



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

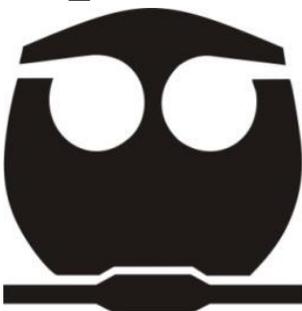
**Inhibidores de la polimerización de la tubulina acoplados  
al sitio de la colchicina: Una revisión crítica de la  
información cristalográfica**

**TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

**Luis Fernando Colorado Pablo**



**Ciudad Universitaria, CDMX**

**Año 2023**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

<b>PRESIDENTE:</b>	Francisco Hernández Luis
<b>VOCAL:</b>	Alfonso Sebastián Lira Rocha
<b>SECRETARIO:</b>	Rodrigo Aguayo Ortiz
<b>1er. SUPLENTE:</b>	Carol Siseth Martínez Caballero
<b>2° SUPLENTE:</b>	Israel González Méndez

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Laboratorio 111, Conjunto E, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México

**ASESOR DEL TEMA:**

Dr. Rodrigo Aguayo Ortiz

---

**SUSTENTANTE:**

Luis Fernando Colorado Pablo

---

## **Dedicatorias**

*A mis padres, Marina y Heriberto. Porque han sido los mejores padres del mundo y porque gracias a sus enseñanzas y amor he logrado cumplir las metas que me he propuesto. Este trabajo culmina todos esos años de esfuerzos que hemos hecho juntos. Los amo*

*A mi hermano Alan y a Bruce. Quienes me han acompañado toda su vida y he compartido muchos momentos especiales a su lado. Los quiero muchísimo*

*A Alan Ricardo. Que ha estado conmigo durante muchos años, creciendo y compartiendo tantos momentos, buenos y malos. Le agradezco muchísimo su amistad y compañía.*

*Esteban e Itzayany. Agradezco profundamente su amistad a lo largo de todos estos años pues me han apoyado siempre en la realización de mis metas.*

*A Israel, Irvin, Rafa, Leslie, Gabriela, Samantha y Fátima. Ustedes hicieron mi estancia en la Facultad la mejor experiencia, les agradezco mucho el apoyo que me brindaron a lo largo de todos los semestres que pasamos juntos. Los quiero profundamente.*

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, particularmente a la Facultad de Química. Por haberme brindado una amplia formación académica y cultural.

Al Dr. Rodrigo Aguayo Ortiz. Por haberme aceptado en su grupo de investigación y brindarme su guía y apoyo durante la realización de este trabajo. Le agradezco también la motivación que me brindó a lo largo de estos meses y la oportunidad de continuar mis estudios de maestría en su grupo.

A mis compañeros y amigos del CADD111: Carlos, Andrés, Efrén, Miguel, Johan, Mariano y Armando. Les agradezco mucho los momentos que hemos compartido en el grupo y sus valiosos consejos que han aportado en la realización de este trabajo.

Esta investigación ha sido realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM IA-201022. Agradezco a la DGAPA-UNAM por la beca recibida.

Agradezco a los miembros del jurado el tiempo que se tomaron en revisar este trabajo, así como por los valiosos comentarios y observaciones que aportaron.

**Índice general**

Abreviaturas y acrónimos .....i

I. Microtúbulos .....1

    1.1. Función y estructura en la célula .....1

    1.2. Polimerización y despolimerización de los microtúbulos .....3

    1.3. Proteínas de unión a microtúbulos .....3

    1.4. Importancia como blanco terapéutico .....5

        1.4.1. Enfermedades degenerativas .....5

        1.4.2. Enfermedades parasitarias .....6

        1.4.3. Otras aplicaciones.....7

II. Agentes dirigidos a los microtúbulos .....8

    2.1. Mecanismos de unión molecular de compuestos antitubulina .....8

    2.2. Agentes estabilizadores de la polimerización .....9

        2.2.1. Sitio del paclitaxel .....9

        2.2.2. Sitio de la laulimalida / pelorusida A.....11

    2.3. Agentes inhibidores de la polimerización.....12

        2.3.1. Sitio de los alcaloides de la vinca.....12

        2.3.2. Sitio de la maytansina .....12

        2.3.3. Sitio de la pironetina.....13

        2.3.4. Sitio del totalam.....13

        2.3.5. Sitio de la colchicina.....14

III. Inhibidores del sitio de la colchicina .....16

    3.1. Información cristalográfica de la tubulina.....16

    3.2. Estudio del sitio de la colchicina .....17

    3.3. Ligandos acoplados en la zona A .....23

        3.3.1. Grupo 1: Similares a colchicina.....23

        3.3.2. Grupo 2: Similares a la podofilotoxina.....26

## Índice

3.3.3.	Grupo 3. Derivados de imidazopiridina, bencimidazol y pirazolopirimidina .....	28
3.3.4.	Grupo 4. Derivados de imidazol, piridina y pirazina .....	29
3.3.5.	Grupo 5. Chalconas y bencidrazida .....	30
3.3.6.	Grupo 6. Derivados de sulfonamida y sulfona.....	32
3.3.7.	Grupo 7. Análogos de buparlisib .....	33
3.3.8.	Grupo 8. Derivados de cumarina, pirimidina y quinazolina .....	34
3.3.9.	Grupo 9. Otros compuestos .....	36
3.4.	Ligandos acoplados en la zona B .....	38
3.5.	Ligandos acoplados en la zona C.....	40
3.5.1.	pK <sub>a</sub> del residuo E198 y volumen de la cavidad .....	43
3.6.	Perfil de interacción de inhibidores de la polimerización .....	45
3.6.1.	TN16 .....	45
3.6.2.	Mivobulina y derivado de benzotiazol .....	45
3.6.3.	Derivados de carbendazim.....	47
3.6.4.	Otros derivados bencimidazólicos.....	48
3.6.5.	Derivados de plinabulina .....	49
3.6.6.	Análogos de PAC.....	51
3.6.7.	Derivados de <i>N</i> -fenilbenzamida .....	52
3.6.8.	Derivados de ciclohexadiona .....	53
3.6.9.	Derivados de aminopirimidina.....	54
3.6.10.	Barbigerona .....	55
3.6.11.	Derivado de quinolina .....	55
IV.	Conclusiones .....	58
V.	Perspectivas .....	58
VI.	Referencias.....	59

---

---

**Abreviaturas y acrónimos**

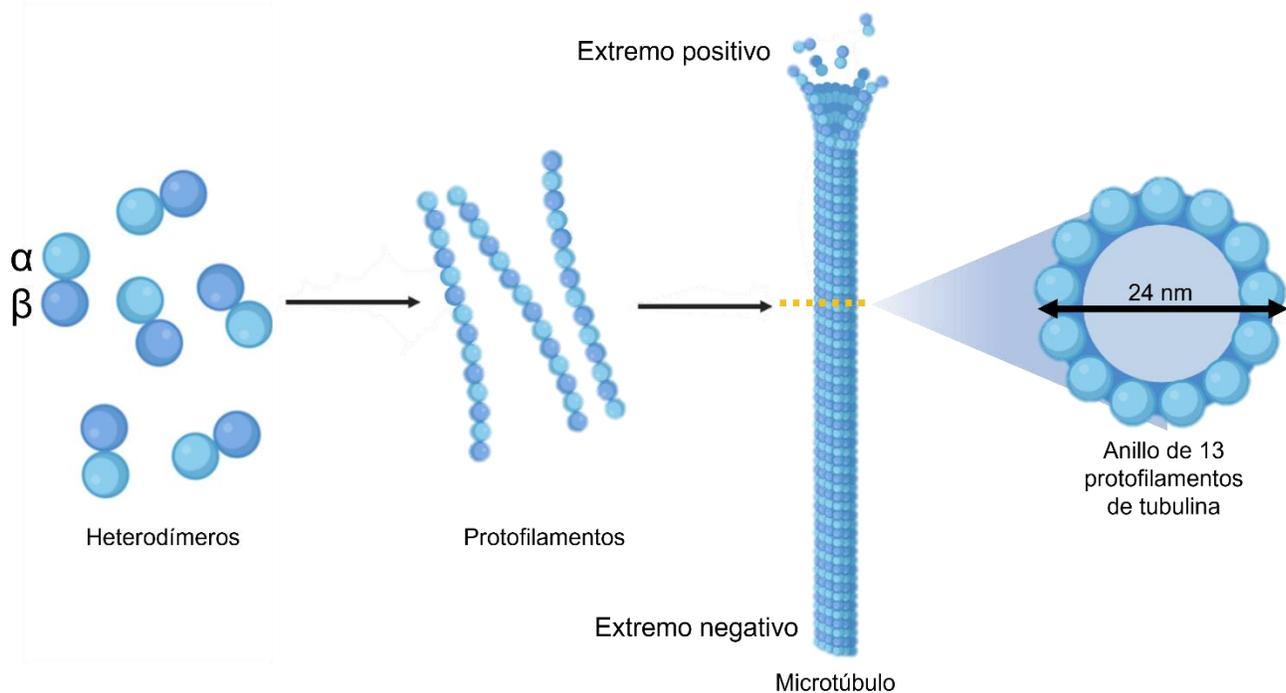
Å	Angstrom(s)
A2780	Línea celular de adenocarcinoma ovárico
A549	Línea celular de cáncer de pulmón
BCG-823	Línea celular de adenocarcinoma gástrico
BCRP/ABCG2	Del inglés: <i>Breast Cancer Resistant Protein</i>
BJAB	Línea celular de linfoma tipo Burkitt
CA-4	Combretastatina
CE <sub>50</sub>	Concentración efectiva 50
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
CRISPRa	Del inglés: <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats of activation</i>
CRISPRi	Del inglés: <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats of inhibition</i>
Da	Daltons
FDA	Del inglés <i>Food and Drug Administration</i> .
FDD	Del inglés: <i>Fragment-based drug design</i>
G2/M	Punto de control de daño al DNA en el ciclo celular
GDP	Guanosina-5'-difosfato
GDP-Pi	Guanosina-5'-difosfato-Fosfato inorgánico
GI <sub>50</sub>	Inhibición del crecimiento 50
GTP	Guanosina-5'-trifosfato
H	Hidrógeno
H10	Hélice 10
H11	Hélice 11
H3	Hélice 3
H6	Hélice 6
H7	Hélice 7
H8	Hélice 8
H9	Hélice 9
HeLa	Línea celular de carcinoma cervical
HepG2	Línea celular de cáncer hepático

HL-60	Línea celular de promielocitos
HTS	Del inglés: <i>High-throughput screening</i>
MAP2	Del inglés <i>Microtubule Associated Proteins 2, Proteínas asociada a microtúbulos 2</i>
MAPs	Del inglés <i>Microtubule Associated Proteins, Proteínas asociada a microtúbulos</i>
Mg <sup>2+</sup>	Ion Magnesio
MM	Masa molar
mn	nanómetro (s)
Nalm6	Línea celular de leucemia linfoblástica multirresistente
nM	Nanomolar
PDB	Del inglés: <i>Protein Data Bank</i>
P-gp/ABCG1	Glicoproteína P
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinasa
pK <sub>a</sub>	Logaritmo negativo de la constante de acidez
RI	Región I de la Zona A del sitio de la colchicina
RII	Región II de la Zona A del sitio de la colchicina
RIII	Región III de la Zona A del sitio de la colchicina
S7	Del inglés <i>Strand 9, lámina 9</i>
S8	Del inglés <i>Strand 8, lámina 8</i>
SDL	Del inglés: <i>Statmin Like Domain</i>
SKOV-3	Línea celular de cistoadenocarcinoma de ovario
T10	Asa 10
T11	Asa 11
T2R	Tetrámero de tubulina unido a RB3
T3	Asa 3
T5	Asa 5
T7	Asa 7
T9	Asa 9
TTL	Tubulina Tirosina Ligasa
μM	Micromolar

## I. Microtúbulos

### 1.1. Función y estructura en la célula

Los microtúbulos son un componente clave en las células eucariontes al cumplir funciones de estabilidad, transporte, división, entre otras. Durante la interfase, forman una matriz intracelular que funciona como soporte del citoesqueleto y organiza el sistema de endomembranas.<sup>1</sup> En la división celular, se encarga de formar los centriolos, centrosomas y el huso mitótico que reparte el material genético entre las dos células hijas. Asimismo, los microtúbulos forman el componente principal de cilios y flagelos que le proporcionan motilidad a ciertas células, como es el caso de los protozoarios.<sup>2,3</sup> En los protozoarios, los microtúbulos están presentes en estructuras que le confieren patogenicidad, como en el conoide de *Toxoplasma* spp., el disco ventral de *Giardia* spp., la matriz ciliar de organismos ciliados, entre otros.<sup>3</sup>



**Figura 1.1.** Esquema de organización de los microtúbulos. De izquierda a derecha se muestran los heterodímeros de  $\alpha/\beta$ -tubulina que se organizan de 'cabeza a cola' en protofilamentos, los cuales se agrupan para dar lugar a la superestructura del microtúbulo. El extremo positivo es de rápido crecimiento y expone a la subunidad de  $\beta$ -tubulina, mientras que el extremo negativo expone a la  $\alpha$ -tubulina y es de lento crecimiento. Un corte transversal del microtúbulo permite visualizar el ordenamiento lateral de los 13 protofilamentos con un diámetro de 24 nm.<sup>4</sup>

Los microtúbulos están constituidos por polímeros de tubulina, una proteína globular que consiste en dos subunidades principales:  $\alpha$ -tubulina y  $\beta$ -tubulina (**Figura 1.1**). Estas proteínas se agrupan en pares para formar heterodímeros de  $\alpha/\beta$ -tubulina, los cuales constituyen el bloque principal en la estructura del microtúbulo.<sup>5,6</sup> El ensamble *cabeza-cola* de estos heterodímeros conlleva a la integración de los protofilamentos, los cuales se asocian en grupos de trece de manera lateral permitiendo la formación de la estructura tubular de 24 nm de diámetro del microtúbulo. Esta estructura presenta características polares en sus límites, es decir, con un extremo positivo y otro negativo. El microtúbulo comprende un extremo de rápido crecimiento, en el cual se expone al a subunidad de  $\beta$ -tubulina, mientras que el extremo de  $\alpha$ -tubulina se denomina de lento crecimiento.<sup>3,6</sup> Los protofilamentos de microtúbulos acoplados de 13 heterodímeros siguen un patrón de hélice, donde una vuelta abarca tres subunidades del protofilamento. En este ordenamiento, se ve favorecido el contacto e interacciones homotípicas entre las subunidades de tubulina, excepto en la región de la '*costura*', donde una unidad de  $\alpha$ -tubulina establece contacto e interacción con la subunidades de  $\beta$ -tubulina del protofilamento cercano.<sup>7</sup>

La tubulina es una de las proteínas estructurales más abundantes y conservadas en los organismos eucariontes. Actualmente, se conocen cinco tipos de tubulina en humanos:  $\alpha$ -tubulina,  $\beta$ -tubulina,  $\gamma$ -tubulina,  $\delta$ -tubulina y  $\epsilon$ -tubulina;<sup>8</sup> solamente las primeras tres se encuentran ampliamente distribuidas en los eucariontes. Como se mencionó anteriormente, la  $\alpha$ -tubulina y  $\beta$ -tubulina se encuentran formando el heterodímero principal de los microtúbulos. Ambas subunidades tienen un sitio de unión a guanosina-5'-trifosfato (GTP); sin embargo, en la subunidad  $\beta$  se hidroliza a esta molécula para formar guanosina-5'-difosfato (GDP) y permitir el ensamble del protofilamento.<sup>3</sup> Por su parte, la  $\gamma$ -tubulina se expresa mayoritariamente en el blastocito durante el desarrollo embrionario. Esta tubulina también interviene de forma auxiliar en la formación de microtúbulos al momento de la división celular, formando complejos que apoyan en la separación de los cromosomas en la región del centrosoma. Además, se ha demostrado que la deficiencia o ausencia de esta tubulina conlleva al arresto de la fase mitótica y consecuentemente a la muerte por apoptosis.<sup>8</sup> En el caso de las subunidades  $\delta$  y  $\epsilon$ , estas tubulinas se hallan principalmente en cilios y flagelos, por lo que se trata de las menos conservadas en los dominios de eucariontes.<sup>3</sup>

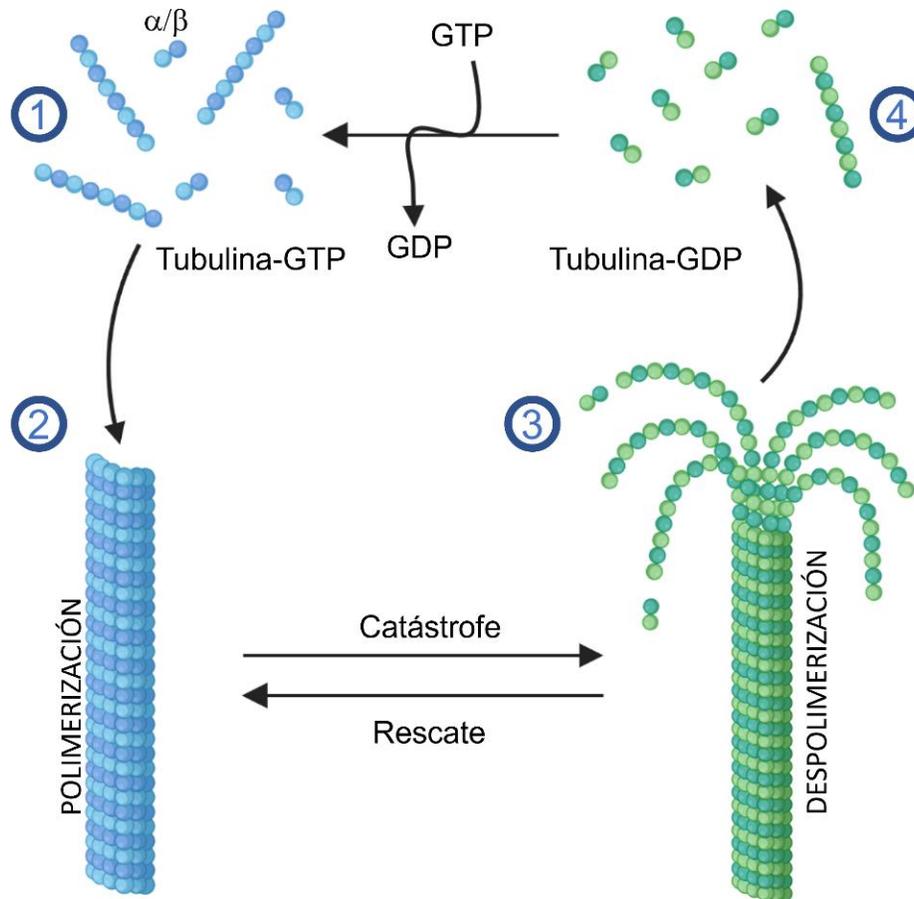
### 1.2. Polimerización y despolimerización de los microtúbulos

Los microtúbulos funcionan como “polímeros dinámicos” alternando entre periodos de crecimiento y contracción. La fase de despolimerización es llamada *catástrofe*, mientras que al proceso de polimerización se le denomina *rescate* (**Figura 1.2**).<sup>3</sup> Debido a que estos procesos ocurren de forma repetida en la célula, reciben en conjunto el nombre de “inestabilidad dinámica”. Este equilibrio de polimerización/despolimerización se encuentra regulado por el cambio de tubulina a tubulina-GTP.<sup>6</sup> La incorporación reversible del nucleótido a los dímeros de  $\alpha/\beta$ -tubulina en el extremo positivo del microtúbulo facilita el primer paso de la polimerización. Sin embargo, el ensamble ocurre únicamente cuando la concentración de heterodímeros libres es alta, es decir, en ausencia del polímero.<sup>3</sup>

Al asociarse los dímeros de tubulina para la formación de los microtúbulos, se promueve un cambio conformacional de ‘*curvo a recto*’ en los heterodímeros. Una vez ensamblados, la subunidad  $\beta$  hidroliza a la molécula GTP en GDP-Fosfato inorgánico (GDP-P<sub>i</sub>) para favorecer la disociación del heterodímero en su extremo positivo. Sin embargo, la velocidad con la que ocurre esta reacción es menor que con la que crece el microtúbulo, estabilizando de esta manera la polimerización. A esta protección se le conoce como ‘*cubierta de GTP*’. Eventualmente, cuando se hidroliza el GTP de la subunidad  $\beta$ , el microtúbulo se despolimeriza rápidamente, desprendiéndose primero en protofilamentos que después se disocian en oligómeros más pequeños. El ciclo de ensamble y desensamble de los microtúbulos culmina con el intercambio de GDP por GTP en la  $\beta$ -tubulina. Cabe mencionar que el nucleótido de GTP en la  $\alpha$ -tubulina no se hidroliza ni se intercambia.<sup>6,7</sup>

### 1.3. Proteínas de unión a microtúbulos

Una vez formados los microtúbulos, se vuelven susceptibles a la despolimerización debido a su propia inestabilidad y al ambiente celular que los rodea. Por esto último, existen proteínas que se unen directamente a los microtúbulos y cumplen funciones estabilizadoras, desestabilizadoras, integradoras, motoras y otras que escapan del propósito del presente trabajo.<sup>3</sup>



**Figura 1.2.** Esquema del equilibrio dinámico (polimerización/despolimerización) de los microtúbulos. (1) Los heterodímeros con GTP (azul) se unen de *cabeza* a *cola* para formar protofilamentos. (2) Los protofilamentos se unen en grupos de 13 para formar el microtúbulo. (3) La actividad de GTP-asa de la  $\beta$ -tubulina inicia una rápida despolimerización volviendo a formar dímeros de  $\alpha/\beta$ -tubulina. (4) Se intercambia GTP por GDP e inicia de nuevo el ciclo. (Modificado de Steinmetz *et al.*<sup>7</sup>)

En particular, se tratarán de dos tipos de proteínas de unión a microtúbulos: estabilizadoras y desestabilizadoras. La función de las primeras involucra, como su nombre lo indica, estabilizar el microtúbulo impidiendo su disgregación, pero también su crecimiento. Dentro de este grupo se pueden encontrar a la proteína tau y proteína asociada a microtúbulos 2 (MAP2). Ambas proteínas se expresan principalmente en tejidos neuronales. Tau es una proteína que ejerce su acción en los botones axonales, los cuales permiten el transporte implicado en las sinapsis químicas.<sup>9</sup> Por su parte, MAP2 es más abundante en estos tejidos y se cree que está implicada en procesos de neuromorfogénesis.<sup>10</sup> Por otro lado, las proteínas desestabilizadoras se encargan de degradar los microtúbulos, promoviendo la catástrofe de estos. Un ejemplo de

estas proteínas es la estatmina, la cual se asocia con oligómeros de tubulina manteniendo una conformación curva, lo que impide su agregación en el polímero.<sup>3,11</sup>

### 1.4. *Importancia como blanco terapéutico*

Dado que los microtúbulos cumplen funciones vitales en el mantenimiento de la célula, se han descubierto y desarrollado compuestos que interfieran en el ciclo de tubulina-microtúbulo con aplicaciones para el tratamiento de enfermedades degenerativas, parasitarias y como agentes herbicidas y fungicidas.<sup>7</sup> En las siguientes subsecciones se abordarán brevemente algunas de estas aplicaciones.

#### 1.4.1. Enfermedades degenerativas

##### 1.4.1.1. Cáncer

En el Cáncer, se presenta un incremento en la proliferación celular comparado con los tejidos normales. Las células malignas poseen alteraciones en los genes que regulan diversos aspectos del ciclo celular. Dichas alteraciones pueden permitir que los tumores progresen y generen resistencia contra los tratamientos convencionales.<sup>12</sup> Durante la mitosis, los microtúbulos se encargan de la formación del huso mitótico, por lo que su tasa de crecimiento aumenta hasta 100 veces. Como las células cancerosas se encuentran en constante división, el aumento en la actividad de los microtúbulos las hace más susceptibles a los tratamientos que inhiban su crecimiento. Por ello, estas estructuras son un sitio idóneo para el desarrollo de moléculas anticancerígenas.<sup>6,12</sup>

A la fecha, existen múltiples compuestos de origen natural y sintético que pueden unirse a la tubulina y a los microtúbulos. Estos compuestos actúan interfiriendo el proceso de polimerización/despolimerización, lo que conlleva al arresto del ciclo celular en el inicio de la mitosis (fase G<sub>2</sub>/M) y posteriormente hacia la apoptosis. Desafortunadamente, se conocen al menos siete isotipos de  $\beta$ -tubulina distribuidos en diferentes tejidos en el humano que, aunque conservan cierta homología, las diferencias son suficientes para afectar el modo de unión de estos compuestos, ocasionando resistencia. Uno de estos isotipos es la isoforma III de la  $\beta$

tubulina ( $\beta$ III), la cual se expresa principalmente en tejido nervioso y su aparición en células cancerosas se asocia con fenotipos resistentes de cáncer, así como a un aumento en la “malignidad” de los tumores y su potencial metastásico. La sobreexpresión de esta isoforma es además una de las principales causas de la resistencia al fármaco paclitaxel.<sup>12,13</sup>

### 1.4.1.2. Enfermedad de Alzheimer

Se ha hecho mención que la proteína tau participa en la estabilización de los microtúbulos en las neuronas. Algunas modificaciones postraduccionales, como lo es la fosforilación de proteínas, regulan la actividad de esta proteína.<sup>9</sup> En la enfermedad de Alzheimer, ocurre una hiperfosforilación de tau, por lo que se clasifica como una tauopatía. Estas modificaciones hacen que tau pierda afinidad por la tubulina, promoviendo así la desestabilización de los microtúbulos. La despolimerización de los microtúbulos y agregación de la proteína tau hiperfosforilada deriva en un aumento en la toxicidad y en la desregulación del transporte neuritas y en la sinapsis, provocando neurodegeneración.<sup>14</sup>

Esta enfermedad manifiesta en el tejido nervioso un aumento de placas  $\beta$ -amiloides, los cuales son agregados insolubles de péptidos amiloides y nudos neurofibrilares, estos últimos son resultado del mal funcionamiento y agregación de tau. Existe una correlación entre la cantidad de estos dos agregados con el progreso de la enfermedad, resultando en pérdida de las funciones cognitivas.<sup>15</sup> Por lo tanto, el desarrollo de moléculas que estabilicen los microtúbulos neuronales pueden ser candidatos llamativos para el tratamiento de la enfermedad.<sup>14</sup>

### 1.4.2. Enfermedades parasitarias

En regiones tropicales y subtropicales, es común encontrar una alta incidencia de enfermedades parasitarias causadas por helmintos y protozoarios. Los parásitos helmínticos incluyen nematodos, cestodos y trematodos,<sup>16</sup> para los cuales existen tratamientos derivados de bencimidazol como el albendazol y mebendazol, solos o en combinación con otros agentes antiparasitarios para infecciones contra nematodos (ej. *Ascaris lumbricoides*, *Enterobius vermiculairs*, *Cooperia spp.*, etc.) y cestodos (ej. *Taenia solium*, *Echinococcus spp.*, *Moniezia expansa*, etc.). Para el caso de los trematodos (ej. *Fasciola hepatica*, *Paragonimus spp.*, etc.), el tratamiento de elección usualmente es triclabendazol.<sup>17</sup> Contra *Giardia intestinalis* y

*Trichomonas vaginalis*, se ha probado la efectividad de otro compuesto bencimidazólico, el carbendazim.<sup>18</sup> La información cristalográfica revela que los derivados bencimidazólicos se unen de forma selectiva a la  $\beta$ -tubulina interfiriendo en la interacción con el monómero de  $\alpha$ -tubulina del heterodímero.<sup>19</sup>

Por otro lado, la orizalina es un derivado de la dinitroanilina usado en un principio como herbicida. Sin embargo, este compuesto ha mostrado actividad prometedora contra protozoarios parásitos al unirse selectivamente en la subunidad de  $\alpha$ -tubulina.<sup>20</sup> El efecto que muestra sobre *T. gondii* es que promueve la formación de microtúbulos más cortos en el conoide, el cual funciona como mecanismo de ingreso a la célula al ser un parásito intracelular obligado, causando que el parásito no sea invasivo.<sup>21</sup> De igual forma, ha mostrado ser selectiva en la inhibición de los microtúbulos de *Plasmodium falciparum*<sup>22</sup> y *Leishmania mexicana* en sus dos etapas de crecimiento, como amastigotes y tripomastigotes.<sup>23</sup> En el caso de *Tripanosoma cruzi*, se ha reportado la inhibición de epimastigotes con orizalina aunque resulta menos potente que una dinitroanilina precursora llamada trifluralina.<sup>24</sup>

### 1.4.3. Otras aplicaciones

En plantas, los microtúbulos están involucrados en el desarrollo de la pared celular. Los compuestos que tengan como blanco los microtúbulos pueden tener actividad herbicida. Tal es el caso de los derivados de la dinitroanilina, herbicidas preemergentes que causan anomalías en regiones de gran actividad meristemática como las raíces, previniendo así el crecimiento de la planta.<sup>25</sup> *Lolium rigidum* es la principal especie de pasto considerada en algunos lugares como especie invasora, ya que tiene un rápido y amplio crecimiento. Para su control, se han utilizado herbicidas como la orizalina y trifluralina, lo que ha conducido al desarrollo de resistencia para los compuestos utilizados comúnmente.<sup>26</sup>

Por su parte, las infecciones micóticas afectan a diversos tipos de cultivos. En la actividad agrícola, se utilizan algunos compuestos que tienen afinidad por la tubulina para tratar esta problemática, los cuales se pueden clasificar en tres grupos: bencimidazoles, *N*-fenilcarbamatos y benzamidas. Dentro de los bencimidazoles se encuentra el carbendazim, nocodazol, mebendazol, entre otros. El dietofencarb es el principal *N*-fenilcarbamato y dentro de las benzamidas encontramos a la zoxamida y etaboxam, por mencionar algunos ejemplos.

## II. Agentes dirigidos a los microtúbulos

Como se mencionó en el capítulo anterior, el ensamblaje de los microtúbulos depende de la unión de GTP al heterodímero de  $\alpha/\beta$ -tubulina, por lo que la reducción de la concentración del nucleótido conlleva a una disminución sustancial de su polimerización. Asimismo, la polimerización de los microtúbulos depende del ambiente donde se encuentren, por ejemplo, la disminución de la temperatura o el incremento en la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  provoca una rápida despolimerización.<sup>3</sup>

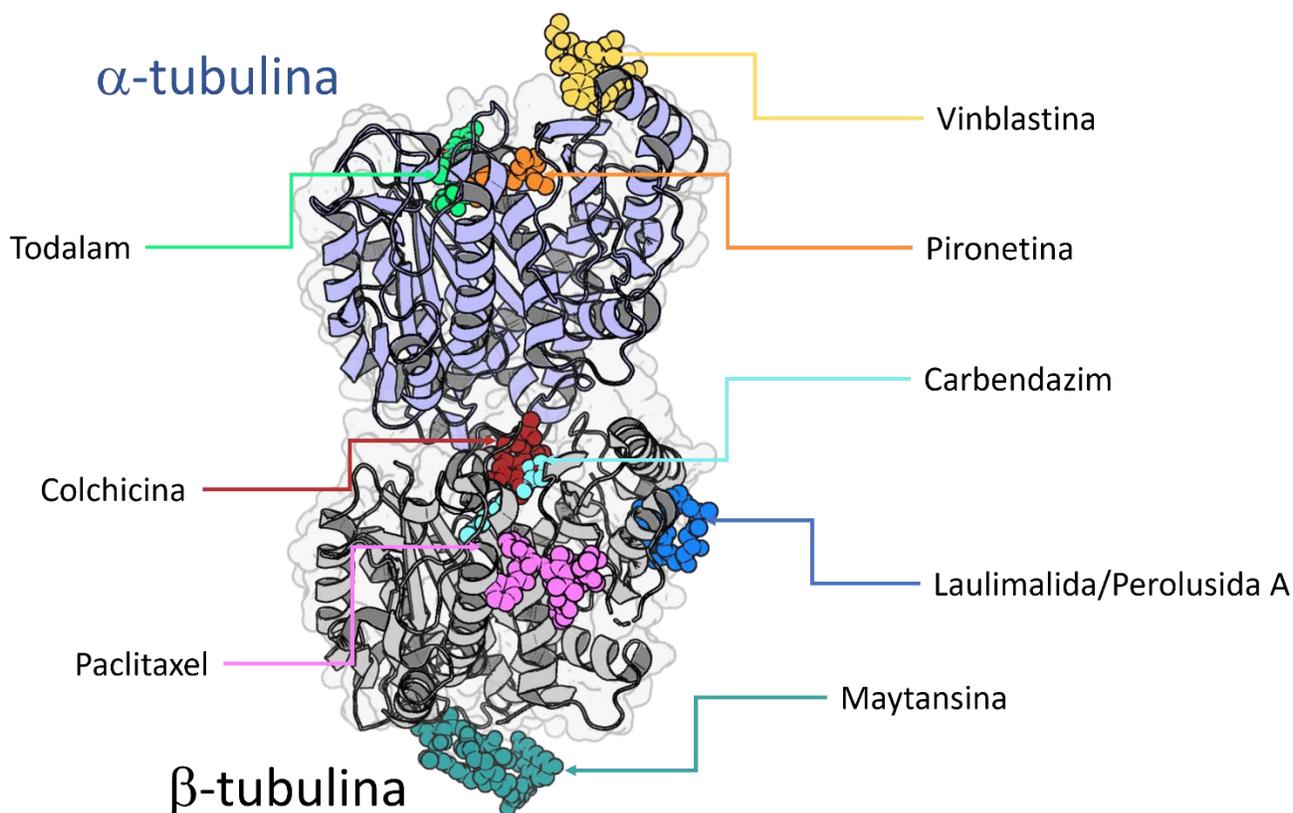
En la actualidad, se conoce un gran número de moléculas que se unen de forma selectiva a la tubulina, los cuales se encargan de regular el equilibrio dinámico de los microtúbulos y, por lo tanto, mediar la amplia variedad de funciones en las que participan.<sup>27</sup> Dado que existe un gran número de proteínas, péptidos y ligandos exógenos capaces de regular la dinámica de los microtúbulos, la tubulina ha sido reconocida como un blanco terapéutico atractivo para el desarrollo de agentes anticancerígenos, antiparasitarios, herbicidas, fungicidas, entre otros.

### 2.1. Mecanismos de unión molecular de compuestos antitubulina

Con base en el efecto sobre la polimerización de la tubulina, los compuestos antitubulina se clasifican en agentes estabilizadores e inhibidores de la polimerización.<sup>7,5</sup> Ambos mecanismos interfieren con la dinámica de los microtúbulos, arrojando el ciclo celular en fase de separación del material genético y promoviendo así la muerte celular por apoptosis.<sup>5</sup>

Los avances en las técnicas de cristalografía de rayos X y crio-microscopía electrónica han permitido establecer el mecanismo molecular de una amplia variedad de compuestos antitubulina y sus sitios de unión en el heterodímero de  $\alpha/\beta$ -tubulina. A la fecha, se han identificados siete sitios de unión de moléculas pequeñas a la  $\alpha/\beta$ -tubulina, los cuales han sido nombrados con base en las siguientes moléculas representativas: paclitaxel, vinblastina, colchicina, maytansina, laulimalida/perolusida A y pironetina (**Figura 2.1**).<sup>27-5</sup> El paclitaxel, la laulimalida y la perolusida A son agentes estabilizadores de los microtúbulos, cuyo sitio de unión se localiza en la subunidad de  $\beta$ -tubulina. Por otro lado, la vinblastina, maytansina, colchicina y pironetina son compuestos inhibidores de la polimerización de la tubulina. La vinblastina y maytansina se unen a la interfaz del heterodímero de tubulina, mientras que la

colchicina interactúa con la subunidad  $\beta$  y la pironetina con la subunidad  $\alpha$ . A principios del año 2022, se describió un nuevo sitio de unión en la  $\alpha$ -tubulina, al cual nos referiremos en este trabajo como el sitio del totalam.<sup>5</sup>



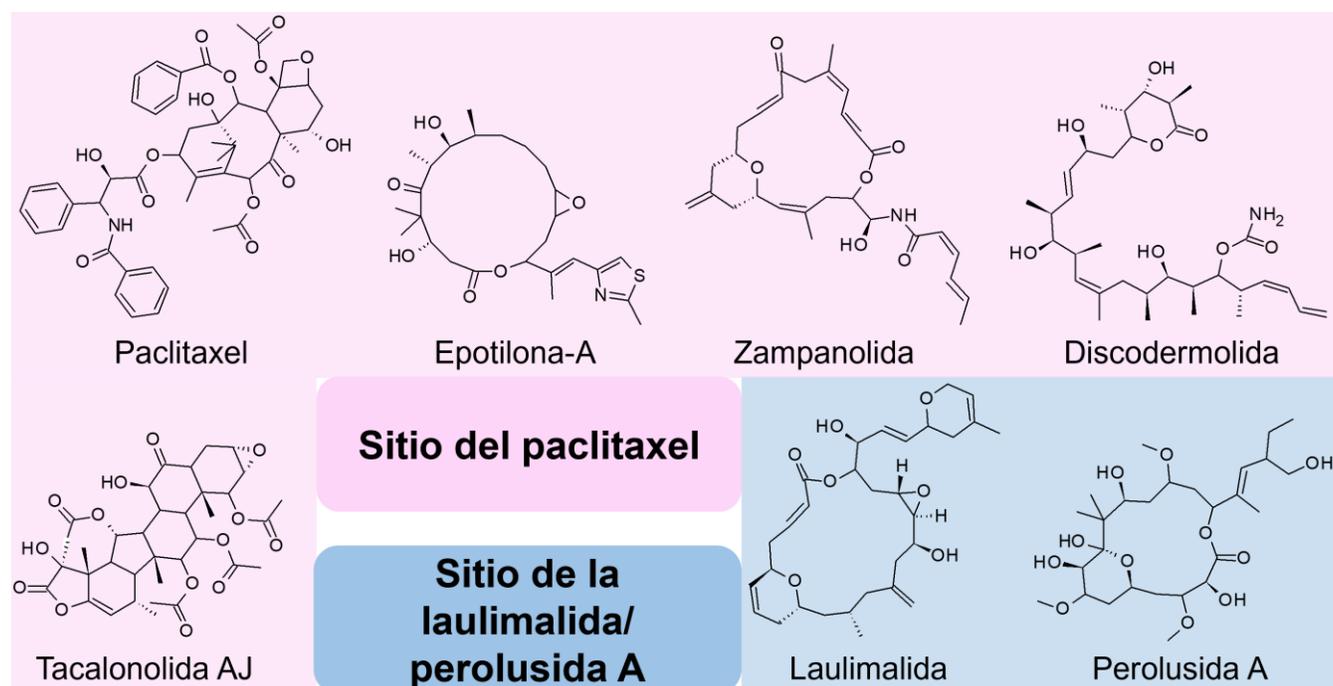
**Figura 2.1.** Representación tridimensional del heterodímero de  $\alpha$ - (azul) y  $\beta$ -tubulina (gris) con los principales compuestos estabilizadores (paclitaxel, laulimalida/perolusida A) e inhibidores (maytansina, vinblastina, maytansina, totalam, colchicina y carbendazim) de la polimerización.

## 2.2. Agentes estabilizadores de la polimerización

### 2.2.1. Sitio del paclitaxel

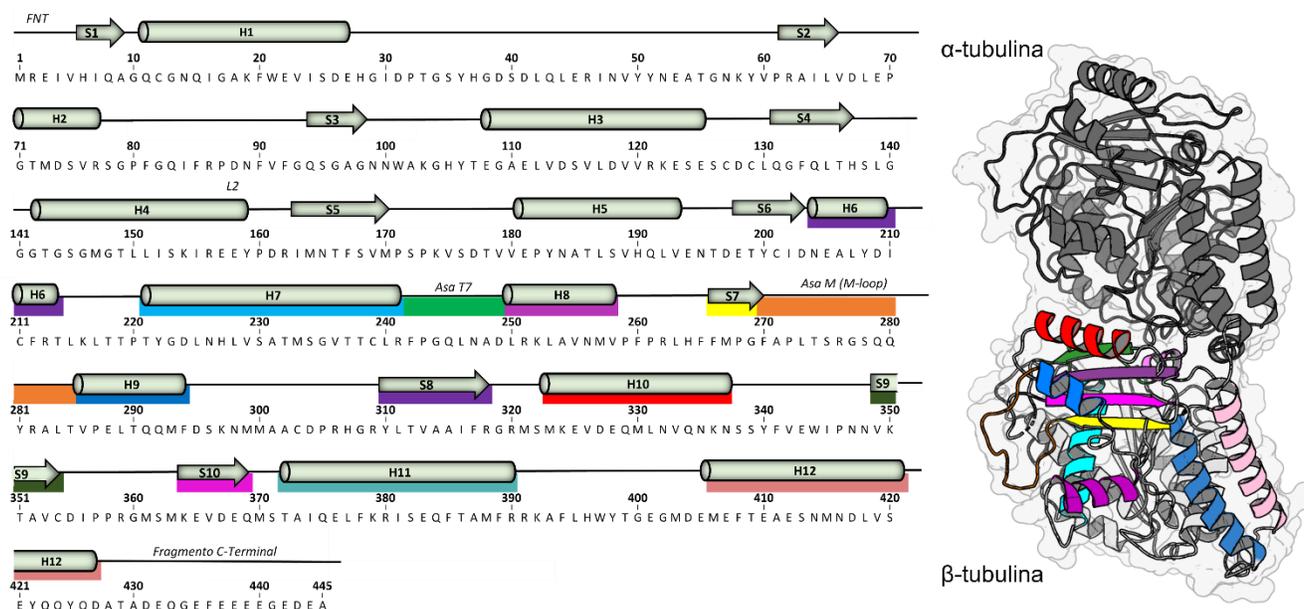
El paclitaxel, cuyo nombre comercial es Taxol®, se trata de un diterpenoide proveniente del extracto del árbol del Tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*), el cual fue aprobado a mediados de 1998 para ser empleado en el tratamiento de diversos tipos de cáncer.<sup>7,5</sup> La molécula presenta una estructura ampliamente hidrofóbica, lo que ha derivado en la dificultad para la formulación de un medicamento.<sup>28</sup> Esta molécula fue el primer estabilizador de microtúbulos debidamente identificado gracias a técnicas de cristalografía de rayos X.<sup>7,28</sup> El sitio de unión del paclitaxel

se localiza en la subunidad de  $\beta$ -tubulina, hacia la luz del microtúbulo, donde además se unen compuestos como epotilona, zampanolida, discodermolida y tacalonolida AJ (**Figura 2.2**). Este sitio se compone por residuos principalmente hidrofóbicos y comprende las regiones de la hélices 6 y 7 (H6 y H7), la lámina 7 (S7) y el asa 9 (T9) que conecta a S7 con la hélice 9 (H9), denominada *M-loop* (**Figura 2.3**).<sup>7,29</sup> El *M-loop* es un segmento estructural de la  $\beta$ -tubulina que va del residuo F270 a T285, y está involucrado en la estabilización de la interacción lateral entre protofilamentos de tubulina. De esta manera, los ligandos acoplados al sitio inducen una conformación helicoidal más estable del *M-loop* que se comprueba al observar los complejos cristalizados.<sup>7,29</sup>



**Figura 2.2.** Estructuras químicas de estabilizadores de la polimerización de los microtúbulos que se unen a la  $\beta$ -tubulina.

Existen otros ligandos que se acoplan a este sitio, pero con un mecanismo diferente. Por ejemplo, la zampanolida y la tacalonolida AJ se unen de forma covalente a los residuos H229 y D226 del sitio de unión del paclitaxel, pero no interactúan con el *M-loop*. Estos compuestos estabilizan el microtúbulo al inducir una conformación más abierta de esta sección para favorecer las interacciones laterales de los protofilamentos.<sup>7,29</sup>



**Figura 2.3.** Representación de la estructura secundaria y terciaria de la  $\beta$ -tubulina. En el esquema de la izquierda, se muestran con cilindros a las  $\alpha$ -hélices y con flechas a las láminas  $\beta$ . La figura de la derecha muestra la estructura tridimensional al heterodímero de  $\alpha/\beta$ -tubulina, empleando el código de colores del esquema de estructura secundaria de la izquierda.

### 2.2.2. Sitio de la laulimalida / pelorusida A

Tanto la laulimalida como la pelorusida A son macrólidos provenientes de esponjas marinas (**Figura 2.2**).<sup>30</sup> El sitio de unión de ambos se encuentra en la superficie de la  $\beta$ -tubulina, donde establece interacciones prioritariamente hidrofóbicas con residuos de las hélices H9 y H10, y las asas que unen a H9-S8 y H10-S9 (T10 y T11, respectivamente) (**Figura 2.3**).<sup>31</sup>

El mecanismo molecular propuesto para ambos ligandos establece que la unión a la superficie de la subunidad  $\beta$  permite la formación de interacciones estabilizantes con la hélice 3 (H3) de la  $\alpha$ -tubulina del protofilamento adyacente. De esta forma, estas moléculas estabilizan el microtúbulo e impiden su disociación. Además, se ha encontrado que los ligandos que se unen al sitio de la laulimalida promueven una conformación que estabiliza el sitio de paclitaxel y viceversa. Esto último ha sugerido la existencia de un efecto sinérgico entre los ligandos de ambos sitios que puede dirigirse hacia la administración conjunta (polifarmacia) para el tratamiento de enfermedades degenerativas.<sup>7,31</sup>

### 2.3. Agentes inhibidores de la polimerización

#### 2.3.1. Sitio de los alcaloides de la Vinca

Dentro de este grupo, se encuentran compuestos de origen natural y semisintéticos como la vinblastina, vincristina, vinorelbina y vinflunin, todos ellos provenientes de las plantas *Vinca rosea* o *Catharanthus roseus* (**Figura 2.4**). *V. rosea* ha sido utilizada desde tiempos ancestrales por la Medicina Tradicional China, originalmente como hipoglucemiante, aunque estudios recientes han demostrado que este efecto es mínimo.<sup>32</sup> En otoño de 1987, la *Food and Drug Administration* (FDA) aprueba el uso de la vinblastina y vincristina para el tratamiento de algunos tipos de tumores sólidos.<sup>7</sup>

El sitio de unión a la tubulina de los alcaloides de la Vinca se encuentra en la subunidad  $\alpha$ , en la interfaz de dos heterodímeros dispuestos verticalmente en el arreglo de protofilamentos ( $\alpha_1\beta_1\alpha_2\beta_2$ ).<sup>33</sup> Los ligandos que se unen a este sitio interactúan con los residuos de la hélice H6, y las asas T5 y H6-H7 (**Figura 2.2**) de la  $\beta$ -tubulina del primer heterodímero ( $\beta_1$ ) junto con la hélice H10, la lámina S9 y el asa T7 de la subunidad de  $\alpha$ -tubulina del segundo heterodímero ( $\alpha_2$ ).<sup>7,33</sup>

Los alcaloides de la vinca actúan también sobre los microtúbulos en dos sitios de unión, en el extremo de rápido crecimiento (extremo positivo) y en la superficie lateral de los mismos. En bajas concentraciones, se unen directamente al extremo positivo del microtúbulo previniendo su elongación y, de forma indirecta, promueven el entrecruzamiento de las MAPs causando desestabilización.<sup>33</sup> En altas concentraciones, los alcaloides de la Vinca promueven la despolimerización al formar agregados en forma de anillos que no son compatibles con la estructura tubular. También promueve una conformación donde el *M-loop* no favorece las interacciones laterales con protofilamentos adyacentes.<sup>7</sup> De cualquier forma, el efecto observado en este grupo de moléculas es la inhibición de la polimerización de los microtúbulos.

#### 2.3.2. Sitio de la maytansina

Este compuesto es un macrólido encontrado en los árboles *Maytenus serratia* y *Maytenus buchananii* (**Figura 2.4**), comúnmente utilizados en la Medicina Tradicional Africana.<sup>34</sup> El sitio

de unión de la maytansina se encuentra en la  $\beta$ -tubulina, muy cerca del nucleótido de GTP. A diferencia de los agentes de unión al sitio del paclitaxel, se ha mostrado que la unión de la maytansina no permite la unión de alcaloides de la vinca.<sup>35</sup> Los ligandos que se acoplan a este sitio interactúan con residuos de las hélices H3 y H11 (**Figura 2.3**), así como con las asas T3 y T5, estableciendo contactos hidrofóbicos y polares. La modificación de este sitio de unión impide el cambio de conformación de curvada a recta del heterodímero de tubulina. De esta manera, no se continúan agregando dímeros de tubulina en el extremo positivo, inhibiendo el proceso de polimerización.<sup>7,35</sup>

### 2.3.3. Sitio de la pironetina

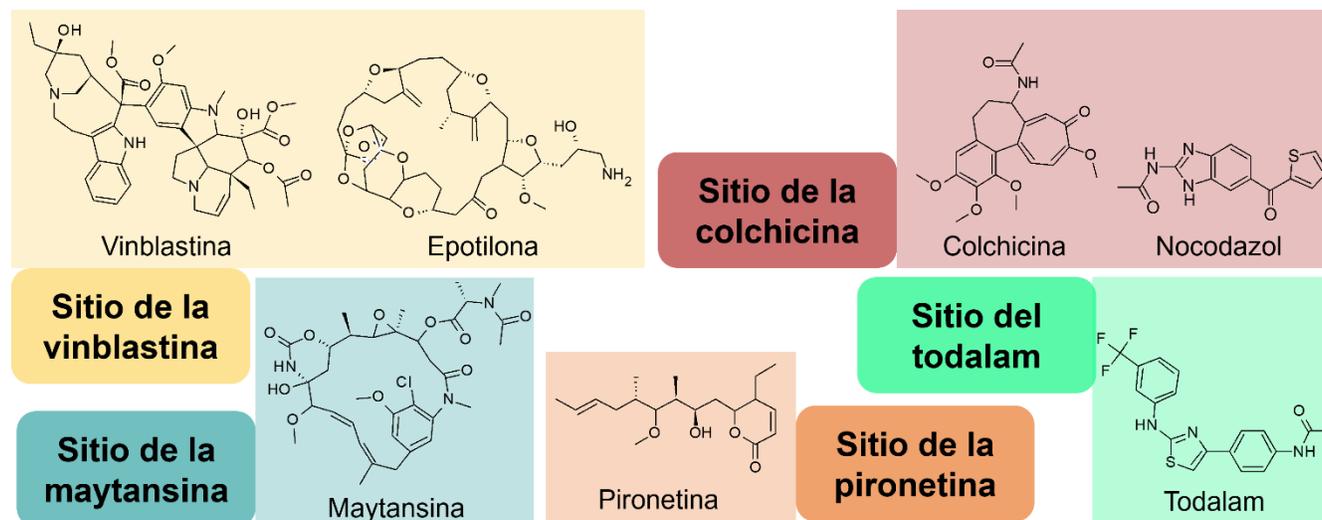
Hasta este momento, los compuestos que se han descrito en las subsecciones anteriores actúan sobre la tubulina uniéndose a la subunidad  $\beta$  o a la interfaz del heterodímero. En esta ocasión, el sitio de la pironetina se localiza en el núcleo de la subunidad  $\alpha$ . La pironetina es un policétido (**Figura 2.4**) proveniente del extracto fermentativo de varias especies de *Streptomyces*, usado en un principio como herbicida y actualmente como agente citotóxico.<sup>36</sup>

Este compuesto se une de forma covalente irreversible al residuo C316 de la subunidad de  $\alpha$ -tubulina al poseer un aceptor de Michael en su estructura. Al unirse la pironetina, se desplaza el asa T7 y la hélice H8 impidiendo la unión del ion de  $Mg^{2+}$ . Este ion es de suma importancia debido a que, permite estabilizar la unión de GDP en la subunidad  $\beta$ -tubulina adyacente. Como consecuencia, el nucleótido pierde afinidad en su sitio y promueve el desensamble de los microtúbulos.<sup>37</sup>

### 2.3.4. Sitio del totalam

El diseño de fármacos basado en fragmentos se ha convertido en una herramienta efectiva en el desarrollo de nuevas moléculas con posible actividad biológica.<sup>5</sup> El totalam, es un compuesto desarrollado con esta metodología (**Figura 2.4**), el cual fue diseñado a partir de un estudio que involucró la evaluación de 56 fragmentos químicamente diversos en la tubulina. Este compuesto se acopla a un sitio totalmente nuevo, el cual se encuentra en la interfaz de dos heterodímeros interactuando principalmente con la cadena  $\alpha$  y ligeramente con la cadena

$\beta$  de un heterodímero adyacente. En la subunidad  $\alpha$ , establece contactos con las láminas S8 y S9 y la hélice H8. Por su parte, en la subunidad  $\beta$  interactúa con el asa T3 y la hélice H11 (**Figura 2.3**). Estas interacciones conllevan a que el totalam impida estéricamente el cambio de conformación de curvo a recto en la etapa de polimerización del microtúbulo. Además, forma oligómeros con forma de anillo que son incapaces de acoplarse en el crecimiento del microtúbulo, como ocurre también con la vinblastina. Se ha demostrado que ambos compuestos pueden unirse a la tubulina simultáneamente teniendo quizás un efecto sinérgico.



**Figura 2.4.** Estructuras químicas de inhibidores de la polimerización de los microtúbulos.

### 2.3.5. Sitio de la colchicina

La colchicina proviene del extracto natural de la planta *Colchicum autumnale*, la cual ha sido utilizada como remedio por la medicina tradicional para el tratamiento de padecimientos como la gota, la fiebre familiar del Mediterráneo y la enfermedad de Bechet. Desafortunadamente, las aplicaciones clínicas de la colchicina se han visto limitadas debido a su alta toxicidad.<sup>6</sup>

El sitio de la colchicina se localiza en el núcleo de la subunidad de  $\beta$ -tubulina, muy cerca de la interfaz del heterodímero; está constituido por la hélices H7 y H8, el asa T7 y las láminas S8 y S9 de la  $\beta$ -tubulina (**Figura 2.3**) y un segmento del asa T5 de la  $\alpha$ -tubulina.<sup>7</sup> Varios estudios han demostrado que el desplazamiento del asa T7 impide estéricamente el cambio de conformación de tubulina a microtúbulo, mecanismo por el cual este compuesto y sus análogos estructurales promueven la despolimerización de los microtúbulos.<sup>11</sup> Este es, probablemente,

el sitio con el mayor número de compuestos reportados que además presentan una gran diversidad estructural.<sup>38</sup> A diferencia de los compuestos que se unen a los sitios anteriormente descritos, la colchicina es una molécula pequeña por la cual resulta más sencillo el desarrollo de moléculas semisintéticas o de síntesis completa.

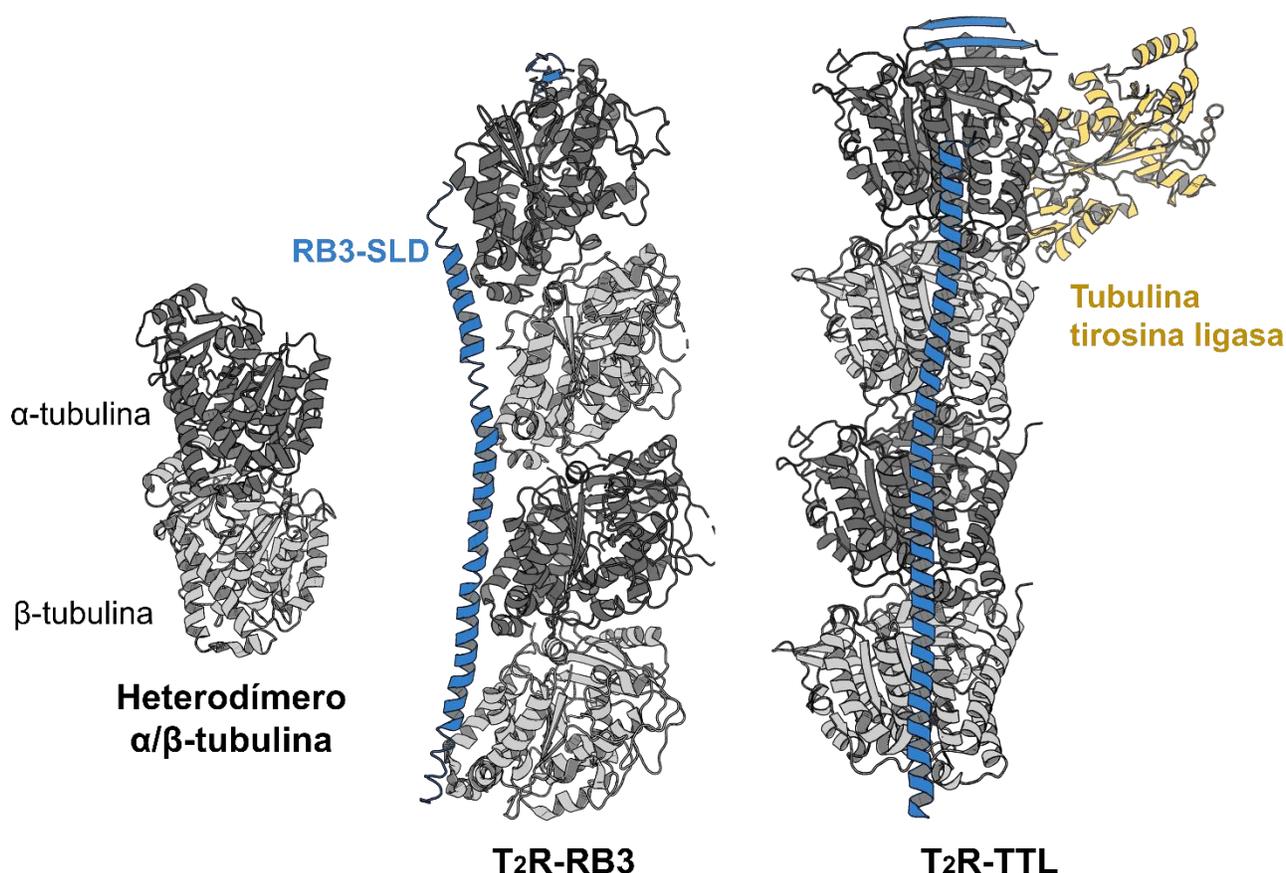
Los derivados de bencimidazol-2-carbamato de metilo, como albendazol, fenbendazol, nocodazol, mebendazol y parbendazol, conocidos por presentar actividad antihelmíntica y anticancerígena, se unen a la  $\beta$ -tubulina en una cavidad muy cercana al sitio de la colchicina, compartiendo además algunos aminoácidos en común.<sup>39</sup> Estos y otros inhibidores de la polimerización que se unen a la cavidad contigua han sido clasificados como inhibidores del sitio de unión de la colchicina.<sup>40,41</sup> Sin embargo, existen características estructurales y de interacción que sugieren que se tratan de dos sitios distintos.

En el presente trabajo monográfico de actualización, se analizará la información cristalográfica de complejos tubulina-ligando, comparando los perfiles de interacción entre moléculas, con la finalidad de obtener un panorama general de los ligandos acoplados en este sitio y poder definir si se trata de un sitio muy amplio, o bien dos sitios contiguos que comparten aminoácidos en común pero que tienen características de polaridad diferentes.

### III. Inhibidores del sitio de la colchicina

#### 3.1. Información cristalográfica de la tubulina

Actualmente, se han depositado en la base de datos del RCSB *Protein Data Bank* (PDB en lo subsecuente) 640 estructuras cristalográficas de multímeros de tubulina y otros segmentos de microtúbulos. Los avances en cristalografía de rayos X han permitido obtener estructuras con mejor resolución. El heterodímero de  $\alpha/\beta$ -tubulina fue cristalizado por primera vez en el año 2001 (PDB: 1JFF<sup>42</sup>, **Figura 3.1**), en presencia del paclitaxel, con una resolución de 3.5 Å.



**Figura 3.1.** Representación tridimensional de los modelos de tubulina depositadas en el *PDB*. De izquierda a derecha, se encuentra el heterodímero de  $\alpha$ - (gris) y  $\beta$ -tubulina (blanco), el complejo T<sub>2</sub>-RB3, que incorpora al heterotetrámero  $\alpha_1\beta_1\alpha_2\beta_2$  a RB3 con un dominio de unión de estatmina (azul), y T<sub>2</sub>R-TTL, el cual incluye un dominio de tubulina tirosina ligasa (amarillo).

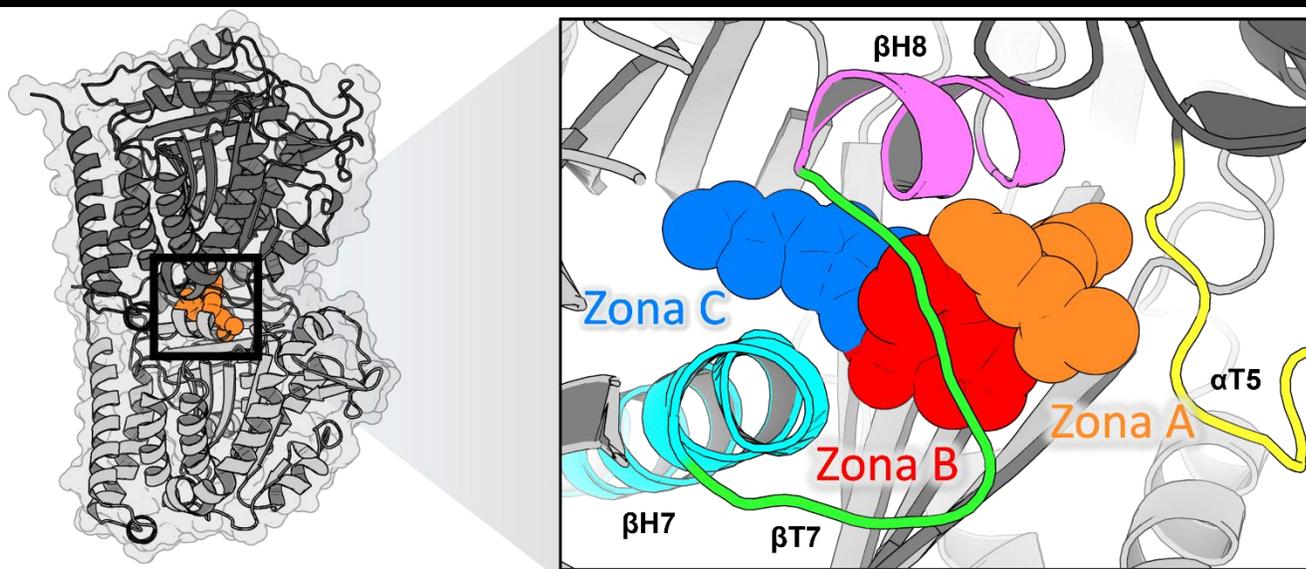
Más tarde, se cristalizó un modelo del heterotetrámero de tubulina ( $\alpha_1\beta_1\alpha_2\beta_2$ ) nombrado T<sub>2</sub>-RB3 (PDB: 3N2G<sup>43</sup>, **Figura 3.1**), en donde la tubulina (T<sub>2</sub>) se encuentra unida a RB3, una proteína de tejido neuronal promotora del proceso de la catástrofe con un dominio de estatmina

(*statmin like domain, SLD*)<sup>44</sup> que permite simular el estado de transición curvado a recto del proceso de polimerización. El modelo actualmente utilizado consiste en el sistema T<sub>2</sub>-RB3 acoplado a un segmento de tubulina-tirosina ligasa (TTL), el cual se ha denominado como T<sub>2</sub>R-TTL (**Figura 3.1**). El segmento final tiene un papel crucial en la estabilización del heterotetrámero, ya que se une al extremo C-terminal de  $\alpha$ -tubulina, imitando la unión cabeza-cola del siguiente dímero de  $\alpha/\beta$ -tubulina<sup>45,46</sup> del sistema T<sub>2</sub>R-TTL reproduciendo de manera más precisa la conformación curvada que adopta la tubulina.

#### 3.2. Estudio del sitio de la colchicina

Se ha revisado ya el papel que cumple la inestabilidad dinámica de los microtúbulos dentro de la célula y las aplicaciones que pueden tener los compuestos que modulen estos procesos para el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas, ya sea favoreciendo o inhibiendo la polimerización. Como se mencionó en el capítulo anterior, el sitio de la colchicina se ubica en la interfaz entre  $\alpha$  y  $\beta$ -tubulina (**Figura 3.2**), conformado por las estructuras de hélice H7 y H8, el asa T7 y las láminas S8 y S9 de la  $\beta$ -tubulina, y una porción del asa T5 de la subunidad  $\alpha$ . Al unirse la colchicina, cambia la conformación T7 y H8 impidiendo estéricamente la interacción entre los dímeros, impidiendo de este modo la polimerización.<sup>11</sup>

Actualmente, el consenso sobre el sitio de la colchicina involucra también a los derivados del bencimidazol-2-carbamato de metilo y ligandos afines a esta región de la  $\beta$ -tubulina. Dado que la diversidad química de los ligandos de unión a este sitio es amplia, así como las regiones que ocupan del mismo, en la literatura se ha propuesto la división de este sitio en tres zonas principales: A, B y C (**Figura 3.2**).<sup>41</sup> La zona A es la que se encuentra más próxima a la interfaz del heterodímero de  $\alpha/\beta$ -tubulina, siendo además el sitio al que se une la colchicina y sus análogos estructurales. Por otra parte, al internarse en la  $\beta$ -tubulina, es posible delimitar a las zonas B y C, siendo esta última la región más internalizada en la subunidad  $\beta$ . A la fecha de realización de este trabajo, se encuentran depositados en el PDB 120 complejos proteína-ligando con inhibidores acoplados en las diferentes zonas de este sitio (**Tabla 3.1**). En las siguientes subsecciones, se realizará una revisión de los inhibidores de la polimerización que se unen a las diferentes zonas del sitio de la colchicina, clasificándolos en grupos por similitud estructural o por modo de unión, describiéndose además las características estructurales esenciales de cada uno de ellos



**Figura 3.2.** Representación tridimensional del heterodímero de  $\alpha$ - (gris) y  $\beta$ -tubulina (blanco) mostrando la localización del sitio de la colchicina (naranja). A la derecha, se muestran las estructuras secundarias principales del sitio y las zonas descritas en el texto principal. Se marcan las zonas en las que se dividirá el sitio para su estudio.

**Tabla 3.1.** Información cristalográfica de complejos proteína-ligando del sitio de la colchicina

CÓDIGO PDB	ID DE LIGANDO	ZONA	GRUPO	ORGANISMO	RESOLUCIÓN (Å)	REFERENCIA
1SA0	CN2	A	1	<i>B. taurus</i>	3.58	Ravelli et al <sup>11</sup>
4O2B	LOC	A	1	<i>B. taurus</i>	2.30	Prota et al <sup>47</sup>
5LP6	71P	A	1	<i>B. taurus</i>	2.90	Marangon et al <sup>48</sup>
5LYJ	7BA	A	1	<i>B. taurus</i>	2.40	Gaspari et al <sup>49</sup>
5NFZ	8WB	A	1	<i>B. taurus</i>	2.10	Field et al <sup>50</sup>
5XKE	LON	A	1	<i>S. scrofa</i>	2.60	-
5XLZ	89U	A	1	<i>B. taurus</i>	2.30	Cheng et al <sup>51</sup>
5Z4P	97O	A	1	<i>B. taurus</i>	2.50	-
5Z4U	96C	A	1	<i>B. taurus</i>	3.18	Lai et al <sup>52</sup>
6K9V	D3L	A	1	<i>B. taurus</i>	2.54	Li et al <sup>53</sup>

CÓDIGO PDB	ID DE LIGANDO	ZONA	GRUPO	ORGANISMO	RESOLUCIÓN (Å)	REFERENCIA
6KPP	DO6	A	1	<i>S. scrofa</i>	2.75	Wang et al <sup>54</sup>
6TDE	N3Z	A	1	<i>O. aries</i>	2.29	Shchegravina et al <sup>55</sup>
6TH4	N9B	A	1	<i>O. aries</i>	2.12	Stein et al <sup>56</sup>
6XER	LOC	A	1	<i>S. scrofa</i>	2.50	Chen et al <sup>57</sup>
7DB9	IC1	A	1	<i>S. scrofa</i>	2.85	-
7Z01	I8R	A	1	<i>B. taurus</i>	1.82	Gao et al <sup>58</sup>
7Z02	I8N	A	1	<i>B. taurus</i>	2.36	Gao et al <sup>58</sup>
1SA1	POD	A	2	<i>B. taurus</i>	4.20	Ravelli et al <sup>11</sup>
5GON	6ZR	A	2	<i>B. taurus</i>	2.48	Zhou et al <sup>59</sup>
5JCB	NV4	A	2	<i>S. scrofa</i>	2.30	Zhao et al <sup>60</sup>
5XAF	84F	A	2	<i>B. taurus</i>	2.55	Zhou et al <sup>61</sup>
5XAG	93X	A	2	<i>B. taurus</i>	2.56	Zhou et al <sup>61</sup>
5XLT	89O	A	2	<i>B. taurus</i>	2.81	Niu et al <sup>62</sup>
6Y6D	OBQ	A	2	<i>B. taurus</i>	2.20	Oliva et al <sup>63</sup>
7DBB	H1F	A	2	<i>S. scrofa</i>	2.81	-
7AU5	RYK	A	2	<i>B. taurus</i>	2.20	Yong et al <sup>64</sup>
5H7O	7Q7	A	3	<i>B. taurus</i>	2.80	Arnst et al <sup>65</sup>
6NNG	DJ9	A	3	<i>S. scrofa</i>	2.40	Arnst et al <sup>66</sup>
6LSM	ERX	A	3	<i>S. scrofa</i>	2.75	Li et al <sup>67</sup>
6LSN	ERR	A	3	<i>S. scrofa</i>	2.44	Li et al <sup>67</sup>
7DBA	H1O	A	3	<i>S. scrofa</i>	2.46	-
6D88	G9K	A	4	<i>S. scrofa</i>	2.85	Wang et al <sup>68</sup>
6AGK	9WR	A	4	<i>B. taurus</i>	2.80	Chen et al <sup>69</sup>
6O5M	G8K	A	4	<i>S. scrofa</i>	2.30	Wang et al <sup>70</sup>
6O5N	QW9	A	4	<i>S. scrofa</i>	3.00	Wang et al <sup>70</sup>

CÓDIGO PDB	ID DE LIGANDO	ZONA	GRUPO	ORGANISMO	RESOLUCIÓN (Å)	REFERENCIA
6O61	KUM	A	4	<i>S. scrofa</i>	2.60	Wang et al <sup>70</sup>
6PC4	O91	A	4	<i>S. scrofa</i>	2.60	Chen et al <sup>69</sup>
6XES	TU3	A	4	<i>S. scrofa</i>	2.32	Chen et al <sup>57</sup>
6XET	TU2	A	4	<i>S. scrofa</i>	2.60	Chen et al <sup>57</sup>
5JVD	6NL	A	5	<i>B. taurus</i>	2.39	Zhou et al <sup>59</sup>
5YL2	8WU	A	5	<i>S. scrofa</i>	2.09	Yang et al <sup>71</sup>
5YLJ	8XO	A	5	<i>S. scrofa</i>	2.70	Yang et al <sup>71</sup>
5YLS	Y50	A	5	<i>S. scrofa</i>	3.00	Yang et al <sup>71</sup>
6F7C	CVT	A	5	<i>B. taurus</i>	2.00	Cury et al <sup>72</sup>
3HKC	E70	A	6	<i>O. aries</i>	3.80	Dorléans et al <sup>73</sup>
3HKE	T13	A	6	<i>O. aries</i>	3.60	Dorléans et al <sup>73</sup>
5OV7	6FS	A	6	<i>B. taurus</i>	2.40	Jost et al <sup>74</sup>
6LS4	S40	A	6	<i>S. scrofa</i>	2.40	Du et al <sup>75</sup>
7DBD	H0U	A	6	<i>S. scrofa</i>	3.09	Lei et al <sup>76</sup>
5M7E	SD5	A	7	<i>B. taurus</i>	2.05	Bohnacker et al <sup>77</sup>
5M7G	FB7	A	7	<i>B. taurus</i>	2.25	Bohnacker et al <sup>77</sup>
5M8D	UGI	A	7	<i>B. taurus</i>	2.25	Bohnacker et al <sup>77</sup>
5M8G	918	A	7	<i>B. taurus</i>	2.15	Bohnacker et al <sup>77</sup>
5XKF	88U	A	8	<i>S. scrofa</i>	2.80	Yan et al <sup>78</sup>
5XKG	890	A	8	<i>S. scrofa</i>	2.20	Yan et al <sup>78</sup>
5XKH	89C	A	8	<i>S. scrofa</i>	2.25	-
6BR1	E3Y	A	8	<i>S. scrofa</i>	2.30	Banerjee et al <sup>79</sup>
6BRF	E44	A	8	<i>S. scrofa</i>	2.50	Banerjee et al <sup>79</sup>
6BRY	GK9	A	8	<i>S. scrofa</i>	2.70	Banerjee et al <sup>79</sup>
6BS2	E9Y	A	8	<i>S. scrofa</i>	2.65	Banerjee et al <sup>79</sup>

CÓDIGO PDB	ID DE LIGANDO	ZONA	GRUPO	ORGANISMO	RESOLUCIÓN (Å)	REFERENCIA
6EG5	J7S	A	8	<i>B. taurus</i>	2.45	Banerjee et al <sup>80</sup>
6N47	KB4	A	8	<i>B. taurus</i>	2.60	Arnst et al <sup>81</sup>
6JCJ	BG0	A	8	<i>B. taurus</i>	2.50	Zhang et al <sup>82</sup>
6X1C	Y5J	A	8	<i>S. scrofa</i>	2.90	Banerjee et al <sup>80</sup>
6X1E	Y5L	A	8	<i>S. scrofa</i>	2.90	Banerjee et al <sup>80</sup>
6X1F	Y5M	A	8	<i>S. scrofa</i>	2.70	Banerjee et al <sup>80</sup>
7LZ7	YJ7	A	8	<i>S. scrofa</i>	2.80	Banerjee et al <sup>80</sup>
7LZ8	YJ4	A	8	<i>S. scrofa</i>	2.92	Banerjee et al <sup>80</sup>
4O2A	2RR	A	9	<i>B. taurus</i>	2.50	Prota et al <sup>47</sup>
4YJ3	4EE	A	9	<i>B. taurus</i>	3.75	McNamara et al <sup>83</sup>
5CB4	TIV	A	9	<i>S. barbatus</i>	2.19	Wang et al <sup>84</sup>
5OSK	A9Q	A	9	<i>B. taurus</i>	2.11	Dohle et al <sup>85</sup>
6GF3	EX5	A	9	<i>B. taurus</i>	2.40	Smedley et al <sup>86</sup>
6GJ4	EZW	A	9	<i>B. taurus</i>	2.40	Brindisi et al <sup>87</sup>
5ZXH	9LX	A	9	<i>B. taurus</i>	2.80	Li et al <sup>88</sup>
6H9B	FWH	A	9	<i>O. aries</i>	2.75	Naret et al <sup>89</sup>
6HX8	GXN	A	9	<i>B. taurus</i>	2.40	Dohle et al <sup>90</sup>
7CPD	G9U	A	9	<i>B. taurus</i>	2.51	-
7CPQ	G9X	A	9	<i>B. taurus</i>	2.60	-
5CA0	LXL	B	10	<i>S. scrofa</i>	2.50	Wang et al <sup>84</sup>
6KNZ	DN0	B	10	<i>B. taurus</i>	2.48	Niu et al <sup>91</sup>
7CBZ	FUO	B	10	<i>S. scrofa</i>	2.61	Wang et al <sup>92</sup>
5S4Q	WVD	B	10	<i>B. taurus</i>	2.59	Mühlethaler et al <sup>27</sup>
5S4R	NW7	B	10	<i>B. taurus</i>	2.35	Mühlethaler et al <sup>27</sup>

CÓDIGO PDB	ID DE LIGANDO	ZONA	GRUPO	ORGANISMO	RESOLUCIÓN (Å)	REFERENCIA
5S4S	K0M	B	10	<i>B. taurus</i>	2.35	Mühlethaler et al <sup>27</sup>
5S4T	K1G	B	10	<i>B. taurus</i>	2.27	Mühlethaler et al <sup>27</sup>
5S4U	GX4	B	10	<i>B. taurus</i>	2.39	Mühlethaler et al <sup>27</sup>
5S4W	WZ7	B	10	<i>B. taurus</i>	2.80	Mühlethaler et al <sup>27</sup>
5S4X	JHD	B	10	<i>B. taurus</i>	2.53	Mühlethaler et al <sup>27</sup>
5S4Y	NSJ	B	10	<i>B. taurus</i>	2.30	Mühlethaler et al <sup>27</sup>
5S51	RWS	B	10	<i>B. taurus</i>	2.40	Mühlethaler et al <sup>27</sup>
5S52	W1P	B	10	<i>B. taurus</i>	2.83	Mühlethaler et al <sup>27</sup>
5S53	WZM	B	10	<i>B. taurus</i>	2.75	Mühlethaler et al <sup>27</sup>
3HKD	N16	C	NA	<i>O. aries</i>	3.70	Dorléans et al <sup>73</sup>
3N2G	G2N	C	NA	<i>O. aries</i>	4.00	Barbier et al <sup>43</sup>
3N2K	K2N	C	NA	<i>O. aries</i>	4.00	Barbier et al <sup>43</sup>
4YJ2	4ED	C	NA	<i>B. taurus</i>	2.60	McNamara et al <sup>83</sup>
5C8Y	PN6	C	NA	<i>S. barbatus</i>	2.59	Wang et al <sup>84</sup>
5CA1	NZO	C	NA	<i>G. gallus</i>	2.40	Wang et al <sup>84</sup>
5XHC	87U	C	NA	<i>S. barbatus</i>	2.75	Ding et al <sup>93</sup>
5XI7	PO7	C	NA	<i>S. barbatus</i>	2.99	-
5O7A	9N5	C	NA	<i>B. taurus</i>	2.50	Sharma et al <sup>94</sup>
5YL4	8WR	C	NA	<i>S. barbatus</i>	2.64	Fu et al <sup>95</sup>
5YZ3	94U	C	NA	<i>B. taurus</i>	2.54	Ning et al <sup>96</sup>
6FKJ	DLW	C	NA	<i>B. taurus</i>	2.15	Bueno et al <sup>97</sup>
6FKL	DLK	C	NA	<i>B. taurus</i>	2.10	Bueno et al <sup>97</sup>
6QQN	2GE	C	NA	<i>B. taurus</i>	2.30	Patterson et al <sup>98</sup>
7CDA	AEU	C	NA	<i>S. scrofa</i>	2.66	Yang et al <sup>38</sup>

CÓDIGO PDB	ID DE LIGANDO	ZONA	GRUPO	ORGANISMO	RESOLUCIÓN (Å)	REFERENCIA
7CE6	AF6	C	NA	<i>S. scrofa</i>	2.69	Yang et al <sup>38</sup>
7CE8	AEX	C	NA	<i>S. scrofa</i>	2.73	Yang et al <sup>38</sup>
7CEK	FW9	C	NA	<i>S. scrofa</i>	2.70	Yang et al <sup>38</sup>
7DBC	H1C	C	NA	<i>S. scrofa</i>	2.40	Lei et al <sup>76</sup>
5S4Z	WN1	C	NA	<i>B. taurus</i>	2.10	Mühlethaler et al <sup>27</sup>
5S50	WZD	C	NA	<i>B. taurus</i>	3.10	Mühlethaler et al <sup>27</sup>
7EMJ	J6L	C	NA	<i>S. scrofa</i>	2.33	-
7ODN	V95	C	NA	<i>B. taurus</i>	2.33	Oliva et al <sup>99</sup>
7OGN	V95	C	NA	<i>B. taurus</i>	2.20	Oliva et al <sup>99</sup>
7EXC	JEL	C	NA	<i>S. scrofa</i>	2.39	-
7Z2N	IAZ	C	NA	<i>B. taurus</i>	2.17	de la Roche et al <sup>100</sup>
7Z2P	NZO	C	NA	<i>B. taurus</i>	2.00	de la Roche et al <sup>100</sup>

**Notas:** NA: No aplica; *B. taurus*: *Bos taurus*; *S. scrofa*: *Sus scrofa*; *S. barbatus*: *Sus barbatus*; *G. gallus*: *Gallus gallus*; *O. aries*: *Ovis aries*

### 3.3. Ligandos acoplados en la zona A

Dentro de esta zona, se tienen recolectadas 78 estructuras de ligandos en la base de datos del PDB, las cuales hemos reunido en nueve grupos con base en su similitud estructural. El código de tres caracteres reportado para cada ligando corresponde al que se le asignó dentro de la misma base de datos, mientras que la numeración se estableció en el presente trabajo para facilitar la lectura.

#### 3.3.1. Grupo 1: Similares a colchicina

La colchicina (compuesto **1a** [LOC], **Figura 3.4**) es el primer compuesto del cual se conoce su sitio de unión en la tubulina y por lo cual se han desarrollado un amplia variedad de análogos y derivados.<sup>6</sup> El ensayo de inhibición de la polimerización de tubulina muestra una concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) de  $1.4 \pm 0.1 \mu\text{M}$  de este compuesto, siendo uno de los más

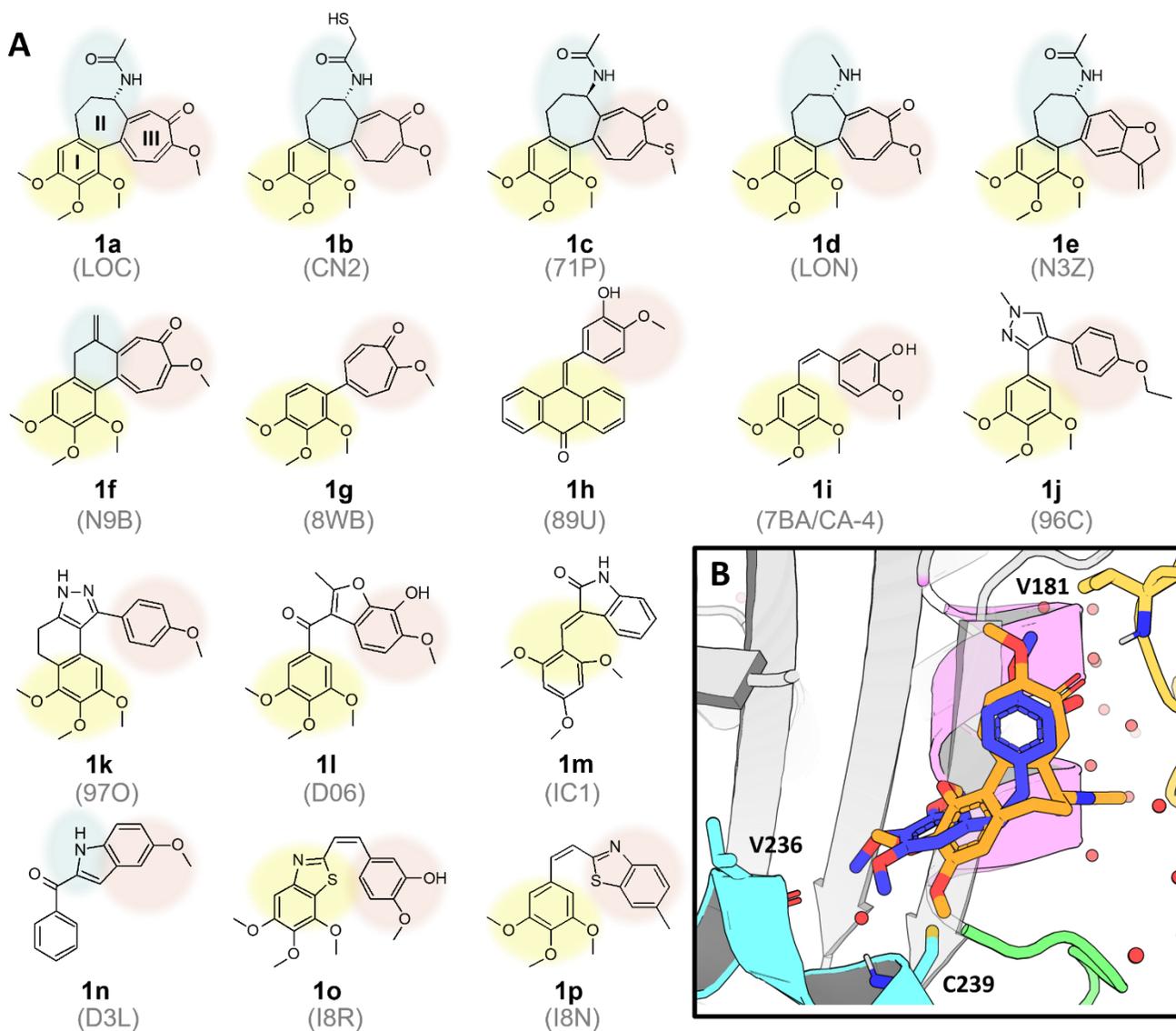
potentes hasta la fecha.<sup>47</sup> La estructura de la colchicina se divide en tres regiones principales, en amarillo se muestra la región I (RI), que corresponde con el anillo de trimetoxibenceno, en azul la región II (RII), la cual abarca el anillo medio de *N*-cicloheptilacetamida y, por último, la región III (RIII) cubre el anillo de 2-metoxitropona.

El derivado de colchicina **1b** (CN2), el cual contiene un sustituyente mercaptoacetil en RII, se empleó en un inicio para comprender cuál enantiómero de la colchicina era el que se acoplaba a la tubulina.<sup>11</sup> De igual forma, se han hecho pequeñas modificaciones a la estructura de la colchicina, como es el reemplazo del grupo metoxilo en RIII por metilito (**1c**, 71P), la metilación de la amina en lugar de acetilación (**1d**, LON) o la formación de anillos (**1e**). El compuesto **1c**, también conocido como tiocolchicina, tiene reportada en la literatura una inhibición del crecimiento 50 (GI<sub>50</sub>) de  $6.3 \pm 1.3 \mu\text{M}$ <sup>48</sup> en células de carcinoma cervical (HeLa), mientras que la formación del anillo de dihidrofurano en compuesto **1e** (N3Z) presentó una CI<sub>50</sub> de 0.01 nM.<sup>55</sup>

Las modificaciones que se han llevado a cabo sobre la estructura de la colchicina no han buscado sólo mejorar la actividad, sino también la selectividad hacia los diferentes tipos de cáncer. El compuesto **1f** (N9B), nombrado PT-100, demostró tener actividad citotóxica frente a cultivos celulares de leucemia (Nalm6 y HL-60) y linfoma tipo Burkitt (BJAB), sin actividad sobre células leucocitarias sanas. Además, ha mostrado un efecto sinérgico con la Vincristina al probarse en células Nalm6, la cual es una línea célula leucemia linfoblástica multirresistente a tratamientos.<sup>56</sup> La simplificación estructural es un aspecto que también se busca lograr al optimizar una molécula, por ello el análogo **1g** (8WB) elimina el núcleo de cicloheptano de RII.<sup>50</sup> El compuesto **1h** (89U) es un derivado de antraquinona, el cual es hasta 4 veces más potente que la colchicina. Las estructuras superpuestas revelan que se acoplan de manera similar a la colchicina en RI y RIII.<sup>51</sup>

La combretastatina (CA-4, **1i**), molécula extraída del árbol *Combretum caffrum*, y sus derivados, son conocidos agentes anticancerígenos. Debido a la presencia de un grupo vinilo en su estructura, ésta puede adquirir dos conformaciones, *cis* o *trans*, siendo la unión de la forma *cis* la más termodinámicamente favorecida. Al unirse esta conformación, los grupos trimetoxifenilo y 3-hidroxi-4-metoxifenilo logran disponerse hacia RI y RIII, respectivamente. Aún se desconoce si la conformación *trans* tiene como efecto la disminución de la actividad biológica.<sup>49</sup> En búsqueda de mejorar la actividad de CA-4, se encontraron a los compuestos **1j-m**. De este grupo, **1j** (96C) y **1l** (D06) han mostrado una potente actividad contra varias

líneas celulares de cáncer, acoplándose al sitio de la colchicina del mismo modo que lo hace CA-4. Además, el compuesto **1l** no tiene efecto citotóxico sobre leucocitos sanos, lo cual ha sido un indicio de selectividad.<sup>52,54</sup> Por su parte, aún se desconoce la actividad de los compuestos **1k** (97O) y **1m** (IC1).



**Figura 3.4** Compuestos del Grupo 1 del sitio de la colchicina. (A) Estructuras químicas y descripción de las regiones RI (amarillo), RII (azul) y RIIL (naranja). (B) Representación tridimensional de la unión de la colchicina (naranja, PDB: 4O2B) y combretastatina (azul, PDB: 5LYJ). Se marcan las estructuras secundarias H7, T7 y H8 (cian, verde y violeta, respectivamente) en la  $\beta$ -tubulina y T5 (amarillo) sobre  $\alpha$ -tubulina, así como los aminoácidos cercanos con los que interactúan.

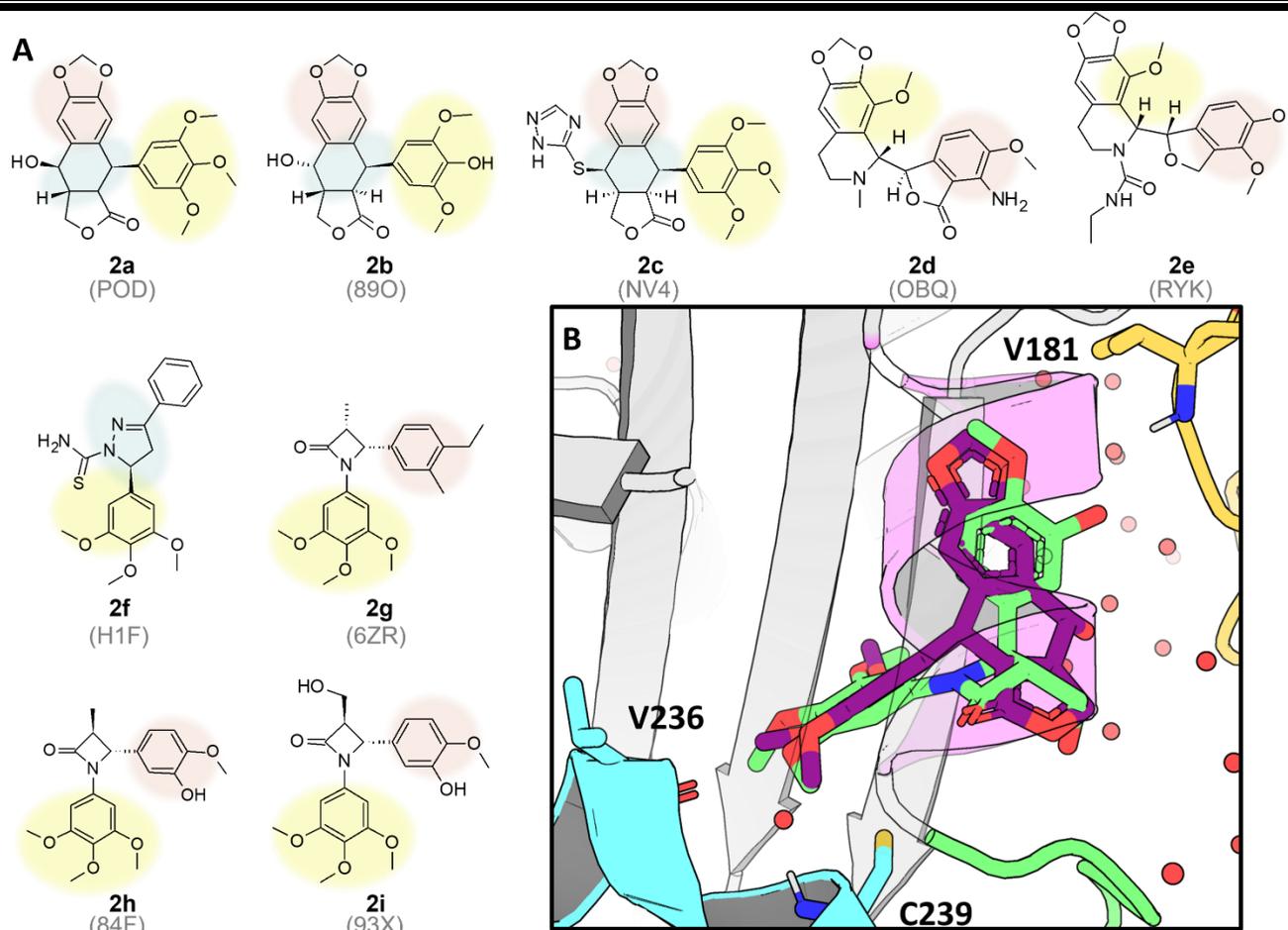
Los derivados indólicos, como es el caso de **1m**, han llamado la atención por poseer una potente actividad anticancerígena *in vitro* e *in vivo*, en especial los de bajo peso molecular. Un ejemplo es el compuesto **1n** (D3L), el cual se une al sitio de la colchicina ocupando las regiones RII y RIII, siendo un candidato atractivo para el desarrollo de compuestos antitubulina.<sup>53</sup> Junto con los derivados del indol, surgieron los compuestos derivados del benzotiazol, entre los cuales los compuestos **1o** (I8R) y **1p** (I8N) han mostrado la capacidad de cambiar su isomería *cis-trans* por medio de la luz. Las investigaciones en estos compuestos pueden conducir al desarrollo de modelos biológicos controlados *in situ*.<sup>58</sup>

#### 3.3.2. Grupo 2: Similares a la podofilotoxina

La podofilotoxina (POD [**2a**], **Figura 3.5**) es un producto natural proveniente de un extracto de las raíces de plantas herbáceas del género *Podophyllum*. Este compuesto es un conocido inhibidor de la polimerización de la tubulina que comparte el sitio de unión de la colchicina.<sup>11</sup> Al igual que sucede con la colchicina, su uso en la clínica se limita por la toxicidad que presenta. Por esto último, se han desarrollado análogos que buscan disminuir los efectos tóxicos en el tratamiento del cáncer.<sup>62</sup>

El compuesto **2b** (89O) es un derivado desmetilado de **2a**, y el modo de unión es prácticamente idéntico (**Figura 3.5**). Comparados con la colchicina, ambos compuestos se superponen en las tres regiones anteriormente descritas.<sup>62</sup> En la búsqueda por mejorar la actividad de los análogos de POD, el compuesto **2c** (NV4) mostró una mayor actividad citotóxica frente a líneas celulares de HeLa, cáncer gástrico (BGC-823) y pulmonar (A549). El anillo de triazol se dispone hacia RII de la colchicina, donde puede formar puentes de hidrógeno con moléculas de agua estructurales y la subunidad  $\alpha$ .<sup>60</sup>

La noscapina es un alcaloide natural utilizado como antitusivo, que, al igual que sus derivados estructurales, ha probado tener actividad anticancerígena. Los compuestos **2d** (OBQ) y **2e** (RYK) son dos de estos derivados, los cuales han presentado actividad inhibidora de la polimerización de la tubulina. En este trabajo, se incluyeron estas moléculas en el grupo de POD debido a que la información cristalográfica revela un modo de unión similar.<sup>63</sup> De estas moléculas, el compuesto **2e** mostró ser el más potente, revelando que la fracción de 1,3-benzodioxol es importante para la actividad biológica.<sup>64</sup> En el caso del compuesto **2f** (H1F), a la fecha no se han reportado datos referentes a su actividad biológica.

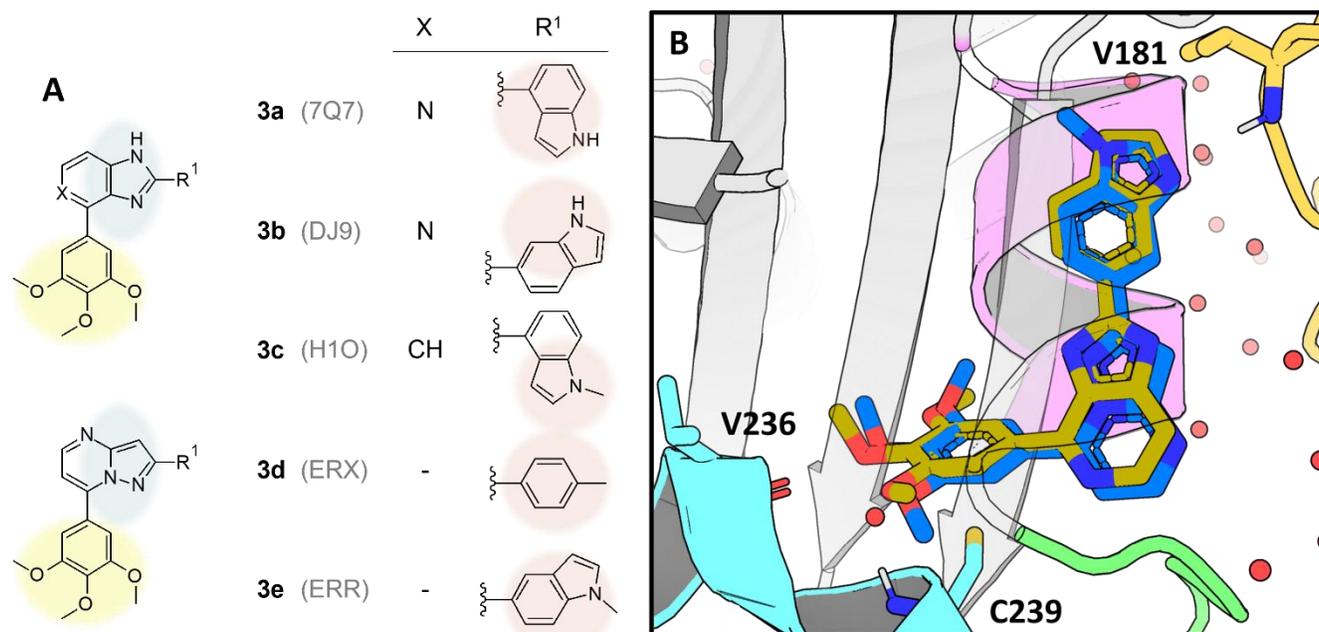


**Figura 3.5** Compuestos del grupo 2 del sitio de la colchicina. (A) Estructuras químicas y descripción de las regiones RI (amarillo), RII (azul) y RIII (naranja). (B) Representación tridimensional de la unión de la podofilotoxina (morado, PDB: 1SA1) y 93X (verde, PDB: 5XAG). Se marcan las estructuras H7, T7 y H8 (cian, verde y violeta, respectivamente) en la  $\beta$ -tubulina y T5 (amarillo) en la  $\alpha$ -tubulina y los aminoácidos cercanos con los que interactúan.

Los compuestos **2g-i** provienen de una serie de compuestos análogos del CA-4, los cuales presentan un anillo  $\beta$ -lactámico espaciador entre los núcleos aromáticos. El cristal del complejo proteína-ligando con **2g** (6ZR) revela que la orientación del isómero *trans* es importante para la actividad biológica, el anillo de trimetoxilo de estos compuestos se internaliza más en el sitio que la colchicina debido al tamaño del espaciador  $\beta$ -lactámico, además de presentar mayor actividad citotóxica con un intervalo de  $CI_{50}$  entre 31 a 63 nM contra líneas de células cancerosas como A2780, HeLa y SKOV-3.<sup>59</sup> De este grupo, los compuestos **2h** (84F) y **2i** (93X) tuvieron una mejor actividad biológica, pues mostraron una  $CI_{50}$  de 0.021 y 0.001  $\mu$ M, respectivamente, contra las mismas líneas celulares.<sup>61</sup>

3.3.3. Grupo 3. Derivados de imidazopiridina, bencimidazol y pirazolopirimidina

Los compuestos pertenecientes a este grupo conservan el anillo trimetoxilado que se acopla a la región RIII de la colchicina (**Figura 3.6**). El compuesto **3a** (7Q7), mostró selectividad y potencia contra células cancerígenas de melanoma metastásico que presenta resistencia al paclitaxel. Además, los ensayos *in vivo* demostraron una reducción del tamaño de tumores pulmonares y un perfil de seguridad adecuado al no afectar tejidos sanos en modelos murinos tratados.<sup>65</sup>



**Figura 3.6.** Compuestos del grupo 3 del sitio de la colchicina. (A) Estructuras químicas y descripción de las regiones RI (amarillo), RII (azul) y RIII (naranja). (B) Representación tridimensional de la unión de DJ9 (verde, PDB: 6NNG) y ERR (azul, PDB: 6LSN) en el sitio. Se marcan las estructuras de H7, T7 y H8 (cian, verde y violeta, respectivamente) en la  $\beta$ -tubulina y T5 (amarillo) en la  $\alpha$ -tubulina y los aminoácidos cercanos con los que interactúan.

Por su parte, el compuesto **3b** (DJ9), un análogo de **3a**, presenta efectos antitumorales y antiangiogénicos *in vivo*; sin embargo, la afinidad que tiene por el sitio es menor que la colchicina y CA-4. A pesar de que este compuesto mostró ser efectivo en líneas celulares de melanoma que presentan resistencia a paclitaxel, estudios previos han sugerido que la despolimerización de la tubulina no sea su principal mecanismo de acción.<sup>66</sup> El compuesto **3c** (H1O) es derivado de **3a**, del cual no se ha reportado aún información referente a su actividad

sobre tubulina. Posiblemente, al tener esta sustitución alifática, su interacción con el sitio hidrofóbico sea mayor en comparación con **3a**.

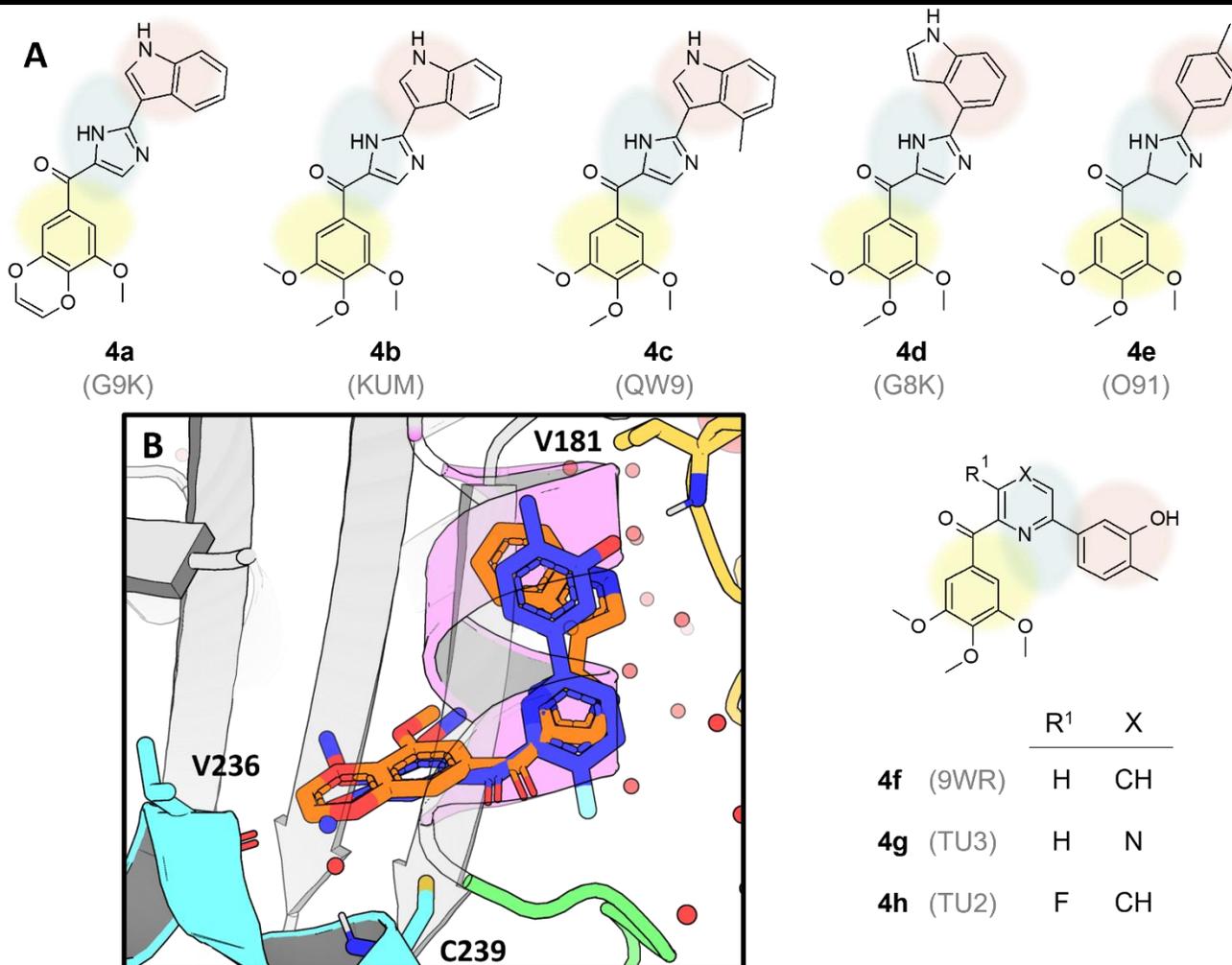
Los derivados de pirazolopirimidina, **3d** (ERX) y **3e** (ERR), mostraron una potente actividad antiproliferativa en células tumorales, con una  $CI_{50}$  de 28 y 24.8 nM, respectivamente. La potencia superior del compuesto **3e** se debe, probablemente, a la amplia superficie de contacto en el sitio de unión. Además, este compuesto es metabólicamente más estable que **3d**.<sup>67</sup>

#### 3.3.4. Grupo 4. Derivados de imidazol, piridina y pirazina

El anillo de 3,4,5-trimetoxibenzoilo es común para muchos de los inhibidores de este sitio. Las modificaciones que se han hecho sobre esta porción de la molécula han llevado a la disminución en los efectos antiproliferativos.<sup>101</sup> En el caso del compuesto **4a** (G9K), se formó un anillo a partir de un par de grupos metoxilo para dar lugar a la benzodioxina (**Figura 3.7**). Esto último permitió una mejora significativa de la actividad anticancerígena, incluyendo líneas celulares resistentes a paclitaxel.<sup>68</sup>

El compuesto **4b** (ABI-231/KUM) es un potente inhibidor de la tubulina que se encuentra en ensayos clínicos para el tratamiento de cáncer de mama y de próstata. A partir de esta estructura han surgido los compuestos **4c** (QW9) y **4d** (G8K), que corresponden a un derivado y análogo, respectivamente. Ambas modificaciones conducen a una mejora en la actividad antiproliferativa frente a diversas líneas celulares de carcinomas resistentes, siendo **4d** el de mayor potencia citotóxica, con una  $GI_{50}$  entre 1.6 a 3.7 nM frente a diversas líneas celulares de cáncer.<sup>70</sup>

El compuesto **4e** (ABI-274/O91) también es un potente inhibidor, aunque ligeramente menos activo que **4b** ( $CI_{50}$  de 13.5 nM y 10 nM, respectivamente). En el intento de optimizar esta molécula, se encontró que al cambiar el anillo de imidazol por piridina, como en el compuesto **4f** (9WR), se observa una mejora en la actividad anticancerígena al alcanzar una  $CI_{50}$  de 1.8 nM contra células cancerosas.<sup>69</sup> A pesar de ser más potente, **4f** es metabólicamente susceptible, por lo que se buscó modificar la estructura para evitar su biotransformación, surgiendo así los compuestos **4g** (TU3) y **4h** (TU2), los cuales son metabólicamente más estables.<sup>57</sup>

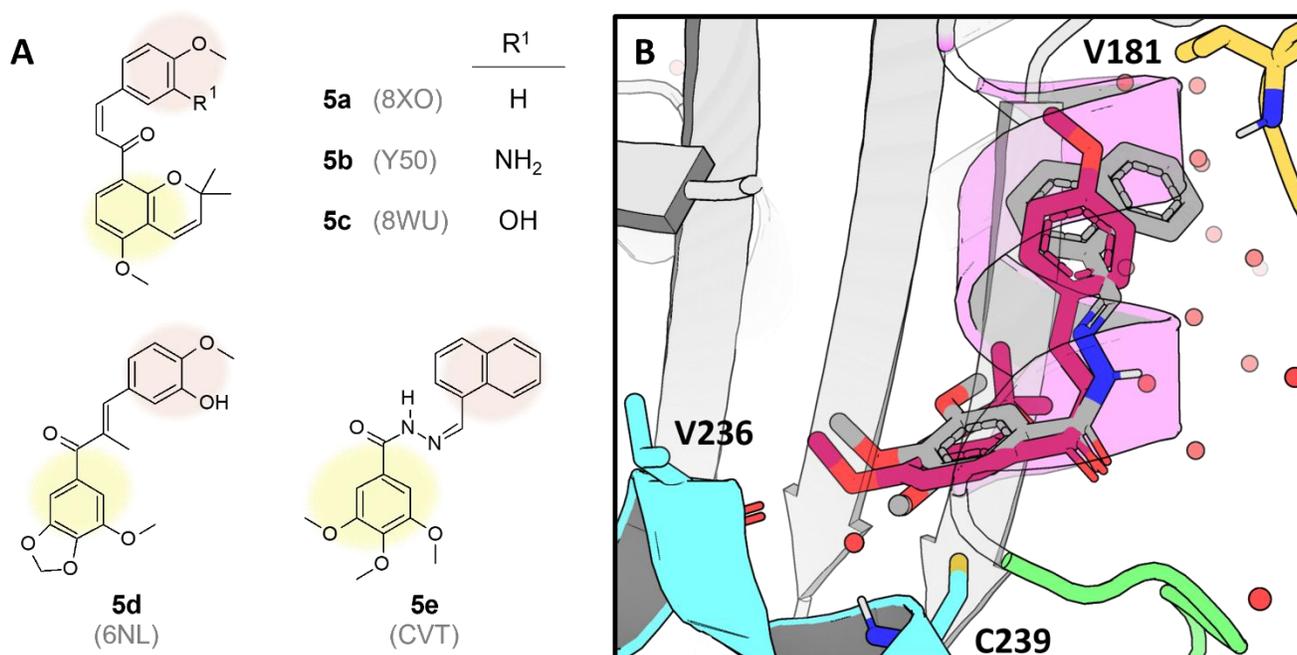


**Figura 3.7.** Compuestos del grupo 4 del sitio de la colchicina. (A) Estructuras químicas y descripción de las regiones RI (amarillo), RII (azul) y RIII (naranja). (B) Representación tridimensional de la unión de G9K (naranja, PDB: 6D88) y TU2 (azul, PDB: 6XET) en el sitio. Se marcan las estructuras de H7, T7 y H8 (cian, verde y violeta, respectivamente) en la  $\beta$ -tubulina y T5 (amarillo) en la  $\alpha$ -tubulina y los aminoácidos cercanos con los que interactúan.

### 3.3.5. Grupo 5. Chalconas y bencidrazida

Los compuestos **5a-d** son análogos de chalcona (**Figura 3.8**), compuestos de origen vegetal importantes en el desarrollo de fármacos con actividades biológicas diversas.<sup>102</sup> La molécula **5a** (8XO), conocida como millepachina, es un producto natural proveniente de la planta *Millettia pachycarpa*. Esta molécula, junto con sus derivados **5b** (Y50) y **5c** (8WU), son capaces de unirse a las regiones RI y RIII del sitio de la colchicina en la tubulina. Dentro de estos tres

compuestos, **5b** fue el que mostró mayor actividad frente a líneas celulares de cáncer hepático (HepG2) y de ovario (A2780S) resistentes a tratamientos convencionales.<sup>71</sup> Yang *et al.*<sup>103</sup> menciona que la unión de este compuesto es de forma irreversible; sin embargo, la información la resolución del complejo mediante rayos X no sugiere la presencia de un enlace covalente entre el ligando y la proteína. La acción irreversible observada durante los ensayos biológicos puede provenir de su unión a otra proteína, o bien a productos de oxidación que se forman durante la incubación con células. El compuesto **5d** (6NL), un análogo estructural de **5a**, mostró una potente actividad antiangiogénica y antitumoral al inhibir el crecimiento de células endoteliales y tumorales, respectivamente, con valores de CI<sub>50</sub> que van de 1 a 10 nM.<sup>104</sup>



**Figura 3.8.** Compuestos del grupo 5 del sitio de la colchicina. (A) Estructuras químicas y descripción de las regiones RI (amarillo) y RIII (naranja). (B) Representación tridimensional de la unión de 8XO (rojo, PDB: 5YLJ) y CVT (gris, PDB: 6F7C) en el sitio. Se marcan las estructuras H7, T7 y H8 (cian, verde y violeta respectivamente) en la  $\beta$ -tubulina y T5 (amarillo) en la  $\alpha$ -tubulina y los aminoácidos cercanos con los que interactúan.

Uno de los mecanismos más importantes en la resistencia a fármacos empleados para el tratamiento de diferentes carcinomas involucra su eflujo a través de transportadores de tipo ABC (ej. P-gp/ABCG1, BCRP/ABCG2).<sup>105</sup> El compuesto **5e** (CVT), el cual posee un conector de hidrazida en lugar del aceptor de Michael, es un compuesto con potente actividad

anticancerígena y mayor estabilidad que los derivados de chalcona, que además no es sustrato de transportadores de resistencia a fármacos. Adicionalmente, este compuesto promueve el daño al DNA que se observa a través de la formación de micronúcleos. Las evaluaciones *in vivo* muestran pérdida de peso y toxicidad gastrointestinal, por lo que abre la búsqueda de compuestos que disminuyan estos efectos.<sup>72</sup>

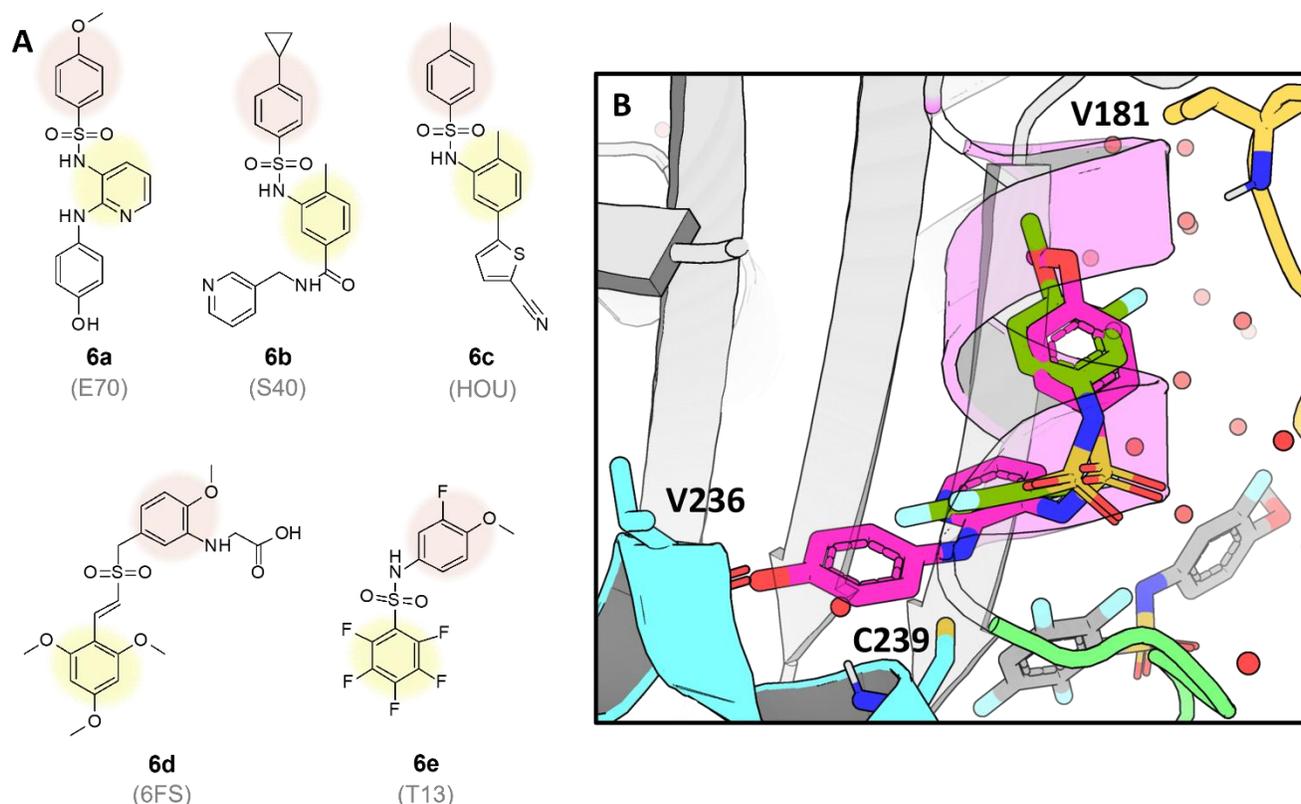
### 3.3.6. Grupo 6. Derivados de sulfonamida y sulfona

El compuesto **6a** (E70) se acopla a las regiones RII y RIII de la colchicina a través del anillo de piridina y 4-metoxifenilbencensulfonamida, respectivamente (**Figura 3.9**). Esta molécula interactúa en una región más internalizada por lo que no tiene contacto con el asa  $\alpha$ T5. Durante la optimización de este derivado, se encontró que el compuesto **6b** (S40) supera la resistencia al paclitaxel y carece de neurotoxicidad en ensayos celulares y modelos murinos.<sup>75</sup> Por su parte, la actividad inhibidora de la polimerización del compuesto **6c** (HOU) fue determinada con una concentración efectiva 50 (CE<sub>50</sub>) de 21 nM. Este compuesto orienta el sustituyente nitrilo hacia la cavidad hidrofóbica del sitio de la colchicina. Dado que no es sustrato de la glicoproteína P y es capaz de unirse a la isoforma  $\beta$ III, se ha seleccionado como una molécula promisoría para superar la resistencia al tratamiento con otros agentes dirigidos a los microtúbulos.<sup>76</sup>

El rigosertib (**6d**, 6FS) no poseía un modo de unión establecido cuando se encontraba en fase III. Sin embargo, en el año 2020 la FDA aprobó su uso para el tratamiento del síndrome mielodisplásico. En un principio, se atribuyó su actividad biológica por su posible acción como inhibidor de la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K). Más tarde, técnicas combinadas de grupos de repeticiones palindrómicas cortas regularmente interespaciadas de inhibición y activación (CRISPRi y CRISPRa, por sus siglas en inglés, respectivamente) demostraron que el compuesto se une a tubulina en el sitio de la colchicina. La resolución del complejo proteína-ligando revela que el rigosertib establece interacciones hidrofóbicas en la  $\beta$ -tubulina y un puente de hidrógeno con el residuo T179 del asa  $\alpha$ T5.<sup>74</sup>

La información cristalográfica del compuesto **6e** (T13), muestra que este compuesto se une de dos formas al sitio. La primera de ellas es mediante una unión covalente con el residuo C239, mientras que la segunda se posiciona a través de un acoplamiento no covalente próximo a la

interfaz del heterodímero. Cabe mencionar que estos modos de unión no son excluyentes el uno del otro.<sup>73</sup>

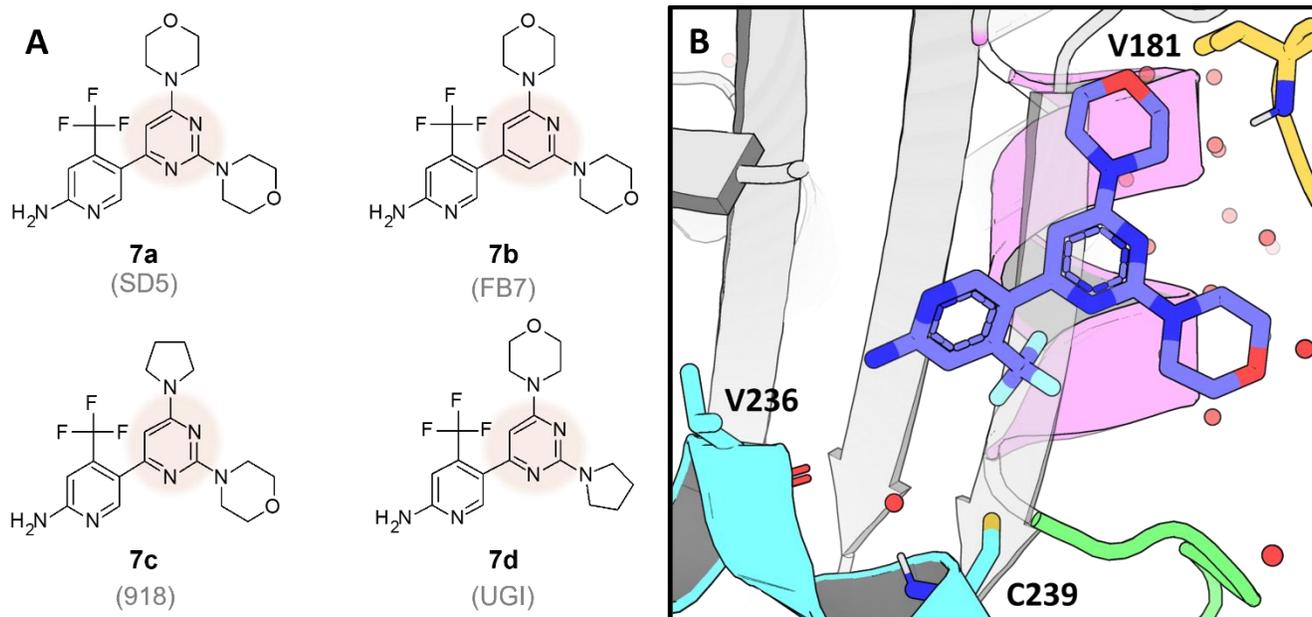


**Figura 3.9** Compuestos del grupo 6 del sitio de la colchicina. (A) Estructuras químicas y descripción de las regiones RI (amarillo) y RIII (naranja). (B) Representación tridimensional de la unión de E70 (rosa, PDB: 3HKC) y T13 (verde, PDB: 3HKE) en el sitio. La estructura en gris corresponde al modo de unión covalente de T13 con el residuo C239. Se marcan las estructuras de H7, T7 y H8 (cian, verde y violeta, respectivamente) en la  $\beta$ -tubulina y T5 (amarillo) en la  $\alpha$ -tubulina y los aminoácidos cercanos con los que interactúan.

### 3.3.7. Grupo 7. Análogos de buparlisib

El buparlisib (**7a**, SD5) es un conocido inhibidor de la cinasa PI3K empleado para el tratamiento del cáncer, del cual se ha descubierto recientemente que posee actividad inhibidora de la polimerización de la tubulina al unirse al sitio de la colchicina (**Figura 3.10**). En 2017, Bohnacker *et al.*<sup>77</sup> sintetizaron una serie de análogos estructurales (**7b-d**) de este compuesto con el fin de potenciar la actividad antitubulina. Para conocer la orientación del buparlisib en la tubulina, se sintetizaron a los compuestos **7c** (918) y **7d** (UGI), en los cuales se reemplaza a

uno de los sustituyentes de morfolina por pirrolidina para la generación de regioisómeros. De estos compuestos, el **7c** presentó una actividad inhibitoria sobre tubulina 30 veces mayor que **7d**, con una  $CI_{50}$  de 0.40  $\mu$ M y 12  $\mu$ M, respectivamente. Además, en ese estudio se encontró que al reemplazar el núcleo central de pirimidina por piridina (i.e., **7a**) las moléculas pierden actividad inhibitoria de cinasa, pero mejoran la actividad inhibitoria de la polimerización.



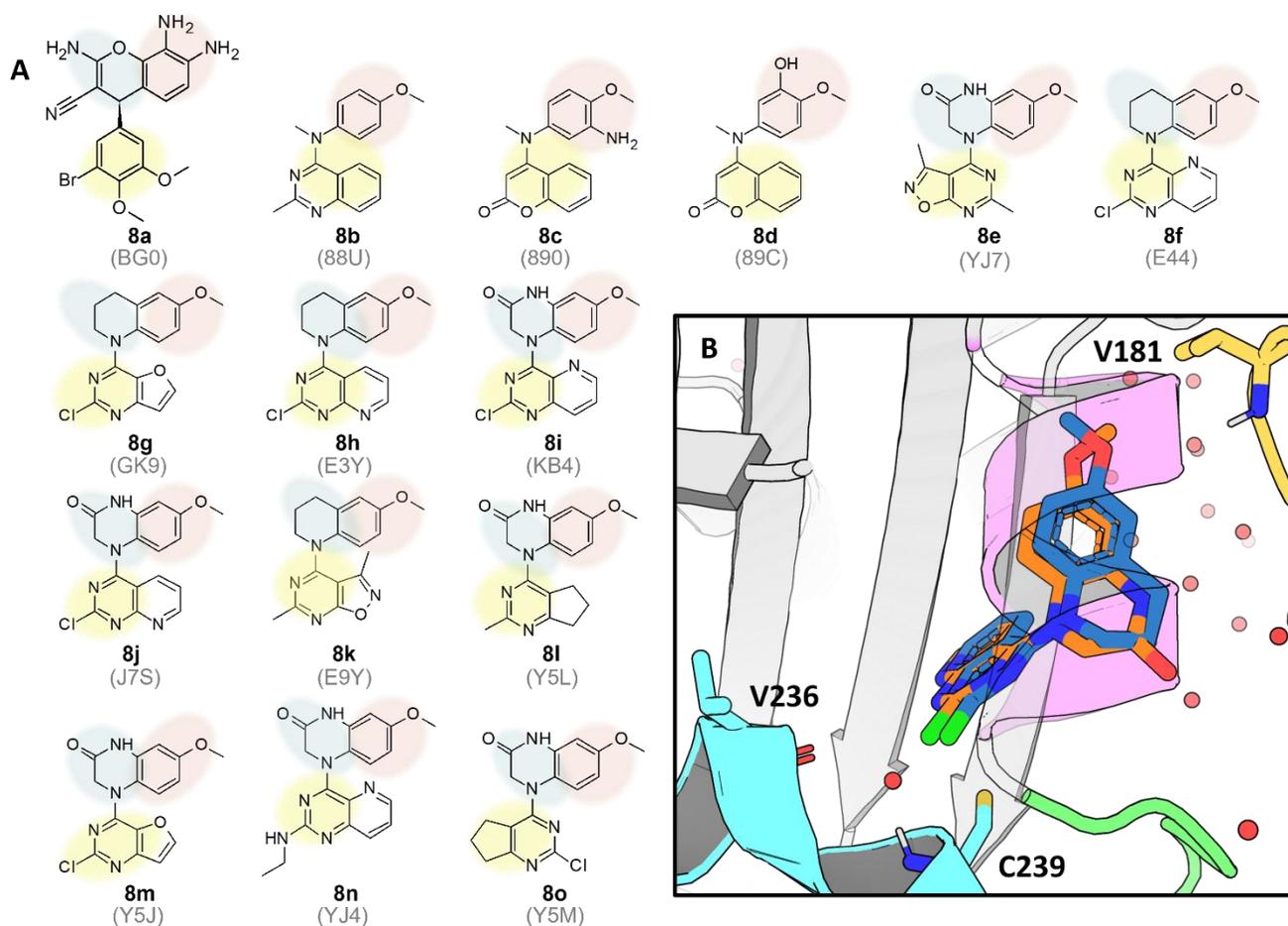
**Figura 3.10.** Compuestos del grupo 7 de la colchicina. (A) Estructuras químicas y descripción de la región RIII (naranja). (B) Representación tridimensional de la unión de SD5 (azul, PDB: 5M7E) en el sitio. Se marcan las estructuras de H7, T7 y H8 (cian, verde y violeta, respectivamente) en la  $\beta$ -tubulina y T5 (amarillo) en la  $\alpha$ -tubulina y los aminoácidos cercanos con los que interactúan.

### 3.3.8. Grupo 8. Derivados de cumarina, pirimidina y quinazolina

La información que proporciona el cristal del complejo proteína-ligando de **8a** (BG0) indica que se acopla bien a las tres regiones anteriormente descritas para la colchicina (**Figura 3.11**). La unión de este compuesto puede ayudar a explicar la relación estructura-actividad de otros derivados de benzopirano. Por ejemplo, se ha visto que la ausencia del anillo dimetoxifenilo disminuye en gran medida la actividad inhibitoria de la polimerización, pues se pierden interacciones hidrofóbicas importantes en esa área del sitio.<sup>82</sup>

El compuesto **8b** (88U), conocido como verubulina, ha demostrado ser un potente inhibidor de la polimerización de la tubulina cuya evaluación en fases clínicas fue suspendida debido a la

alta toxicidad que presentó.<sup>106</sup> Por esto último, se decidió modificar al núcleo de quinazolina por una cumarina, dando lugar al compuesto **8c** (890), el cual ha demostrado tener potente actividad citotóxica contra líneas celulares de cáncer multirresistentes. El anillo de quinazolina y cumarina de ambos compuestos se superponen perfectamente en el sitio; sin embargo, la presencia del carbonilo de la lactona de **8c** conlleva a una disminución de la superficie hidrofóbica de contacto y, por lo tanto, una disociación en un menor tiempo.<sup>78</sup> Acerca del compuesto **8d** (89C), a la fecha no hay información reportada sobre su actividad biológica, pero es posible observar que se trata de un análogo hidroxilado de **8c**.



**Figura 3.11.** Compuestos del grupo 8 de la colchicina. (A) Estructuras químicas y descripción de las regiones RI (amarillo), RII (azul) y RIII (naranja). (B) Representación tridimensional de la unión de E3Y (azul, PDB: 6BR1) y J7S (naranja, PDB: 6EG5) en el sitio. Se marcan las estructuras de H7, T7 y H8 (cian, verde y violeta, respectivamente) en la  $\beta$ -tubulina y T5 (amarillo) en la  $\alpha$ -tubulina y los aminoácidos cercanos con los que interactúan.

En 2018, Banerjee *et al.*<sup>79</sup> sintetizaron la serie compuestos **8e-h**, los cuales resultaron de modificar el anillo bencénico de la quinazolina en **8d** por piridina, isoxazol y furano. Adicionalmente, se llevó a cabo la formación de un anillo de piperidina para restringir la movilidad del sustituyente 4-metoxifenilo. De entre ellos, los compuestos **8g** (E3Y) y **8h** (G9K) fueron los que mostraron los efectos antitumorales más sobresalientes, incluso presentando actividad contra líneas celulares resistentes al tratamiento con paclitaxel. Con base en la estructura de **8h**, se sintetizaron los compuestos **8i** (KB4) y **8j** (J7S), los cuales se diferencian por tener un núcleo de quinoxalinona en lugar de la tetrahydroquinolina. Estos compuestos mostraron una actividad inhibitoria de la polimerización más significativa que con el núcleo original. Además, los ensayos *in vitro* de **8i** mostraron una mejor actividad citotóxica, reflejada en sus valores de  $CI_{50}$  que van desde 1.6 a 10.3 nM contra diferentes líneas celulares de cáncer. Sin embargo, la poca solubilidad, inestabilidad metabólica y toxicidad observada en modelos animales conllevó a la selección del compuesto **8j** como el mejor candidato para continuar con modificaciones estructurales.<sup>81</sup>

Los esfuerzos por mejorar al compuesto **8i** resultaron en la generación de la serie **8k-o**. Estos compuestos se unen al sitio de la colchicina e impiden la polimerización de los microtúbulos, de entre estos **8n** (YJ4) y **8o** (Y5L) mostraron ser los de mayor actividad en ensayos *in vitro* de polimerización, proliferación y migración celulares. Además, el compuesto **8o** mostró un perfil farmacocinético y estabilidad metabólica prometedora.<sup>80</sup>

### 3.3.9. Grupo 9. Otros compuestos

Dentro de este grupo se encuentran compuestos que no se relacionan en estructura o modo de unión, pero que se acoplan en el sitio de la colchicina (**Figura 3.12**).

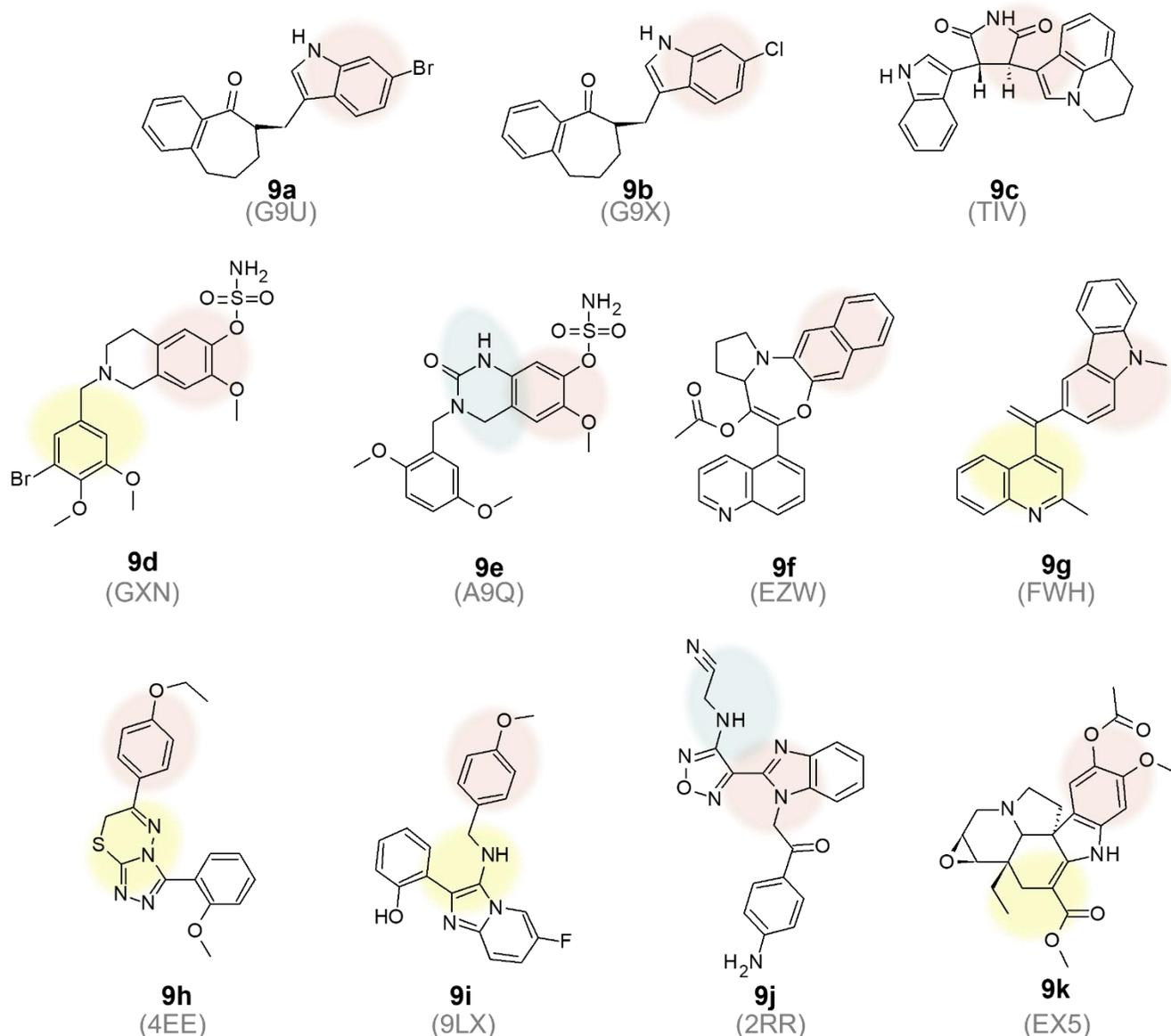
Los compuestos **9a** (G9U) y **9b** (9GX) son análogos en los que sólo se intercambia halógeno. A la fecha, no se ha publicado su potencia como inhibidores de la polimerización o actividad biológica en líneas celulares.

El tivantinib (**9c**, TIV), se encuentra en fases clínicas para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer. Esta sustancia muestra potente actividad anticancerígena y no es susceptible a los transportadores ABC, por lo que supera la resistencia a fármacos.<sup>19</sup>

A pesar del novedoso modo de unión de los compuestos **9d** (GXN) y **9e** (A9Q), su actividad biológica no supera a la de CA-4. Sin embargo, abre camino para el desarrollo de nuevas moléculas más potentes.<sup>90,85</sup>

Los compuestos **9f** (EZW) y **9g** (FWH) mostraron actividad biológica significativa en células con sobreexpresión de glicoproteína P y resistentes a CA-4, respectivamente.<sup>87,89</sup>

El compuesto **9h** (4EE) se encontró a través de cribado de alto rendimiento (*High-throughput screening, HTS*), mostrando selectividad hacia líneas celulares de cáncer.<sup>83</sup>



**Figura 3.12.** Compuestos del grupo 9 del sitio de la colchicina. Estructuras químicas y Estructuras químicas y descripción de las regiones RI (amarillo), RII (azul) y RIII (naranja).

El cristal del compuesto **9i** (9LX) reveló que la formación del puente de hidrógeno intramolecular entre el fenol y el núcleo de imidazo[1,2-*a*]piridina restringe la movilidad de la molécula y permite que la molécula ejerza su actividad antiproliferativa.<sup>88</sup>

El compuesto **9j** (2RR) surge de la hidrólisis del profármaco lisavanbulina y tiene actividad inhibitoria de los microtúbulos con una  $CI_{50}$  de 1.4  $\mu\text{M}$ . Se determinó que **9j** se une a los heterodímeros  $\alpha/\beta$  libres y es incapaz de acoplarse a los microtúbulos preformados en protofilamentos. Su unión en el sitio se debe principalmente a contactos hidrofóbicos mediante los anillos de bencimidazol y 3-amino oxodiazol en las regiones RII y RIII de la colchicina.<sup>47</sup>

El compuesto **9k** (EX5) es un alcaloide perteneciente a las jerantinas, los cuales forman parte del extracto de la planta *Tabernaemontana corybromosa* y ha demostrado tener una potente actividad anticancerígena por su unión a microtúbulos. Debido a la complejidad de la estructura, es difícil lograr la síntesis de estos compuestos. Smedley *et al.*<sup>86</sup> propusieron un método de semi-síntesis enantioselectiva y sustentable para estos alcaloides. La información cristalográfica revela que se unen al sitio de la colchicina y los ensayos *in vitro* permitieron determinar una  $CI_{50}$  de 0.80  $\mu\text{M}$  contra líneas celulares de cáncer, muy parecida al producto natural de referencia [(-)-jerantinina A,  $CI_{50}=0.78 \mu\text{M}$ ].

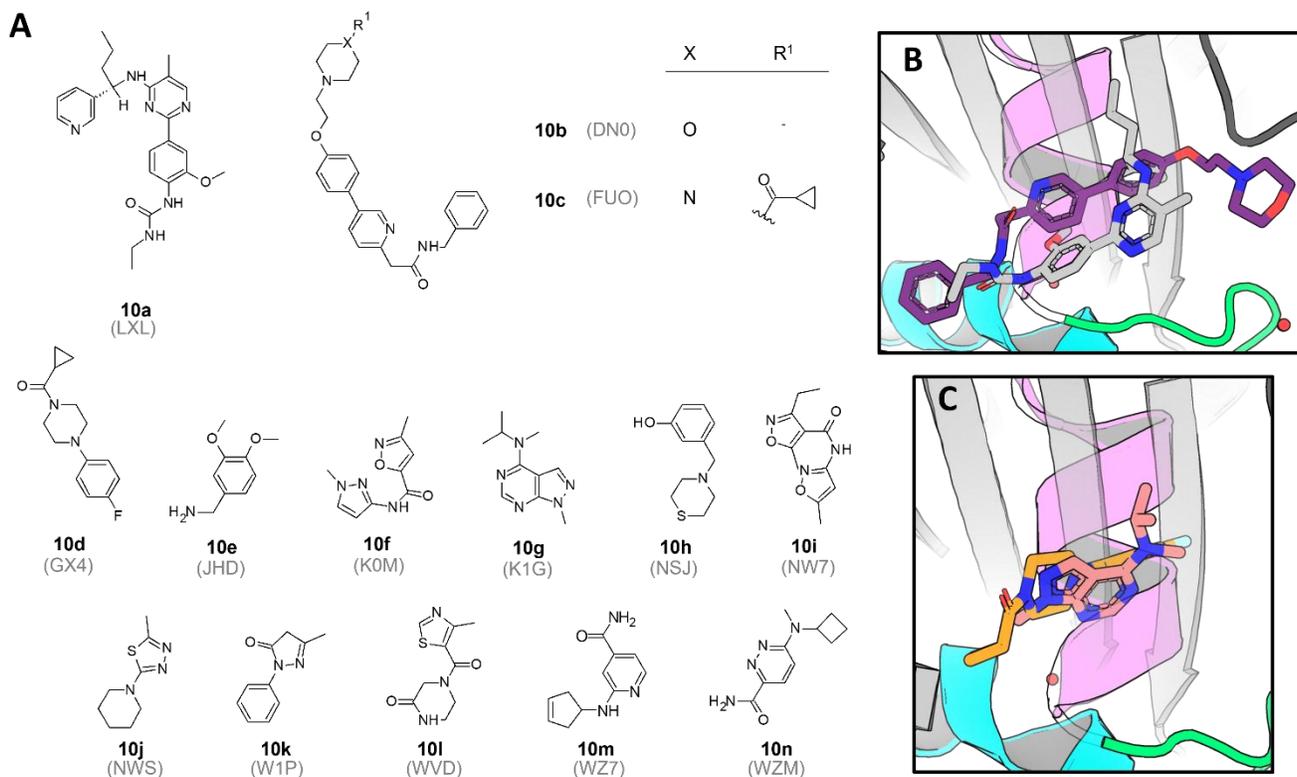
#### 3.4. Ligandos acoplados en la zona B

En esta zona se encuentran agrupados los ligandos que, por su extensión, se acoplan a lo largo de la cavidad que corresponde al sitio de la colchicina (**Figura 3.13**). Se nombrará grupo 10 siguiendo la nomenclatura utilizada en el apartado anterior.

La lexibulina (**10a**, LXL) interactúa con los residuos  $\beta\text{V236}$  de H7,  $\beta\text{D249}$  en T7 y  $\alpha\text{T179}$  en T5. Durante su descubrimiento, los análogos que poseían una cadena alquílica más larga mejoraron la actividad inhibitoria de la polimerización, pues establecían una mayor superficie hidrofóbica de contacto en la Zona A.<sup>84</sup>

La tirbanibulina, como también se le conoce al compuesto **10b** (DN0), es conocida por inhibir la proteína tirosina cinasa del protooncogén SRC, el cual está involucrado en la motilidad, morfología y supervivencia celular. Es por ello que se ha estudiado esta vía de señalización como blanco terapéutico en el tratamiento de algunos tipos de cáncer y en la queratosis

actínica, para la cual se encuentra aprobada para su comercialización.<sup>107,108</sup> También ha sido demostrado que tiene actividad inhibitoria de la polimerización de tubulina mediante ensayos de inmunofluorescencia, además de presentar baja toxicidad en contraste con otros inhibidores. El complejo proteína-ligando revela que **10b** se extiende ampliamente en el sitio y establece contactos principalmente hidrofóbicos y mediante puentes de agua con  $\beta$ E198.<sup>91</sup>



**Figura 3.13.** (A) Estructuras químicas de la zona B del sitio de la colchicina (grupo 10). (B) Representación tridimensional de la unión de lexibulina (gris, PDB: 5CA0) y tirbanibulina (morado, PDB: 6KNZ), se marcan las estructuras de H7, T7 y H8 en la  $\beta$ -tubulina (cian, verde y violeta respectivamente) y T5 (gris) en la  $\alpha$ -tubulina. (C) Representación tridimensional de la unión de los fragmentos GX4 (naranja, PDB: 5S4U) y K1G (rosa, PDB: 5S4T) se marcan las estructuras de H7, T7 y H8 en la  $\beta$ -tubulina (cian, verde y violeta respectivamente).

Con el fin de mejorar la actividad inhibitoria de la polimerización de **10b**, se encontró que **10c** (FUO) es 10 veces más activo sobre la tubulina que su predecesor, con una  $CI_{50}$  de 0.6 nM contra la  $CI_{50}$  de 6.8 nM. Se une de una manera similar a la tirbanibulina, además de que la fracción de ciclopropilacetil piperazina establece contactos con  $\alpha$ -tubulina en un nuevo sitio. De igual manera, **10c** mantiene la actividad inhibitoria de la cinasa de SRC. Mediante estudios

*in vivo*, se determinó que posee un adecuado perfil farmacocinético y baja toxicidad, por lo que la optimización de este compuesto puede ser una nueva estrategia en el desarrollo de inhibidores de la polimerización de la tubulina.<sup>92</sup>

Los compuestos **10d-n** se encontraron a través de un cribado virtual de fragmentos de baja masa molecular ( $MM < 200$  Da). En total, el estudio reveló 56 fragmentos de diversa naturaleza química acoplados en 27 sitios distintos en el heterodímero de tubulina. Combinado con estudios cristalográficos, se confirmó la unión de 11 de estos en esta zona del sitio de la colchicina (**Figura 3.13**).<sup>27</sup>

#### 3.5. Ligandos acoplados en la zona C

El conjunto de ligandos que se acoplan en esta zona presenta una amplia variedad de estructuras. Los cristales de complejos tubulina-ligando que se han resuelto permite ver que el modo de unión y los sitios de interacción difieren de ligando a ligando, donde cada uno de estos compuestos o grupos de compuestos son capaces de explorar un subconjunto de estas interacciones.<sup>109</sup> Resulta interesante observar que la mayoría de los ligandos que se acoplan en esta zona del sitio presentan formas tautoméricas. Por ejemplo, los derivados de bencimidazol-2-carbamato de metilo, como el nocodazol, mebendazol, entre otros, siempre se representan con un enlace C=N dentro del biciclo. Sin embargo, esto no puede ser confirmado con la densidad electrónica de los cristales con tubulina, debido a su baja resolución.<sup>110</sup> Por ello, en este trabajo se considerará la existencia de los tautómeros más probables que se puedan presentar de cada grupo de ligandos.

Otro aspecto a considerar en este grupo de moléculas es el estado de protonación de los aminoácidos en el sitio. En 2018, Guzmán-Ocampo, *et al.*<sup>111</sup> propusieron la existencia del estado protonado de la cadena lateral de  $\beta$ E198. El estudio sugirió que el ambiente hidrofóbico del sitio favorece la presencia del estado protonado al poseer un  $pK_a$  cercano a 6.21 (el  $pK_a$  del aminoácido en agua es de 4.25). Recientemente, se ha propuesto que el puente de hidrógeno que se forma con el residuo  $\beta$ E198 es clave en el mecanismo de acción de los inhibidores de la polimerización con actividad degradadora de la tubulina. Esta interacción es catalogada como un puente de hidrógeno de baja barrera energética,<sup>38</sup> los cuales son un tipo especial de puentes de hidrógeno cortos caracterizados por compartir equitativamente un

átomo de H, que puede entenderse como una transferencia de protón intermolecular. Esta clase de interrelación se ha detectado en numerosos sitios catalíticos de enzimas pues son más favorecidos entálpicamente que los puentes de hidrógeno convencionales.<sup>112</sup>

Adicionalmente, el estudio realizado por Guzmán-Ocampo *et al.*<sup>111</sup> demostraron la importancia en la interacción proteína-ligando de una molécula de agua estructural cercana al residuo C239, la cual se encuentra estabilizada por la formación de puentes de hidrógeno con el grupo amino de la cadena principal de C239 y el oxígeno del grupo carbonilo de G235.<sup>109,111</sup>

Las interacciones principales que se han reportado para los ligandos de este sitio y que se tomarán en cuenta para describir el modo de unión de estos compuestos, son las siguientes: (1) interacciones hidrofóbicas con el residuo F167, (2) interacciones por puente de hidrógeno con N165, V236 y E198, y (3) la interacción de puente de agua con la molécula de agua estructural.<sup>73,19,109</sup> En la **Tabla 3.2** se enlistan las interacciones principales de los ligandos co-cristalizados en esta zona del sitio.

**Tabla 3.2.** Resumen de las interacciones que forman los ligandos con los aminoácidos circundantes y moléculas de agua de primer nivel de la zona C del sitio de la colchicina

Código de ligando	Puente de hidrógeno			Hidrofóbico	Puente de agua
	N165	E198	V236	F167	
N16		✓	✓	✓	✓
G2N	✓	✓	✓		
K2N	✓	✓	✓		
4ED	✓				✓
PN6		✓	✓	✓	✓

Interacciones

Código de ligando	Puente de hidrógeno			Hidrofóbico	Puente de agua
	N165	E198	V236	F167	
NZO	✓	✓	✓		✓
87U	✓	✓	✓	✓	✓
PO7		✓	✓	✓	✓
9N5		✓			
8WR	✓	✓	✓	✓	✓
94U	✓	✓			
DLW		✓			✓
DLK		✓			✓
2GE		✓			✓
AEU		✓		✓	
AF6		✓		✓	
AEX		✓		✓	
FW9		✓			✓
H1C	✓	✓	✓		✓
WN1	✓	✓			
WZD	✓	✓	✓		

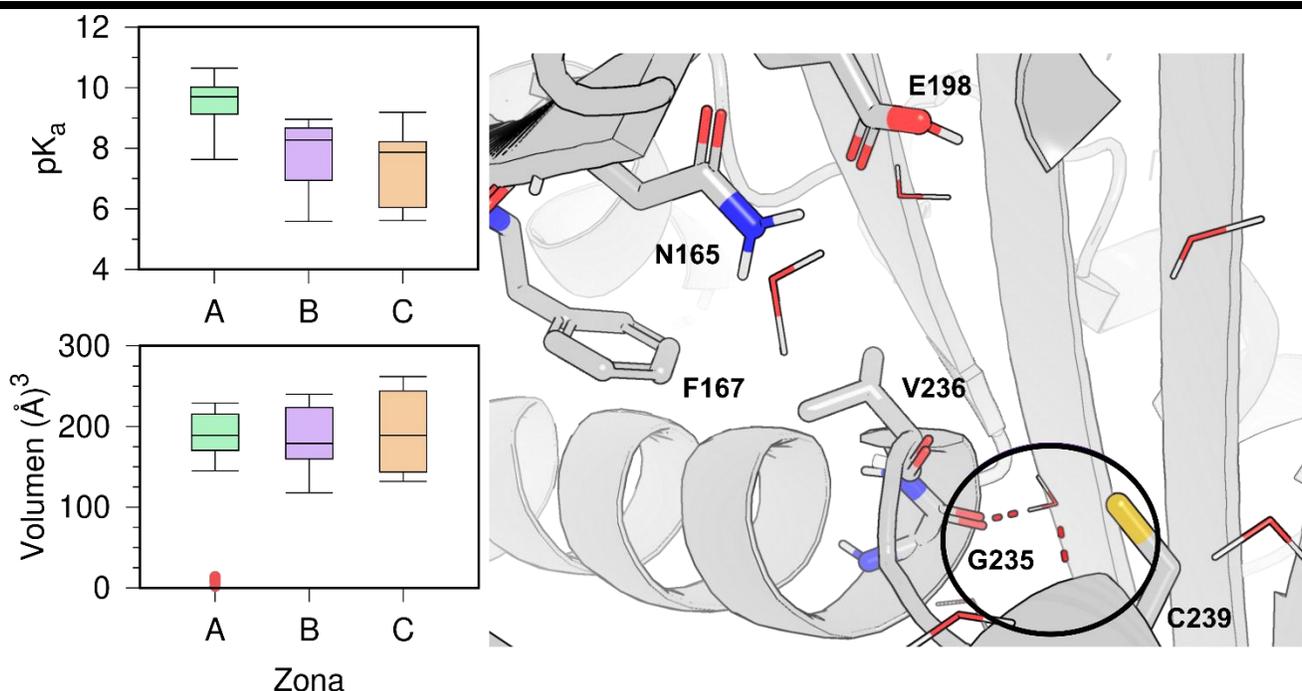
Código de ligando	Interacciones				Puente de agua
	Puente de hidrógeno			Hidrofóbico	
	N165	E198	V236	F167	
V95	✓	✓	✓		✓
J6L	✓	✓			✓
JEL		✓		✓	
IAZ	✓	✓	✓		

### 3.5.1. $pK_a$ del residuo E198 y volumen de la cavidad

Las proteínas incluyen aminoácidos que mantienen equilibrios ácido-base en sus cadenas laterales como Asp, Glu, Arg, Lys e His. El ambiente que rodea a cada aminoácido influye en su estado de protonación. Al final, tendremos que una proteína puede presentar diferentes microestados de protonación en los aminoácidos que la conforman, siendo que estos pueden modificarse no sólo por el pH del medio en general, sino también por los ligandos con los que se encuentran interactuando.<sup>113</sup>

Como se mencionó anteriormente, el residuo E198 cumple un papel importante en la interacción con los inhibidores acoplados en este sitio. Para determinar el estado de protonación del residuo que incluya la información cristalográfica, se llevó a cabo la determinación del  $pK_a$  de los residuos involucrados en la interacción proteína-ligando con el programa PROPKA 3.0<sup>114,115</sup> para cada uno de los ligandos recolectados en las tres diferentes zonas (**Figura 3.14**).

Para explicar el cambio de  $pK_a$  del residuo  $\beta$ E198, se infiere que el volumen de la cavidad del sitio se modifica por la presencia de los diferentes ligandos en cada zona. Para ello se realizó un análisis de volumen con POVME 3.0.<sup>116</sup> Cuando los ligandos se internan en el sitio, como es el caso de los que están en la Zona C, modifican la estructura de la cavidad y exponen los residuos al solvente, lo que influye en el valor de  $pK_a$  de este aminoácido.



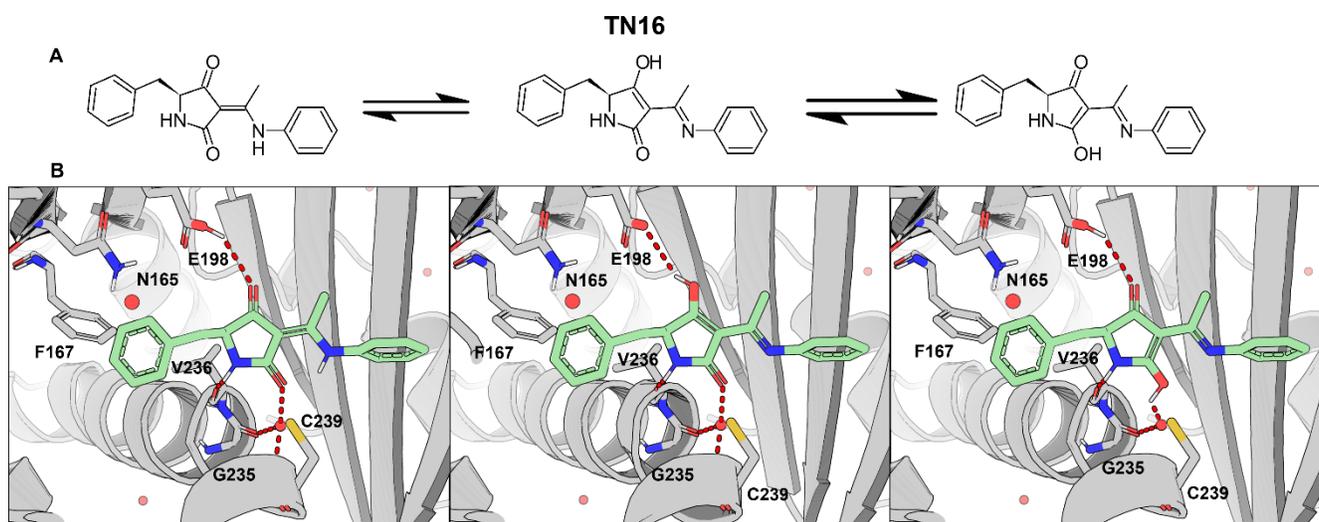
**Figura 3.14.** (Superior Izquierda) Gráfico de  $pK_a$  de la cadena lateral del residuo  $\beta$ E198 por zona del sitio. (Inferior izquierda) Gráfico de volumen en  $\text{\AA}^3$  de la cavidad del sitio de la colchicina dividido por zona, los puntos rojos representan valores atípicos del volumen. (Derecha) Representación tridimensional de la zona C del sitio de la colchicina en la  $\beta$ -tubulina (gris). Se marcan los principales aminoácidos con los que interactúan los ligandos y se destacan los puentes de H con la molécula de agua.

El análisis de volumen de la cavidad muestra que no hay diferencias significativas en el volumen entre cada zona, sólo algunos de complejos, representados en la **Figura 3.14** por puntos rojos indican que se encuentra más cerrada esta parte del sitio. Por lo que no es concluyente que la modificación del volumen de la cavidad influya directamente en la disminución del  $pK_a$ . Sin embargo, el análisis de  $pK_a$  por zona sugiere una reducción en el valor debido a la interacción que se tiene con los ligandos y/o exposición a moléculas de agua. Sin embargo, el valor registrado es muy superior al del ácido glutámico en agua, por lo que se demuestra la alta probabilidad de que este aminoácido se encuentre protonado cuando interactúa con los ligandos.

3.6. Perfil de interacción de inhibidores de la polimerización

3.6.1. TN16

El primer compuesto identificado en esta zona es el llamado TN16 (**N16, Figura 3.15**). Dado que se encontraba próximo al sitio de la colchicina, los autores se refirieron a este únicamente como un sitio contiguo<sup>73</sup> Debido al equilibrio de protonación de  $\beta$ E198, se forma un puente de hidrógeno con los tres tautómeros propuestos, así como con la molécula de agua de primer nivel. Su extensión en la cavidad le permite establecer contactos hidrofóbicos con F167 y en anillo bencílico de su estructura.

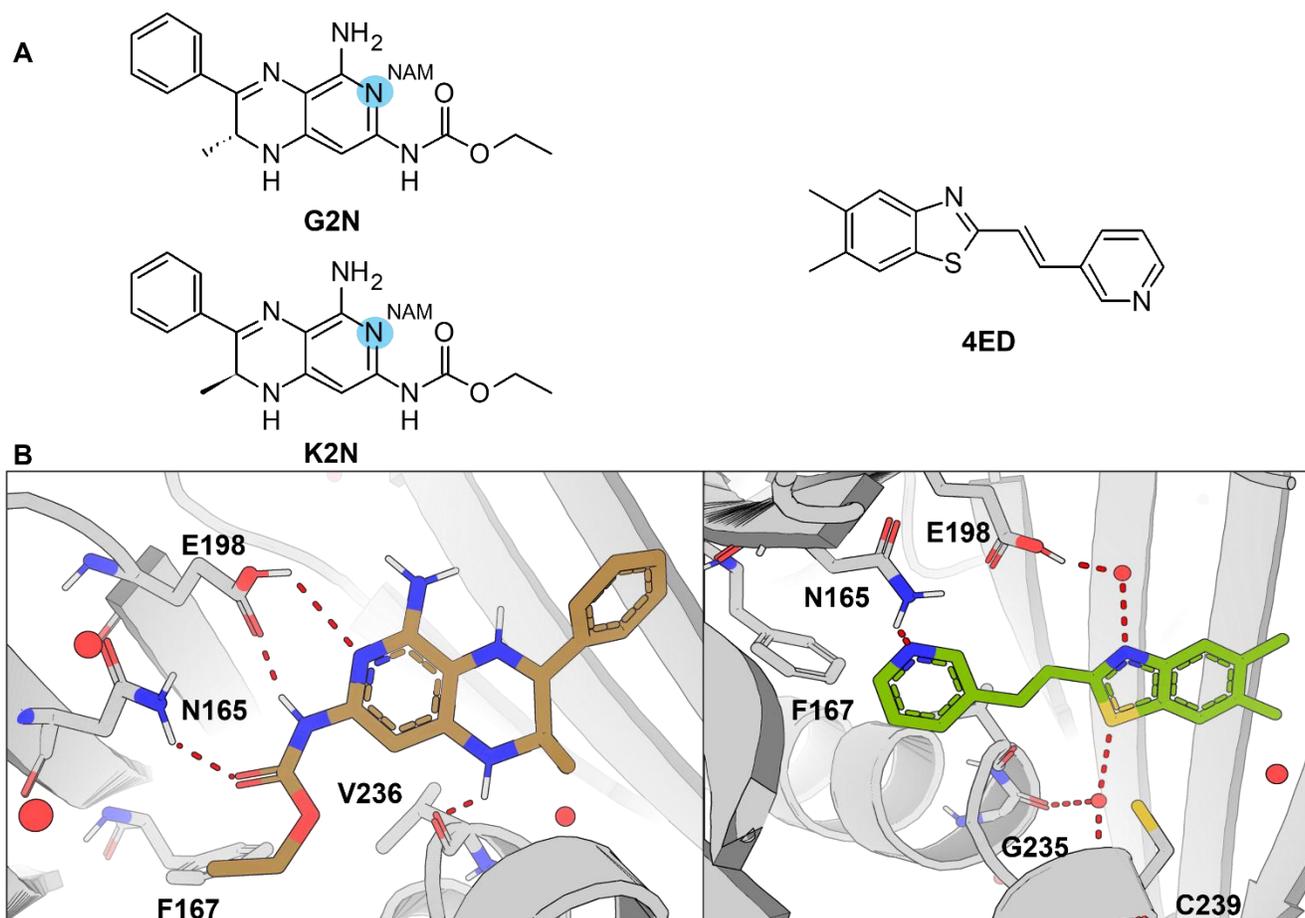


**Figura 3.15.** (A) Estructura química de TN16 y sus formas tautoméricas. (B) Representación tridimensional del modo de unión de las formas tautoméricas de TN16 (verde, PDB: 3HKD) en la  $\beta$ -tubulina (gris). Se marcan los puentes de hidrógeno y el puente de agua (rojo) que forma con los residuos E198 y V236 y la molécula de agua entre G235 y C239, respectivamente. También se marcan los aminoácidos cercanos con los que interactúa.

3.6.2. Mivobulina y derivado de benzotiazol

La mivobulina corresponde a la mezcla racémica de los compuestos **G2N** y **K2N (Figura 3.16)**, ambos ocupan el mismo sitio de **TN16**. Además, se encontró que ejercen impedimento estérico, disminuyendo el espacio en la región de la colchicina, lo que conlleva a que las hélices H7 y H8, así como las láminas S8 y S9, impidan la conformación recta en el paso de tubulina-microtúbulo.<sup>43</sup> Ambos compuestos establecen puentes de hidrógeno con los residuos E198,

V236 y N165 de la  $\beta$ -tubulina y contactos hidrofóbicos entre F167 y la porción de carbamato de etilo, aunque por la libertad de la cadena es probable que no influya en gran medida en su modo de unión. No se considera el estado protonado del Nitrógeno NAM (**Figura 3.16**) debido a que el  $pK_a$  calculado es de 5.92.



**Figura 3.16.** (A) Estructuras químicas de G2N, K2N y 4ED. Se marca el Nitrógeno NAM (azul). (B) Representación tridimensional del modo de G2N (café, PDB: 3N2G) y 4ED (verde, PDB: 4YJ2) en la  $\beta$ -tubulina (gris). Se marcan los puentes de hidrógeno y el puente de agua (rojo) que forma con los residuos E198, N165 y V236 para ambos compuestos y las moléculas de agua cerca de G235 y E198 para 4ED únicamente. Se marcan también los aminoácidos cercanos con los que interactúa.

Entonces, **TN16** se convierte en un compuesto modelo para esta parte del sitio de la colchicina que se encuentra más embebido en la  $\beta$ -tubulina. El cristal del compuesto **4ED** confirma la extensión del sitio y que solamente se superponen una pequeña fracción (**Figura 3.16**), en este caso del anillo de benzotiazol con el anillo trimetoxibenceno de la colchicina. La resolución de este cristal, comparada con la de **TN16**, permite encontrar la presencia de moléculas de

agua estructurales. En este caso, se identificaron moléculas de agua que forman un puente de agua con la fracción de benzotiazol y el residuo E198 y la molécula de agua que se encuentra cerca de G235 que forma un puente de agua débil con el azufre de este anillo. Además, se forma un puente de hidrógeno con N165 y la porción de piridina, este anillo aromático no alcanza a establecer interacciones hidrofóbicas con F167. En conjunto, estas interacciones son importantes para el desarrollo de compuestos con actividad antitubulina.<sup>83</sup>

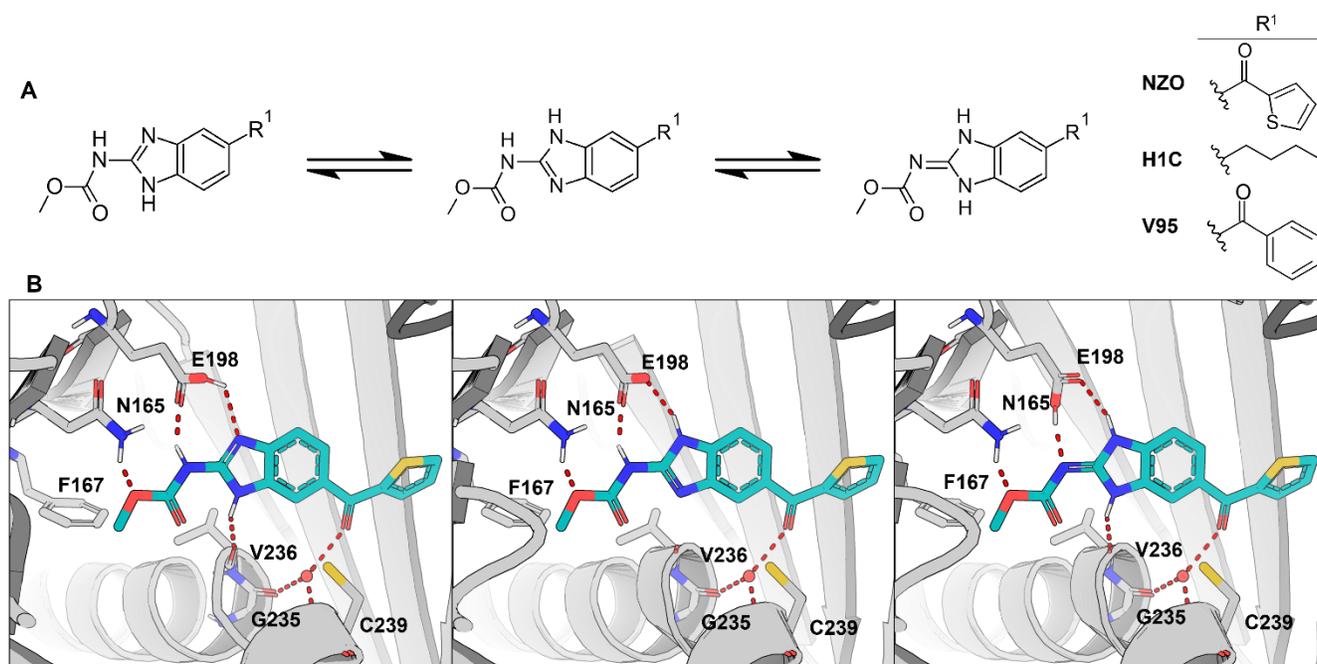
#### 3.6.3. Derivados de carbendazim

Los derivados de carbendazim han sido reconocidos por su actividad antihelmíntica; sin embargo, pasó mucho tiempo antes de que se conociera el sitio de unión de estos compuestos. Aunque se conocía que las mutaciones F167T, E198A y F200T llevaban a un fenotipo resistente de parásitos,<sup>117</sup> no fue sino hasta el año 2016 que se cristaliza el complejo tubulina-nocodazol (**NZO**) que es posible identificar a este grupo de derivados en la Zona C. La información cristalográfica del complejo con **NZO** confirma la presencia de interacciones de puente de hidrógeno con N165, E198 y V236, que también están presentes en otros derivados como parbendazol (**H1C**) y mebendazol (**V95**, **Figura 3.17**). La presencia de la molécula de agua de primer nivel forma un puente de agua con el carbonilo del **NZO** y **V95**. Esta fracción aromática es la que se superpone ligeramente con la región RI de la colchicina en ambos compuestos.

Recientemente, el parbendazol (**H1C**) mostró una mayor potencia frente a células cancerosas en comparación con otros bencimidazoles como febendazol, mebendazol y oxibendazol, con una  $CI_{50}$  de 0.19  $\mu M$ .<sup>118</sup> Su cadena alifática se sobrepone mejor con el sitio de la colchicina, pues esta región es de características más hidrofóbicas. Probablemente, la suma de estas interacciones, junto con los puentes de hidrógeno anteriormente descritos, contribuyen a que su actividad inhibitoria destaque de entre otros bencimidazoles.<sup>76</sup>

Por otra parte, el mebendazol (**V95**) es parte del tratamiento de infecciones por helmintos, además de que ha demostrado tener actividad antiproliferativa contra varios tipos de cáncer.<sup>119</sup> Se han cristalizado los complejos con mebendazol-T<sub>2</sub>R-TTL (PDB: 7OGN) y mebendazol-T<sub>1</sub>D (PDB: 7ODN). La proteína T<sub>1</sub>D se compone de un heterodímero de tubulina proveniente de tejido nervioso, donde predomina la isoforma de tubulina  $\beta III$ ; junto con un dominio de

repetición de anquirina la cual se une selectivamente al extremo de rápido crecimiento del microtúbulo inhibiendo de esta manera la polimerización. Por esta razón se ha utilizado como un modelo de la isoforma  $\beta$ III.<sup>120</sup> El cambio del residuo C239 por S239 entre las isoformas  $\beta$ II y  $\beta$ III, respectivamente, puede ser indicio de la selectividad de los bencimidazoles por la tubulina de helmintos que la de mamíferos, pues ellos conservan cisteína en esta posición. Además, la farmacocinética de estos compuestos puede inferir también en la toxicidad selectiva.<sup>99</sup>



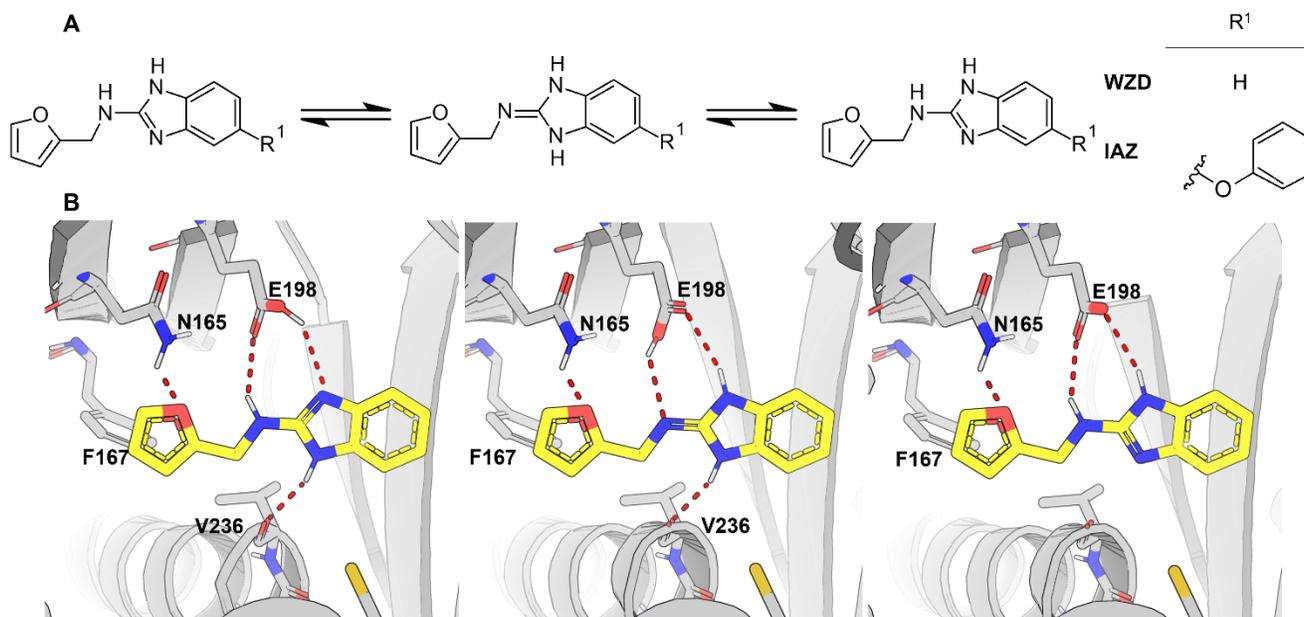
**Figura 3.17.** (A) Estructuras químicas de derivados de carbendazim: nocodazol (NZO), parbendazol (H1C), mebendazol (V95) y sus formas tautoméricas más probables. (B) Representación tridimensional del modo de unión de las formas tautoméricas de NZO (verde, PDB: 5CA1) en la  $\beta$ -tubulina (gris). Se marcan los puentes de hidrógeno y el puente de agua (rojo) que forma con los residuos E198, N165 y V236 y la molécula de agua entre G235 y C239, respectivamente. Se marcan también los aminoácidos cercanos con los que interactúa.

#### 3.6.4. Otros derivados bencimidazólicos

El cribado de fragmentos realizado por Mühlethaler *et al.*<sup>27</sup> permitió identificar dos moléculas interesantes que se acoplan a esta zona, **WN1** (Figura 3.21) y **WZD**. El fragmento **WZD** (Figura 3.18) posee un núcleo de 2-aminobencimidazol, el cual interactúa con la Zona C del sitio de la

colchicina de la  $\beta$ -tubulina de modo similar a los derivados de carbendazim, a través de puentes de hidrógeno con E198, V236 y N165. De igual manera, se toman en cuenta los tautómeros más probables que se forman en este núcleo.

Recientemente, se publicó el complejo con tubulina de **IAZ**, este compuesto fue un diseño basado en fragmentos (*fragment-based drug design*, FDD) a partir de **WZD**. Al igual que **WZD**, debido al núcleo de bencimidazol se deben considerar los diferentes posibles especies tautoméricas que facilitan la interacción con E198 y V236 (**Figura 3.18**). Por su parte, el anillo de furano actúa como aceptor de puente de hidrógeno con N167 y el sustituyente fenoxilo en la posición 6 del bencimidazol se acopla en la región de la colchicina, probablemente por contactos hidrofóbicos. La suma de estas interacciones podría explicar la potente actividad antiproliferativa de **IAZ**, presentando una  $CI_{50}$  de  $0.9 \mu M$  contra células HeLa.<sup>100</sup>

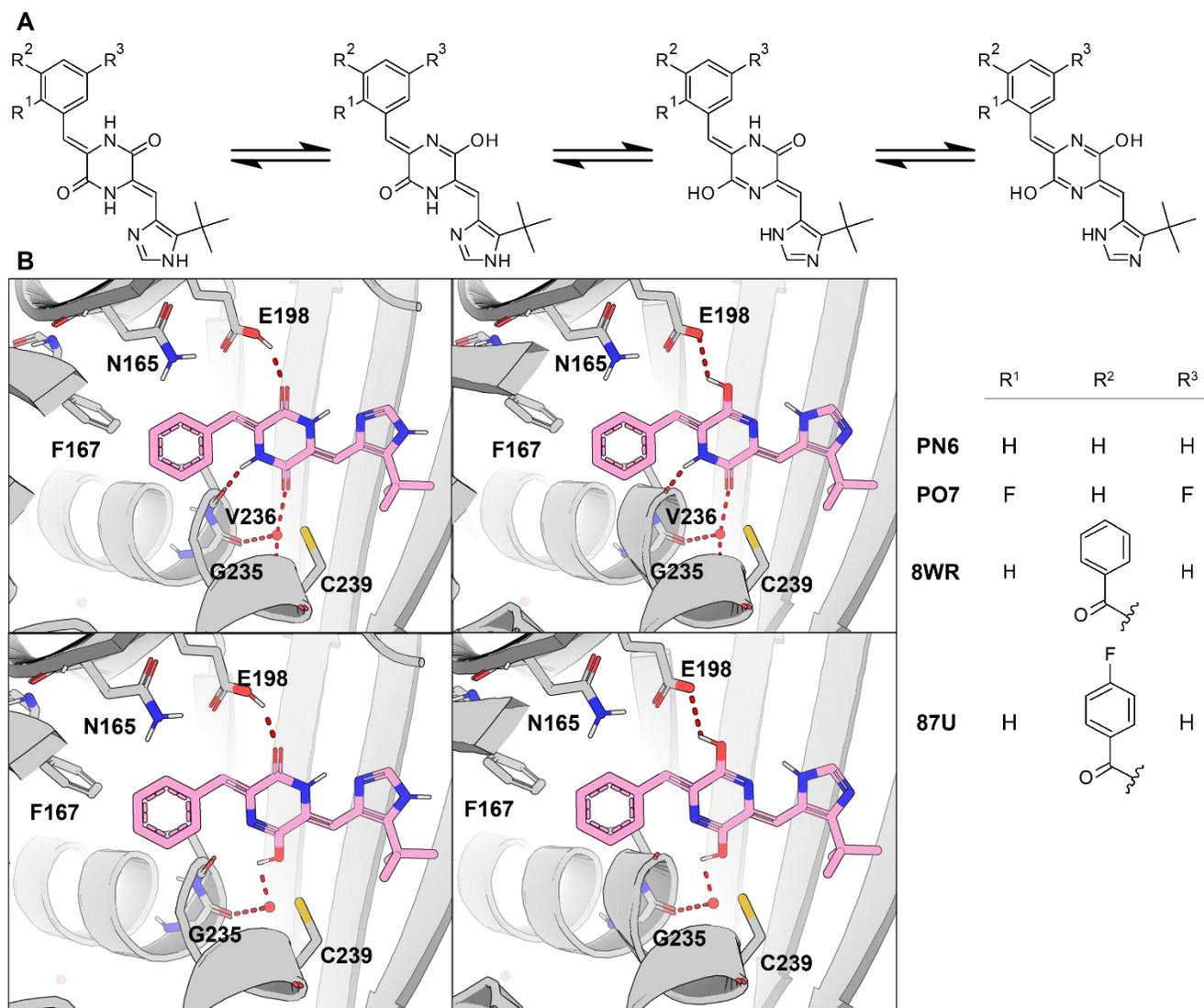


**Figura 3.18.** (A) Estructura química de WZD, IAZ y sus formas tautoméricas más probables. (B) Representación tridimensional del modo de unión de las formas tautoméricas de WZD (amarillo, PDB: 5S50) en la  $\beta$ -tubulina (gris). Se marcan los puentes de hidrógeno (rojo) que forma con los residuos N165, E198 y V236 junto con los aminoácidos con los que interactúa.

### 3.6.5. Derivados de plinabulina

En el mismo estudio donde se cristalizó el **NZO** se resolvió el complejo de tubulina con la plinabulina (**PN6**, **Figura 3.19**), un conocido agente vasodisruptor, el cual se une de un modo

similar estableciendo puentes de hidrógeno con E198 y V236 en la  $\beta$ -tubulina y el puente de agua con G235. Este compuesto dispone hacia la Zona A un sustituyente de imidazol que permite la interacción con el residuo T175 en el asa  $\alpha$ 5.<sup>19</sup> Es importante mencionar que entre el anillo central y el de imidazol se forma un puente de hidrógeno intramolecular, lo que restringe su movilidad en el sitio.



**Figura 3.19.** (A) Estructuras químicas de derivados de plinabulina (PN6) y sus formas tautoméricas. (B) Representación tridimensional del modo de unión de las formas tautoméricas de PN6 (rosa, PDB: 5C8Y) en la  $\beta$ -tubulina (gris). Se marcan los puentes de hidrógeno y el puente de agua (rojo) que forma con E198 y V236 y la molécula de agua entre G235 y C239, respectivamente. Se marcan también los aminoácidos con los que interactúa.

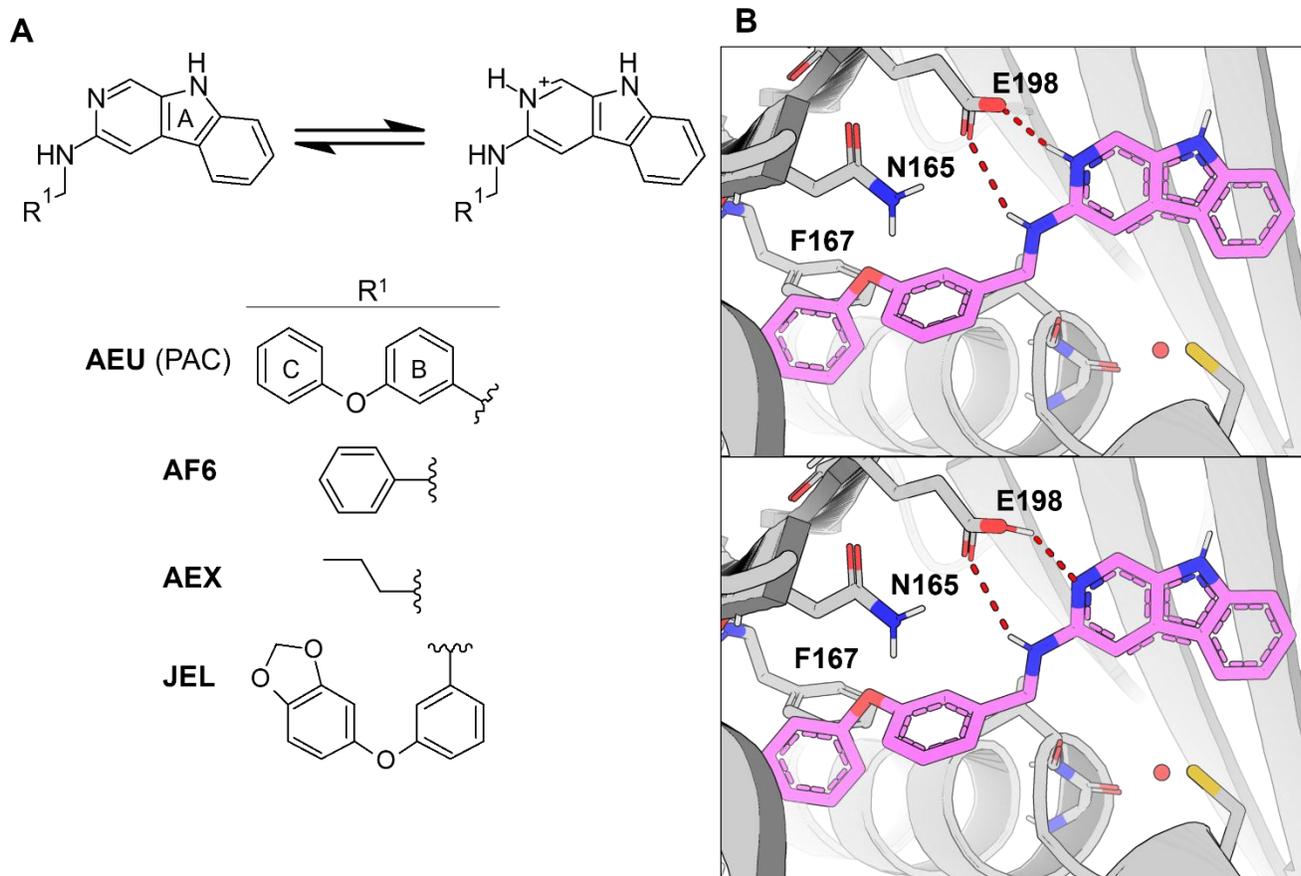
Los compuestos **87U**, **8WR** y **PO7** son derivados de plinabulina, los cuales se unen de modo similar pues conservan el anillo central de dicetopiperazina y el anillo de imidazol. El anillo central presenta 4 formas tautoméricas principales que conservan un puente de hidrógeno con las formas en equilibrio de E198, dos de estos tautómeros interactúan directamente con V236 y la interacción con la molécula de agua se mantiene constante para todos los equilibrios. En el caso de **8WR**, la porción añadida del anillo de fenilo cambia la conformación de F167 de modo que forme una interacción  $\pi$ - $\pi$  que posiblemente aumente su afinidad.<sup>95</sup> Para **87U**, la extensión de 4-fluorobenzoilo permite una interacción tipo  $\pi$ - $\pi$  con el residuo  $\beta$ F20, lo que explicaría la mejora de su actividad.<sup>93</sup> A la fecha, no se cuenta con información sobre la actividad del compuesto **PO7**, sin embargo, la estructura permite visualizar interacciones similares a la plinabulina.

#### 3.6.6. Análogos de PAC

El estudio de **AEU**, nombrado PAC, demuestra que existe la formación de puentes de hidrógeno de baja barrera energética entre E198 y el anillo de piridina (**Figura 3.20**). Al ser más fuerte esta interacción que los puentes de hidrógeno convencionales, se ha reportado que los ligandos exhiben un mecanismo de disrupción de los microtúbulos con gran potencia ( $CI_{50}$  en  $0.074 \mu\text{M}$  contra la línea celular HeLa).<sup>121</sup> Para estudiar con mayor profundidad el modo de unión y perfil de interacción de **AEU**, se llevó a cabo la co-cristalización de los compuestos **AF6** y **AEX**, donde se encontró que los anillos B y C (**Figura 3.20**) pueden ser intercambiados por una cadena alifática o un anillo, pues estos últimos muestran una actividad y acoplamiento en el sitio similares a **AEU**.<sup>38</sup>

Actualmente, no se cuenta con información acerca de la actividad de **JEL**, pero por la información cristalográfica se puede inferir que se une estableciendo interacciones similares a los tres compuestos anteriores. En el caso de **AEU**, **AF6** y **JEL** su extensión les permite alcanzar a F167 y formar interacciones hidrofóbicas que pueden mejorar su afinidad en el sitio.

En la búsqueda de compuestos a través un cribado virtual, se encontró al compuesto **FW9**, el cual se une de modo muy similar a **AEU** a través de un puente de hidrógeno de baja barrera energética. Estas interacciones son incluso más favorables energéticamente que las que se forman entre E198 y otros inhibidores como nocodazol y plinabulina.<sup>38</sup>

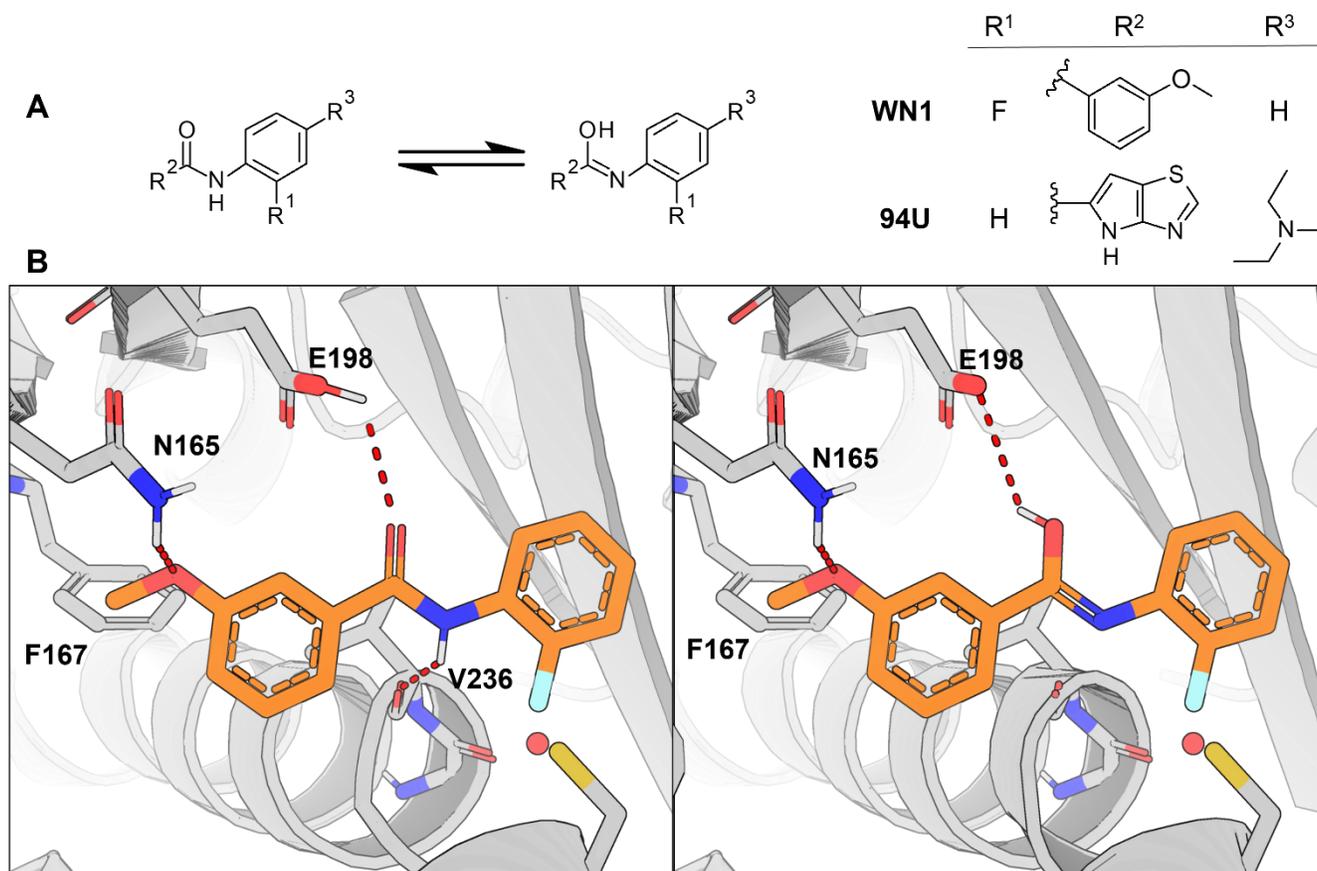


**Figura 3.20.** (A) Estructura química de los derivados de  $\beta$ -carbolina y su forma protonada. (B) Representación tridimensional del modo de unión de AEU (rosa, PDB: 7CDA) en la  $\beta$ -tubulina (gris). Se marcan los puentes de hidrógeno (rojo) que forma con el residuo E198 y los aminoácidos cercanos con los que interactúa.

### 3.6.7. Derivados de *N*-fenilbenzamida

Con el fin de encontrar el modo de unión de un compuesto de potencia similar, pero con menor solubilidad, se cristalizó el compuesto **94U**. Este compuesto establece interacciones de puente de hidrógeno entre la porción de pirrolotiazol con E198 y N165 (**Figura 3.21**). Por su parte, la amida central establece también un puente de hidrógeno con E198 y V236, mientras que en la fracción amino terciaria establece contactos hidrofóbicos con los residuos de la Zona A.<sup>96</sup> Al igual que otros agentes de unión a esta zona, existe un equilibrio de protonación de E198 y las formas tautoméricas de la amida central en la estructura.

El compuesto **WN1** proviene del cribado de fragmentos realizado por Mühlethaler *et al.*<sup>27</sup> Al igual que **94U**, el grupo amida forma puentes de hidrógeno con E198 y V236, mientras que el anillo de 3-metoxifenilo actúa como aceptor de puente de hidrógeno en su interacción con N165. A diferencia de **94U**, no hay un sustituyente en R<sup>3</sup> que permita su interacción con la Zona A (**Figura 3.21**).

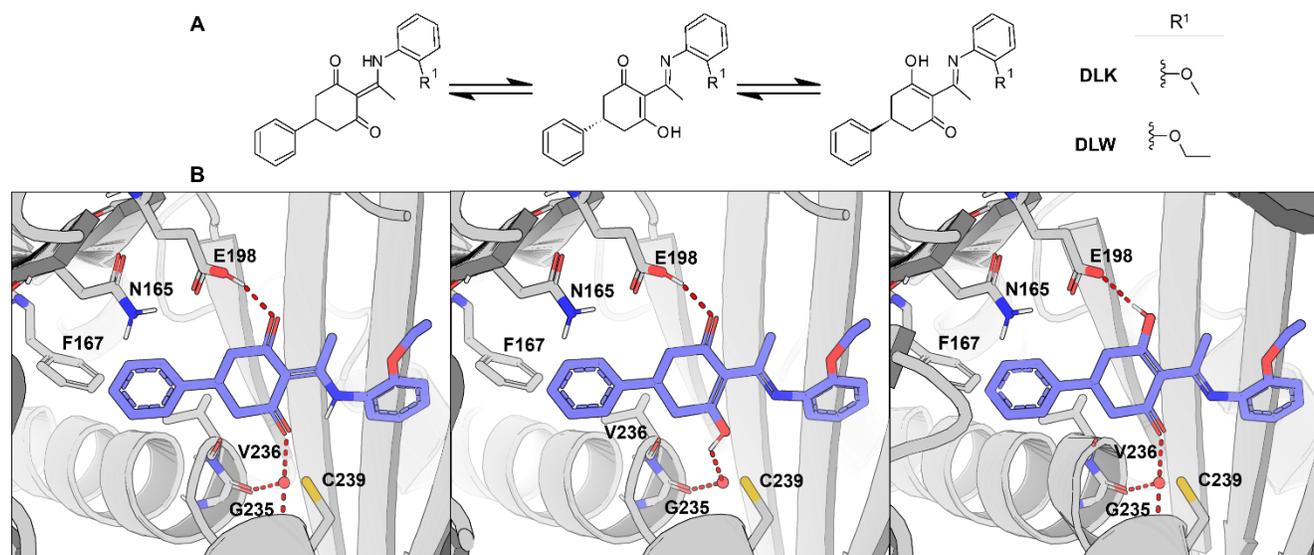


**Figura 3.21.** (A) Estructuras químicas de WN1 y 94U, junto con sus formas tautoméricas. (B) Representación tridimensional del modo de unión de las formas tautoméricas de WN1 (naranja, PDB: 5S4Z) en la  $\beta$ -tubulina (gris). Se marcan los puentes de hidrógeno (rojo) que forma con los residuos N165 y E198, al igual que los aminoácidos cercanos con los que interactúa.

### 3.6.8. Derivados de ciclohexadiona

Los compuestos **DLK** y **DLW** son derivados de ciclohexadiona (**Figura 3.22**), los cuales comparten una desviación cuadrática media (RMSD) de 0.37 Å entre sí. Estos ligandos se internalizan en esta parte del sitio y forman interacciones hidrofóbicas de los aminoácidos

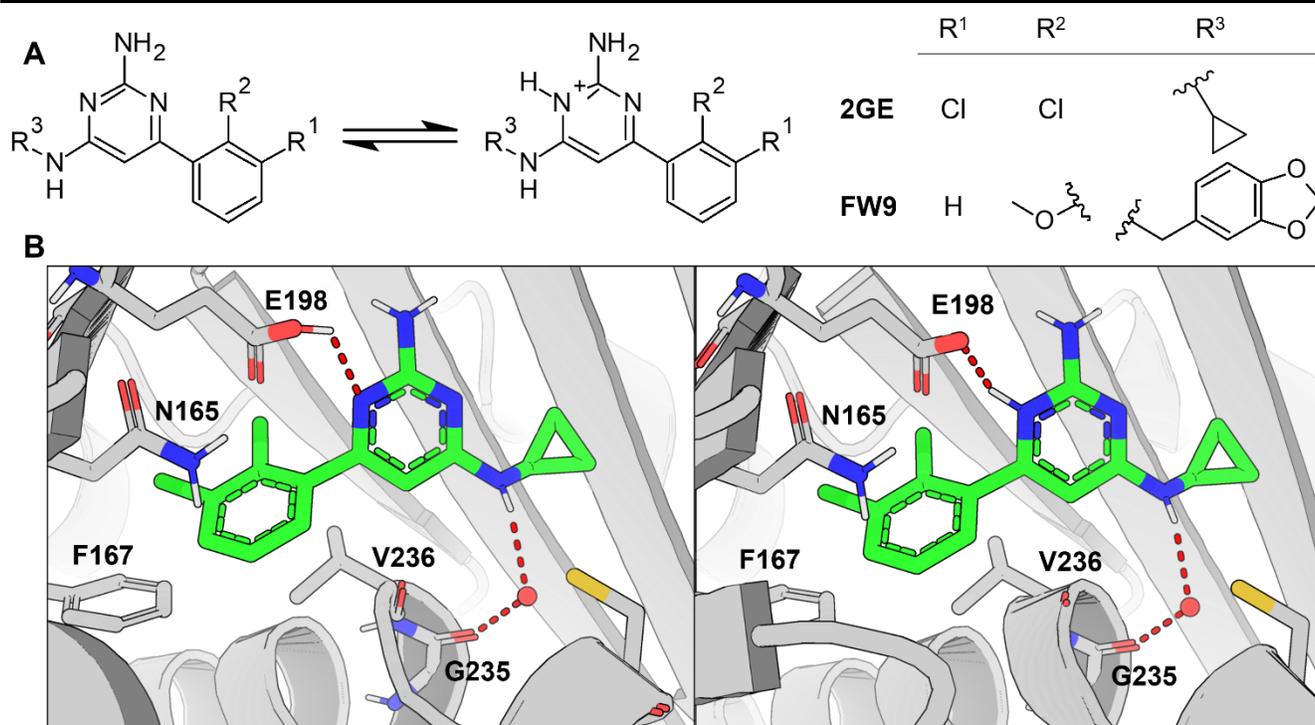
circundantes de las cadenas S8 a S10, el asa T7 y las hélices H7 y H8. De estos dos compuestos, **DLW** es el más activo con valores de  $CI_{50}$  que van desde 0.068 a 0.1  $\mu$ M contra varias líneas celulares de cáncer.<sup>97</sup> Además, forman puente de hidrógeno con E198 y un puente de agua con la molécula cercana a G235, al igual que sus tautómeros más probables. El anillo de 2-etoxifenilo establece contactos hidrofóbicos más favorables en RI de la Zona A, lo que podría explicar que sea más activo que **DLK**.



**Figura 3.22.** (A) Estructuras químicas de DLW, DLK y sus formas tautoméricas. (B) Representación tridimensional del modo de unión de las formas tautoméricas de DLW (púrpura, PDB: 6FKJ) en la  $\beta$ -tubulina (gris). Se marcan los puentes de hidrógeno y el puente de agua (rojo) que forma con el residuo E198 y la molécula de agua entre G235 y C239, respectivamente. Se marcan también los aminoácidos cercanos con los que interactúa.

### 3.6.9. Derivados de aminopirimidina

La estructura de **2GE** es similar a **FW9**, ambos compuestos presentan un anillo central de 2,4-diaminopirimidina (**Figura 3.23**).<sup>98</sup> Por lo tanto, es probable que presente también un puente de hidrógeno de baja barrera energética con E198. La amina secundaria presente en ambas moléculas puede formar un puente de agua con la molécula cercana a G235. En el caso de la sustitución de la amina secundaria, es probable que **FW9** forme mejores interacciones pues se superpone esta región en la Zona A que posee características más hidrofóbicas.



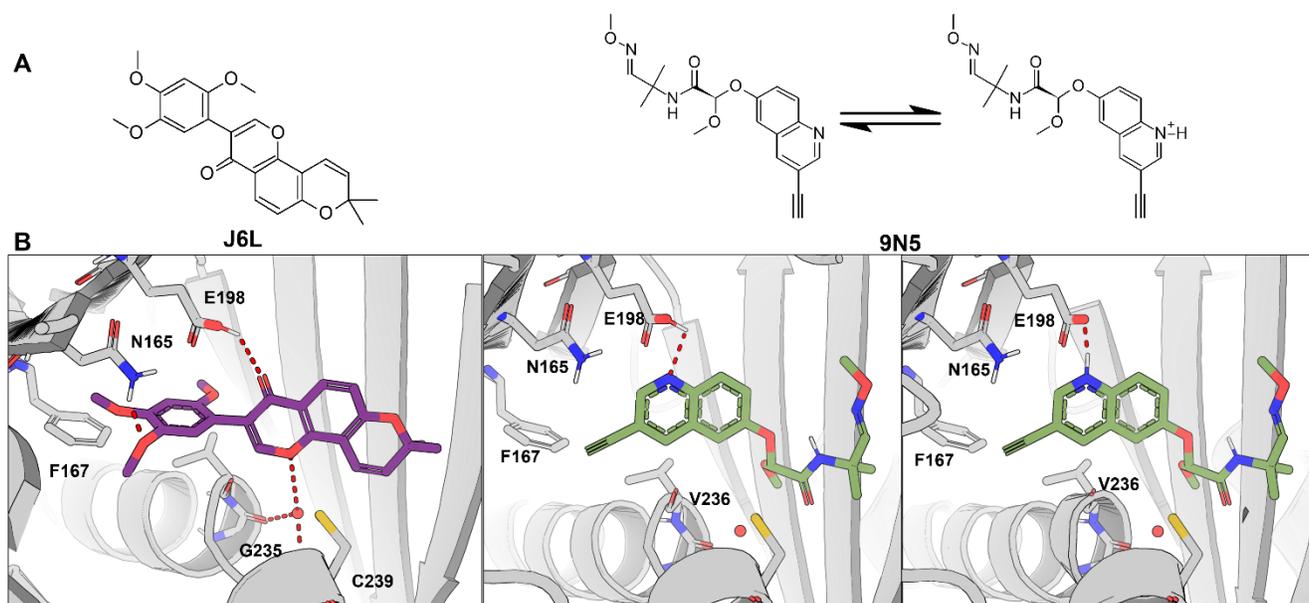
**Figura 3.23.** (A) Estructuras químicas de 2GE, FW9 y sus formas protonadas. (B) Representación tridimensional del modo de unión de 2GE y su forma protonada (verde, PDB: 6QQN) en la  $\beta$ -tubulina (gris). Se marcan el puente de hidrógeno y el puente de agua (rojo) que forma con el residuo E198 y la molécula de agua entre G235 y C239, respectivamente, junto los aminoácidos con los que interactúa

### 3.6.10. Barbigerona

A la fecha de realización de este trabajo, no se cuenta con información acerca de la actividad del compuesto **J6L** (**Figura 3.25**). Sin embargo, el complejo tubulina-ligando permite observar que forma interacciones por puente de hidrógeno con E198 y N165 como la gran mayoría de los inhibidores de esta zona. La molécula de agua de primer nivel cercana a G235 también es importante en la unión de este compuesto.

### 3.6.11. Derivado de quinolina

El compuesto **9N5** es un derivado de quinolina que mantiene interacciones principalmente hidrofóbicas y algunos puentes de hidrógeno en la RI de la Zona A (**Figura 3.19**).<sup>94</sup> El anillo de quinolina es capaz de formar interacción con E198 en un equilibrio donde se transfiere el protón entre sus átomos.



**Figura 3.24.** (A) Estructura química de J6L, 9N5 y su forma protonada. (B) Representación tridimensional del modo de unión de 9N5 (verde, PDB: 5OA7) y J6L (morado, PDB: 7JEM) en la  $\beta$ -tubulina (gris). Se marcan el puente de hidrógeno (rojo) que forma con E198 y los aminoácidos cercanos con los que interactúa.

La información cristalográfica existente sobre los inhibidores de la polimerización acoplados a este sitio podemos afirmar que el comportamiento de los ligandos en la Zona A y Zona C difieren ampliamente. Primero, es evidente la diversidad estructural que destaca entre las dos zonas; por ejemplo, en la Zona A tienen presencia mayoritariamente ligandos con una amplia superficie hidrofóbica y, por ende, establecen contactos hidrofóbicos. Por otro lado, en la Zona C se encuentran ligandos que poseen grupos básicos que permiten formar interacciones con V236 y E198, siendo este residuo un aminoácido clave en la unión de ligandos en la zona. Debemos entonces mencionar que la región que corresponde a la Zona A tiene características principalmente hidrofóbicas, mientras que para la región de la Zona C destaca por sus características más hidrofílicas. Si bien es cierto que comparten algunos aminoácidos en común, la evidencia apunta a que se trata de dos sitios diferentes, por lo que es necesario hacer la distinción entre ambos.

---

## **Hallazgos importantes**

La denominada “inestabilidad dinámica” de los microtúbulos y su regulación sigue siendo un blanco farmacológico importante para diversas aplicaciones. De entre todos los sitios de unión que posee el dímero de  $\alpha/\beta$ -tubulina, el sitio de la colchicina posee una amplia variedad de moléculas acopladas en él. Dentro de esta gran diversidad de moléculas estudiadas, cerca del 76% se unen en las denominadas Zonas A y B del sitio de la colchicina. En consecuencia, muchos estudios que exploran nuevas moléculas que actúen como inhibidores de la polimerización reincidenten en compuestos con perfiles de interacción similares a la colchicina. Las Zonas A y C del sitio poseen diferencias fisicoquímicas importantes, de este modo establecen interacciones particulares con los ligandos acoplados en cada zona. Esto se puede notar en que los compuestos unidos en la Zona A cuentan con características principalmente hidrofóbicas, mientras que, en la Zona C se encuentran moléculas que poseen grupos básicos capaces de formar puentes de hidrógeno con la cavidad que conforma esta parte del sitio. Resulta entonces que, es necesario considerar estas diferencias para el desarrollo de nuevos inhibidores de la polimerización.

### IV. Conclusiones

La tubulina es un blanco terapéutico importante para el tratamiento de enfermedades infecciosas y crónico degenerativas debido a las diversas funciones que desempeñan en la célula. La interrupción de la “inestabilidad dinámica” de los microtúbulos es el mecanismo de acción más común para los compuestos contra tubulina.

En el presente trabajo se revisa el conocimiento reportado por varios grupos de investigación en la cristalización de complejos tubulina-ligando, específicamente de inhibidores que se acoplan en el sitio de la colchicina en las tres zonas que se ha dividido el sitio para su estudio.

La revisión de la información cristalográfica permitió clasificar por similitud estructural a los diversos ligandos y establecer el perfil de interacción de éstos en las tres zonas de la amplia cavidad que representa el sitio.

Se hace hincapié en considerar el estado protonado del residuo E198 de la  $\beta$ -tubulina y las moléculas de agua de primer nivel ya que establece interacciones mediante puente de hidrógeno y de agua, respectivamente, que son muy importantes en la unión de los ligandos en el sitio.

El desarrollo de moléculas con selectividad por el sitio de unión de la colchicina es de gran interés ya que, en comparación con otros sitios de unión en la tubulina, estos compuestos son de menor tamaño y complejidad, lo que facilita su síntesis. Mejorar la actividad antitubulina de estos inhibidores podría representar una alternativa en el tratamiento de fenotipos resistentes de parásitos y células cancerosas.

### V. Perspectivas

Con la información recopilada en este trabajo se busca realizar un modelo de farmacóforo que considere las interacciones importantes del sitio como los estados de protonación de los aminoácidos y las moléculas de agua estructurales de primer nivel.

También se busca que con el diseño de farmacóforo se propongan nuevas estructuras de inhibidores que se acoplen en el sitio con los que se realizarán estudios *in silico* e *in vitro* para evaluar su actividad antitubulina.

---

**VI. Referencias**

1. Katsetos, C. D., Dráberová, E., Legido, A., Dumontet, C. & Dráber, P. Tubulin targets in the pathobiology and therapy of glioblastoma multiforme. I. Class III  $\beta$ -tubulin. *J. Cell. Physiol.* **221**, 505–513 (2009).
2. Dong, M., Liu, F., Zhou, H., Zhai, S. & Yan, B. Novel natural product-and privileged scaffold-based tubulin inhibitors targeting the colchicine binding site. *Molecules* **21**, (2016).
3. Goodson, H. V & Jonasson, E. M. Microtubules and Microtubule-Associated Proteins. *Cold Spring Hrb Perspect Biol* **10**, 022608 (2018).
4. Pampaloni, F. & Florin, E. L. Microtubule architecture: inspiration for novel carbon nanotube-based biomimetic materials. *Trends Biotechnol.* **26**, 302–310 (2008).
5. 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. Chemie - Int. Ed.* **61**, 11 (2022).
6. McLoughlin, E. C. & O'Boyle, N. M. Colchicine-binding site inhibitors from chemistry to clinic: A review. *Pharmaceuticals* **13**, 1–43 (2020).
7. Steinmetz, M. O. & Prota, A. E. Microtubule-Targeting Agents : Strategies To Hijack the Cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* **28**, 776–792 (2018).
8. Rosselló, C. A., Lindström, L., Eklund, G., Corvaisier, M. & Kristensson, M. A.  $\gamma$ -Tubulin– $\gamma$ -Tubulin Interactions as the Basis for the Formation of a Meshwork. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 3245–3258 (2018).
9. Tudorică, V., Bălșeanu, T.-A., Albu, V.-C., Bondari, S., Bumbea, A.-M. & Pîrșcoveanu, M. Tau protein in neurodegenerative diseases. *Rom J Morphol Embryol* **10**, 1141–1150 (2017).
10. Dehmelt, L. & Halpain, S. The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins Gene organization and evolutionary history. *Genome Biol.* **6**, 1–10 (2004).
11. 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* **428**, 198–202 (2004).
12. Kamal, M. A., Al-Zahrani, M. H., Khan, S. H., Khan, M. H., Al-Subhi, H. A., Kuerban, A., Aslam, M., Al-Abbasi, F. A. & Anwar, F. Tubulin Proteins in Cancer Resistance: A Review. *Curr. Drug Metab.* **21**, 178–185 (2020).

13. Leandro-García, L. J., Leskelä, S., Landa, I., Montero-Conde, C., López-Jiménez, E., Letón, R., Cascón, A., Robledo, M. & Rodríguez-Antona, C. Tumoral and tissue-specific expression of the major human  $\beta$ -tubulin isotypes. *Cytoskeleton* **67**, 214–223 (2010).
14. Fernandez-Valenzuela, J. J., Sanchez-Varo, R., Muñoz-Castro, C., De Castro, V., Sanchez-Mejias, E., Navarro, V., Jimenez, S., Nuñez-Diaz, C., Gomez-Arboledas, A., Moreno-Gonzalez, I., Vizuite, M., Davila, J. C., Vitorica, J. & Gutierrez, A. Enhancing microtubule stabilization rescues cognitive deficits and ameliorates pathological phenotype in an amyloidogenic Alzheimer's disease model. *Sci. Rep.* **10**, 1–17 (2020).
15. Santiago-Mujika, E., Luthi-Carter, R., Giorgini, F., Kalaria, R. N. & Mukaetova-Ladinska, E. B. Tubulin and Tubulin Posttranslational Modifications in Alzheimer's Disease and Vascular Dementia. *Front. Aging Neurosci.* **13**, 1–14 (2021).
16. Fennell, B. J., Naughton, J. A., Barlow, J., Brennan, G., Fairweather, I., Hoey, E., McFerran, N., Trudgett, A. & Bell, A. Microtubules as antiparasitic drug targets. *Expert Opin. Drug Discov.* **3**, 501–518 (2008).
17. Aguayo-Ortiz, R. Estudio computacional de un modelo del posible sitio de unión de benzimidazoles a la  $\beta$ -tubulina de helmintos y protozoarios. (Universidad Nacional Autónoma de México, 2012).
18. Katiyar, S. K., Gordon, V. R., McLaughlin, G. L. & Edlind, T. D. Antiprotozoal activities of benzimidazoles and correlations with  $\beta$ - tubulin sequence. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 2086–2090 (1994).
19. Wang, Y. & Zhang, H. Structures of a diverse set of colchicine binding site inhibitors in complex with tubulin provide a rationale for drug discovery. *FEBS J.* **283**, 102–111 (2016).
20. Aguayo-Ortiz, R. & Dominguez, L. Unveiling the Possible Oryzalin-Binding Site in the  $\alpha$ -Tubulin of *Toxoplasma gondii* . *ACS Omega* **7**, 18434–18442 (2022).
21. Morrissette, N. Targeting *Toxoplasma* tubules: Tubulin, microtubules, and associated proteins in a human pathogen. *Eukaryot. Cell* **14**, 2–12 (2015).
22. Hirst, W. G., Fchet, D., Kuropka, B., Weise, C., Saliba, K. J. & Reber, S. Purification of functional *Plasmodium falciparum* tubulin allows for the identification of parasite-specific microtubule inhibitors. *Curr. Biol.* **32**, 919-926.e6 (2022).
23. Chan, M. M. Y., Triemer, R. E. & Fong, D. Effect of the anti-microtubule drug oryzalin on growth

- and differentiation of the parasitic protozoan *Leishmania mexicana*. *Differentiation* **46**, 15–21 (1991).
24. Alonso, V. L., Carloni, M. E., Gonçalves, C. S., Martínez Peralta, G., Chesta, M. E., Pezza, A., Tavernelli, L. E., Motta, M. C. M. & Serra, E. Alpha-Tubulin Acetylation in *Trypanosoma cruzi*: A Dynamic Instability of Microtubules Is Required for Replication and Cell Cycle Progression. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **11**, 1–17 (2021).
  25. Morejohn, L. C., Bureau, T. E., Molè-Bajer, J., Bajer, A. S. & Fosket, D. E. Oryzalin, a dinitroaniline herbicide, binds to plant tubulin and inhibits microtubule polymerization in vitro. *Planta* **172**, 252–264 (1987).
  26. Chen, J., Yu, Q., Owen, M., Han, H. & Powles, S. Dinitroaniline herbicide resistance in a multiple-resistant *Lolium rigidum* population. *Pest Manag. Sci.* **74**, 925–932 (2018).
  27. Mühlethaler, T., Gioia, D., Prota, A. E., Sharpe, M. E., Cavalli, A. & Steinmetz, M. O. Comprehensive Analysis of Binding Sites in Tubulin. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **60**, 13331–13342 (2021).
  28. Yang, C. P. H. & Horwitz, S. B. Taxol®: The first microtubule stabilizing agent. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
  29. Balaguer, F. de A., Mühlethaler, T., Estévez-Gallego, J., Calvo, E., Giménez-Abián, J. F., Risinger, A. L., Sorensen, E. J., Vanderwal, C. D., Altmann, K. H., Mooberry, S. L., Steinmetz, M. O., Oliva, M. Á., Prota, A. E. & Díaz, J. F. Crystal structure of the cyclostreptin-tubulin adduct: Implications for tubulin activation by taxane-site ligands. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 1–17 (2019).
  30. Castro-Alvarez, A., Pineda, O. & Vilarrasa, J. Further Insight into the Interactions of the Cytotoxic Macrolides Laulimalide and Peloruside A with Their Common Binding Site. *ACS Omega* **3**, 1770–1782 (2018).
  31. 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. Chemie - Int. Ed.* **53**, 1621–1625 (2014).
  32. Zhang, Y., Yang, S. H. & Guo, X. L. New insights into Vinca alkaloids resistance mechanism and circumvention in lung cancer. *Biomed. Pharmacother.* **96**, 659–666 (2017).
  33. Martino, E., Casamassima, G., Castiglione, S., Cellupica, E., Pantalone, S., Papagni, F., Rui, M., Siciliano, A. M. & Collina, S. Vinca alkaloids and analogues as anti-cancer agents: Looking back,

- peering ahead. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **28**, 2816–2826 (2018).
34. Roberts, P. J. Maytansine. *Drugs Future* **5**, 50 (1980).
  35. 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.* **111**, 13817–13821 (2014).
  36. Prota, A. E., Setter, J., Waight, A. B., Bargsten, K., Murga, J., Diaz, J. F. & Steinmetz, M. O. Pironetin Binds Covalently to  $\alpha$ Cys316 and Perturbs a Major Loop and Helix of  $\alpha$ -Tubulin to Inhibit Microtubule Formation. *J. Mol. Biol.* **428**, 2981–2988 (2016).
  37. Coulup, S. K. & Georg, G. I. Revisiting microtubule targeting agents:  $\alpha$ -Tubulin and the pironetin binding site as unexplored targets for cancer therapeutics. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **29**, 1865–1873 (2019).
  38. Yang, J., Li, Y., Qiu, Q., Wang, R., Yan, W., Yu, Y., Niu, L., Pei, H., Wei, H., Ouyang, L., Ye, H., Xu, D., Wei, Y., Chen, Q. & Chen, L. Small Molecules Promote Selective Denaturation and Degradation of Tubulin Heterodimers through a Low-Barrier Hydrogen Bond. *J. Med. Chem.* **65**, 9159–9173 (2022).
  39. Aguayo-Ortiz, R., Cano-González, L., Castillo, R., Hernández-Campos, A. & Dominguez, L. Structure-based approaches for the design of benzimidazole-2-carbamate derivatives as tubulin polymerization inhibitors. *Chem. Biol. Drug Des.* **90**, 40–51 (2017).
  40. Afaf H. El-masry, H. H. F. and S. H. A. A. Synthesis and Antimicrobial Activity of Some New Benzimidazole Derivates. *Molecules* **5**, 1429–1438 (2000).
  41. Boiani, M. & Gonzalez, M. Imidazole and Benzimidazole Derivatives as Chemotherapeutic Agents. *Mini-Reviews Med. Chem.* **5**, 409–424 (2005).
  42. Löwe, J., Li, H., Downing, K. H. & Nogales, E. Refined structure of  $\alpha\beta$ -tubulin at 3.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **313**, 1045–1057 (2001).
  43. Barbier, P., Dorléans, A., Devred, F., Sanz, L., Allegro, D., Alfonso, C., Knossow, M., Peyrot, V. & Andreu, J. M. Stathmin and interfacial microtubule inhibitors recognize a naturally curved conformation of tubulin dimers. *J. Biol. Chem.* **285**, 31672–31681 (2010).
  44. Nakao, C., Itoh, T. J., Hotani, H. & Mori, N. Modulation of the stathmin-like microtubule destabilizing activity of RB3, a neuron-specific member of the SCG10 family, by its N-terminal

- domain. *J. Biol. Chem.* **279**, 23014–23021 (2004).
45. Ersfeld, K., Web, J., Plessmann, U., Dodemont, H., Gerke, V. & Weber, K. Characterization of the Tubulin-Tyrosine Ligase. **120**, 725–732 (1993).
  46. Prota, A. E., Magiera, M. M., Kuijpers, M., Bargsten, K., Frey, D., Wieser, M., Jaussi, R., Hoogenraad, C. C., Kammerer, R. A., Janke, C. & Steinmetz, M. O. Structural basis of tubulin tyrosination by tubulin tyrosine ligase. *J. Cell Biol.* **200**, 259–270 (2013).
  47. Prota, A. E., Danel, F., Bachmann, F., Bargsten, K., Buey, R. M., Pohlmann, J., Reinelt, S., Lane, H. & Steinmetz, M. O. The Novel Microtubule-Destabilizing Drug BAL27862 Binds to the Colchicine Site of Tubulin with Distinct Effects on Microtubule Organization. *J. Mol. Biol.* **426**, 1848–1860 (2014).
  48. Marangon, J., Christodoulou, M. S., Casagrande, F. V. M., Tiana, G., Dalla Via, L., Aliverti, A., Passarella, D., Cappelletti, G. & Ricagno, S. Tools for the rational design of bivalent microtubule-targeting drugs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **479**, 48–53 (2016).
  49. Gaspari, R., Prota, A. E., Bargsten, K., Cavalli, A. & Steinmetz, M. O. Structural Basis of cis- and trans-Combretastatin Binding to Tubulin. *Chem* **2**, 102–113 (2017).
  50. Field, J. J., Pera, B., Gallego, J. E., Calvo, E., Rodríguez-Salarichs, J., Sáez-Calvo, G., Zuwerra, D., Jordi, M., Andreu, J. M., Prota, A. E., Ménchon, G., Miller, J. H., Altmann, K. H. & Díaz, J. F. Zampanolide Binding to Tubulin Indicates Cross-Talk of Taxane Site with Colchicine and Nucleotide Sites. *J. Nat. Prod.* **81**, 494–505 (2018).
  51. Cheng, J., Wu, Y., Wang, Y., Wang, C., Wang, Y., Wu, C., Zeng, S., Yu, Y. & Chen, Q. Structure of a benzylidene derivative of 9(10H)-anthracenone in complex with tubulin provides a rationale for drug design. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **495**, 185–188 (2018).
  52. Lai, Q., Wang, Y., Wang, R., Lai, W., Tang, L., Tao, Y., Liu, Y., Zhang, R., Huang, L., Xiang, H., Zeng, S., Gou, L., Chen, H., Yao, Y. & Yang, J. Design, synthesis and biological evaluation of a novel tubulin inhibitor 7a3 targeting the colchicine binding site. *Eur. J. Med. Chem.* **156**, 162–179 (2018).
  53. Li, Y., Yang, J., Niu, L., Hu, D., Li, H., Chen, L., Yu, Y. & Chen, Q. Structural insights into the design of indole derivatives as tubulin polymerization inhibitors. *FEBS Lett.* **594**, 199–204 (2020).
  54. Wang, T., Wu, C., Wang, C., Zhang, G., Arnst, K. E., Yao, Y., Zhang, Z., Wang, Y., Pu, D. & Li, W. Unraveling the molecular mechanism of BNC105, a phase II clinical trial vascular disrupting

- agent, provides insights into drug design. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **525**, 148–154 (2020).
55. Shchegravina, E. S., Svirshchevskaya, E. V., Combes, S., Allegro, D., Barbier, P., Gigant, B., Varela, P. F., Gavryushin, A. E., Kobanova, D. A., Shchekotikhin, A. E. & Fedorov, A. Y. Discovery of dihydrofuranoalcolcolchicinoids - Highly potent antimitotic agents with low acute toxicity. *Eur. J. Med. Chem.* **207**, 112724 (2020).
56. Stein, A., Hilken née Thomopoulou, P., Frias, C., Hopff, S. M., Varela, P., Wilke, N., Mariappan, A., Neudörfel, J. M., Fedorov, A. Y., Gopalakrishnan, J., Gigant, B., Prokop, A. & Schmalz, H. G. B-nor-methylene Colchicinoid PT-100 Selectively Induces Apoptosis in Multidrug-Resistant Human Cancer Cells via an Intrinsic Pathway in a Caspase-Independent Manner. *ACS Omega* **7**, 2591–2603 (2022).
57. Chen, H., Deng, S., Albadari, N., Yun, M. K., Zhang, S., Li, Y., Ma, D., Parke, D. N., Yang, L., Seagroves, T. N., White, S. W., Miller, D. D. & Li, W. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Stable Colchicine-Binding Site Tubulin Inhibitors 6-Aryl-2-benzoyl-pyridines as Potential Anticancer Agents. *J. Med. Chem.* **64**, 12049–12074 (2021).
58. Gao, L., Meiring, J. C. M., Varady, A., Ruider, I. E., Heise, C., Wranik, M. & Velasco, C. D. In Vivo Photocontrol of Microtubule Dynamics and Integrity, Migration and Mitosis, by the Potent GFP-Imaging-Compatible Photoswitchable Reagents SBTubA4P and SBTub2M. *J. Am. Chem. Soc.* **144**, 5614–5628 (2022).
59. Zhou, P., Liu, Y., Zhou, L., Zhu, K., Feng, K., Zhang, H., Liang, Y., Jiang, H., Luo, C., Liu, M. & Wang, Y. Potent Antitumor Activities and Structure Basis of the Chiral  $\beta$ -Lactam Bridged Analogue of Combretastatin A-4 Binding to Tubulin. *J. Med. Chem.* **59**, 10329–10334 (2016).
60. Zhao, W., Zhou, C., Guan, Z. Y., Yin, P., Chen, F. & Tang, Y. J. Structural Insights into the Inhibition of Tubulin by the Antitumor Agent 4 $\beta$ -(1,2,4-triazol-3-ylthio)-4-deoxypodophyllotoxin. *ACS Chem. Biol.* **12**, 746–752 (2017).
61. Zhou, P., Liang, Y., Zhang, H., Jiang, H., Feng, K., Xu, P., Wang, J., Wang, X., Ding, K., Luo, C., Liu, M. & Wang, Y. Design, synthesis, biological evaluation and cocrystal structures with tubulin of chiral  $\beta$ -lactam bridged combretastatin A-4 analogues as potent antitumor agents. *Eur. J. Med. Chem.* **144**, 817–842 (2018).
62. Niu, L., Wang, Y., Wang, C., Wang, Y., Jiang, X., Ma, L., Wu, C., Yu, Y. & Chen, Q. Structure of 4'-demethylepipodophyllotoxin in complex with tubulin provides a rationale for drug design.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.* **493**, 718–722 (2017).

63. Oliva, M. A., Prota, A. E., Rodríguez-Salarichs, J., Bennani, Y. L., Jiménez-Barbero, J., Bargsten, K., Canales, Á., Steinmetz, M. O. & Díaz, J. F. Structural Basis of Noscapine Activation for Tubulin Binding. *J. Med. Chem.* **63**, 8495–8501 (2020).
64. Yong, C., Devine, S. M., Abel, A. C., Tomlins, S. D., Muthiah, D., Gao, X., Callaghan, R., Steinmetz, M. O., Prota, A. E., Capuano, B. & Scammells, P. J. 1,3-Benzodioxole-Modified Noscapine Analogues: Synthesis, Antiproliferative Activity, and Tubulin-Bound Structure. *ChemMedChem* **16**, 2882–2894 (2021).
65. Arnst, K. E., Wang, Y., Hwang, D. J., Xue, Y., Costello, T., Hamilton, D., Chen, Q., Yang, J., Park, F., Dalton, J. T., Miller, D. D. & Li, W. A potent, metabolically stable tubulin inhibitor targets the colchicine binding site and overcomes taxane resistance. *Cancer Res.* **78**, 265–277 (2018).
66. Arnst, K. E., Wang, Y., Lei, Z. N., Hwang, D. J., Kumar, G., Ma, D., Parke, D. N., Chen, Q., Yang, J., White, S. W., Seagroves, T. N., Chen, Z. S., Miller, D. D. & Li, W. Colchicine binding site agent DJ95 overcomes drug resistance and exhibits antitumor efficacy. *Mol. Pharmacol.* **96**, 73–89 (2019).
67. Li, G., Wang, Y., Li, L., Ren, Y., Deng, X., Liu, J., Wang, W., Luo, M., Liu, S. & Chen, J. Design, synthesis, and bioevaluation of pyrazolo[1,5-a]pyrimidine derivatives as tubulin polymerization inhibitors targeting the colchicine binding site with potent anticancer activities. *Eur. J. Med. Chem.* **202**, 112519 (2020).
68. Wang, Q., Arnst, K. E., Wang, Y., Kumar, G., Ma, D., Chen, H., Wu, Z., Yang, J., White, S. W., Miller, D. D. & Li, W. Structural Modification of the 3,4,5-Trimethoxyphenyl Moiety in the Tubulin Inhibitor VERU-111 Leads to Improved Antiproliferative Activities. *J. Med. Chem.* **61**, 7877–7891 (2018).
69. Chen, H., Deng, S., Wang, Y., Albadari, N., Kumar, G., Ma, D., Li, W., White, S. W., Miller, D. D. & Li, W. Structure-Activity Relationship Study of Novel 6-Aryl-2-benzoyl-pyridines as Tubulin Polymerization Inhibitors with Potent Antiproliferative Properties. *J. Med. Chem.* **63**, 827–846 (2020).
70. Wang, Q., Arnst, K. E., Wang, Y., Kumar, G., Ma, D., White, S. W., Miller, D. D., Li, W. & Li, W. Structure-guided design, synthesis, and biological evaluation of (2-(1 H-Indol-3-yl)-1 H-imidazol-4-yl)(3,4,5-trimethoxyphenyl) methanone (ABI-231) analogues targeting the colchicine binding site in Tubulin. *J. Med. Chem.* **62**, 6734–6750 (2019).

71. Brindisi, M., Ulivieri, C., Alfano, G., Gemma, S., de Asís Balaguer, F., Khan, T., Grillo, A., Chemi, G., Menchon, G. & Prota, A. E. The compound millepachine and its derivatives inhibit tubulin polymerization by irreversibly binding to the colchicine-binding site in  $\beta$ -tubulin. *J. Biol. Chem.* **293**, 9461–9472 (2018).
72. Cury, N. M., Mühlethaler, T., Laranjeira, A. B. A., Canevarolo, R. R., Zenatti, P. P., Lucena-Agell, D., Barasoain, I., Song, C., Sun, D., Dovat, S., Yunes, R. A., Prota, A. E., Steinmetz, M. O., Díaz, J. F. & Yunes, J. A. Structural Basis of Colchicine-Site targeting Acylhydrazones active against Multidrug-Resistant Acute Lymphoblastic Leukemia. *iScience* **21**, 95–109 (2019).
73. Dorléans, A., Gigant, B., Ravelli, R. B. G., Mailliet, P., Mikol, V. & Knossow, M. Variations in the colchicine-binding domain provide insight into the structural switch of tubulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 106 13775–13779 at <https://doi.org/10.1073/pnas.0904223106> (2009).
74. Jost, M., Chen, Y., Gilbert, L. A., Horlbeck, M. A., Krenning, L., Menchon, G., Rai, A., Cho, M. Y., Stern, J. J., Prota, A. E., Kampmann, M., Akhmanova, A., Steinmetz, M. O., Tanenbaum, M. E. & Weissman, J. S. Combined CRISPRi/a-Based Chemical Genetic Screens Reveal that Rigosertib Is a Microtubule-Destabilizing Agent. *Mol. Cell* **68**, 210-223.e6 (2017).
75. Du, T., Lin, S., Ji, M., Xue, N., Liu, Y. & Zhang, Z. A novel orally active microtubule destabilizing agent S-40 targets the colchicine-binding site and shows potent antitumor activity. *Cancer Lett.* **495**, 22–32 (2020).
76. Lei, J. H., Ma, L. L., Xian, J. H., Chen, H., Zhou, J. J., Chen, H., Lei, Q., Li, Y. Y., Wang, Y. Y. & Wang, Y. X. Structural insights into targeting of the colchicine binding site by ELR510444 and parbendazole to achieve rational drug design. *RSC Adv.* **11**, 18938–18944 (2021).
77. Bohnacker, T., Prota, A. E., Beaufils, F., Burke, J. E., Melone, A., Inglis, A. J., Rageot, D., Sele, A. M., Cmiljanovic, V., Cmiljanovic, N., Bargsten, K., Aher, A., Akhmanova, A. & Díaz, J. Deconvolution of Buparlisib's mechanism of action defines specific PI3K and tubulin inhibitors for therapeutic intervention. *Nat. Commun.* **8**, 1–13 (2017).
78. Yan, W., Yang, T., Yang, J., Wang, T., Yu, Y., Wang, Y., Chen, Q., Bai, P., Li, D., Ye, H., Qiu, Q., Zhou, Y., Hu, Y., Yang, S., Wei, Y., Li, W. & Chen, L. SKLB060 Reversibly Binds to Colchicine Site of Tubulin and Possesses Efficacy in Multidrug-Resistant Cell Lines. *Cell. Physiol. Biochem.* **47**, 489–504 (2018).
79. Banerjee, S., Arnst, K. E., Wang, Y., Kumar, G., Deng, S., Yang, L., Li, G. B., Yang, J., White, S.

- W., Li, W. & Miller, D. D. Heterocyclic-Fused Pyrimidines as Novel Tubulin Polymerization Inhibitors Targeting the Colchicine Binding Site: Structural Basis and Antitumor Efficacy. *J. Med. Chem.* **61**, 1704–1718 (2018).
80. Banerjee, S., Mahmud, F., Deng, S., Ma, L., Yun, M. K., Fakayode, S. O., Arnst, K. E., Yang, L., Chen, H., Wu, Z., Lukka, P. B., Parmar, K., Meibohm, B., White, S. W., Wang, Y., Li, W. & Miller, D. D. X-ray Crystallography-Guided Design, Antitumor Efficacy, and QSAR Analysis of Metabolically Stable Cyclopenta-Pyrimidinyl Dihydroquinoxalinone as a Potent Tubulin Polymerization Inhibitor. *J. Med. Chem.* **64**, 13072–13095 (2021).
81. Arnst, K. E., Banerjee, S., Wang, Y., Chen, H., Li, Y., Yang, L., Li, W., Miller, D. D. & Li, W. X-ray Crystal Structure Guided Discovery and Antitumor Efficacy of Dihydroquinoxalinone as Potent Tubulin Polymerization Inhibitors. *ACS Chem. Biol.* **14**, 2810–2821 (2019).
82. Zhang, Z., Wang, C., Ma, L., Jiang, X., Wu, C., Wang, Y., Jiang, Y., Zheng, W., Yang, Y., Ma, Y. & Yang, J. Molecular mechanism of crolibulin in complex with tubulin provides a rationale for drug design. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **511**, 381–386 (2019).
83. McNamara, D. E., Senese, S., Yeates, T. O. & Torres, J. Z. Structures of potent anticancer compounds bound to tubulin. *Protein Sci.* **24**, 1164–1172 (2015).
84. Wang, Y., Zhang, H., Gigant, B., Yu, Y., Wu, Y., Chen, X., Lai, Q., Yang, Z., Chen, Q. & Yang, J. Structures of a diverse set of colchicine binding site inhibitors in complex with tubulin provide a rationale for drug discovery. *FEBS J.* **283**, 102–111 (2016).
85. Dohle, W., Jourdan, F. L., Menchon, G., Prota, A. E., Foster, P. A., Mannion, P., Hamel, E., Thomas, M. P., Kasprzyk, P. G., Ferrandis, E., Steinmetz, M. O., Leese, M. P. & Potter, B. V. L. Quinazolinone-Based Anticancer Agents: Synthesis, Antiproliferative SAR, Antitubulin Activity, and Tubulin Co-crystal Structure. *J. Med. Chem.* **61**, 1031–1044 (2018).
86. Smedley, C. J., Stanley, P. A., Qazzaz, M. E., Prota, A. E., Olieric, N., Collins, H., Eastman, H., Barrow, A. S., Lim, K. H., Kam, T. S., Smith, B. J., Duivenvoorden, H. M., Parker, B. S., Bradshaw, T. D., Steinmetz, M. O. & Moses, J. E. Sustainable Syntheses of (-)-Jerantinines A & e and Structural Characterisation of the Jerantinine-Tubulin Complex at the Colchicine Binding Site. *Sci. Rep.* **8**, 1–7 (2018).
87. Brindisi, M., Ulivieri, C., Alfano, G., Gemma, S., de Asís Balaguer, F., Khan, T., Grillo, A., Chemi, G., Menchon, G. & Prota, A. E. Structure-activity relationships, biological evaluation and structural studies of novel pyrrolonaphthoxazepines as antitumor agents. *Eur. J. Med. Chem.* **162**, 290–

- 320 (2019).
88. Li, Z., Ma, L., Wu, C., Meng, T., Ma, L., Zheng, W., Yu, Y., Chen, Q., Yang, J. & Shen, J. The Structure of MT189-Tubulin Complex Provides Insights into Drug Design. *Lett. Drug Des. Discov.* **16**, 1069–1073 (2018).
89. Naret, T., Khelifi, I., Provot, O., Bignon, J., Levaique, 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.* **62**, 1902–1916 (2019).
90. Dohle, W., Protá, A. E., Menchon, G., Hamel, E., Steinmetz, M. O. & Potter, B. V. L. Tetrahydroisoquinoline Sulfamates as Potent Microtubule Disruptors: Synthesis, Antiproliferative and Antitubulin Activity of Dichlorobenzyl-Based Derivatives, and a Tubulin Cocrystal Structure. *ACS Omega* **4**, 755–764 (2019).
91. Niu, L., Yang, J., Yan, W., Yu, Y., Zheng, Y., Ye, H., Chen, Q. & Chen, L. Reversible binding of the anticancer drug KXO1 (tirbanibulin) to the colchicine-binding site of  $\beta$ -tubulin explains KXO1's low clinical toxicity. *J. Biol. Chem.* **294**, 18099–18108 (2019).
92. Wang, L., Zheng, Y., Li, D., Yang, J., Lei, L., Yan, W., Zheng, W., Tang, M., Shi, M., Zhang, R., Cai, X., Ni, H., Ma, X., Li, N., Hong, F., Ye, H. & Chen, L. Design, Synthesis, and Bioactivity Evaluation of Dual-Target Inhibitors of Tubulin and Src Kinase Guided by Crystal Structure. *J. Med. Chem.* **64**, 8127–8141 (2021).
93. Ding, Z., Ma, M., Zhong, C., Wang, S., Fu, Z., Hou, Y., Liu, Y., Zhong, L., Chu, Y., Li, F., Song, C., Wang, Y., Yang, J. & Li, W. Development of novel phenoxy-diketopiperazine-type plinabulin derivatives as potent antimicrotubule agents based on the co-crystal structure. *Bioorganic Med. Chem.* **28**, 115186 (2020).
94. Sharma, A., Gonzalo, S., Olieric, N. & As, F. De. Quinolin-6-Yloxyacetamides Are Microtubule Destabilizing Agents That Bind to the Colchicine Site of Tubulin. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1336–1347 (2017).
95. Fu, Z., Hou, Y., Ji, C., Ma, M., Tian, Z., Deng, M., Zhong, L., Chu, Y. & Li, W. Design, synthesis and biological evaluation of anti-pancreatic cancer activity of plinabulin derivatives based on the co-crystal structure. *Bioorganic Med. Chem.* **26**, 2061–2072 (2018).
96. Ning, N., Yu, Y., Wu, M., Zhang, R., Zhang, T., Zhu, C., Huang, L., Yun, C. H., Benes, C. H., Zhang, J., Deng, X., Chen, Q. & Ren, R. A novel microtubule inhibitor overcomes multidrug

- resistance in tumors. *Cancer Res.* **78**, 5949–5957 (2018).
97. Bueno, O., Estévez Gallego, J., Martins, S., Prota, A. E., Gago, F., Gómez-Sanjuan, A., Camarasa, M. J., Barasoain, I., Steinmetz, M. O., Díaz, J. F., Pérez-Pérez, M. J., Liekens, S. & Priego, E. M. High-affinity ligands of the colchicine domain in tubulin based on a structure-guided design. *Sci. Rep.* **8**, 1–17 (2018).
  98. Patterson, J. C., Joughin, B. A., Prota, A. E., Mühlethaler, T., Jonas, O. H., Whitman, M. A., Varmeh, S., Chen, S., Balk, S. P., Steinmetz, M. O., Lauffenburger, D. A. & Yaffe, M. B. VISAGE Reveals a Targetable Mitotic Spindle Vulnerability in Cancer Cells. *Cell Syst.* **9**, 74-92.e8 (2019).
  99. Oliva, M. Á., Tosat-Bitrián, C., Barrado-Gil, L., Bonato, F., Galindo, I., Garaigorta, U., Álvarez-Bernad, B., París-Ogáyar, R., Lucena-Agell, D., Giménez-Abián, J. F., García-Dorival, I., Urquiza, J., Gastaminza, P., Díaz, J. F., Palomo, V. & Alonso, C. Effect of Clinically Used Microtubule Targeting Drugs on Viral Infection and Transport Function. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 1–22 (2022).
  100. de la Roche, N. M., Mühlethaler, T., Di Martino, R. M. C., Ortega, J. A., Gioia, D., Roy, B., Prota, A. E., Steinmetz, M. O. & Cavalli, A. Novel fragment-derived colchicine-site binders as microtubule-destabilizing agents. *Eur. J. Med. Chem.* **241**, 114614 (2022).
  101. Wang, Z., Chen, J., Wang, J., Ahn, S., Li, C. M., Lu, Y., Loveless, V. S., Dalton, J. T., Miller, D. D. & Li, W. Novel tubulin polymerization inhibitors overcome multidrug resistance and reduce melanoma lung metastasis. *Pharm. Res.* **29**, 3040–3052 (2012).
  102. Ramírez Escobedo, M. E., Barajas Bermúdez, L., Pérez Berumen, C., Sáenz Galindo, A. & Silva Belmares, S. Y. Synthesis and biological activity of chalcones. *Rev. Mex. Ciencias Farm.* **43**, 7–14 (2012).
  103. Yang, J., Yan, W., Yu, Y., Wang, Y., Yang, T., Xue, L., Yuan, X., Long, C., Liu, Z., Chen, X., Hu, M., Zheng, L., Qiu, Q., Pei, H. & Li. The compound millepachine and its derivatives inhibit tubulin polymerization by irreversibly binding to the colchicine-binding site in  $\beta$ -tubulin. *J. Biol. Chem.* **293**, 9461–9472 (2018).
  104. Canela, M., Noppen, S., Bueno, O., Prota, A. E., Sáez-calvo, G., Jimeno, M., Benkheil, M., Steinmetz, M. O. & Priego, E. Antivascular and antitumor properties of the tubulin-binding chalcone TUB091. *Oncotarget* **8**, 14325–14342 (2017).
  105. Choi, C. H. ABC transporters as multidrug resistance mechanisms and the development of chemosensitizers for their reversal. *Cancer Cell Int.* **5**, 1–13 (2005).

106. Kim LJ, Chamberlain MC, Zhu J, Raizer JJ, Grimm SA, Phuphanich S, Fadul CE, Rosenfeld S, Balch AH, P. C. Phase II study of verubulin (MPC-6827) for the treatment of subjects with recurrent glioblastoma naïve to treatment with bevacizumab. *J. Clin. Oncol.* **29**, 2088–2088 (2011).
107. Roskoski, R. Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324**, 1155–1164 (2004).
108. Markham, A. & Duggan, S. Tirbanibulin: First Approval. *Drugs* **81**, 509–513 (2021).
109. Majumdar, S., Maiti, S. & Ghosh Dastidar, S. Dynamic and Static Water Molecules Complement the TN16 Conformational Heterogeneity inside the Tubulin Cavity. *Biochemistry* **55**, 335–347 (2016).
110. Obydenov, K. L., Kalinina, T. A., Galieva, N. A., Beryozkina, T. V., Zhang, Y., Fan, Z., Glukhareva, T. V. & Bakulev, V. A. Synthesis, Fungicidal Activity, and Molecular Docking of 2-Acylamino and 2-Thioacylamino Derivatives of 1 H-benzo[ d]imidazoles as Anti-Tubulin Agents. *J. Agric. Food Chem.* **69**, 12048–12062 (2021).
111. Guzmán-Ocampo, D. C., Aguayo-Ortiz, R., Cano-González, L., Castillo, R., Hernández-Campos, A. & Dominguez, L. Effects of the Protonation State of Titratable Residues and the Presence of Water Molecules on Nocodazole Binding to  $\beta$ -Tubulin. *ChemMedChem* **13**, 20–24 (2018).
112. Kemp, M. T., Lewandowski, E. M. & Chen, Y. Low barrier hydrogen bonds in protein structure and function. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* **1869**, 140557 (2021).
113. Khaniya, U., Mao, J., Wei, R. J. & Gunner, M. R. Characterizing Protein Protonation Microstates Using Monte Carlo Sampling. *J. Phys. Chem. B* **126**, 2476–2485 (2022).
114. Søndergaard, C. R., Olsson, M. H. M., Rostkowski, M. & Jensen, J. H. Improved treatment of ligands and coupling effects in empirical calculation and rationalization of p K a values. *J. Chem. Theory Comput.* **7**, 2284–2295 (2011).
115. Olsson, M. H. M., Søndergaard, C. R., Rostkowski, M. & Jensen, J. H. PROPKA3: Consistent treatment of internal and surface residues in empirical p K a predictions. *J. Chem. Theory Comput.* **7**, 525–537 (2011).
116. Wagner, J. R., Sørensen, J., Hensley, N., Wong, C., Zhu, C., Perison, T. & Amaro, R. E. POVME 3.0: Software for Mapping Binding Pocket Flexibility. *J. Chem. Theory Comput.* **13**, 4584–4592 (2017).

117. Aguayo-Ortiz, R., Méndez-Lucio, O., Romo-Mancillas, A., Castillo, R., Yépez-Mulia, L., Medina-Franco, J. L. & Hernández-Campos, A. Molecular basis for benzimidazole resistance from a novel  $\beta$ -tubulin binding site model. *J. Mol. Graph. Model.* **45**, 26–37 (2013).
118. Florio, R., Veschi, S., Di Giacomo, V., Pagotto, S., Carradori, S., Verginelli, F., Cirilli, R., Casulli, A., Grassadonia, A., Tinari, N., Cataldi, A., Amoroso, R., Cama, A. & De Lellis, L. The benzimidazole-based anthelmintic parbendazole: A repurposed drug candidate that synergizes with gemcitabine in pancreatic cancer. *Cancers (Basel)*. **11**, (2019).
119. Daniel, J. P., Mesquita, F. P., Da Silva, E. L., de Souza, P. F. N., Lima, L. B., de Oliveira, L. L. B., de Moraes, M. E. A., Moreira-Nunes, C. de F. A., Burbano, R. M. R., Zanatta, G. & Montenegro, R. C. Anticancer potential of mebendazole against chronic myeloid leukemia: in silico and in vitro studies revealed new insights about the mechanism of action. *Front. Pharmacol.* **13**, 1–11 (2022).
120. Pecqueur, L., Duellberg, C., Dreier, B., Jiang, Q., Wang, C., Plückthun, A., Surrey, T., Gigant, B. & Knossow, M. A designed ankyrin repeat protein selected to bind to tubulin caps the microtubule plus end. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 12011–12016 (2012).
121. Ikeda, R., Kurosawa, M., Okabayashi, T., Takei, A., Yoshiwara, M., Kumakura, T., Sakai, N., Funatsu, O., Morita, A., Ikekita, M., Nakaike, Y. & Konakahara, T. 3-(3-Phenoxybenzyl)amino- $\beta$ -carboline: A novel antitumor drug targeting  $\alpha$ -tubulin. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **21**, 4784–4787 (2011).