Khosroshahi, M.; Côté, M. F.; Gagné-Boulet, M.; Fortin, S. 4-(3-Alkyl-2-Oxoimidazolidin-1-yl)-N-Phenylbenzenesulfonamides as New Antimitotic Prodrugs Activated by Cytochrome P450 1A1 in Breast Cancer Cells. *Bioorg Med Chem* **2018**, *26* (18), 5045–5052. DOI: 10.1016/j.bmc.2018.09.001.
- (99) Ouellette, V.; Chavez Alvarez, A. C.; Bouzriba, C.; Hamel-Côté, G.; Fortin, S. 4-(3-Alkyl-2-Oxoimidazolidin-1-yl)-N-Phenylbenzenesulfonamide Salts: Novel Hydrosoluble Prodrugs of Antimitotics Selectively Bioactivated by the Cytochrome P450 1A1 in Breast Cancer Cells. *Bioorg Chem* **2023**, *140*. DOI: 10.1016/j.bioorg.2023.106820.
- (100) Segreti, J. A.; Brooks, K. A.; Marsh, K. C.; Bauch, J. L.; Lan, Y.; Thomas Lin, C.; Rosenberg, S. H.; Sham, H. L.; Reinhart, G. A.; Cox, B. F.; Polakowski, J. S. Tumour-Selective Antivasular Effects of the Novel Anti-Mitotic Compound A-318315: An in Vivo Rat Regional Haemodynamic Study. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **2010**, *37* (5–6), 636–640. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2010.05365.x.
- (101) Vicente-Blázquez, A.; González, M.; Medarde, M.; Mollinedo, F.; Peláez, R. New Indolesulfonamide Derivatives Targeting the Colchicine Site of Tubulin: Synthesis, Anti-Tumour Activity, Structure–Activity Relationships, and Molecular Modelling. *J Enzyme Inhib Med Chem* **2021**, *36* (1), 2025–2044. DOI: 10.1080/14756366.2021.1975277.
- (102) Zhou, J.; Zhang, Y.; Cui, Y. W.; Li, Z. M.; Song, H. R.; Dong, J. H.; Chen, X. G.; Xu, B. L. Synthesis and Cytotoxic Evaluation of N-(4-Methoxy-1H-Benzo[d]imidazol-7-yl)-Arylsulfonamide and N-Aryl-(4-Methoxy-1H-Benzo[d]imidazol)-7-Sulfonamide Analogs of Combretastatin A-4. *J Asian Nat Prod Res* **2011**, *13* (4), 330–340. DOI: 10.1080/10286020.2011.556091.
- (103) Hu, L.; Li, Z. R.; Li, Y.; Qu, J.; Ling, Y. H.; Jiang, J. D.; Boykin, D. W. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Carbazole Sulfonamides as a Novel Class of Antimitotic Agents against Solid Tumors. *J Med Chem* **2006**, *49* (21), 6273–6282. DOI: 10.1021/jm060546h.
- (104) Liu, J.; Xue, D.; Zhu, X.; Yu, L.; Mao, M.; Liu, Y. Anticancer Evaluation of a Novel Dithiocarbamate Hybrid as the Tubulin Polymerization Inhibitor. *Invest New Drugs* **2020**, *38* (2), 525–532. DOI: 10.1007/s10637-019-00799-z.
- (105) Ding, L.; Wei, F.; Wang, N.; Sun, Y.; Wang, Q.; Fan, X.; Qi, L.; Wang, S. Tertiary Sulphonamide Derivatives as Dual Acting Small Molecules That Inhibit LSD1 and Suppress Tubulin Polymerisation against Liver Cancer. *J Enzyme Inhib Med Chem* **2021**, *36* (1), 1563–1572. DOI: 10.1080/14756366.2021.1917564.
- (106) González, M.; Ellahioui, Y.; Gallego, L.; Vicente-Blázquez, A.; Álvarez, R.; Medarde, M.; Peláez, R. Novel Amino Analogs of the Trimethoxyphenyl Ring in Potent Colchicine Site Ligands Improve Solubility by the Masked Polar Group Incorporation (MPGI) Strategy. *Bioorg Chem* **2023**, *131*. DOI: 10.1016/j.bioorg.2022.106282.

- (107) González, M.; Ovejero-Sánchez, M.; Vicente-Blázquez, A.; Medarde, M.; González-Sarmiento, R.; Peláez, R. Methoxy and Bromo Scans on N-(5-Methoxyphenyl) Methoxybenzenesulphonamides Reveal Potent Cytotoxic Compounds, Especially against the Human Breast Adenocarcinoma MCF7 Cell Line. *J Enzyme Inhib Med Chem* **2021**, *36* (1), 1029–1047. DOI: 10.1080/14756366.2021.1925265.
- (108) Medina, J. C. Benzenesulfonamides and Benzamides as Therapeutic Agents. WO 99/36391, 1999.
- (109) Li, Q.; Sham, H.; Woods, K. W.; Steiner, B. A.; Gwaltney II, S. L.; Barr, K. J.; Imade, H. M.; Rosenberg, S. Cell Proliferation Inhibitors. US 6,521,658 B1, 2023.
- (110) Chauthe, S. K.; Mahajan, S.; Rachamalla, M.; Tikoo, K.; Singh, I. P. Synthesis and Evaluation of Linear Furanocoumarins as Potential Anti-Breast and Anti-Prostate Cancer Agents. *Med Chem Res* **2015**, *24* (6), 2476–2484. DOI: 10.1007/s00044-014-1312-6.
- (111) Issa, M. Y.; Elshal, M. F.; Fathallah, N.; Abdelkawy, M. A.; Bishr, M.; Salama, O.; Abulfadl, Y. S. Potential Anticancer Activity of the Furanocoumarin Derivative Xanthotoxin Isolated from Ammi Majus L. Fruits: In Vitro and In Silico Studies. *Molecules* **2022**, *27* (3). DOI: 10.3390/molecules27030943.
- (112) Shan, B.; Medina, J. C.; Santha, E.; Frankmoelle, W. P.; Chou, T.-C.; Learned, R. M.; Narbut, M. R.; Stott, D.; Wu, P.; Jaen, J. C.; Rosen, T.; Timmermans, P. B. M. W. M.; Beckmann, H. Selective, Covalent Modification of Tubulin Residue Cys-239 by T138067, an Antitumor Agent with in Vivo Efficacy against Multidrug-Resistant Tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1999**, *96*, 5686–5691. DOI: 10.1073/pnas.96.10.5686.
- (113) Gwaltney, S. L.; Imade, H. M.; Barr, K. J.; Li, Q.; Gehrke, L.; Credo, R. B.; Warner, R. B.; Lee, Y.; Kovar, P.; Wang, J.; Nukkala, M. A.; Zielinski, N. A.; Frost, D.; Ng, S.-C.; Sham, H. L. Novel Sulfonate Analogues of Combretastatin A-4: Potent Antimitotic Agents. *Bioorg Med Chem Lett* **2001**, *11*, 871–874. DOI: 10.1016/S0960-894X(01)00098-1.
- (114) McLoughlin, E. C.; O'boyle, N. M. Colchicine-Binding Site Inhibitors from Chemistry to Clinic: A Review. *Pharmaceuticals* **2020**, *13* (1). DOI: 10.3390/ph13010008.
- (115) Maya, A. B. S.; Pérez-Melero, C.; Mateo, C.; Alonso, D.; Fernández, J. L.; Gajate, C.; Mollinedo, F.; Peláez, R.; Caballero, E.; Medarde, M. Further Naphthylcombretastatins. An Investigation on the Role of the Naphthalene Moiety. *J Med Chem* **2005**, *48* (2), 556–568. DOI: 10.1021/jm0310737.
- (116) Álvarez, R.; Álvarez, C.; Mollinedo, F.; Sierra, B. G.; Medarde, M.; Peláez, R. Isocombretastatins A: 1,1-Diarylethenes as Potent Inhibitors of Tubulin Polymerization and Cytotoxic Compounds. *Bioorg Med Chem* **2009**, *17*, 6422–6431. DOI: 10.1016/j.bmc.2009.07.012.

- (117) Sánchez Maya, A. B.; Pérez-Melero, C.; Salvador, N.; Peláez, R.; Caballero, E.; Medarde, M. New Naphthylcombretastatins. Modifications on the Ethylene Bridge. *Bioorg Med Chem* **2005**, *13* (6), 2097–2107. DOI: 10.1016/j.bmc.2005.01.012.
- (118) Bzeih, T.; Naret, T.; Hachem, A.; Jaber, N.; Khalaf, A.; Bignon, J.; Brion, J. D.; Alami, M.; Hamze, A. A General Synthesis of Arylindoles and (1-Arylvinyl)Carbazoles: Via a One-Pot Reaction from N-Tosylhydrazones and 2-Nitro-Haloarenes and Their Potential Application to Colon Cancer. *Chemical Communications* **2016**, *52* (88), 13027–13030. DOI: 10.1039/c6cc07666a.
- (119) Naret, T.; Khelifi, I.; Provot, O.; Bignon, J.; Levaïque, H.; Dubois, J.; Souce, M.; Kasselouri, A.; Deroussent, A.; Paci, A.; Varela, P. F.; Gigant, B.; Alami, M.; Hamze, A. 1,1-Diheterocyclic Ethylenes Derived from Quinaldine and Carbazole as New Tubulin-Polymerization Inhibitors: Synthesis, Metabolism, and Biological Evaluation. *J Med Chem* **2019**, *62* (4), 1902–1916. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b01386.
- (120) Álvarez, R.; Puebla, P.; Díaz, J. F.; Bento, A. C.; García-Navas, R.; De La Iglesia-Vicente, J.; Mollinedo, F.; Andreu, J. M.; Medarde, M.; Peláez, R. Endowing Indole-Based Tubulin Inhibitors with an Anchor for Derivatization: Highly Potent 3-Substituted Indolephenstatins and Indoleisocombretastatins. *J Med Chem* **2013**, *56* (7), 2813–2827. DOI: 10.1021/jm3015603.
- (121) Llauger, L.; He, H.; Kim, J.; Aguirre, J.; Rosen, N.; Peters, U.; Davies, P.; Chiosis, G. Evaluation of 8-Arylsulfanyl, 8-Arylsulfoxyl, and 8-Arylsulfonyl Adenine Derivatives as Inhibitors of the Heat Shock Protein 90. *J Med Chem* **2005**, *48* (8), 2892–2905. DOI: 10.1021/jm049012b.
- (122) Li, W.; Yin, Y.; Yao, H.; Shuai, W.; Sun, H.; Xu, S.; Liu, J.; Yao, H.; Zhu, Z.; Xu, J. Discovery of Novel Vinyl Sulfone Derivatives as Anti-Tumor Agents with Microtubule Polymerization Inhibitory and Vascular Disrupting Activities. *Eur J Med Chem* **2018**, *157*, 1068–1080. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.08.074.
- (123) Prakash, G. K. S.; Mathew, T.; Panja, C.; Olah, G. A. Chlorotrimethylsilane-Nitrate Salts as Oxidants: Direct Oxidative Conversion of Thiols and Disulfides to Sulfonyl Chlorides. *J Org Chem* **2007**, *72* (15), 5847–5850. DOI: 10.1021/jo070907g.
- (124) Binisti, C.; Assogba, L.; Touboul, E.; Mounier, C.; Huet, J.; Ombetta, J.-E.; Dong, C. Z.; Redeuilh, C.; Heymans, F.; Godfroid, J.-J. Structure-Activity Relationships in Platelet-Activating Factor (PAF). 11-From PAF-Antagonism to Phospholipase A 2 Inhibition: Syntheses and Structure-Activity Relationships in 1-Arylsulfamido-2-Alkylpiperazines. *Eur. J. Med. Chem* **2001**, *36*, 809–828. DOI: 10.1016/s0223-5234(01)01274-0.
- (125) Offer, J.; Boddy, C. N. C.; Dawson, P. E. Extending Synthetic Access to Proteins with a Removable Acyl Transfer Auxiliary. *J Am Chem Soc* **2002**, *124* (17), 4642–4646. DOI: 10.1021/ja016731w.

- (126) Qiu, Z.; Lv, L.; Li, J.; Li, C. C.; Li, C. J. Direct Conversion of Phenols into Primary Anilines with Hydrazine Catalyzed by Palladium. *Chem Sci* **2019**, *10* (18), 4775–4781. DOI: 10.1039/c9sc00595a.
- (127) Morrison, D. C.; Lee H.P.C. A New Preparation of 8-Nitro-2-Naphthylamine. *J Org Chem* **1962**, *27*, 3336–3337. DOI: 10.1021/jo01056a522.
- (128) Schiedel, M.; Rumpf, T.; Karaman, B.; Lehotzky, A.; Oláh, J.; Gerhardt, S.; Ovádi, J.; Sippl, W.; Einsle, O.; Jung, M. Aminothiazoles as Potent and Selective Sirt2 Inhibitors: A Structure-Activity Relationship Study. *J Med Chem* **2016**, *59* (4), 1599–1612. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b01517.
- (129) Chahal, M.; Dhillon, S.; Rani, P.; Kumari, G.; Aneja, D. K.; Kingler, M. Unravelling the Synthetic and Therapeutic Aspects of Five, Six and Fused Heterocycles Using Vilsmeier-Haack Reagent. *RSC Adv* **2023**, *13* (38), 26604–26629. DOI: 10.1039/d3ra04309f.
- (130) Álvarez, R.; Aramburu, L.; Gajate, C.; Vicente-Blázquez, A.; Mollinedo, F.; Medarde, M.; Peláez, R. Methylsulfanylpyridine Based Diheteroaryl Isocombretastatin Analogs as Potent Anti-Proliferative Agents. *Eur J Med Chem* **2021**, *209*. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112933.
- (131) González, M.; Alcolea, P. J.; Álvarez, R.; Medarde, M.; Larraga, V.; Peláez, R. New Diarylsulfonamide Inhibitors of Leishmania Infantum Amastigotes. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* **2021**, *16*, 45–64. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2021.02.006.
- (132) Vicente Blázquez, A. Novel Indole-Based Antimitotic Agents: Design, Synthesis and Study of the Antitumor Mechanism of Action, Universidad de Salamanca, 2020.
- (133) Pan, X.; Wang, H.; Li, C.; Zhang, J. Z. H.; Ji, C. MolGpka: A Web Server for Small Molecule PKa Prediction Using a Graph-Convolutional Neural Network. *J Chem Inf Model* **2021**, *61* (7), 3159–3165. DOI: 10.1021/acs.jcim.1c00075.
- (134) Remko, M.; Von Der Lieth, C. W. Theoretical Study of Gas-Phase Acidity, PK a, Lipophilicity, and Solubility of Some Biologically Active Sulfonamides. *Bioorg Med Chem* **2004**, *12* (20), 5395–5403. DOI: 10.1016/j.bmc.2004.07.049.
- (135) Escala, N.; Valderas-García, E.; Álvarez Bardón, M.; de Agüero, V. C. G.; López-Pérez, J. L.; Rojo-Vázquez, F. A.; Feliciano, A. S.; Martínez-Valladares, M.; Balaña-Fouce, R.; del Olmo, E. Further and New Target-Based Benzimidazole Anthelmintics Active against Teladorsagia Circumcincta. *J Mol Struct* **2022**, *1269*. DOI: 10.1016/j.molstruc.2022.133735.
- (136) Hussein, A. A.; Al-Hadedi, A. A. M.; Mahrath, A. J.; Moustafa, G. A. I.; Almalki, F. A.; Alqahtani, A.; Shityakov, S.; Algazally, M. E. Mechanistic Investigations on Pinnick Oxidation: A Density Functional Theory Study. *R Soc Open Sci* **2020**, *7* (2). DOI: 10.1098/rsos.191568.

- (137) Midya, G. C.; Kapat, A.; Maiti, S.; Dash, J. Transition-Metal-Free Hydration of Nitriles Using Potassium Tert -Butoxide under Anhydrous Conditions. *Journal of Organic Chemistry* **2015**, *80* (8), 4148–4151. DOI: 10.1021/jo502752u.
- (138) Ayuda-Durán, P.; Hermansen, J. U.; Giliberto, M.; Yin, Y.; Hanes, R.; Gordon, S.; Kuusanmäki, H.; Brodersen, A. M.; Andersen, A. N.; Taskén, K.; Wennerberg, K.; Enserink, J. M.; Skånland, S. S. Standardized Assays to Monitor Drug Sensitivity in Hematologic Cancers. *Cell Death Discov* **2023**, *9* (1). DOI: 10.1038/s41420-023-01722-5.
- (139) Van Meerloo, J.; Kaspers, G.; Cloos, J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In *Cancer Cell Culture: Methods and Protocols*; 2011; Vol. 731, pp 237–258. DOI: 10.1007/978-1-61779-080-5_20.
- (140) Grad, I.; Hanes, R.; Ayuda-Durán, P.; Kuijjer, M.; Enserink, J.; Meza-Zepeda, L.; Myklebost, O. Discovery of Novel Candidates for Anti-Liposarcoma Therapies by Medium-Scale High-Throughput Drug Screening. *PLoS One* **2021**, *16* (3), e0248140. DOI: 10.1371/journal.pone.0248140.
- (141) Melvold, K.; Giliberto, M.; Karlsen, L.; Ayuda-Durán, P.; Hanes, R.; Holien, T.; Enserink, J.; Brown, J. R.; Tjønnfjord, G. E.; Taskén, K.; Skånland, S. S. Mcl-1 and Bcl-XL Levels Predict Responsiveness to Dual MEK/Bcl-2 Inhibition in B-Cell Malignancies. *Mol Oncol* **2022**, *16* (5), 1153–1170. DOI: 10.1002/1878-0261.13153.
- (142) Riss, T. L.; Moravec, R. A.; Niles, A. L.; Duellman, S.; Benink, H. A.; Worzella, T. J.; Minor L. Cell Viability Assays. In *The Assay Guidance Manual*; 2013.
- (143) Hanes, R.; Ayuda-Durán, P.; Rønneberg, L.; Nakken, S.; Hovig, E.; Zucknick, M.; Enserink, J. M. Screenwerk: A Modular Tool for the Design and Analysis of Drug Combination Screens. *Bioinformatics* **2023**, *39* (1). DOI: 10.1093/bioinformatics/btac840.
- (144) Greene, L. M.; O’Boyle, N. M.; Nolan, D. P.; Meegan, M. J.; Zisterer, D. M. The Vascular Targeting Agent Combretastatin-A4 Directly Induces Autophagy in Adenocarcinoma-Derived Colon Cancer Cells. *Biochem Pharmacol* **2012**, *84* (5), 612–624. DOI: 10.1016/j.bcp.2012.06.005.
- (145) Malebari, A. M.; Greene, L. M.; Nathwani, S. M.; Fayne, D.; O’Boyle, N. M.; Wang, S.; Twamley, B.; Zisterer, D. M.; Meegan, M. J. β -Lactam Analogues of Combretastatin A-4 Prevent Metabolic Inactivation by Glucuronidation in Chemoresistant HT-29 Colon Cancer Cells. *Eur J Med Chem* **2017**, *130*, 261–285. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.02.049.
- (146) Gallego-Yerga, L.; Chiliquinga, A. J.; Peláez, R. Novel Tetrazole Derivatives Targeting Tubulin Endowed with Antiproliferative Activity against Glioblastoma Cells. *Int J Mol Sci* **2023**, *24* (13). DOI: 10.3390/ijms241311093.

- (147) Zottel, A.; Jovčevska, I.; Šamec, N.; Komel, R. Cytoskeletal Proteins as Glioblastoma Biomarkers and Targets for Therapy: A Systematic Review. *Crit Rev Oncol Hematol* **2021**, *160*. DOI: 10.1016/j.critrevonc.2021.103283.
- (148) Kakumoto, M.; Sakaeda, T.; Takara, K.; Nakamura, T.; Kita, T.; Yagami, T.; Kobayashi, H.; Okamura, N.; Okumura, K. Effects of Carvedilol on MDR1-Mediated Multidrug Resistance: Comparison with Verapamil. *Cancer Sci* **2003**, *94* (1), 81–86. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2003.tb01356.x.
- (149) Varma, M. V. S.; Ashokraj, Y.; Dey, C. S.; Panchagnula, R. P-Glycoprotein Inhibitors and Their Screening: A Perspective from Bioavailability Enhancement. *Pharmacol Res* **2003**, *48* (4), 347–359. DOI: 10.1016/S1043-6618(03)00158-0.
- (150) Thomas, H.; Coley, H. M.; Parker Kodiak, J.; Pastel, A.; Ellefson, J. Overcoming Multidrug Resistance in Cancer: An Update on the Clinical Strategy of Inhibiting P-Glycoprotein From the Collection of Mr. *Cancer Control* **2003**, *10* (2), 107–184. DOI: 10.1177/107327480301000207.
- (151) Mahavorasirikul, W.; Viyanant, V.; Chaijaroenkul, W.; Itharat, A.; Na-Bangchang, K. Cytotoxic Activity of Thai Medicinal Plants against Human Cholangiocarcinoma, Laryngeal and Hepatocarcinoma Cells in Vitro. *BMC Complement Altern Med* **2010**, *10* (55). DOI: 10.1186/1472-6882-10-55.
- (152) Calderón-Montaño, J. M.; Burgos-Morón, E.; Orta, M. L.; Maldonado-Navas, D.; García-Domínguez, I.; López-Lázaro, M. Evaluating the Cancer Therapeutic Potential of Cardiac Glycosides. *Biomed Res Int* **2014**, *2014* (794930). DOI: 10.1155/2014/794930.
- (153) Kim, K. H.; Sederstrom, J. M. Assaying Cell Cycle Status Using Flow Cytometry. *Curr Protoc Mol Biol* **2015**, *111*, 28.6.1-28.6.11. DOI: 10.1002/0471142727.mb2806s111.
- (154) Darzynkiewicz, Z.; Huang, X.; Zhao, H. Analysis of Cellular DNA Content by Flow Cytometry. *Curr Protoc Immunol* **2017**, *2017*, 5.7.1-5.7.20. DOI: 10.1002/cpim.36.
- (155) Janssen, A.; Medema, R. H. Mitosis as an Anti-Cancer Target. *Oncogene* **2011**, *30* (25), 2799–2809. DOI: 10.1038/onc.2011.30.
- (156) Birk, M.; Bürkle, A.; Pekari, K.; Maier, T.; Schmidt, M. Cell Cycle-Dependent Cytotoxicity and Mitotic Spindle Checkpoint Dependency of Investigational and Approved Antimitotic Agents. *Int J Cancer* **2012**, *130* (4), 798–807. DOI: 10.1002/ijc.26036.
- (157) Jia, M.; Pei, Y.; Li, N.; Zhang, Y.; Song, J.; Niu, J. B.; Yang, H.; Zhang, S.; Sun, M. Synthesis and Biological Evaluation of 4-Phenyl-5-Quinolinylnyl Substituted Isoxazole Analogues as Potent Cytotoxic and Tubulin Polymerization Inhibitors against ESCC. *Eur J Med Chem* **2024**, *275*. DOI: 10.1016/j.ejmech.2024.116611.

- (158) Chung, K. S.; Choi, H. E.; Shin, J. S.; Cho, Y. W.; Choi, J. H.; Cho, W. J.; Lee, K. T. 6,7-Dimethoxy-3-(3-Methoxyphenyl)isoquinolin-1-Amine Induces Mitotic Arrest and Apoptotic Cell Death through the Activation of Spindle Assembly Checkpoint in Human Cervical Cancer Cells. *Carcinogenesis* **2013**, *34* (8), 1852–1860. DOI: 10.1093/carcin/bgt133.
- (159) Moreira, J.; Silva, P. M. A.; Castro, E.; Saraiva, L.; Pinto, M.; Bousbaa, H.; Cidade, H. BP-M345 as a Basis for the Discovery of New Diarylpentanoids with Promising Antimitotic Activity. *Int J Mol Sci* **2024**, *25* (3). DOI: 10.3390/ijms25031691.
- (160) Elineni, K. K.; Gallant, N. D. Microtubules Mechanically Regulate Cell Adhesion Strengthening via Cell Shape. *CMBE* **2014**, *7* (1), 136–144. DOI: 10.1007/s12195-013-0316-5.
- (161) Weber, A.; Iturri, J.; Benitez, R.; Zemljic-Jokhadar, S.; Toca-Herrera, J. L. Microtubule Disruption Changes Endothelial Cell Mechanics and Adhesion. *Sci Rep* **2019**, *9* (1). DOI: 10.1038/s41598-019-51024-z.
- (162) D’Arcy, M. S. Cell Death: A Review of the Major Forms of Apoptosis, Necrosis and Autophagy. *Cell Biol Int* **2019**, *43* (6), 582–592. DOI: 10.1002/cbin.11137.
- (163) Ouyang, L.; Shi, Z.; Zhao, S.; Wang, F. T.; Zhou, T. T.; Liu, B.; Bao, J. K. Programmed Cell Death Pathways in Cancer: A Review of Apoptosis, Autophagy and Programmed Necrosis. *Cell Prolif* **2012**, *45* (6), 487–498. DOI: 10.1111/j.1365-2184.2012.00845.x.
- (164) Gallego-Yerga, L.; Ceña, V.; Peláez, R. Potent and Selective Benzothiazole-Based Antimitotics with Improved Water Solubility: Design, Synthesis, and Evaluation as Novel Anticancer Agents. *Pharmaceutics* **2023**, *15* (6). DOI: 10.3390/pharmaceutics15061698.
- (165) Van Engeland, M.; Nieland, L. J. W.; Ramaekers, F. C. S.; Schutte, B.; Reutelingsperger, C. P. M. Annexin V-Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure. *Cytometry*. January 1, 1998, pp 1–9. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0320(19980101)31:1<1::AID-CYTO1>3.0.CO;2-R.
- (166) Demchenko, A. P. Beyond Annexin V: Fluorescence Response of Cellular Membranes to Apoptosis. *Cytotechnology*. March 2013, pp 157–172. DOI: 10.1007/s10616-012-9481-y.
- (167) Darzynkiewicz, Z.; Galkowski, D.; Zhao, H. Analysis of Apoptosis by Cytometry Using TUNEL Assay. *Methods*. **2008**, *44* (3), 250–254. DOI: 10.1016/j.ymeth.2007.11.008.
- (168) Jänicke, R. U. MCF-7 Breast Carcinoma Cells Do Not Express Caspase-3. *Breast Cancer Res Treat* **2009**, *117* (1), 219–221. DOI: 10.1007/s10549-008-0217-9.

- (169) Yang, X.-H.; Sladek, T. L.; Liu, X.; Butler, B. R.; Froelich, C. J.; Thor, A. D. Reconstitution of Caspase 3 Sensitizes MCF-7 Breast Cancer Cells to Doxorubicin- and Etoposide-Induced Apoptosis 1. *Cancer Res* **2001**, *61*, 348–354.
- (170) Brentnall, M.; Rodriguez-Menocal, L.; De Guevara, R. L.; Cepero, E.; Boise, L. H. Caspase-9, Caspase-3 and Caspase-7 Have Distinct Roles during Intrinsic Apoptosis. *BMC Cell Biol* **2013**, *14* (1). DOI: 10.1186/1471-2121-14-32.
- (171) Gonzalez-Ramirez, M.; Salvesen, G. S. A Primer on Caspase Mechanisms. *Semin Cell Dev Biol* **2018**, *82*, 79–85. DOI: 10.1016/j.semcdb.2018.01.002.
- (172) Artymovich, K.; Appledorn, D. M. A Multiplexed Method for Kinetic Measurements of Apoptosis and Proliferation Using Live-Content Imaging. *Methods Mol Biol* **2015**, *1219*, 35–42. DOI: 10.1007/978-1-4939-1661-0_4.
- (173) Hanson, K. M.; Finkelstein, J. N. An Accessible and High-Throughput Strategy of Continuously Monitoring Apoptosis by Fluorescent Detection of Caspase Activation. *Anal Biochem* **2019**, *564–565*, 96–101. DOI: 10.1016/j.ab.2018.10.022.
- (174) Karatoprak, G. Ş.; Akkol, E. K.; Genç, Y.; Bardakci, H.; Yücel, Ç.; Sobarzo-Sánchez, E. Combretastatins: An Overview of Structure, Probable Mechanisms of Action and Potential Applications. *Molecules* **2020**, *25* (11). DOI: 10.3390/molecules25112560.
- (175) Foster, R. S.; Fowkes, A.; Cayley, A.; Thresher, A.; Werner, A. L. D.; Barber, C. G.; Kocks, G.; Tennant, R. E.; Williams, R. V.; Kane, S.; Stalford, S. A. The Importance of Expert Review to Clarify Ambiguous Situations for (Q)SAR Predictions under ICH M7. *Genes and Environment* **2020**, *42* (1). DOI: 10.1186/s41021-020-00166-y.
- (176) Barber, C.; Fowkes, A.; Hanser, T.; Heghes, C. From Model Performance to Decision Support – The Rise of Computational Toxicology in Chemical Safety Assessments. *Comput Toxicol*. Elsevier B.V. 2024. DOI: 10.1016/j.comtox.2024.100303.
- (177) Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. *Sci Rep* **2017**, *7*. DOI: 10.1038/srep42717.
- (178) Hughes, J. D.; Blagg, J.; Price, D. A.; Bailey, S.; DeCrescenzo, G. A.; Devraj, R. V.; Ellsworth, E.; Fobian, Y. M.; Gibbs, M. E.; Gilles, R. W.; Greene, N.; Huang, E.; Krieger-Burke, T.; Loesel, J.; Wager, T.; Whiteley, L.; Zhang, Y. Physicochemical Drug Properties Associated with in Vivo Toxicological Outcomes. *Bioorg Med Chem Lett* **2008**, *18* (17), 4872–4875. DOI: 10.1016/j.bmcl.2008.07.071.
- (179) Jorgensen, W. L.; Duffy, E. M. Prediction of Drug Solubility from Structure. *Adv Drug Deliv Rev* **2002**, *54*, 355–366. DOI: 10.1016/s0169-409x(02)00008-x.

8. APÉNDICE