



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Orgánica I

Tesis Doctoral

**LA ESTRUCTURA DEL DOMINIO DE COLCHICINA
COMO BASE PARA EL DISEÑO Y SÍNTESIS DE
COMPUESTOS CON PROPIEDADES ANTIMITÓTICAS Y
ANTIVASCULARES**

Oskía Bueno Zaragüeta

DIRECTORAS

Eva M^a Priego Crespo

M^a Jesús Pérez Pérez

Instituto de Química Médica (CSIC)

Madrid, 2017



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el grupo de investigación *Nucleósidos y análogos como fuente de moléculas bioactivas* del Instituto de Química Médica perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), bajo la dirección de la Prof. María Jesús Pérez Pérez y la Dra. Eva María Priego, y dentro del marco de los proyectos SAF2012-39760-C02-01 y SAF2015-64629-C2-1-R, financiados por el Ministerio de Economía y Competitividad, y BIPEDD-CM-S2010/BMD-2457, financiado por la Comunidad de Madrid.

La autora agradece a la Sociedad Española de Química Terapéutica el premio “Ramón Madroñero” otorgado en la XVII Convocatoria de Premios para Investigadores Noveles de la Sociedad Española de Química Terapéutica. El trabajo recogido en este premio es parte de lo reflejado en el Capítulo 2 de la presente Tesis Doctoral.

ÍNDICE

Nota sobre puntuación y nomenclatura.....	i
Abreviaturas.....	iii
Resumen.....	v
Summary.....	xi

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS GENERALES

1. Introducción General.....	3
1.1. Terapia antivascular como estrategia frente al cáncer.....	3
1.2. Agentes interruptores de la vascularización tumoral (VDAs).....	8
1.2.1. Clasificación.....	8
1.2.2. Mecanismo de acción.....	9
1.2.3. Colchicina, combretastatina A-4 y otros ejemplos de VDAs que se unen al sitio de colchicina en tubulina.....	11
1.3. Estructuras de rayos X de tubulina con ligandos del sitio de colchicina.....	15
1.3.1. Estructura de tubulina.....	15
1.3.2. Sitio de unión de colchicina en $\alpha\beta$ -tubulina.....	16
1.3.3. Ligandos del dominio de unión de colchicina como agentes desestabilizantes de los microtúbulos: Conformación recta versus conformación curva de tubulina.....	21
1.4. Actividad antitumoral de la CA-4: evidencias e interrogantes.....	22
2. Objetivos Generales.....	25
3. Bibliografía.....	27

1. CAPÍTULO 1. DERIVADOS DE CICLOHEXANODIONA COMO LIGANDOS DEL DOMINIO DE COLCHICINA EN TUBULINA

1.1. Introducción y antecedentes.....	39
1.2. Objetivos.....	43
1.3. Resultados y discusión.....	45
1.3.1. Estudios de docking de TUB075 en el dominio de colchicina.....	45
1.3.2. Síntesis y evaluación biológica de derivados de TUB075 basados en estudios de docking.....	47
1.2.3.1. Síntesis.....	47
1.2.3.2. Evaluación biológica.....	51
a) Actividad antiproliferativa.....	51
b) Determinación de la solubilidad de TUB075 , 1.22 y 1.23	52
c) Determinación de la constante de asociación (K_a) de 1.23 con tubulina.....	52

1.3.3. Determinación de la estructura del complejo TUB075-tubulina mediante difracción de rayos X.....	54
1.3.4. Nuevos derivados de TUB075 basados en estudios de mapas de afinidad del complejo TUB075-tubulina.....	56
1.3.4.1. Estudios de mapas de afinidad del complejo TUB075-tubulina.....	56
1.3.4.2. Síntesis y evaluación de derivados de benzofurano.....	58
a) Síntesis y evaluación del compuesto 1.35	58
b) Síntesis y evaluación de nuevos derivados de 1.35	59
c) Determinación de la constante de asociación (K_a).....	63
1.3.4.3. Estudios para la determinación del mecanismo de acción..	65
a) Estudio del efecto en la progresión del ciclo celular.....	65
b) Estudio de la actividad caspasa-3.....	67
c) Estudio del efecto interruptor de la vascularización.....	68
1.3.5. Nuevos derivados basados en la superposición de los complejos de rayos X TUB075-tubulina y DAMA-colchicina-tubulina.....	70
1.3.5.1. Mapas de afinidad del complejo DAMA-colchicina-tubulina y superposición con TUB075	70
1.3.5.2. Síntesis y evaluación de nuevos derivados basados en los mapas de afinidad de DAMA-colchicina.....	72
a) Síntesis.....	72
b) Evaluación de la actividad antiproliferativa.....	76
c) Determinación de la constante de asociación (K_a).....	78
1.3.5.3. Estudios para la determinación del mecanismo de acción..	79
a) Estudio del efecto en la progresión del ciclo celular.....	79
b) Estudio de la actividad caspasa-3.....	81
c) Estudio del efecto interruptor de la vascularización.....	82
1.3.5.4. Síntesis y evaluación del profármaco de 1.106	83
a) Síntesis.....	84
b) Determinación de la solubilidad de 1.106 y 1.109	85
c) Evaluación de la actividad antiproliferativa de 1.109	85
d) Estudios de estabilidad en PBS y suero fetal bovino.....	86
1.4. Conclusiones.....	89
1.5. Bibliografía.....	93

2. CAPÍTULO 2. CHALCONAS Y MIMÉTICOS COMO ESQUELETOS ALTERNATIVOS A LAS COMBRESTATINAS

2.1. Antecedentes.....	99
2.2. Objetivos.....	101
2.3. Resultados y discusión.....	103
2.3.1. Isomerización <i>E/Z</i> de TUB091 y síntesis mejorada de TUB099	103
2.3.2. Síntesis de análogos conformacionalmente restringidos por ciclación sobre el anillo A.....	106

2.3.3. Estructura de rayos X del complejo TUB092-tubulina.....	108
2.3.4. Diseño de nuevos ligandos basados en la estructura del complejo TUB092-tubulina.....	111
2.3.5. Síntesis y evaluación de nuevos análogos conformacionalmente restringidos mediante ciclación sobre el anillo B.....	113
2.3.5.1. Síntesis de nuevos derivados ciclados empleando un intermedio organolítico.....	113
2.3.5.2. Síntesis y actividad antiproliferativa de nuevos derivados ciclados mediante sustitución electrófila aromática.....	114
2.3.6. Estudio del modo de unión del compuesto 2.31 con tubulina.....	121
2.3.6.1. Determinación de la constante de asociación (K_a) de 2.31 con tubulina.....	121
2.3.6.2. Estudios de docking y dinámica molecular 2.31 con tubulina.....	121
2.3.7. Síntesis y evaluación de profármacos de 2.31	123
a) Síntesis del conjugado de Asn-Pro de 2.31	123
b) Determinación de la solubilidad de 2.31 y 2.38	124
c) Evaluación de la actividad antiproliferativa de 2.38	124
d) Estudio de estabilidad en PBS y en suero fetal bovino de 2.38	124
2.3.8. Ensayos <i>in vivo</i> del profármaco TUB099	125
2.4. Conclusiones.....	129
2.5. Bibliografía.....	131

CONCLUSIONES GENERALES..... 137

PARTE EXPERIMENTAL

1. Chemistry procedures.....	143
1.1. Chemistry procedures in chapter 1.....	143
1.2. Chemistry procedures in chapter 2.....	178
2. Computational methods.....	191
2.1. Docking studies.....	191
2.2. Molecular dynamics simulation.....	191
2.3. Analysis of molecular dynamics trajectories.....	192
2.4. Affinity maps calculation.....	192
3. Solubility and stability determination.....	193
3.1. Solubility determination.....	193
3.2. Stability determination in PBS and 10% fetal bovine serum (FBS).....	193
4. Biological methods.....	194
4.1. Cell proliferation.....	194
4.2. Cell cycle analysis.....	194
4.3. Fluorescence detection of caspase-3 activity in live cells.....	195
4.4. Tube formation.....	195
4.5. Determination of binding constants.....	195

4.6. In vivo experiments.....	196
5. X-Ray crystallography.....	197
6. Bibliography.....	199

ANEXO

Supplementary material. NMR spectra of selected compounds	205
---	-----

NOTA SOBRE PUNTUACIÓN Y NOMENCLATURA

Con el fin de simplificar la publicación de los resultados en revistas internacionales que requieren uso de puntuación en la numeración inglesa, se ha utilizado este sistema en la presente Memoria. Así, las cifras decimales se indican con puntos en lugar de con comas, aceptado por la Real Academia Española de la Lengua en el Diccionario Panhispánico de Dudas desde su primera edición en octubre de 2005 (<http://lema.rae.es/dpd/?key=punto>).

ABREVIATURAS

En esta Memoria se han empleado los acrónimos y abreviaturas recomendados en: *Journal of Organic Chemistry*: "Guidelines for Authors". Enero 2017. (http://pubs.acs.org/paragonplus/submission/jocea/jocea_authguide.pdf).

Otras abreviaturas empleadas son menos frecuentes y se detallan a continuación:

CA-1	Combretastatina A-1
CA-2	Combretastatina A-2
CA-4	Combretastatina A-4
CA-1P	Combretastatina A-1 fosfato
CA-4P	Combretastatina A-4 fosfato
CD26	Dipeptidil-peptidasa tipo IV
CI₅₀	Concentración inhibitoria 50
DMAE	Degeneración macular asociada a la edad
DMXAA	Ácido 5,6-dimetilxantenona-4-acético
DPP-IV	Dipeptidil-peptidasa tipo IV
FAA	Ácido 8-flavon acético
HATU	Hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N' tetrametiluronio
K_a	Constante de asociación
logP	Coeficiente de partición
NF-κB	Factor nuclear κB (<i>nuclear factor-κB</i>)
NSCLC	Cáncer de pulmón no microcítico (<i>Non small-cell lung cancer</i>)
PBS	Tampón fosfato (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PDB	<i>Protein data bank</i>
P-gp	<i>Permeability glycoprotein</i>
RB3-SLD	Proteína tipo estatmina RB3 (<i>RB3-stathmin-like domain</i>)
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
R-PT	(R)-(+)-etil-5-amino-2-metil-1,2-dihidro-3-fenilpirido[3,4-b]pirazin-7-il carbamato
SFB	Suero fetal bovino
STING	Proteína estimuladora de genes de interferón
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α (<i>tumor necrosis factor α</i>)
TTL	Tubulina tirosina ligasa
VDA	Agente interruptor de la vascularización tumoral (<i>Vascular Disrupting Agents</i>)

RESUMEN

LA ESTRUCTURA DEL DOMINIO DE COLCHICINA COMO BASE PARA EL DISEÑO Y SÍNTESIS DE COMPUESTOS CON PROPIEDADES ANTIMITÓTICAS Y ANTIVASCULARES

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El desarrollo de redes de vasos sanguíneos que puedan aportar oxígeno y nutrientes es una de las características esenciales para el crecimiento de tumores sólidos. Dada la importancia de un adecuado flujo sanguíneo en el entorno tumoral para la expansión celular y la metástasis tumoral, la búsqueda de compuestos capaces de inhibir dicha vascularización centra grandes expectativas en el estudio actual de nuevas estrategias antineoplásicas. Dentro de la terapia antivascolar, los agentes interruptores de la vascularización tumoral (VDAs) ocupan un papel primordial debido a su mecanismo de acción, complementario a las terapias ya existentes. Los VDAs actúan directa y selectivamente sobre el endotelio tumoral, induciendo cambios morfológicos y funcionales que provocan el descenso rápido y dramático del flujo sanguíneo en el seno del tumor, el cual acaba necrosándose. Dentro de los VDAs, los compuestos más estudiados se encuadran dentro del grupo de ligandos del sitio de colchicina en tubulina, que inhiben la polimerización de los microtúbulos celulares, actuando así como agentes antimitóticos.

La acción antitumoral dual de los VDAs basados en colchicina (antivascolar y antimitótico) explica el enorme potencial terapéutico de esta clase de compuestos. Entre estos VDAs cabe destacar la combretastatina A4 (CA-4), compuesto de referencia del que además existen varios derivados que actualmente se encuentran en fases clínicas avanzadas. Ahora bien, estos candidatos, junto a otros VDAs que también están siendo objeto de investigación clínica, todavía presentan notables limitaciones que obstaculizan el desarrollo farmacéutico de los mismos, tales como la baja estabilidad química y/o la limitada solubilidad. Por ello, el objetivo central de esta Tesis ha consistido en la búsqueda de nuevos VDAs ligandos del sitio de colchicina de mejor perfil farmacológico, que solventen los problemas de los compuestos desarrollados hasta el momento.

Desde 2011, el desarrollo de nuevos VDAs ha sido un área de interés en nuestro grupo de investigación. Así, a partir de la información disponible en nuestro grupo relativa a dos familias de compuestos que habían mostrado su capacidad para unirse al dominio de colchicina en tubulina, en la presente Memoria se ha profundizado en la interacción a nivel molecular de estos ligandos con tubulina y así se ha realizado el

diseño, síntesis y evaluación de nuevas familias de compuestos. El trabajo realizado se ha organizado en 2 capítulos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El Capítulo 1 se ha centrado en una familia de compuestos para la que ya se había demostrado su afinidad por tubulina y su actividad antiproliferativa y antivascular, siendo el compuesto “cabeza de serie” o hit, la 5-fenil-2-(1-((2-etoxi)fenil)amino)etiliden)ciclohexano-1,3-diona (TUB075). Haciendo uso de distintas herramientas computacionales se ha llevado a cabo el diseño racional y síntesis de nuevas series de compuestos con el fin de mejorar la solubilidad acuosa y/o la afinidad por tubulina, modificaciones que han estado centradas en el fragmento de 2-etoxifenilo (anillo D).

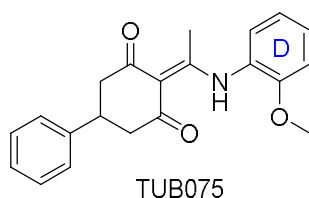


Figura A. Estructura química de TUB075, compuesto “cabeza de serie” del Capítulo 1.

Basándonos en estudios de docking del hit inicial TUB075 en el sitio de unión de colchicina, se observó la existencia de un túnel desde el sustituyente etoxi hacia la interfaz con la subunidad α de tubulina. Así, para ocupar este túnel, y con el fin de mejorar la solubilidad del hit inicial, se han incorporado grupos polares terminales alargando la cadena del sustituyente en posición *orto* del anillo D. Los mejores resultados se han obtenido mediante la introducción de una cadena de dietilenglicol, con el que se ha conseguido un derivado 16 veces más soluble que el hit inicial.

La resolución mediante difracción de rayos X del complejo TUB075-tubulina, descrito en esta Memoria, ha sido la base para el diseño de nuevos derivados con mayor afinidad por tubulina. Haciendo uso de distintas herramientas computacionales se han estudiado los mapas de afinidad de los complejos TUB075-tubulina y DAMA-colchicina, lo que ha permitido identificar nuevas zonas de interacción próximas al anillo D del esqueleto de ciclohexanodiona. Para ocupar estas zonas de interacción, se han diseñado dos series de compuestos.

Por una parte, y mediante el estudio de los mapas de afinidad del complejo TUB075-tubulina, se diseñaron compuestos que incorporaban un anillo de benzofurano como anillo D, que posteriormente fueron funcionalizados en la posición 2 de dicho heterociclo. Siguiendo esta estrategia, se ha obtenido un compuesto con una capacidad antiproliferativa en el rango nanomolar (8 - 31 nM), y una elevada constante de afinidad

por tubulina ($2.87 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$), lo que supone la mayor constante de afinidad descrita para un ligando del sitio de colchicina. Por otra parte, la superposición de la estructura 3D de TUB075 y los mapas de afinidad obtenidos para el complejo DAMA-colchicina-tubulina permitieron el diseño de derivados que incorporaban en la posición *orto* del anillo D un anillo aromático extra manteniendo como nexo de unión de ambos anillos un átomo de oxígeno. Sobre este nuevo anillo se introdujeron sustituyentes de distinta naturaleza lo que permitió la obtención de derivados con actividades antiproliferativas en el rango submicromolar, siendo especialmente efectiva la incorporación de un grupo amino. La presencia de este grupo amino ha permitido la síntesis de un profármaco por derivatización con el dipéptido Asn-Pro. Este profármaco ha mostrado una actividad antiproliferativa en el mismo orden que el amino derivado, una solubilidad 100 veces mayor a éste, y una eficaz liberación del amino derivado por vía enzimática (SFB).

Los estudios biológicos llevados a cabo sobre los compuestos más prometedores de este capítulo han puesto de manifiesto su capacidad para detener el ciclo celular en la fase G2/M a una concentración inferior a la empleada para observar el mismo efecto en el hit inicial TUB075. Además, se ha confirmado la capacidad de estos derivados para inducir la apoptosis y su actividad antivascolar por interrupción de una red de vasos endoteliales preformada.

En el Capítulo 2, el punto de partida lo han constituido las α -metilchalconas TUB091 y TUB092 descritas por nuestro grupo de investigación. Las propiedades más características de estos compuestos incluyen su actividad antiproliferativa en el rango nanomolar y su unión al sitio de unión de colchicina en tubulina con una constante de asociación del orden de 10^7 M^{-1} . Además, el compuesto TUB099, producto de la derivatización como profármaco de TUB091, mantenía su actividad antiproliferativa y presentaba elevada solubilidad. Sin embargo, TUB099 se había obtenido como mezcla de isómeros *E/Z* en una relación 2/1, por lo que aún no era idóneo para su evaluación como VDA *in vivo*. Así, el primer objetivo de este capítulo ha sido el estudio de la isomerización de este compuesto, y una vez identificado que sufría un fenómeno de fotoisomerización, se llevó a cabo la síntesis del profármaco en ausencia de luz, lo que permitió obtener muy mayoritariamente el isómero *E*, responsable de la actividad.

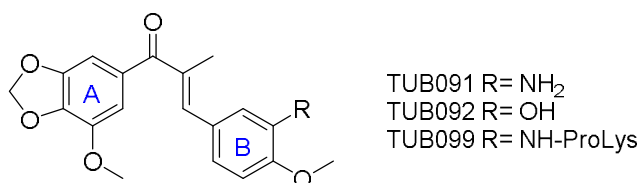


Figura B. Estructuras químicas de TUB091, TUB092 Y TUB099.

El segundo objetivo ha sido fijar la configuración *trans* del compuesto TUB091, mediante la síntesis de miméticos conformacionalmente restringidos para lo que se han seguido dos estrategias. En la primera se propuso restringir el derivado TUB091 por ciclación sobre el anillo A. Esta aproximación condujo a una pérdida de actividad de entre 2 y 3 órdenes de magnitud, por lo que se concluyó que esta restricción conformacional no era adecuada para mimetizar la conformación bioactiva de la chalcona TUB091.

Para la segunda estrategia, hemos hecho uso de un diseño racional basado en la estructura del complejo cristalino TUB092-tubulina descrito en esta Memoria. En base a los datos estructurales obtenidos, se abordó el diseño de nuevos derivados conformacionalmente restringidos mediante ciclación sobre el anillo B, y se exploraron distintos anillos aromáticos en el fragmento A. De los compuestos sintetizados, habría que destacar un derivado de 5-aminotetrahidronaftaleno, que presentó una potente actividad antiproliferativa (0.022 – 0.047 μM) y una constante de afinidad por tubulina similar a la de colchicina. Al igual que en el Capítulo 1, se ha sintetizado el conjugado de Asn-Pro de este compuesto, que mostró un incremento espectacular de la solubilidad respecto al compuesto padre pero su evaluación antiproliferativa puso de manifiesto una pérdida de actividad con respecto al derivado con amino libre, posiblemente debido a su ineficaz liberación.

Finalmente, se han llevado a cabo ensayos *in vivo* con el profármaco TUB099 en modelos de ratón de melanoma y cáncer de mama. Estos modelos han mostrado su potente efecto antitumoral y que además es capaz de impedir la metástasis. En particular, su efecto antimetastásico fue incluso superior al mostrado por el compuesto de referencia CA-4P. Además, estos ensayos permitieron demostrar el mecanismo de acción VDA *in vivo* de TUB099, poniendo de manifiesto una vez más el gran potencial terapéutico de este tipo de compuestos.

CONCLUSIONES

A partir de la información disponible en nuestro grupo de investigación relativa a dos familias de ligandos del sitio de unión de colchicina en $\alpha\beta$ -tubulina, en la presente Memoria, se ha profundizado en el análisis y estudio del dominio de unión de colchicina mediante distintas herramientas computacionales, lo que ha servido como base para el diseño de nuevos ligandos. Haciendo uso de procedimientos sintéticos ya establecidos o su adaptación a situaciones concretas, se han sintetizado y evaluado nuevos derivados con propiedades antimetóticas y antivascuales. Entre los nuevos derivados

sintetizados, se ha conseguido mejorar tanto la afinidad por tubulina, así como incrementar la solubilidad acuosa. Este último objetivo se ha logrado mediante la incorporación de sustituyentes polares dirigidos hacia la interfaz de las subunidades de α y β -tubulina o mediante la preparación de profármacos. La evaluación *in vivo* de uno de los profármacos sintetizados ha puesto de manifiesto su potente efecto antitumoral, antimetastásico y antivascular, avalando así el interés de los VDAs como agentes terapéuticos anticancerosos.

SUMMARY

STRUCTURE OF THE COLCHICINE DOMAIN TO DRIVE THE DESIGN AND SYNTHESIS OF LIGANDS WITH ANTIMITOTIC AND ANTIVASCULAR PROPERTIES

INTRODUCTION AND OBJECTIVES

The requirement of vascularization for tumor growth and metastasis has become one of the greatest areas of research in the latest years. Solid tumors cannot grow without blood supply to provide oxygen and nutrients. In addition, blood flow in the tumor environment is crucial for cell invasion during metastasis process. Thereby, the antivascular therapy is considered a promising approach to cancer treatment. Particularly, vascular disrupting agents (VDAs) play an important role due to their mechanism of action, complementary to other existing therapies. VDAs act directly and selectively over tumor endothelium, inducing crucial morphological and functional changes. Consequently, blood flow is dramatically decreased and the hypoxia generated unleashes the final tumor necrosis. The best studied VDAs are tubulin ligands at the colchicine binding site. These ligands inhibit microtubule polymerization, having in this way an additional antimitotic effect.

The antitumor activity of VDAs based on colchicine is due to their dual mechanism of action (antivascular and antimitotic) which support the potential therapeutic value of these agents. The prototype compound among VDAs acting at the colchicine site in tubulin is combretastatin A-4 (CA-4). Although identified more than two decades ago, the mechanism of action of CA-4 is still not fully elucidated. It should be mentioned that some CA-4 analogues and other VDAs are currently candidates in clinical trials. However, they still present serious drawbacks that hamper their pharmaceutical validation, such as low chemical stability and limited solubility. Therefore, the development of new VDAs with a better pharmaceutical profile is critical.

On the basis of the above mentioned, the central objective of this Thesis has consisted in the development of new VDAs acting at the colchicine-site of tubulin with better pharmaceutical profile that may contribute to the pharmaceutical validation of these agents and avoid main drawbacks of current VDA candidates.

Since 2011, VDAs have been a major interest in our research group. Based on the information related to two families of colchicine-site ligands identified in our laboratory, this work has envisaged a further study of the structure of the colchicine domain to drive

the design, synthesis and evaluation of new derivatives with antimitotic and antivasular properties. The performed work has been organized in two Chapters.

RESULTS AND DISCUSSION

Chapter 1 has been focused on a new family of tubulin binding agents at the colchicine-site with proved antiproliferative and antivasular activity, being the 2-(1-((2-ethoxyphenyl)amino)ethylidene)-5-phenylcyclohexane-1,3-dione (TUB075) our hit compound. Applying different computational methods, new series of compounds have been designed and further synthesized with the aim of improving aqueous solubility and/or tubulin affinity of our hit, so that structural modifications have been developed on the 2-ethoxyphenyl fragment (fragment D).

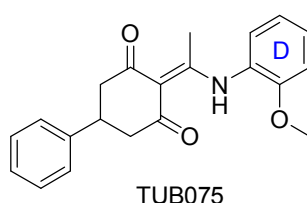


Figura A. Chemical structure of TUB075, hit compound of Chapter 1.

Based on docking studies of TUB075 at the colchicine-site, a tunnel was observed from the ethoxy substituent towards the α -tubulin interface. Thus, the elongation and incorporation of polar groups at this substituent was the first strategy applied to improve solubility. The best results were obtained by incorporating a diethylenglycol moiety so that the resulting derivative was 16-fold more soluble than the initial hit.

The resolution of the complex TUB075-tubulin by X-ray diffraction, described in this Thesis, has been the base for the design and synthesis of new analogues with higher affinity for tubulin. Binding domain analysis of the TUB075-tubulin and DAMA-colchicine-tubulin complexes has been carried out with different computational tools, that has been crucial to identify new interaction areas close to fragment D of the cyclohexanedione scaffold. To occupy these areas, two series of new analogues have been designed.

On the one hand, by studying the affinity maps of TUB075-tubulin complex, new analogues with a benzofuran ring as fragment D were envisaged. Position 2 of the benzofuran ring was differently functionalized to explore this pocket. Following this strategy, a compound with antiproliferative activity in the nanomolar range (8 – 31 nM) was identified, which showed a high affinity constant for tubulin ($2.87 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$), being, to the best of our knowledge, the highest affinity constant described in the literature for a colchicine-site ligand. On the other hand, by studying the affinity maps of DAMA-colchicine-tubulin complex and its superposition with the 3D structure of TUB075, a new

series of derivatives were designed, which incorporate a new aromatic ring (called ring E) at the *ortho* position of fragment D, keeping an oxygen as linker between both rings. Different types of substituents were introduced at ring E, being particularly effective the incorporation of an amino group. The presence of this amino allowed the synthesis of a prodrug by its derivatization with the Asn-Pro dipeptide. This prodrug enhanced solubility 100-fold and stability determination in PBS and fetal bovine serum confirmed that the release of the active compound was via enzymatic process.

Studies performed to determine the mechanism of action of the most promising compounds revealed that they caused cell cycle arrest in G2/M at lower doses than TUB075, in the same manner as other colchicine-site ligands. In addition, their capacity to induce apoptosis was demonstrated by caspase-3 activity. Moreover, these new analogues produce vascular disruption by interrupting established endothelial tubular networks. Their binding at the colchicine site in tubulin was previously confirmed by competition assays with R-PT.

In [Chapter 2](#) the starting point were the α -methylchalcones TUB091 and TUB092 described by our research group. The main characteristics of these compounds included their antiproliferative activity in the nanomolar range and their binding constant for tubulin at 10^7 M^{-1} . In addition, prodrug TUB099, product of the derivatization of TUB091, showed the same antiproliferative activity with greater solubility. However, TUB099 was obtained as two isomers E/Z with a 2/1 rate. Therefore it was not still a good candidate for *in vivo* evaluation as VDA.

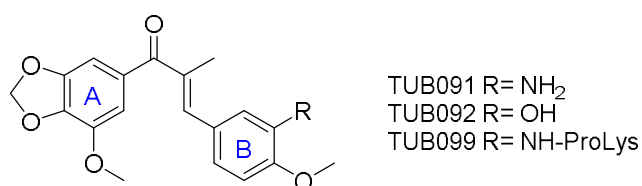


Figura B. Chemical structures of TUB091, TUB092 Y TUB099.

Thus, the first objective was the study of the isomerization of TUB099, which revealed that this compound underwent a photoisomerization phenomenon. The synthesis of this compound in the absence of light afforded mainly the *E* isomer, the one responsible for its antiproliferative activity.

The second objective was the synthesis of new analogues with restricted conformation. To do so, mimetics of the chalcone TUB091 were synthesized applying two approaches. Firstly, a cyclization on fragment A was proposed, incorporating an indenone at ring A. However, this structural modification led to a 2 or 3 orders of

magnitude lower activity. Thereby, this conformational restriction seemed to be not suitable to mimic the bioactive conformation of TUB091.

The second approach was based on the resolution of the complex TUB092-tubulin by X-ray diffraction, described in this Thesis. Based on this structural data, new analogues were designed by introducing a 6-membered saturated cycle at ring B, i.e. having a tetrahydronaftalene ring as fragment B. In addition, different aromatic rings were explored as fragment A. Among the synthesized compounds, one of the 5-amino-tetrahydronaftalene derivatives showed a potent antiproliferative activity (0.022 – 0.047 μM) and a binding constant for tubulin similar to that of colchicine. Following the prodrug strategy applied in Chapter 1, the Asn-Pro derivative was synthesized, which enhanced dramatically solubility compared to the parent compound. Nevertheless, its biological evaluation showed a decrease in the antiproliferative activity, probably due to an inefficiency release of the active compound.

Finally, *in vivo* experiments with the prodrug TUB099 in melanoma and breast cancer models in mice were carried out. In these models, TUB099 inhibited primary tumor growth and effectively reduced spontaneous metastasis. Particularly, the antimetastatic effect was higher than that of the reference compound CA-4P. In addition, this experiments showed the VDA mechanism of action of TUB099, demonstrating the potential therapeutic value of this type of compounds.

CONCLUDING REMARKS

In this Thesis, based on previous information from our research group about two families of colchicine-site binders in $\alpha\beta$ -tubulin, we have further analyzed the structure of the colchicine domain to drive the design of new analogues applying different computational tools. Making use of robust and well established chemical procedures, and adapting the described procedures when required, we have addressed the synthesis and evaluation of new derivatives with antimitotic and antivasular properties. Among the synthesized compounds, higher affinity for tubulin and increased solubility than initial hit was achieved. Particularly, solubility was enhanced through the incorporation of polar groups that may reach the $\alpha\beta$ -tubulin interface and through the preparation of prodrugs. One of the synthesized compounds evaluated *in vivo*, showed antitumor, antimetastatic and antivasular effects, which strongly supports the interest of these type of compounds as anticancer therapeutic agents.

