



UNIVERSIDAD DE GRANADA

Programa de Doctorado en Farmacia
Departamento de Química Farmacéutica y Orgánica

Tesis Doctoral

Inhibidores de la interacción HA-CD44 con actividad antitumoral: diseño, síntesis, evaluación biológica y liberación selectiva

Doctorando

José Manuel Espejo Román

Directoras de tesis

Dra. Ana Conejo García

Dra. Rosario María Sánchez Martín

Granada, 14 de abril de 2023



CENTRO PFIZER-UNIVERSIDAD DE GRANADA-JUNTA DE ANDALUCÍA
DE GENÓMICA E INVESTIGACIÓN ONCOLÓGICA

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: José Manuel Espejo Román
ISBN: 978-84-1117-857-0
URI: <https://hdl.handle.net/10481/82077>

El doctorando / *The doctoral candidate* José Manuel Espejo Román y las directoras de la tesis / *and the thesis supervisors* Dra. Ana Conejo García y Dra. Rosario María Sánchez Martín.

Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo realizado por el doctorando bajo la dirección de las directoras de tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado resultados o publicaciones.

/

Guarantee, by signing this Doctoral Thesis, that the work has been done by the doctoral candidate under the direction of the thesis supervisors and, as far as our knowledge reaches, in the performance of the work, the rights of other authors to be cited (when their results or publications have been used) have been respected.

Lugar y fecha / *Place and date*:

Granada, 14 de abril de 2023

Directoras de la tesis / *Thesis supervisors*

Ana Conejo García

Rosario María Sánchez Martín

Doctorando / *Doctoral Candidate*

José Manuel Espejo Román

Firmado / *Signed*

Firmado / *Signed*

Firmado / *Signed*

A mis padres y a Laura, por estar siempre ahí

*“We have two lives, and the second begins
when we realize we only have one”*

Confucius

Agradecimientos

Ha sido un camino lleno de altibajos, lloros, alegrías, nuevos desafíos, momentos eufóricos en los que los experimentos salían y otros frustrantes sin saber por qué no salía nada..., vamos, como la vida misma, una montaña rusa. Esta etapa de tesis doctoral no hubiera sido posible realizarla sin el apoyo y la ayuda de las personas que me han acompañado en este camino, por eso me gustaría tener unas palabras de agradecimiento hacia ellas.

En primer lugar, tengo que dar las gracias a mis directoras, Ana y Rosario, os agradezco de corazón poder darme la oportunidad y la confianza de trabajar en ciencia a vuestro lado. Ana, contigo empezó todo, nunca olvidaré esos inicios en los que me enseñabas a hacer reacciones y columnas y me contagiabas ese gusanillo por el apasionante mundo de la química farmacéutica. Rosario, gracias por darme la posibilidad de entrar en tu grupo de investigación y poder descubrir el mundo de las celulillas y las nanos, no olvidaré tus palabras tranquilizadoras en tantos momentos de este camino. Sois un ejemplo admirable para mí tanto profesional como personalmente, combináis a la perfección una dedicación y capacidad para afrontar todo tipo de situaciones junto con una calidad humana inmejorable. Gracias por enseñarme, ayudarme, animarme y hacerme crecer en todos los aspectos de la vida.

A Belén, si alguien sabe lo que he pasado hasta llegar aquí eres tú. Siempre recordaré los miles de momentos de todo tipo por los que hemos pasado (risas, enfados, días malos, buenos, experimentos imposibles, ideas locas...). Has sido una persona muy importante en este camino, no puedo estar más agradecido a toda la ayuda, consejo y fuerza que me has dado en todo momento, pero especialmente con lo que me quedo por encima de todo es por la amistad que hemos formado. Gracias por todo.

Al grupo NanoChemBio, una familia de personas maravillosas en todos los sentidos, Victoria, Agus, Antonio, Angélica, Javi, Jose, Tere, Araceli, Carmen, Mónica, Juanjo, Carlos, Mari Carmen, Rocío, Jose L. Gracias por tantos momentos compartidos, cafés, comidas, quedadas... habéis hecho que de gusto trabajar a vuestro lado. Habéis sido fundamentales en el día a día, gracias por amenizar los días difíciles, gracias por todas las ideas que hemos compartido para lograr cada meta y por supuesto por siempre estar dispuestos a ayudar. Será imposible olvidarme de esos desayunos con churros en los que desprendíamos felicidad a raudales. En especial quiero agradecer a Victoria, por todo el apoyo que me has dado en los momentos difíciles y por siempre transmitirme tranquilidad y positividad, ante todo. Y claro está, por ser la persona que me enseñó a manejarme en cultivos celulares cuando

estaba saliendo del cascarón. Y a Agus, por tantos cafés, conversaciones y buenos ratos juntos. No me puedo olvidar de M^a Paz, muchas gracias por tu ayuda al inicio de esta etapa, no había nadie mejor que tú en hacer preguntas y buscar el por qué de cada cosa.

A toda la gente de Genyo, en especial a los compañeros de la sala 3 donde tanto tiempo hemos pasado, Inma, Alberto, Amador, Juansan, Mati, Vicky, Angel, Juan Carlos... gracias a todos por hacer un ambiente de trabajo en el que el buen rollo siempre estaba presente. Hemos pasado grandes momentos no solo de trabajo, hemos podido disfrutar de fiestas, cervezas y momentos que han hecho que el camino fuera mucho más llevadero. También a todo el personal de Genyo, por siempre hacer lo máximo para que pudiéramos trabajar de la mejor forma posible.

Quiero agradecer también a todas las personas que forman parte de la Facultad de Farmacia, se podría decir que es mi segundo hogar ya que ya son más de 11 años desde que entre por primera vez y es especial el cariño que siempre le he tenido. A Meriem, por sus buenos consejos y por nuestras charlas en las comidas en el departamento. A Joaquín, por siempre preocuparse por como me iba la tesis, por orientarme en muchas ocasiones, por compartir experiencias enriquecedoras en todos los aspectos y por transmitirme esa inquietud por la química farmacéutica, siempre te estaré agradecido (imposible no acordarme también de que mi primera espátula salió de tu bata). A Olga, por ayudarme en mis inicios en el laboratorio, por su disponibilidad, por mostrarme siempre su apoyo y por poder descubrir Ferrara gracias a ella. A Dori y Encarna, por siempre estar dispuestas a ayudarme y por hacerme sentir tan a gusto en el departamento. A Samuel, por su profesionalidad y buscarme huecos imposibles para realizar cualquier análisis a cualquier hora. A los compañeros que estuvieron a mi lado en tantos días de laboratorio, a Fabio, Nerea, Álvaro, María Dolores, Guille, Fabio C, Pilar, Patri, Antonio M. ... gracias por transmitirme tanto conocimiento y tan buenos momentos entre columna y columna, ha sido un placer trabajar a vuestro lado.

A la gente de Zaragoza, en particular a mis compañeras de piso que me hicieron más amena la estancia, Helena y Jennifer. Al Bifi, a todo su personal por hacerme sentir como uno más y en especial a Ramón y a su grupo de investigación por tratarme genial y darme la oportunidad de iniciarme y poder trabajar en el complejo mundo de las proteínas. A Víctor por su ayuda y guía en el día a día, a Andrés, Javi, Ana, Anita, María, Pablo, Vio, Mati, David... por los buenos momentos vividos tanto dentro como fuera del Bifi (benditas barbacoas en el huerto). A Pepe, mi paisano, por las tardes que nos íbamos al huerto a beber unas cervecitas y por ese último viaje a Granada inolvidable jeje... Y a Diego, la mejor persona que me llevo de mi estancia en Zaragoza, por nuestras

miles de charlas, risas y planes. Gracias por ayudarme en los momentos más complicados, creo que nunca podré agradecerte lo suficiente todo lo que hiciste por mí.

A mi familia italiana, por hacerme pasar tres de los mejores meses de mi vida. A Delia, por tratarme como si fuera un hijo, por mostrarme toda su ayuda y cariño en lo personal y en lo profesional por permitirme trabajar haciendo moleculitas en su laboratorio. A Tea, mi compi y amiga, infinidades de momentos vividos contigo desde las columnas eternas hasta el paseo en bici diluviando cargados de pastelitos. A Martina, mi diablesa y compi de oficina, por los cafés, spritzs y momentos compartidos "it's the same". A Davide I. por nuestras tardes de oficina acompañándonos el uno al otro cuando se hacía de noche y por ese momento de aventura a por mi primera bici allí. A Salvatore, Remo, Valentina, Davide, Chiara, Anna, Greta, Virginia, Julia... por ayudarme y hacerme sentir como en casa. A la parte de Farmacología, por permitirme trabajar y formarme en un área totalmente nueva para mí, en especial a Chiara, Michela y Stefano por vuestra ayuda en todo momento. También tengo que agradecer a todos los chics de la residencia Putinati, en especial a Marco, por nuestras cenas, paseos en bici y por tantas conversaciones enriquecedoras. Y a Luca, por esas cervezas y charlas de los viernes a las tantas de la noche que tanto nos hacían desconectar. Y por último, a María y su equipo, por ese trato espectacular y esas comidas riquísimas en Macao con Fernando, mi cordobés ferrarense.

A mis chicos de Mazarrón, en especial a Dani, Diego y Aida, no me olvido de vosotros, nuestros veranos volverán, estoy seguro de ello. A mis abuelos de allí, Paquito y Paquita, gracias por el cariño que siempre recibo de vosotros y por tratarme como un nieto más.

A Cleydson, mi brasileiro que me ha demostrado que la distancia no existe, siempre hablar contigo ha sido sinónimo de felicidad, alegría y complicidad. No es sencillo encontrar gente como tú. Gracias por haberte podido conocer y seguir teniendo la gran amistad que tenemos. ¡Te prometo que te visitaré a Amapá con *cerveja verde*!

A mis brothers, Juanki, Alvarito y Bolo por todos los momentos compartidos desde enanos, y lo más importante por los que quedan y vendrán. Nuestras juntas siempre han sido una motivación para seguir hacia delante con energía y alegría. Sois una pieza fundamental de mi vida, gracias y mil gracias por ser los mejores amigos que una persona puede tener.

A mi hermano Emi, lo mejor que me he llevado de Farmacia, por su bondad, lealtad y nobleza. Por las experiencias que hemos vivido, por darme la mano desde el primer momento y por esa amistad que hemos formado. Lo mejor está por venir. A mi Cris, por todo lo que llevamos viviendo juntos y por escucharme cuando necesitaba desahogarme...gracias por tus buenos consejos, eres una persona esencial en mi vida. A mis niños Xino, Edu, Josemas, Angelillo... que aunque últimamente nos veamos poco siempre os tengo presente en mi vida por tantas experiencias juntos.

A mi familia, a mis titos, primos y a mis abuelos. En especial, a mi primo Raúl, mi doble, por sus palabras y ánimos en tantos momentos de este largo camino y a mis abuelos Joaquín y Dolores que sé que desde el cielo estáis dándonos a toda la familia la fuerza necesaria para seguir y cumplir nuestros sueños.

A mi Antoñi, Pedro, Sam y Carlos, por vuestro cariño y apoyo desde el principio. A mi sobrina Alejandra, espero dibujar contigo tus primeros bencenos.

A mi madre y a mi padre, por guiarme y darme siempre los mejores consejos posibles. Gracias por apoyarme y creer en mí en todo momento. Gracias por tener siempre esas palabras motivadoras y enriquecedoras para volver a levantarme en los peores momentos. Os quiero.

Y por último, a ti Laura, por comprenderme y ser tan paciente durante esta etapa. Gracias por ese apoyo incondicional y por mostrarme la cara buena de las cosas incluso en los momentos más duros. En definitiva, gracias por ser la mejor compañera de vida posible. Y como último, último, a Pipo, mi fiel compañero amarillo y cantarín por poner melodía y alegría a mi vida.

Criterios de calidad para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Granada

Publicación de un artículo científico aceptado en revistas relevantes en el campo de conocimiento de la tesis doctoral, firmada por el doctorando, incluyendo parte de los resultados de la tesis:

Espejo-Román, J. M.; Rubio-Ruiz, B.; Cano-Cortés, V.; Cruz-López, O.; Gonzalez-Resines, S.; Domene, C.; Conejo-García, A.; Sánchez-Martín, R. M. Selective Anticancer Therapy Based on a HA-CD44 Interaction Inhibitor Loaded on Polymeric Nanoparticles. *Pharmaceutics* 2022, 14 (4), 788. DOI: 10.3390/pharmaceutics14040788. Impact factor (JCR 2021): 6.525. Pharmacology and Pharmacy: 39/279 (Q1).

Criterios de calidad para la obtención de la Mención de Doctorado Internacional por la Universidad de Granada

Estancia: siguiendo la normativa de la UGR se ha realizado una estancia de 3 meses en una institución de enseñanza superior o centro de investigación de prestigio de un país extranjero: Septiembre-Diciembre 2022. Departamento de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Ferrara (Italia) bajo la supervisión de la Dra. Delia Preti, Profesora Titular de Química Farmacéutica. Financiación: Ayuda a la Movilidad para Estancias Breves y Traslados Temporales (2021) (Referencia EST21/00641).

Idioma de la tesis doctoral: siguiendo la normativa de la UGR, parte de la tesis doctoral, al menos un resumen extenso y las conclusiones, debe redactarse y presentarse en una de las lenguas habituales para la comunicación científica en el campo de conocimiento en el que se enmarca el trabajo de investigación, distinta a cualquiera de las lenguas oficiales en España. En esta memoria se ha redactado la introducción en español y el resto de apartados en inglés, si bien el resumen y las conclusiones se han redactado en ambos idiomas. La tesis será defendida en español a excepción de las conclusiones, que serán defendidas en inglés.

Becas y financiación

El candidato doctoral José Manuel Espejo Román agradece las fuentes de financiación que han hecho posible esta tesis doctoral:

- Ayuda para la Formación de Profesorado Universitario (FPU) 2016. Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. Referencia FPU16/02061.

- Ayuda a la Movilidad para Estancias Breves y Traslados Temporales (2021). Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. Referencia EST21/00641.

- Este trabajo ha recibido financiación de los grupos de investigación CTS-130: Investigación y desarrollo de fármacos y CTS-987: Desarrollo de estrategias terapéuticas y de diagnóstico (NANOHEMBIO) a través del Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2021-128109OB-I00), del Instituto Carlos III (DTS18/00121), de la Conserjería de Economía, Conocimiento y Universidad (P18-RT-1679 y PVT-PSETC-2.0), de la Conserjería de Universidad, Investigación e Innovación (AT21-00246) de la Junta de Andalucía y de la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación de la Universidad de Granada (PR/17/006).

Índice

Abreviaturas	1
Resumen/Abstract	5
1. Introducción.....	9
1.1. Cáncer	9
1.1.1. Epidemiología del cáncer.....	9
1.1.2. Características del cáncer	10
1.1.3. Carcinogénesis, invasión y metástasis.....	12
1.1.4. Retos actuales en el tratamiento del cáncer	14
1.2. HA.....	15
1.2.1. Metabolismo del HA	17
1.2.1.1. Síntesis del HA	18
1.2.1.2. Degradación del HA	20
1.2.2. HA y cáncer	22
1.3. Hialadherinas	24
1.4. Receptor CD44	25
1.4.1. Estructura proteica del CD44.....	25
1.4.2. Gen CD44 e isoformas estándar y variantes.....	27
1.4.3. Modificaciones postraduccionales y otros ligandos de CD44	29
1.4.4. Funciones fisiológicas y patológicas de CD44.....	31
1.4.5. Biología estructural del CD44-HABD.....	33
1.5. Interacción HA-CD44.....	35
1.5.1. Vías de señalización y eventos regulados por la interacción HA-CD44	37
1.6. Papel del HA en la terapia contra el cáncer	40
1.6.1. Degradación del HA por la acción de las HYALs.....	40
1.6.2. Inhibición de la síntesis del HA	41
1.6.3. Fármacos dirigidos por acción del HA.....	41
1.6.4. Inactivación del HA	41
1.6.5. Disminución de la expresión de CD44	42
1.6.5.1. Terapia genética	42

1.6.5.2. Productos naturales	42
1.6.6. Inhibición de la interacción HA-CD44	43
1.6.6.1. Anticuerpos anti-CD44	43
1.6.6.2. Proteínas de fusión	44
1.6.6.3. oHA.....	44
1.6.6.4. Pequeñas moléculas derivadas de hongos: F-16438 y F-19848 A	45
1.6.6.5. Etopósido	46
1.6.6.6. THIQs como inhibidores de la interacción HA-CD44.....	47
1.6.6.7. Otras pequeñas moléculas no glucosídicas	51
1.7. Nanotecnología	52
1.7.1. Nanotecnología activamente dirigida hacia CD44	55
1.7.2. NPs como sistema de liberación controlada y selectiva de fármacos	57
1.7.2.1. Liberación selectiva basada en la acción de las esterasas	58
1.7.2.2. Liberación selectiva basada en cambios de pH.....	58
1.7.3. NPs de poliestireno	59
1.7.3.1. Síntesis y funcionalización de las NPs de poliestireno	59
1.7.3.2. Caracterización fisicoquímica de las NPs de poliestireno	62
1.7.3.3. Aplicaciones de las NPs de poliestireno.....	63
2. Objectives.....	67
3. Results and discussion.....	71
3.1. <i>N</i> -Aryl THIQ derivatives as HA-CD44 interaction inhibitors: design, synthesis, computational studies and antitumor effect	71
3.1.1. Molecular design and docking studies.....	71
3.1.2. Chemical synthesis	73
3.1.3. Biological evaluation	74
3.1.4. Hit to lead optimization	78
3.1.4.1. Molecular design, synthesis and antiproliferative activity	78
3.1.4.2. Assessment of CD44-binding capacity	79
3.1.4.3. Computational studies	80
3.1.4.4. Apoptotic studies	83
3.1.4.5. Three-dimensional cancer model evaluation	84

3.2. Design and synthesis of 3-(indacen-4-ylcarbamoyl)-2-arylsulfonyl THIQ derivatives as antiproliferative agents.....	87
3.2.1. Molecular design	87
3.2.2. Chemical synthesis.....	88
3.2.2.1. Synthesis of indacenamine intermediate 30	88
3.2.2.2. Synthesis of non-amine compounds JE7-JE12	89
3.2.2.3. Synthesis of amine compounds JE13-JE21	91
3.2.3. Antiproliferative studies	92
3.3. Design, synthesis and biological evaluation of an HA-CD44 interaction inhibitor loaded on polymeric NPs	97
3.3.1. Design, synthesis and biological evaluation of <i>N</i> -alkyl THIQ derivatives	97
3.3.2. Study of the effect of structural modification of THIQ on CD44 interaction by computational studies	99
3.3.3. Synthesis and physicochemical characterization of the nanodevice to target CD44.....	104
3.3.3.1. Preparation of JE22-NPs	104
3.3.3.2. Physicochemical characterization of JE22-NPs	105
3.3.3.3. Determination of JE22-NPs concentration by spectrophotometric method	106
3.3.3.4. Efficiency of conjugation and drug release of JE22-NPs	107
3.3.4. Synthesis and characterization of the fluorescent nanodevice.....	109
3.3.4.1. Preparation of JE22-Cy5-NPs	109
3.3.4.2. Physicochemical characterization of JE22-Cy5-NPs	110
3.3.4.3. Efficiency of conjugation of JE22 and Cy5 for JE22-Cy5-NPs	111
3.3.5. Evaluation of efficiency of the designed nanodevice JE22-NPs for antitumor activity. Assessment of biological activity of JE22-NPs	112
3.3.6. Evaluation of efficiency of the designed nanodevice for the inhibition of CD44 receptor binding	117
3.3.6.1. Analysis of the interaction of the designed nanodevice JE22-NPs with CD44+ cells by confocal microscopy.....	117
3.3.6.2. Assessment of CD44-binding capacity.....	118
3.3.6.3. Influence of JE22-NPs in migration of CD44+ cells.....	119
3.3.6.4. Apoptotic activity of JE22-NPs	120

3.3.7. In-depth study of the mechanism of action of compound JE22	122
3.3.7.1. Preparation of CD44-HABD	122
3.3.7.2. STD NMR spectroscopy studies.....	124
3.3.7.3. DMR studies	127
4. Materials and methods	131
4.1. General	131
4.1.1. Chemistry	131
4.1.2. Biology.....	132
4.1.2.1. Cell culture	132
4.1.2.2. Flow cytometry analysis of CD44 expression.....	132
4.1.2.3. Cell viability assays	132
4.1.2.4. HA-FITC binding assay	133
4.1.2.5. Apoptosis assay	133
4.1.2.6. Statistical analysis	134
4.2. Experimental section of chapter 3.1	135
4.2.1. Computational.....	135
4.2.1.1. Systems set up	135
4.2.1.2. Molecular docking calculations.....	135
4.2.1.3. MD simulations	136
4.2.2. Chemistry and characterization	137
4.2.2.1. General procedure for the synthesis of 5-amino (18), 8-amino (19) and 5-hydroxy (23) THIQ intermediates	137
4.2.2.2. General procedure for the synthesis of compounds JE1a-JE1e	138
4.2.2.3. General procedure for the synthesis of compounds JE1f and JE1g	139
4.2.2.4. General procedure for the synthesis of 5-amino (JE2a-JE2g) and 8-amino (JE3a-JE3i) derivatives	140
4.2.2.5. General procedure for the synthesis of compounds JE4a-JE4g , JE5 and JE6	146
4.2.3. Biology.....	149
4.2.3.1. Spheroids assay	149
4.3. Experimental section of chapter 3.2	151
4.3.1. Chemical materials and methods.....	151

4.3.2. Synthesis of intermediate 30	151
4.3.2.1. Synthesis of 3-chloro-1-(2,3-dihydro-1 <i>H</i> -inden-5-yl) propan-1-one (26)...151	
4.3.2.2. Synthesis of 3,5,6,7-tetrahydro- <i>s</i> -indacen-1(2 <i>H</i>)-one (27)	152
4.3.2.3. Synthesis of 8-nitro-3,5,6,7-tetrahydro- <i>s</i> -indacen-1(2 <i>H</i>)-one (28) and 4-nitro-3,5,6,7-tetrahydro- <i>s</i> -indacen-1(2 <i>H</i>)-one (29)	152
4.3.2.4. Synthesis of 1,2,3,5,6,7-hexahydro- <i>s</i> -indacen-4-amine (30).....	153
4.3.3. General procedure for the synthesis of intermediates 41-45	153
4.3.4. Synthesis of 4-chlorosulfonyl benzoic acid methyl ester intermediate (39)	155
4.3.5. General procedure for the synthesis of indacenyl tetrahydroisoquinoline carboxamide derivatives JE7-JE11b	156
4.3.6. Synthesis of (<i>S</i>)-4-((3-((1,2,3,5,6,7-hexahydro- <i>s</i> -indacen-4-yl)carbamoyl)-3,4- dihydroisoquinolin-2(1 <i>H</i>)-yl)sulfonyl)benzoic acid (JE12)	159
4.3.7. Synthesis of (<i>S</i>)-2-((4-(dimethylamino)phenyl)sulfonyl)- <i>N</i> -(1,2,3,5,6,7-hexahydro- <i>s</i> - indacen-4-yl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxamide (JE13)	160
4.3.8. General procedure for the synthesis of amine derivatives JE14-JE20 with the general structure of indacenyl tetrahydroisoquinoline carboxamide	161
4.3.9. Synthesis of (<i>S</i>)- <i>N</i> -(1,2,3,5,6,7-hexahydro- <i>s</i> -indacen-4-yl)-2-((4-(piperazin-1- yl)phenyl)sulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxamide (JE21)	165
4.4. Experimental section of chapter 3.3	167
4.4.1. Computational	167
4.4.1.1. Systems set up	167
4.4.1.2. MD simulations.....	167
4.4.2. Chemistry and characterization.....	175
4.4.2.1. Synthesis of 4-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1 <i>H</i>)-yl)butan-2-one (JE22) (Michael addition)	175
4.4.2.2. Synthesis of 4-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1 <i>H</i>)-yl)butan-2-ol (JE23).....	176
4.4.2.3. Synthesis of 3-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1 <i>H</i>)-yl)propanoic acid (JE24)	176
4.4.2.4. General procedure for the synthesis of compounds JE25 and JE22 (Nucleophilic substitution)	177
4.4.2.5. Synthesis of Naked-NPs (52).....	178
4.4.2.6. Characterization of Naked-NPs (52)	178
4.4.2.7. Determination of NPs concentration (NPs/ μ L) by spectrophotometric method	179

4.4.2.8. Preparation of therapeutic polymeric nanoparticles JE22-NPs	179
4.4.2.9. Preparation of therapeutic and fluorescent nanoparticles JE22-Cy5-NPs	181
4.4.2.10. Characterization of JE22-NPs and JE22-Cy5-NPs	183
4.4.2.11. Stability study of JE22-NPs	183
4.4.2.12. Determination of conjugation efficiency (CE) of JE22 for JE22-NPs and JE22-Cy5-NPs	183
4.4.2.13. Determination of CE of Cy5 for JE22-Cy5-NPs	184
4.4.2.14. Evaluation of drug release profile of JE22-NPs	184
4.4.2.15. Fluorescence determination of JE22-Cy5-NPs by flow cytometry	185
4.4.2.16. Fluorescence determination of JE22-Cy5-NPs by confocal laser microscopy	185
4.4.3. Biology.....	185
4.4.3.1. Study of pH effect on MDA-MB-231 cell viability	185
4.4.3.2. Confocal microscopy analysis	185
4.4.3.3. Wound healing assay	186
4.4.4. Expression and purification of <i>HsCD44</i> -HABD	186
4.4.5. STD NMR spectroscopy studies.....	187
4.4.6. DMR studies	187
4.4.6.1. Drugs and reagents	187
4.4.6.2. Cells	187
4.4.6.3. DMR assay.....	187
4.4.6.4. Data analysis	188
5. Conclusiones/Conclusions	189
6. Bibliography	193
Apéndices	227
Apéndice 1. Derechos, permisos y creación de figuras.....	227
Apéndice 2. Espectros de RMN ¹ H y ¹³ C	229

Abreviaturas

4-MU:	4-metilumbeliferona
AcOEt:	Ethyl acetate
AIBN:	Azobisisobutyronitrile
BSA:	Bovine Serum Albumin
CD44:	Cluster de Diferenciación 44
CD44s:	Isoforma CD44 estándar
CD44v:	Isoforma CD44 variante
CE:	Conjugation Efficiency
CGenFF:	CHARMM General Force Field
CHARMM:	Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics
COX2:	Ciclooxigenasa 2
CRC:	Concentration Response Curve
CSC:	Células madre cancerígenas (Cancer Stem Cells)
Cy7:	Cianina 7
DCE:	Dichloroethane
DCM:	Dichloromethane
Dde:	Etil 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)
DIC:	<i>N,N'</i> -diisopropylcarbodiimide
DLS:	Dispersión de luz dinámica (Dynamic Light Scattering)
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF:	Dimetilformamida
DMR:	Redistribución de masa dinámica (Dynamic Mass Redistribution)
DMSO:	Dimethyl sulfoxide
DVB:	Divinilbenceno
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EC ₅₀ :	Half maximal Efficacy Concentration
EGFR:	Receptor del factor de crecimiento epidérmico (Epidermal Growth Factor Receptor)
EMT:	Transición Epitelio-Mesénquima
Eq.:	Equivalent
ERM:	Ezrina, Radixina y Moesina
ESI-TOF:	Electrospray Ionization Time-Of-Flight
FAK:	Vía de la quinasa de adhesión focal (Focal Adhesion Kinase)
FBS:	Fetal Bovine Serum
FDA:	Administración de alimentos y medicamentos (Food and Drug Administration)
FGF:	Factor de crecimiento de fibroblastos (Fibroblast Growth Factor)
Fmoc:	9 <i>H</i> -fluoren-9-il-metoxicarbonilo
GAGs:	Glicosaminoglicanos
GDP:	Guanosín difosfato (Guanosine Diphosphate)
GEM:	Group Epitope Mapping
GFP:	Proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein)
GlcNAc:	<i>N</i> -acetil-D-glucosamina

GlcUA:	Ácido D-glucurónico
HA:	Ácido Hialurónico o hialuronano
HA ₈ :	Octosacárido de HA
HABD:	Dominio de unión al HA (Hyaluronan Binding Domain)
HA-FITC:	Fluorescein-labelled HA
HASs:	Hialuronano Sintetasas
HBEGF:	Factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina (Heparin-Binding EGF-like Growth Factor)
HEPES:	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazine- <i>N'</i> -ethanesulfonic acid
HMW-HA:	HA de alto peso molecular (High Molecular Weight HA)
HPLC:	Cromatografía Líquida de alta eficacia (High Performance Liquid Chromatography)
HRMS:	High-Resolution Mass Spectrometry
Hs:	Human
HYALs:	Hialuronidasas
IC ₅₀ :	Concentración Inhibitoria semimáxima
IgG1:	Inmunoglobulina G1
IPTG:	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
K _D :	Constante de disociación
LC:	Loading Capacity
LE:	Eficiencia del Ligando
LGA:	Lamarckian Genetic Algorithm
LMW-HA:	HA de bajo peso molecular (Low Molecular Weight HA)
LYVE1:	Receptor de HA endotelial de los vasos linfáticos
MAPK/ERK:	Vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (Mitogen-Activated Protein Kinases/Extracellular signal Regulated Kinases)
MBP:	Maltose-Binding Protein
MCT:	Transportador de Monocarboxilatos
MD:	Molecular Dynamics
MDR1:	Proteína de resistencia a múltiples fármacos 1 (Multidrug Resistance Protein 1)
MFI:	Mean Fluorescence Intensity
Mm:	Mouse
MMP:	Metaloproteinasas de Matriz
mRNA:	ARN mensajero (messenger RNA)
MSA:	Methanesulfonic Acid
n-DMR:	Negative DMR
NK:	Naked
NMR:	Nuclear Magnetic Resonance
NPs:	Nanopartículas
NPT:	Constant-Temperature, constant-Pressure ensemble
ns:	Nanosecond
OD:	Densidad Óptica
oHA:	Pequeños oligosacáridos de HA
OMS:	Organización Mundial de la Salud
PBS:	Phosphate Buffered Saline
PCA:	Principal Component Analysis
PCs:	Principal Components
PDA:	Photo Diode Array
PDGF:	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (Platalet Derived Growth Factor)

PDI:	Índice de Polidispersidad
p-DMR:	Positive DMR
PES:	Potential Energy Surface
PI:	Propidium Iodide
PI3K:	Vía fosfatidilinositol-3-quinasa (Phosphoinositide 3-Kinase)
PIP3:	Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (Phosphatidylinositol 3,4,5-Triphosphate)
PIPES:	Piperazine- <i>N,N'</i> -bis(2-ethanesulfonic acid)
PLGA:	Ácido poli(láctico-co-glicósido)
pm:	Picometer
ppm:	Parts per million
PtO:	Platinum Oxide
PVP:	Polyvinylpyrrolidone
QM:	Quantum Mechanics
RHAMM:	Receptor de Motilidad Mediado por HA
RMSD:	Root Mean Square Deviation
RMSF:	Root Mean Square Fluctuation
ROS:	Especies reactivas de oxígeno (Reactive Oxygen Species)
SC:	Solid Content
SDS-PAGE:	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SEM:	Microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy)
SEM:	Standard Error of the Mean
shRNA:	ARN de horquilla corta (short hairpin RNA)
siRNA:	ARN de silenciamiento (silencing RNA)
SPPS:	Síntesis en fase sólida de péptidos (Solid Phase Peptide Synthesis)
SPR:	Resonancia de Plasmón de Superficie
STAT3:	Tranductor de Señal y Activador de la Transcripción 3
STD:	Diferencia de transferencia de saturación (Saturation Transfer Difference)
TEA:	Triethylamine
TEM:	Microscopía electrónica de transmisión (Transmission Electron Microscopy)
TEV:	Tobacco Etch Virus Protease
TFA:	Trifluoroacetic Acid
TGF- β :	Factor de crecimiento transformante β (Transforming Growth Factor β)
THF:	Tetrahydrofuran
THIQ:	Tetrahidroisoquinolina (Tetrahydroisoquinoline)
TIP3P:	Transferable Intermolecular Potential with 3 Points
TLC:	Thin Layer Chromatography
TLR:	Receptores de tipo Toll
TOP2:	Topoisomerasa II
t_R :	Retention Time
TSG6:	Proteína del gen 6 inducible por el factor de necrosis tumoral
UDP:	Uridina difosfato (Uridine Diphosphate)
uPA:	Activador del plasminógeno de tipo uroquinasa
VBAH:	Vinyl Benzyl Amine Hydrochloride
VEGF:	Factor de crecimiento endotelial vascular (Vascular Endothelial Growth Factor)
VMD:	Visual MD

Resumen

El cáncer representa un grave problema clínico en la sociedad actual y un reto para la comunidad científica. Esta enfermedad es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en España. El ácido hialurónico o hialuronano (HA) desempeña un papel fundamental en el crecimiento, migración e invasión de tumores malignos. Las funciones del HA están mediadas por su interacción con el cluster de diferenciación 44 (CD44) y otras hialadherinas. Numerosos estudios científicos han destacado el papel de CD44 y su expresión en cantidades anómalas en la mayoría de tumores sólidos humanos. La interacción HA-CD44 está asociada a determinadas patologías que incluyen el cáncer y la inducción de angiogénesis. Además, en condiciones patológicas se promueven modificaciones postranslacionales que dan lugar a isoformas del receptor CD44 con una mayor capacidad de unión al HA, lo que conduce a una mayor tumorigenicidad.

Aunque se han propuesto diferentes estrategias para inhibir la unión entre el HA y el CD44, pocos trabajos se han centrado en el desarrollo de pequeñas moléculas como inhibidores de la interacción. La tetrahidroisoquinolina (THIQ) es una de las primeras estructuras no glucosídicas que ha mostrado actividad inhibitoria en la interacción HA-CD44, por lo que ha sido nuestra base para el desarrollo y optimización de nuevos inhibidores.

El empleo de nanotecnología ofrece numerosas ventajas en el tratamiento del cáncer. Dirigir el fármaco selectivamente a las células tumorales y reducir su exposición al tejido sano conlleva una notable disminución de los efectos tóxicos tan acusados de las actuales terapias antitumorales.

El objetivo general de esta tesis doctoral es el desarrollo de nuevos inhibidores de la interacción HA-CD44 así como el diseño de un nanosistema que permita su liberación selectiva en células tumorales.

El diseño de los inhibidores se ha realizado utilizando los datos cristalográficos existentes. Se han sintetizado tres series de compuestos derivados de THIQ. Específicamente, derivados de *N*-aril (serie A), derivados de 3-(indacen-4-ilcarbamoil)-2-arilsulfonil (serie B) y derivados de *N*-alquil (serie C) THIQ. Se ha evaluado la actividad de los compuestos frente a diferentes líneas tumorales y se ha analizado la interacción de los compuestos más potentes con el CD44. Se ha llevado a cabo un estudio más exhaustivo del mecanismo de acción de uno de los inhibidores mediante estudios de espectroscopía resonancia magnética nuclear de diferencia de transferencia de saturación (STD

NMR, acrónimo del inglés *saturation transfer difference nuclear magnetic resonance*) y redistribución de masa dinámica (DMR, acrónimo del inglés *dynamic mass redistribution*).

Para dirigir de forma selectiva este inhibidor al tejido tumoral, se han utilizado nanoesferas de poliestireno debido a su biodisponibilidad y facilidad de funcionalización. Tras la conjugación con el inhibidor seleccionado se ha llevado a cabo la evaluación de la eficacia del nanosistema en términos de capacidad para liberar el inhibidor y sus efectos hacia células tumorales.

Abstract

Cancer represents an unmet clinical need and an intellectual challenge for the scientific community. It is one of the main causes of morbidity and mortality in Spain. Hyaluronic acid or hyaluronan (HA) plays a key role in the growth, migration and invasion of malignant tumors. HA functions are mediated by its interaction with cluster of differentiation 44 (CD44) and other hyaladherins. Many scientific studies have emphasized the role of CD44 and its expression in abnormal amounts in the majority of human solid tumors. HA-CD44 interaction is associated with certain pathologies including cancer and induction of angiogenesis. In addition, pathological conditions promote alternate splicing and post-translational modifications to produce diversified CD44 molecules with enhanced HA binding, leading to increased tumorigenicity.

Although different strategies have been proposed to inhibit the binding between HA and CD44, limited work has focused on the development of small molecules as inhibitors of the HA-CD44 interaction. Tetrahydroisoquinoline (THIQ) is one of the first non-glycosidic structures that has shown inhibitory activity on HA-CD44 interaction and is therefore our basis for the development and optimization of new inhibitors.

Nanotechnology has made a remarkable contribution to cancer therapy. In order to provide more effective and safer treatments, a wide variety of nanostructures have been explored to selectively carry and deliver drugs into the targeted cell or tissue. Thus, the exposure of noncancerous tissue to the drug is reduced, leading to less toxicity.

The general objective of this doctoral thesis is the development of new inhibitors of HA-CD44 interaction and the design of a nanosystem that allows its selective release in tumor cells.

The inhibitors have been designed using existing crystallographic data. Three series of THIQ-derived compounds have been synthesized. Specifically, *N*-aryl (A series), 3-(indacen-4-ylcarbamoyl)-2-arylsulfonyl (B series) and *N*-alkyl (C series) THIQ derivatives. The activity of the compounds has been evaluated against different tumor lines and the interaction of the most potent compounds with CD44 has been analyzed. Further study of the mechanism of action of one of the inhibitors has been carried out using saturation transfer difference nuclear magnetic resonance spectroscopy (STD NMR) and dynamic mass redistribution (DMR) studies.

To selectively target this inhibitor to tumor tissue, polystyrene nanospheres have been used due to their bioavailability and easy functionalisation. After conjugation with the selected inhibitor, the efficacy of the nanosystem was evaluated in terms of its ability to release the inhibitor and its effects on tumor cells.

1. Introducción

1.1. Cáncer

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define cáncer, también llamado neoplasia o tumor maligno, como un término genérico que designa a un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo. Se caracterizan por el crecimiento descontrolado de células alteradas, que con frecuencia se extienden más allá de sus límites habituales. Al invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos se denomina metástasis, que son la principal causa de muerte por cáncer.¹

1.1.1. Epidemiología del cáncer

El cáncer es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a escala mundial, tan solo por detrás de las enfermedades cardiovasculares. En 2020 se registraron alrededor de 19,3 millones de nuevos casos, lo que supone que el 20% de la población padeció algún tipo de cáncer. Se prevé que en los próximos 20 años se genere un aumento hasta los 27 millones de nuevos casos.² Es destacable que en las últimas décadas la incidencia del cáncer se esté incrementando rápidamente por todo el mundo, siendo una de las principales causas de muerte en los países más desarrollados. Se estima que el número de defunciones a causa del cáncer en 2020 fue de 10 millones de personas produciendo una de cada seis muertes en todo el mundo.^{2,3} En el año 2020, los tumores más frecuentemente diagnosticados en el mundo fueron los de mama, pulmón, colorrectal, próstata y estómago (Figura 1A). Por otro lado, el cáncer de pulmón es el tipo de cáncer que produce un mayor número de muertes, seguido del cáncer de colorrectal, hígado, estómago y mama. Aunque se han descrito más de 100 tipos de cáncer, estos cinco representan más de la mitad del número total de defunciones por esta enfermedad (Figura 1B).^{2,4}

El cáncer es la segunda causa de muerte en España, en 2020 se registraron 113.000 defunciones y se estima que la mortalidad por cáncer se incrementará a más de 160.000 casos en 2040.⁵

A pesar de estos datos, el aumento de la morbilidad del cáncer viene acompañado de una disminución gradual en su mortalidad. Este hecho se asocia con la mejora de los sistemas de diagnóstico y de los tratamientos empleados, al descubrimiento de nuevas dianas y al desarrollo de

terapias innovadoras. Sin embargo, el progresivo aumento de la incidencia y la resistencia a los tratamientos convencionales hacen que sea necesaria una investigación continua que permita comprender mejor los mecanismos biomoleculares que desencadenan la aparición, desarrollo y diseminación de las células tumorales.⁴

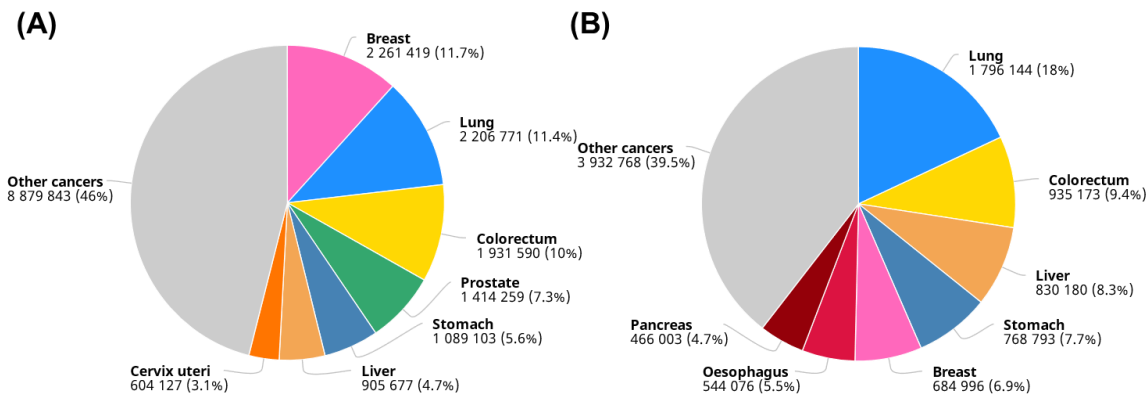


Figura 1. Estimación del número de casos y muertes por cáncer en 2020. **(A)** Estimación del número de casos en 2020 englobando todo tipo de tumores, ambos sexos y edades. **(B)** Estimación del número de muertes en 2020 incluyendo todos los tumores, sexos y edades. Adaptación de la ref. 3.

1.1.2. Características del cáncer

El cáncer es una enfermedad heterogénea que engloba a diferentes tipos de células. La mayoría de los cánceres están compuestos por células que contribuyen a la progresión del tumor y a la metástasis. Además de las células cancerosas y las células madre cancerígenas (CSC, acrónimo del inglés *cancer stem cells*), también hay que destacar a las células inmunitarias inflamatorias, los fibroblastos asociados al cáncer, las células endoteliales que generan la vasculatura tumoral y los pericitos que la sustentan.⁶ Estas células tumorales se originan a partir de un proceso de varias etapas que suele consistir en la progresión de una lesión precancerosa a una masa celular diferenciable denominada tumor, invadiendo los tejidos y los órganos sanos y, finalmente, diseminándose por todo el cuerpo, alcanzando el sistema circulatorio y/o linfático originando metástasis.⁷ Las células tumorales se caracterizan por el mantenimiento de la señalización proliferativa, auto-renovación e invasión y colonización de zonas normalmente reservadas a otras células.^{6,8} Además, presentan una menor especialización que las células sanas, por lo que no se diferencian en células con una función específica, esto es uno de los motivos por los que las células tumorales se dividen indiscriminadamente.^{6,9} Asimismo, las células tumorales estimulan la formación de vasos sanguíneos alrededor de los tumores con el objetivo de obtener nutrientes y de formar un microambiente favorable para el crecimiento del tumor.¹⁰ Estas propiedades junto a la evasión de la supresión del crecimiento, la inmortalidad replicativa que permite a las células tumorales evadir la

senescencia y la muerte celular desregularizando la función de los telómeros y la resistencia a la muerte celular o apoptosis que sirve como barrera natural contra el desarrollo del cáncer, constituyen las seis señales de identidad del cáncer (Figura 2).^{6,8} En 2011, Hanahan y Weinberg actualizaron las señales de identidad del cáncer incluyendo dos características emergentes y dos factores habilitantes a las propuestas originalmente. El primer grupo engloba la desregulación de la energía celular mediante desajustes del metabolismo energético que favorecen el crecimiento y la división celular, y la evasión de la respuesta inmunitaria. Por último, estos autores añadieron dos factores habilitantes que son cruciales en la adquisición de todas las características mencionadas previamente. La inestabilidad genómica, que confiere ventajas selectivas y el dominio de ciertos clones de células en un entorno tisular local, y la inflamación, que aporta moléculas bioactivas al microambiente tumoral contribuyendo al desarrollo de varias de las características anteriores (Figura 2).^{6,11}

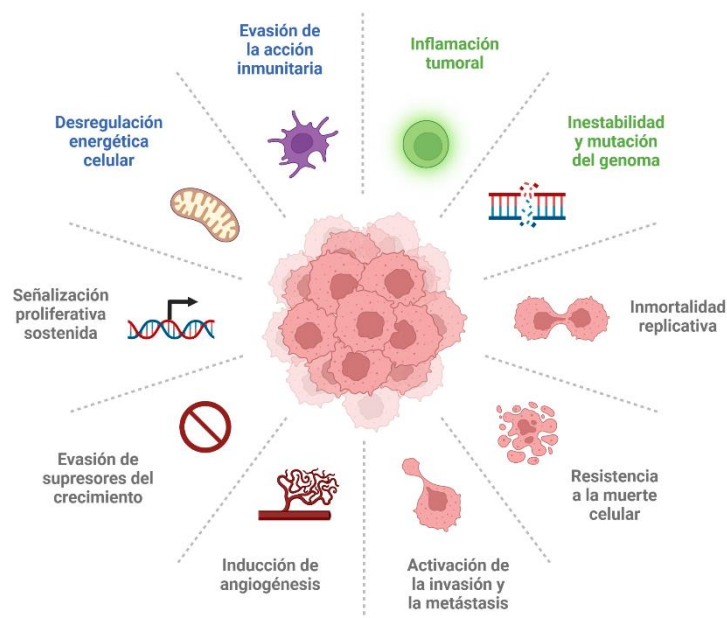


Figura 2. Las diez señales de identidad que los tumores adquieren durante el proceso carcinogénico. En un primer lugar se describieron, el mantenimiento de la señalización proliferativa, la evasión de la supresión de crecimiento, la inducción de la angiogénesis, la activación de la invasión y la metástasis, la resistencia a la muerte celular y la inmortalidad replicativa (gris). Más de una década después, se introdujeron dos propiedades nuevas (la desregulación de la energía celular y la evasión de la respuesta inmunitaria, en azul) y dos factores habilitantes del cáncer (la inflamación y la inestabilidad y mutación del genoma, en verde). Adaptación de la ref. 11.

La alteración en el metabolismo energético celular causado por la disfunción mitocondrial, hace que sea posible considerar al cáncer como una enfermedad metabólica. Las células cancerosas metabolizan la glucosa de forma distinta a las células normales; aun en presencia de oxígeno, las células tumorales tienen un metabolismo basado en la obtención de glucosa, glucólisis, producción

de lactato y poca obtención de ATP a diferencia de las células normales que producen gran cantidad de ATP mediante respiración mitocondrial. Esto implica que el rendimiento energético de las células tumorales sea mucho menor, obligándolas a captar cantidades masivas de glucosa para crecer. Esta desviación del metabolismo energético se conoce como efecto Warburg.¹²

1.1.3. Carcinogénesis, invasión y metástasis

La carcinogénesis es el proceso por el que una célula normal se transforma en cancerosa debido a mutaciones en el material genético, originando clones con mayor capacidad de proliferación, supervivencia y crecimiento. Aunque el origen clonal de los tumores no implica que una célula sea cancerosa, el desarrollo del cáncer es un proceso multietapa donde las células se convierten en malignas progresivamente después de una acumulación gradual de mutaciones.⁷ Las células del sistema inmune normalmente son capaces de eliminar esos procesos tumorales, sin embargo, algunos de los clones pueden evadir los mecanismos de control mediante la adquisición de distintas capacidades. Una única célula puede desencadenar un tumor maligno mediante errores en la replicación del ADN, esto se da principalmente por inestabilidad genómica, transferencia de genes y cambios en el microambiente celular.⁶ De media hay aproximadamente de treinta a sesenta mutaciones somáticas en el momento de la detección de un cáncer.¹³ Estas mutaciones pueden ser heredadas o adquiridas de *novo* por exposición a carcinógenos externos. Estos agentes pueden clasificarse en tres tipos; carcinógenos físicos (radiaciones ultravioletas e ionizantes), carcinógenos químicos (amianto, componentes del humo del tabaco, contaminantes de los alimentos y del agua de bebida) y carcinógenos biológicos (determinados virus, bacterias y parásitos).^{1,6}

Aproximadamente el 40% de los nuevos casos detectados y el 60% de las muertes pueden evitarse mediante el control de los principales factores de riesgo conductuales y dietéticos (índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y de alcohol).^{14,15} Por otro lado, el envejecimiento es otro elemento fundamental en la aparición del cáncer ya que da lugar a la pérdida de eficacia de los mecanismos de reparación celular y a la acumulación general de factores de riesgo.¹

En el proceso carcinogénico las células portan fenotipos necesarios para la malignidad, debido a que se seleccionan positivamente los fenotipos asociados con un mayor crecimiento y supervivencia celular.¹⁶ Esta transformación consta de tres fases: iniciación, promoción y progresión.

- **Iniciación.** Durante esta etapa se producen mutaciones en el ADN de las células por acción de carcinógenos que llevan a cabo la activación de oncogenes y/o a la inactivación de genes supresores de tumores. Así, las células tumorales pierden su capacidad para regular el ciclo

celular, viéndose alterada la maquinaria celular implicada en su regulación lo que lleva a la proliferación celular descontrolada y a la inhibición de la apoptosis.

- Promoción. Esta se caracteriza por la expansión clonal de las células que sufrieron esas modificaciones genéticas, observándose un aumento de la proliferación y una disminución de la muerte celular.
- Progresión. Las células siguen dividiéndose sin control, generando errores en la replicación y mutaciones en el ADN, que hacen que las células pierdan su grado de diferenciación y adquieran además nuevas capacidades biológicas que permitan al tumor crecer e invadir otros tejidos.¹⁷

Una vez originado el tumor, la malignidad de este depende de la capacidad de infiltración y metástasis. Este proceso comprende las siguientes etapas: activación de la transición epitelio-mesénquima (EMT), invasión local, intravasación, circulación por el torrente sanguíneo, extravasación y supervivencia de las células cancerosas en el órgano receptor.¹⁸ Normalmente, dadas las diferencias entre el lugar del tumor primario y del órgano receptor, es necesario un nicho metastásico, que facilite las condiciones necesarias para la supervivencia de las células tumorales. La formación del nicho metastásico incluye la modificación de la matriz extracelular, la remodelación de la red vascular, la participación de células no cancerosas (células de la médula ósea, células endoteliales, fibroblastos...) y la expresión de moléculas de señalización (fibronectina, tenascina-c, periostina...). Asimismo, el desarrollo tumoral crea un ambiente proinflamatorio, que consta de quimiocinas, factores de crecimiento, metaloproteinasas que degradan la matriz extracelular (MMPs) y agentes que dañan el ADN.^{6,18}

Cada célula sana posee una serie de genes que participan en la regulación de su crecimiento y división celular. En el inicio de la progresión tumoral, intervienen dos clases de genes fundamentales:

- Proto-oncogenes: son genes que codifican para proteínas clave en la proliferación y la diferenciación celular y se encuentran en estado inactivo. Cuando se activan, inducen división celular incontrolada. Los mecanismos de activación de proto-oncogenes a oncogenes son mutaciones puntuales, inserciones o traslocaciones cromosómicas. Tienen herencia dominante, es decir, la mutación de uno de los alelos es suficiente para manifestar la mutación. Por ejemplo: factores de crecimiento, Ras, factores de transcripción como Myc, Jun y Fas y genes que codifican proteínas reguladoras del ciclo celular como CDK7.
- Genes supresores de tumor: codifican proteínas que inhiben la proliferación celular y normalmente están activos. Cuando sufren una mutación se inhibe la retención del ciclo,

progresa y se facilita el desarrollo de un tumor. Los mecanismos que alteran la función de estos genes son similares a los de activación de los oncogenes; sin embargo, a diferencia de los oncogenes, es necesario la inactivación de los dos alelos para la pérdida de función, siendo así un mecanismo de carácter recesivo. Por ejemplo: *p53*, que detiene la división celular, induce la muerte apoptosis de células anormales y está involucrado en muchos tipos de cáncer y; *RB1*, que es uno de los principales controles del ciclo celular y está involucrado en retinoblastoma, cáncer de hueso, vejiga, pulmón y mama.¹⁹⁻²¹

1.1.4. Retos actuales en el tratamiento del cáncer

Alrededor del 50% de los tumores se pueden evitar reduciendo los factores de riesgo y aplicando estrategias preventivas. También es muy importante una detección precoz de la enfermedad y un tratamiento adecuado de los pacientes. Un diagnóstico correcto del cáncer es fundamental para poder determinar un tratamiento eficaz y adecuado, ya que cada tipo de cáncer necesita de un protocolo específico que puede comprender una o más tipos de modalidades, como la quimioterapia, la radioterapia, la inmunoterapia o la cirugía.²² El objetivo de la terapia antitumoral es conseguir una alta selectividad sobre las células tumorales, es decir, atacar únicamente a dichas células, de esta manera, cuanto mayor conocimiento se tenga sobre la biología de las células tumorales, se podrán diseñar y desarrollar fármacos más selectivos. Aunque se ha producido un gran avance en la comprensión de las bases celulares y moleculares del cáncer, los tratamientos actuales carecen de la especificidad necesaria para eliminar las células tumorales sin ocasionar efectos adversos graves.²³

Por otro lado, se ha demostrado como algunos de los primeros fármacos eran capaces de eliminar tumores, pero en la mayoría de los casos no eliminaban las CSCs. Las CSCs han experimentado continuos procesos de auto-renovación y diferenciación, desarrollando mecanismos de protección frente a agentes xenobióticos. Los estudios actuales remarcan que este tipo de células se encuentra en bajos porcentajes y en estado quiescente, lo que hace que sea muy difícil su identificación por parte de fármacos quimioterapéuticos, que generalmente actúan sobre células sometidas a procesos de división descontrolada. Las CSCs no aparecen en estos procesos de división incontrolada, por lo que muestran “inmunidad” hacia este tipo de terapias. Además, en algunos casos resulta difícil identificar el origen de las mutaciones debido a la gran alteración genética que se refleja en un fenotipo canceroso. Aunque ciertos mecanismos epigenéticos indican que la hipermetilación y la hipometilación del ADN están relacionadas con el desarrollo del cáncer, es difícil encontrar terapias epigenéticas selectivas que controlen estos mecanismos sin provocar alteraciones completas en el genoma humano.²⁴

La falta de modelos químicos útiles para el desarrollo de agentes antitumorales, la necesidad urgente de nuevos fármacos para contrarrestar la amplia propagación del cáncer y el desarrollo de la resistencia a múltiples fármacos, justifica y promueve la búsqueda de nuevas sustancias químicas que puedan servir como prototipos para diseñar nuevos agentes antitumorales. Por lo tanto, un objetivo primordial para la comunidad científica es proporcionar nuevos agentes más eficaces y selectivos para el cáncer dada su alta incidencia entre la población, para ello se persiguen principalmente los siguientes objetivos específicos:

- a) Reducir los efectos adversos de los fármacos actuales con los consecuentes beneficios para la población afectada por esta patología y la disminución en el uso de recursos para mitigar tales efectos.
- b) Proporcionar fármacos capaces de disminuir el potencial metastásico de las células tumorales mejorando así el resultado y la calidad de vida de los pacientes afectados por el cáncer.

Los receptores de superficie celular interaccionan con biomoléculas que tienen un papel importante en la proliferación, migración, diferenciación celular y apoptosis, entre otros procesos relacionados con el cáncer. Por lo tanto, la interacción de estos receptores con las moléculas bioactivas del entorno extracelular resulta ser una diana farmacológica muy interesante con el objetivo de conseguir una terapia dirigida.²⁵

1.2. HA

El HA es un polímero lineal no ramificado de carácter natural que se aisló por primera vez en 1934 a partir del humor vítreo del ojo bovino.²⁶

Pertenece a un grupo de heteropolisacáridos llamado glicosaminoglicanos (GAGs). Todos los GAGs poseen una estructura basada en la repetición de unidades de disacárido de un aminoazúcar y un ácido urónico. En concreto, el HA es un GAG no sulfatado y su estructura está constituida por unidades repetidas de un disacárido de *N*-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) y ácido D-glucurónico (GlcUA) que se unen por enlaces β -(1,3)-glicosídicos. La unión entre los disacáridos tiene lugar mediante enlaces β -(1,4)-glicosídicos (Figura 3A).^{27,28} Cuando ambos monosacáridos se encuentran en configuración β , se forma una estructura muy estable, al situarse los grupos radicales voluminosos (hidroxilo, carboxilo y acetamido) en una posición ecuatorial favorable desde el punto de vista estérico. A diferencia del resto de GAGs, que presentan diferentes isómeros debido a la distribución de sus grupos sulfato, el HA solo puede variar la longitud de sus cadenas y su grado de

pureza al carecer de ellos. El HA normalmente se encuentra en forma de cadena libre, mientras que otros GAGs se enlazan covalentemente a proteínas formando proteoglucanos. A veces, se pueden encontrar en la matriz extracelular aglomeraciones de proteoglucanos unidos de forma indirecta a moléculas de HA formando complejos.^{26,28}

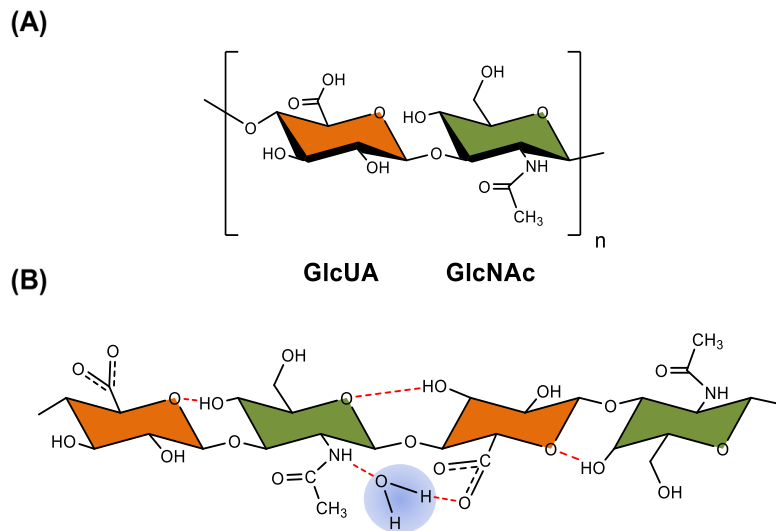


Figura 3. (A) Estructura química del HA formada por unidades repetidas del disacárido de GlcUA (naranja) y GlcNAc (verde). (B) Estructura secundaria de un tetrasacárido de HA. El agua interacciona con el HA mediante la formación de enlaces de hidrógeno representados con líneas rojas discontinuas.

El HA posee un amplio rango de pesos moleculares (1-10.000 kDa) y está presente en todos los vertebrados y en muchas cepas bacterianas. Se distribuye por casi todos los tejidos animales (tejido nervioso, epitelial, embrionario, conectivo, superficies celulares, cordón umbilical, etc) y es responsable de la integridad estructural de los mismos.^{26,29,30} Además, es un componente esencial de la matriz extracelular, donde se encuentra en forma de sal como hialuronato, de alto carácter hidrófilo. Debido a la abundancia de cargas negativas en su estructura, tiene una gran capacidad de hidratación que le permite crear un espacio acuoso en su interior por medio de plegamientos, llegando a tener una proporción de agua asociada mil veces mayor que su peso molecular.³¹ Las moléculas de agua se unen a los grupos carboxilo y acetamido mediante enlaces de hidrógeno para estabilizar la estructura secundaria del polímero, formando una estructura helicoidal levógira de una sola hebra (Figura 3B). Esta estructura le otorga un carácter anfipático, permitiendo formar complejos con fosfolípidos y participando en el transporte molecular transmembrana. En medio acuoso, este polímero puede adquirir una estructura terciaria en forma de doble hélice debido a las interacciones hidrofóbicas entre los anillos y a enlaces de hidrógeno intermoleculares entre los grupos amida y carboxilo de las moléculas adyacentes. El establecimiento de esta estructura depende del peso molecular y de la concentración de HA. Al aumentar estos dos parámetros, se

pueden formar estructuras más fuertes de HA en forma de redes ordenadas y las soluciones acuosas de este biopolímero adquieren una mayor viscosidad y viscoelasticidad. Al ser un polielectrolito, sus propiedades reológicas están influenciadas por cambios en el pH, la temperatura y las fuerzas iónicas. Esto hace que el HA sea especialmente sensible a cambios en el pH, ya que tanto valores excesivamente ácidos o básicos (pHs inferiores a 4 o superiores a 11) degradan el polímero por hidrólisis. Este comportamiento tan característico hace que el HA tenga un rol muy importante en un diverso número de procesos fisiológicos.³²⁻³⁵

Debido a su alta capacidad de hidratación, permite aportar resistencia mecánica, protección y lubricación en los tejidos, considerándose un componente esencial del cartílago articular y del líquido sinovial de las articulaciones. La alta viscoelasticidad que presenta el HA, le permite ser una molécula esencial en el crecimiento y la remodelación tisular gracias a su fácil adaptación a los espacios vacíos.^{26,36}

Por otro lado, gracias a sus propiedades fisicoquímicas, el papel principal de los medios ricos en HA es generar un ambiente que promueva la proliferación, migración celular y transmisión de señales, lo que es de vital importancia durante procesos que implican comunicación y diferenciación de células madres, como en la embriogénesis o la regulación de la hematopoyesis en la médula ósea.³⁶⁻

38

Al participar en la señalización celular y en el transporte de metabolitos entre células, también desempeña un papel clave en muchas condiciones fisiológicas y patológicas, por ejemplo, en el correcto desarrollo cardiovascular, intestinal y esquelético, la homeostasis, la respuesta de reparación frente a una lesión, infección o inflamación de tejido y en el desarrollo tumoral.^{28,31,39}

1.2.1. Metabolismo del HA

El HA tiene un metabolismo muy dinámico. Las células deben mantener un equilibrio entre la síntesis de HA y su degradación para mantener una concentración constante en los tejidos y dar forma al entorno molecular en el que viven. Este balance es fundamental ya que va a dictaminar el peso molecular de las moléculas de HA, un factor clave en el proceso patológico.^{40,41} Existen tejidos donde no se produce un balance total en su metabolismo, si no que predomina uno de los dos procesos metabólicos, por ejemplo, en la dermis, se sintetiza más HA del que se cataboliza.⁴²

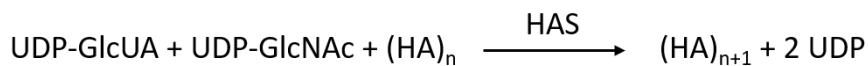
En el ser humano, la cantidad total de HA es de unos 15 g y se estima que alrededor de un tercio del total se metaboliza y renueva diariamente.⁴³ La duración del HA en el organismo difiere según su localización; la vida media del HA en el torrente sanguíneo varía entre 3 y 5 minutos, menos de un día en la piel y entre 1 y 3 semanas en el cartílago.⁴⁴

1.2.1.1. Síntesis del HA

A diferencia de otros GAGs que son sintetizados en el aparato de Golgi en asociación con proteínas, la síntesis del HA se lleva a cabo en la cara interna de la membrana plasmática y puede alcanzar un peso molecular muy alto.²⁸

La síntesis del HA se lleva a cabo mediante la acción de tres hialuronano sintasas (HASs): HAS1, HAS2 y HAS3, unas glicosiltransferasas que tienen su sitio catalítico en la cara interna de la membrana celular. Aunque el HA se sintetiza en la cara citosólica de la célula mediante el empleo de precursores citosólicos, a medida que las sintasas van ensamblando monómeros, se van transfiriendo las cadenas de HA al medio extracelular.⁴⁵ Aunque se considere una molécula predominantemente extracelular, pueden encontrarse trazas intracelulares o moléculas unidas de forma no covalente a glicoproteínas de la superficie de la membrana.^{40,45}

Dorfman y Stoolmiller revelaron en 1969 que los iones de Mg^{2+} eran esenciales en el proceso de formación de las cadenas de HA a partir de sus precursores, uridina difosfato (UDP, acrónimo del inglés *uridine diphosphate*)-GlcNAc y el UDP-GlcUA.⁴⁶ Estas enzimas desarrollan dos procesos enzimáticos en el proceso de polimerización del HA, por un lado, la adición de una unidad de UDP-GlcNAc y por otro, la adición de la unidad de UDP-GlcUA a la cadena de HA. El producto que se genera tras la agregación de cada azúcar se convierte en el sustrato para la siguiente adición (Figura 4). A continuación, se muestra la reacción general de la síntesis del HA:⁴⁵



Para la generación de una unidad de disacárido y la extensión de la cadena de HA, las HASs poseen al menos seis funciones distintas. Dos sitios de unión para los distintos sustratos, dos sitios donde actúan la glucosiltransferasa de GlcUA y GlcNAc, un sitio aceptor para la cadena de UDP-HA que se va formando y, por último, la capacidad para transferir la cadena de HA hacia el exterior. Una vez terminado el proceso, la adición de monosacáridos se repite hasta formar las cadenas de HA con tamaño variable. Los sustratos de UDP son producidos y utilizados por las HASs en el interior de la célula, mientras que la cadena de HA originada es translocada continuamente al exterior de la célula por extrusión a través de un poro de la membrana celular (Figura 4). Antes de su liberación, la cadena de HA puede llegar a tener una masa de más de 8.000 kDa (unos 40.000 monosacáridos). Una vez en el exterior, el HA puede formar complejos con proteínas de unión, originando una capa pericelular a la que se pueden unir otras estructuras.^{45,47,48}

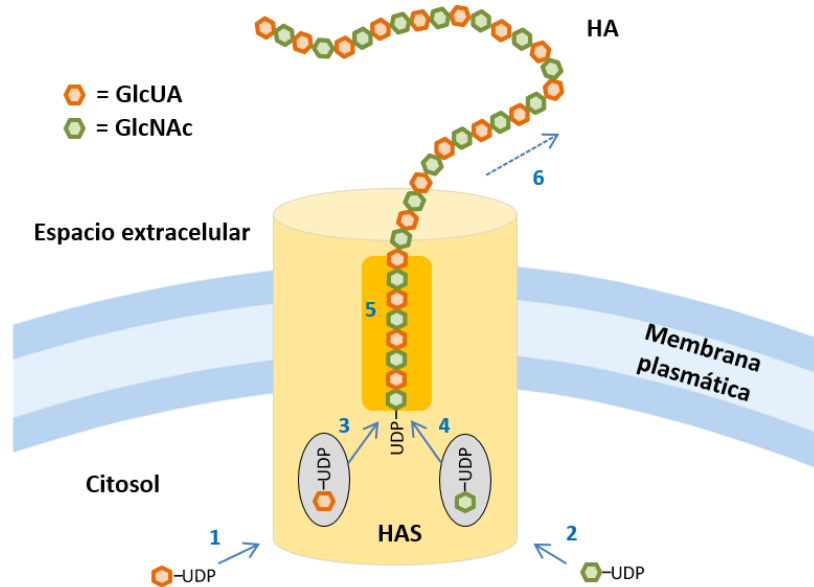


Figura 4. Proceso de polimerización mediante el que las HASs sintetizan el HA y lo transfieren al exterior de la célula. Los números 1-6 representan las distintas funciones que se requieren para que las enzimas ensamblen los monosacáridos (GlcUA, en naranja y GlcNAc en verde) y produzcan las cadenas de HA; 1) sitio de unión a UDP-GlcUA, 2) sitio de unión a UDP-GlcNAc, 3) transferasa β (1,3) GlcUA, 4) transferasa β (1,4) GlcNAc, 5) aceptor de HA y 6) translocación de HA. Adaptación de la ref. 45.

Aunque las tres isoformas de HAS poseen una estructura similar en su secuencia de aminoácidos, las secuencias genéticas que las codifican se encuentran en distintos cromosomas, por lo que la actividad de cada una de ellas está controlada por diversos factores de crecimiento, citoquinas, estrés celular y otras proteínas como quinasas. Los genes que codifican las HASs (*has1*, *has2* y *has3*) responden de forma distinta a las señales de transcripción, por lo que las distintas isoformas difieren entre sí en propiedades bioquímicas, actividad, elongación de producto y estabilidad.⁴⁹ En estudios *in vitro* e *in vivo* se han obtenido variaciones significativas en la síntesis de HA por cada enzima. Se cree que la razón de las diferencias encontradas se debe a que las propiedades enzimáticas de las isoformas son complementarias entre sí, de manera que la síntesis de HA esté regulada a distintos niveles en función de la expresión de las enzimas que la sintetizan. HAS1 y HAS3 muestran mayores niveles de expresión en el hígado, músculo esquelético y corazón, mientras HAS2 se expresa de manera predominante en el intestino delgado y en el corazón.²⁸

La isoforma HAS1 es la menos activa y se encarga de la síntesis de HA de alto peso molecular (HMW-HA, acrónimo del inglés *high molecular weight hyaluronic acid*) (200-2.000 kDa). HAS2 sintetiza cadenas de HA de alto peso molecular (de más de 2.000 kDa) y es crítica para la supervivencia animal ya que la deficiencia de esta enzima en etapas embrionarias se asocia a letalidad. Su acción está asociada a la proliferación celular y puede estar implicada en procesos inflamatorios, cáncer o fibrosis pulmonar. Por último, HAS3 es la isoenzima más activa y se encarga de la síntesis de

moléculas de HA de bajo peso molecular (LMW-HA, acrónimo del inglés *low molecular weight hyaluronic acid*) por debajo de 200 kDa (Figura 5).^{50,51}

Una regulación incorrecta de los genes que codifican estas enzimas puede dar lugar a una producción anormal de HA y producir situaciones patológicas. Se ha observado la sobreexpresión de estas enzimas en carcinomas altamente metastásicos y se ha relacionado con un mal pronóstico en varios tumores humanos. Los patrones de expresión de las HASs se pueden considerar como biomarcadores específicos del cáncer.⁵²

La inhibición de la HAS1 participa en la regulación del cáncer de vejiga ya que disminuye la proliferación de estas células tumorales.⁵³ HAS1 también se ha relacionado con un pronóstico desfavorable en el cáncer de colon. Por otro lado, se ha visto como las células tumorales agresivas de ovario y mama expresan altos niveles de HAS2 en comparación con las células tumorales de menor agresividad. De hecho, los niveles de expresión de HAS están correlacionados con los niveles de estadificación del cáncer de mama y la supervivencia del paciente. En la metástasis de próstata y cáncer de colon se expresan altos niveles de HAS3, lo que hace indicar que la actividad de HAS3 tiene un papel clave en el desarrollo de estos tumores.⁵⁴⁻⁵⁶

Por tanto, el HA, producto de la actividad de las HASs se relaciona positivamente con el fenotipo maligno de las células tumorales. El exceso de HA promueve la proliferación de células malignas y el desarrollo del cáncer.⁵⁷

1.2.1.2. Degradación del HA

Las moléculas de HA se degradan en oligómeros de bajo peso molecular en el organismo mediante dos mecanismos; uno enzimático específico llevado a cabo por hialuronidasas (HYALs) y otro no específico marcado por el daño oxidativo debido a especies reactivas de oxígeno (ROS, acrónimo del inglés *reactive oxygen species*).

Las HYALs poseen un elevado grado de homología en su secuencia aunque difieren en su distribución tisular, ya que pueden ser específicas de un órgano o de amplia distribución. La mayoría son enzimas lisosomales y para alcanzar su actividad máxima van a necesitar un pH ácido. Existen seis tipos de HYAL en humanos; HYAL1, HYAL2, HYAL3, HYAL4, HYAL5 (PH20) e HYAL6 (HYALP1), aunque solo las cinco primeras son funcionales.⁵⁸

HYAL1 y HYAL2 son las principales HYALs expresadas en los tejidos somáticos de los mamíferos, con una homología en su secuencia relativamente alta. HYAL1 también se encuentra en el plasma y se localiza en el interior de los lisosomas donde predomina el pH ácido, fundamental para alcanzar su actividad máxima. En cambio, HYAL2 se encuentra anclada a la superficie celular a través de

glicofosfatidilinositol y a diferencia de HYAL1 puede desarrollar su actividad en un amplio rango de pH. La escisión del HA por parte de HYAL1 y 2 está coordinada y es secuencial. Cuando el HA se encuentra unido a su receptor principal, el CD44, la enzima HYAL2 degrada progresivamente el HMW-HA en fragmentos de 10 a 100 kDa en el exterior de la membrana plasmática. Posteriormente, los fragmentos de HA resultantes de diferente tamaño se hidrolizan por HYAL1 después de ser internalizados en endo-lisosomas, generando pequeños oligosacáridos de HA (oHA) (Figura 5).⁵⁸⁻⁶⁰

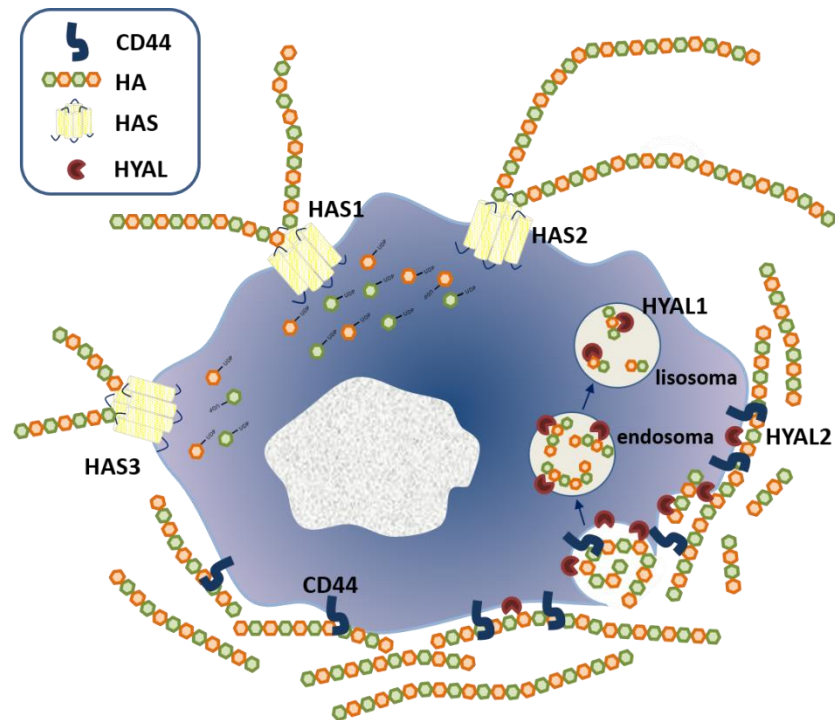


Figura 5. Metabolismo del HA. El HA es sintetizado en la membrana plasmática por HAS1-3 originando cadenas de diferente tamaño de HA. En la biodegradación del HA participan el receptor CD44 y las enzimas HYALs. El HMW-HA se une a la superficie celular por CD44 y es hidrolizado en primer lugar por HYAL2 dando lugar a fragmentos de unos 20 kDa. Posteriormente, estos fragmentos son internalizados y degradados en oligosacáridos más pequeños por HYAL1.

HYAL3 también es expresada, con menos frecuencia, en una amplia gama de células somáticas y en el interior de vesículas. Esta enzima parece que está involucrada en el aumento de la actividad de HYAL1.²⁸

La enzima HYAL4 se encuentra expresada en la placenta y en el tejido muscular y se encarga de degradar predominantemente un GAG sulfatado, el condroitín sulfato. HYAL5 se localiza en el tejido testicular y presenta actividad en un amplio rango de pH, fragmentando el HA en pequeños oligosacáridos de 2 o 3 unidades. Por último, HYAL6, es un pseudogen que se haya en el testículo, pero no es funcional.⁶¹

El impacto positivo de la actividad de las HASs sobre el crecimiento, la migración y la malignidad de la mayoría de los tipos de células tumorales demuestra que las HYALs desempeñan un papel importante como supresores de tumores.⁶²

El HA crea un microambiente tumoral compacto difícil de penetrar, debido a ello, aumenta la presión intersticial en el tumor y se puede bloquear la entrada de agentes quimioterapéuticos y su difusión por la masa tumoral. Como consecuencia de esto, se inhibe la acción terapéutica de los fármacos, es por ello, que el HA está relacionado con los procesos de quimioresistencia. Las HYALs tienen un papel muy importante en este proceso ya que son enzimas que hidrolizan el HA, promoviendo la difusión de los fluidos inyectados en los tejidos y facilitando su absorción. Van a actuar degradando el HA, disminuyendo la presión intersticial del fluido y aumentando así la penetración del fármaco e incrementando su eficacia.^{62,63}

Por otro lado, estudios en cáncer de mama y de próstata han relacionado la sobreexpresión de estas enzimas con la progresión y capacidad invasiva de las células tumorales.^{64,65}

Así como las diferencias en la actividad y regulación de cada enzima son importantes, el tamaño del HA es crítico en el desarrollo del microambiente y progresión tumoral.^{28,40,41}

1.2.2. HA y cáncer

Aunque inicialmente se consideraba al HA una molécula cuyas funciones eran atribuidas exclusivamente a sus propiedades físicas, actualmente se tiene constancia de su dinamismo y de la respuesta dual, dependiendo de la longitud de sus cadenas, al interactuar con moléculas de la membrana plasmática y de la matriz extracelular.²⁸

Las cadenas de HMW-HA se asocian a proliferación y anti-angiogénesis; además, desarrollan labores beneficiosas en procesos inflamatorios, desarrollo y reparación de tejidos controlando los niveles de citoquinas inflamatorias y también están involucradas en los procesos de ovulación, fecundación y embriogénesis; mientras que las cadenas de LMW-HA que son dependientes de diversos factores como la temperatura, concentración de sales, pH o iones específicos, están relacionadas con la producción de citoquinas pro-inflamatorias, la angiogénesis, la estimulación del sistema inmune y la remodelación tisular en el proceso de cicatrización.²⁸

El microambiente que se aprecia en torno al tumor está considerado un factor determinante para el desarrollo tumoral.⁶⁶ El HA, uno de los principales componentes del estroma tumoral y de la superficie de las células tumorales, influye notablemente en procesos de oncogénesis al tener capacidad de modificar este microambiente. Las mutaciones genéticas que conducen al cáncer

regulan la síntesis de componentes de la matriz extracelular de manera anormal, disminuyendo la secreción de proteínas fundamentales y potenciando la retención de algunos metabolitos en las células. Sin embargo y como ya se ha comentado anteriormente, las bases biológicas de la oncogénesis van más allá de las mutaciones genéticas, por lo que el ambiente registrado en las zonas anexas a un tumor también interviene en los procesos de crecimiento, migración tumoral, angiogénesis y en la estimulación de proteasas degradantes de tejidos.⁵⁸

Asimismo, el HA desempeña un papel central en muchos aspectos del desarrollo y progresión del cáncer: el HMW-HA favorece la división, proliferación y la migración de células cancerosas además del reclutamiento intratumoral de fibroblastos y macrófagos asociados a tumores; el LMW-HA se asocia con una mayor agresividad del tumor por la expresión de citoquinas y proteasas que remodelan el microambiente tumoral y; pequeños fragmentos de HA promueven la angiogénesis, oncogénesis y acciones inmunosupresoras mediante la activación de cascadas de señalización fundamentales en el proceso de progresión del cáncer.^{28,67-70}

El aumento de la síntesis de HA origina alteraciones en la matriz extracelular produciendo un aumento de la turgencia y de la hidratación de la misma. A su vez, se incrementa el espacio entre las láminas de las fibras de colágeno, produciendo la disminución de la adhesión celular, el aumento de la motilidad celular y así, la invasividad de las células tumorales. Por tanto, las alteraciones que tengan lugar en el metabolismo del HA durante el desarrollo del tumor, también producirán cambios en el comportamiento y en las propiedades tumorales. Además, se ha visto que el HA participa en la regulación del proceso EMT de las células tumorales, proceso fundamental en la motilidad e invasión de las mismas.⁶¹

El HA forma organizaciones inter e intramoleculares, creando una capa viscosa adecuada para el crecimiento tumoral y la metástasis. La matriz tumoral rica en HA, proporciona integridad estructural, mantenimiento de la homeostasis, liberación de factores de crecimiento, citoquinas y nutrientes esenciales para el desarrollo y la proliferación celular. En general, en condiciones patológicas, este polímero va a favorecer la formación de un medio extracelular óptimo para la expansión e invasión tumoral.⁶¹

Principalmente, cuando interacciona con proteínas de la superficie celular, desempeña un papel clave en cascadas de señalización intracelulares asociadas con el crecimiento del tumor, la adhesión de células tumorales, neovascularización y metástasis.⁵⁶

En diversas patologías de carácter inflamatorio, se ha relacionado el aumento de HA extracelular y de sus oligómeros parcialmente degradados con el desarrollo de inflamaciones y tumores malignos.^{70,71} Por otro lado, se ha demostrado la asociación entre niveles elevados de HA con

pronósticos desfavorables de tumores de estómago, ovario y colorrectal, entre otros. También se han vinculado parámetros patológicos y clínicos de agresividad del cáncer de mama metastásico con concentraciones elevadas de HA.^{54,72-74}

Aunque es complejo el papel del HA en el cáncer debido a que sus efectos a nivel celular dependen de su tamaño y del entorno en el que se encuentre, se puede concluir que muchos efectos protumorigénicos están altamente relacionados con el mismo. Además, las enzimas involucradas en su metabolismo también son de especial relevancia ya que influyen de manera significativa en el comportamiento del HA en la célula.⁷⁵

Como ya hemos comentado anteriormente, el HA pueden interaccionar con distintos tipos de proteínas, que se denominan hialadherinas. Cuando el HA se une a estos receptores se activan una serie de vías de señalización que desencadenan procesos de proliferación, motilidad celular, diferenciación, degradación e internalización del HA en la célula.²⁸ Entre los principales receptores a los que se une el HA se encuentran; el receptor CD44 (su principal receptor y del que hablaremos en la siguiente sección), el receptor de motilidad mediado por HA (RHAMM), receptores de tipo Toll (TLR2 y TLR4), receptores de HA endotelial de los vasos linfáticos (LYVE1), la proteína del gen 6 inducible por el factor de necrosis tumoral (TSG6), otras proteínas y glicoproteínas de la superficie de la membrana plasmática o del plasma sanguíneo.^{28,61}

1.3. Hialadherinas

Las funciones del HA están mediadas a través de diversas hialadherinas que presentan diferencias significativas en su expresión tisular, localización celular y regulación, así como en la afinidad y especificidad por el HA.⁶⁷ Algunas hialadherinas como el CD44 o LYVE1 están asociadas con las membranas celulares, mientras que otras, como TSG6 y otros receptores de adhesión se encuentran en la matriz extracelular o en el citoplasma. La primera hialadherina que se descubrió fue RHAMM, que se expresa en el citoplasma y en el núcleo, también se puede encontrar expresada transitoriamente en la superficie celular de leucocitos y fibroblastos, regulando la migración y proliferación celular mediada por el HA tanto en células normales como tumorales.⁷⁶ Otros receptores de la superficie celular, como los receptores TLR2 y TLR4, están involucrados en la activación de las respuestas inmunitarias innatas al reconocer preferentemente oligosacáridos muy pequeños derivados del HA resultantes de la infección por patógenos que actúan como señales de peligro para el organismo.^{77,78}

Las cadenas de HA son reconocidas por diferentes receptores desencadenando diversas respuestas biológicas.⁴⁹ Las bases moleculares para entender el reconocimiento del HA por parte de estas

proteínas es clave para comprender la biología del HA y las diferentes posibilidades terapéuticas de actuación.

Estructuralmente, la mayoría de las hialadherinas contienen un dominio similar a la lectina de aproximadamente 100 residuos llamado módulo *Link* que es la región por la que el HA se une a las mismas. Entre las hialadherinas que contienen el módulo *Link*, se incluyen el receptor asociado a la membrana LYVE1 que se expresa en el endotelio de los vasos linfáticos y está implicado en la degradación de HA y en el tráfico de células dentro de los vasos y ganglios linfáticos.⁷⁹ Este módulo *Link* también lo incluye TSG6, la hialadherina más pequeña que es secretada en la matriz extracelular en respuesta a estímulos inflamatorios.⁸⁰ TSG6 también puede unirse covalentemente al HA mediante un mecanismo independiente del módulo *Link* favoreciendo la formación de complejos filamentosos periódicos que promueven la adhesión de leucocitos.⁸¹ Algunas hialadherinas, como por ejemplo RHAMM, carecen del módulo *Link* pero contienen el motivo BX₇B que se cree que es el sitio por donde interactúan con el HA y median la migración y proliferación celular en muchas células normales o tumorales.⁸²

1.4. Receptor CD44

El CD44, que también presenta el módulo *Link*, es la hialadherina más caracterizada, tanto estructural como funcionalmente. Es una glicoproteína transmembrana codificada por un único gen que se expresa en la superficie de un amplio abanico de tipos celulares (entre las que se incluyen las células epiteliales, inmunitarias como macrófagos o leucocitos y las del endotelio vascular, entre otras) en una variedad de isoformas diferentes. También se puede encontrar como proteína soluble en los fluidos corporales tras haber sido escindida de la membrana celular. La isoforma que se exprese y el tipo de célula dictan las propiedades de unión del CD44 al HA.^{83,84}

Es el principal receptor de unión al HA y es una molécula multiestructural y multifuncional que participa, entre otras, en interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, en la migración celular, y en la presentación de factores de crecimiento/citoquinas/quimioquinas para coordinar señales que permitan que las respuestas celulares cambien en el entorno tisular.⁸⁵

1.4.1. Estructura proteica del CD44

Estructuralmente, el CD44 está formado por cuatro regiones: dominio extracelular, extracelular próximo a la membrana, transmembrana y citoplasmático (Figura 6).

El dominio extracelular o extremo *N*-terminal de la proteína contiene una secuencia muy conservada en vertebrados (~85% de homología) que consta de seis cisteínas que forman tres enlaces disulfuro, varios sitios de *N* y *O*-glicosilación y el módulo *Link*, la región que tiene en común con las demás hialadherinas. Este dominio también recibe el nombre de sitio de unión al HA (HABD, acrónimo del inglés *hyaluronan binding domain*) y es la zona de unión a los ligandos en todas las isoformas del receptor. En la sección **1.4.5.** se expone de forma detallada la estructura del CD44-HABD y los residuos clave en la unión con el HA.

Próximo a la membrana, se encuentra una región extracelular que contiene una secuencia no conservada (~35% de homología entre especies de mamíferos) que consta de sitios susceptibles tanto para la unión de carbohidratos como para el corte y empalme "*splicing*" alternativo de los exones del gen (proceso de regulación de la expresión génica de las células eucariotas por el que se obtienen diferentes proteínas a partir de un único gen). Es la región donde se encuentran los exones variables y tiene un papel importante en la determinación de las propiedades de unión a la proteína.

El dominio transmembrana sirve de plataforma de formación del CD44 y de unión de cofactores, receptores, quinasas y proteínas adaptadoras. Esta región tiene una homología de un 100% con otras especies de mamíferos.

Por último, el dominio citoplasmático (~85% de homología entre especies de mamíferos) es la región intracelular que contiene el extremo *C*-terminal de la proteína y a través de ella, el CD44 interacciona con ciertas proteínas citoplasmáticas. También sirve de plataforma de unión de diversas proteínas citoesqueléticas como la anquirina, que al interactuar con el CD44 produce la activación de diversas cascadas de adhesión y proliferación celular. Además, esta región contiene una señal de localización nuclear que permite la escisión de CD44 de la membrana y su translocación al núcleo. En general, esta parte de la proteína está involucrada en dos tipos de funciones: (i) las relativas a cambios en la afinidad por su ligando y (ii) las consecuentes tras la unión del ligando a la misma que regulan eventos intracelulares posteriores (Figura 6).^{83,84,86,87}

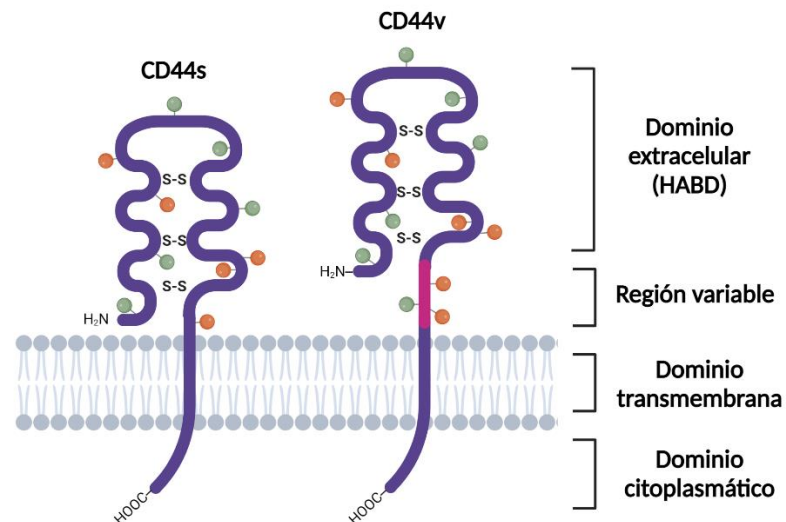


Figura 6. Estructura del CD44. El CD44 puede tener dos isoformas, la estándar (CD44s) y la variante (CD44v). Tiene cuatro dominios bien diferenciados, el HABD extracelular (sitio de unión del HA), la región extracelular próxima a la membrana que es la región variable (representada en rosa) y que solamente está presente en la isoforma CD44v, el dominio transmembrana y el dominio citoplasmático que contiene el extremo C-terminal de la proteína. En naranja y verde están representados los múltiples sitios de O y N-glicosilación, respectivamente.

1.4.2. Gen CD44 e isoformas estándar y variantes

El gen *CD44* (Figura 7A) se localiza en el brazo corto del cromosoma 11 y está formado por 20 exones que determinan la naturaleza de cada uno de los cinco dominios estructurales en los que están agrupados.⁸⁷ El primer dominio contiene los exones 1-5 que codifican para el CD44-HABD, encargado del reconocimiento y de la unión proteína-ligando. El segundo dominio contiene los exones 6-15 que codifican para la región extracelular variable de la proteína y que sufre *splicing* alternativo; el tercer dominio contiene los exones 16 y 17 que codifican para la región extracelular constante proximal a la membrana de la proteína; el cuarto dominio contiene el exón 18 que comprende el dominio transmembrana hidrofóbico y; el quinto dominio incluye los exones 19 y 20 que codifican para la cola citoplasmática que puede sufrir *splicing* alternativo y poseer varias longitudes provocando la interacción con diversas proteínas presentes en el interior celular o modulando señales intracelulares.^{86,88,89}

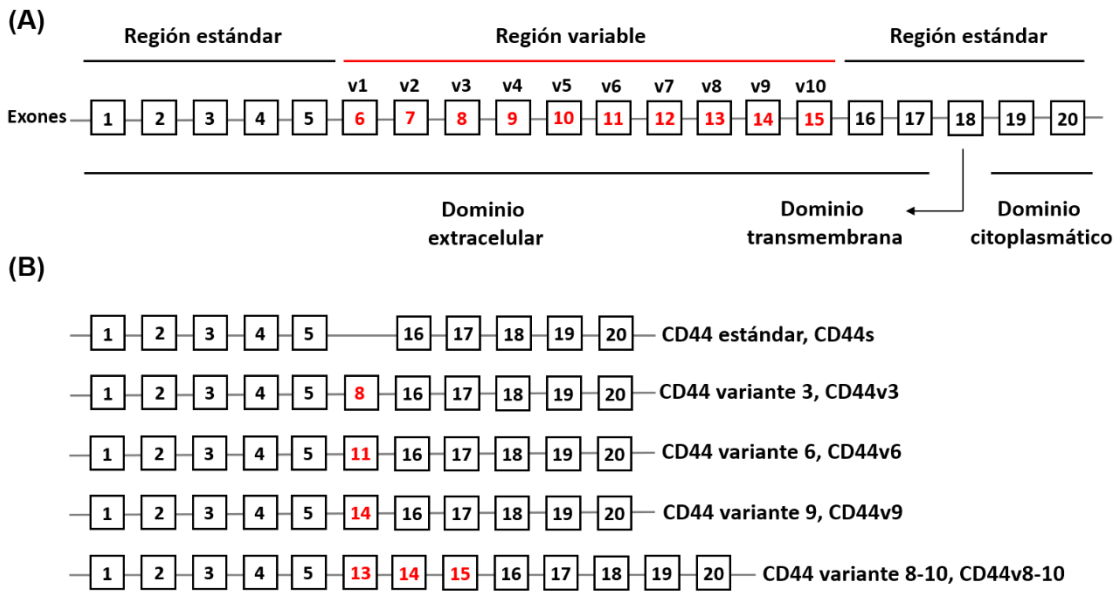


Figura 7. (A) Estructura del gen *CD44*. Consta de dos regiones, la estándar que engloba los exones en negro (1-5 y 16-20) y la región variable que contiene los exones en rojo (6-15). Los exones 1-17 codifican para el dominio extracelular, el exón 18 para el dominio transmembrana y los exones 19-20 expresan el dominio citoplasmático. Dentro del dominio extracelular, los exones 1-5 codifican para el CD44-HABD o sitio de unión a ligandos. El extremo *N* y *C*-terminal lo codifican los exones 1 y 20 respectivamente. **(B)** Estructura génica de algunas de las isoformas más importantes de *CD44*; *CD44s*, *CD44v3*, *CD44v6*, *CD44v9* y *CD44v8-10*. La isoforma estándar carece de la región variable, mientras que las isoformas variantes contienen las regiones estándar más uno o más exones variables insertados mediante *splicing* alternativo.

Podemos dividir el gen en dos regiones dependiendo de su variabilidad (Figura 7A), la región estándar o constante que engloba los primeros cinco exones (1-5) y los cinco últimos (16-20) que siempre van a codificarse juntos dando lugar a la isoforma más corta del *CD44*, la *CD44s* y la región variable (exones 6-15), que codifica la isoforma *CD44v*, ya sea por la unión de un único exón o la combinación de varios entre la región estándar (Figura 6).⁸⁶

Todas las isoformas contienen la forma *CD44s* cuyo ARN mensajero (mRNA, acrónimo del inglés *messenger RNA*) carece de exones variables. Específicamente, el primer exón codifica la secuencia de señal para la región *N*-terminal en el dominio extracelular, en los exones 2 y 3 se encuentra el módulo *Link* y los exones 4, 5, 16 y 17 codifican una región próxima a la membrana. Por último y como ya se ha comentado previamente, el exón 18 y el 19-20 codifican el dominio transmembrana y la región *C*-terminal citoplasmática, respectivamente.⁸⁵ La isoforma *CD44s* se encuentra en la mayoría de células de vertebrados y se expresa tanto en células normales como tumorales. El *CD44s* está asociado a procesos de crecimiento tumoral en cáncer de páncreas y a procesos de progresión celular en cáncer de mama, entre otros.^{86,90}

Como resultado del *splicing* alternativo de exones, existen varias isoformas de CD44v (v1-v10) que contienen uno o más exones variables (Figura 7A,B).⁹¹ Se pueden originar diversas combinaciones de los exones variables modificando el patrón de *splicing* alternativo llevado a cabo por las células, esto supone que dependiendo de sus necesidades, las células pueden producir unas u otras isoformas. Al igual que poseen una gran diversidad desde el punto de vista estructural, las isoformas de CD44 también son muy diversas a nivel funcional y van a presentar una distribución más restringida en comparación a la isoforma estándar.⁸⁶ Están presentes en queratinocitos, linfocitos activados, macrófagos y algunas células epiteliales; por ejemplo, CD44v8-v10 está presente en células epiteliales y CD44v3-v10 en queratinocitos.⁸³

Las isoformas CD44v se expresan únicamente bajo ciertas condiciones específicas, especialmente en distintos tipos de cáncer en estados avanzados, ya que su regulación parece depender en parte de señales oncogénicas.⁹² También actúan como co-receptores para promover la supervivencia celular de las células tumorales y la quimiorresistencia.⁹³ Además, las isoformas CD44v son un marcador de superficie de las CSCs, razón por la cual sirven como objetivo terapéutico para muchos tumores, sin embargo, el valor pronóstico de las isoformas CD44 varía según el tipo de cáncer. Entre las isoformas CD44v, la CD44v6 han demostrado tener un papel crucial en la progresión del cáncer de páncreas, colon y de próstata debido a su capacidad para unirse al factor de crecimiento de los hepatocitos, la osteopontina y otras citoquinas clave producidas en el microambiente tumoral.^{92,94} Otras isoformas como, CD44v2, CD44v3, CD44v5, CD44v9, CD44v10 y CD44v8-10 también han demostrado tener un papel importante en diferentes tipos de cáncer. Por ejemplo, CD44v3 está relacionada con el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, CD44v5 con el cáncer de páncreas y CD44v8-10 se encuentra altamente expresada en los tumores gástricos y de mama. Por otro lado, la expresión de CD44v9 en el cáncer gástrico primario temprano es un marcador pronóstico de recurrencia y la existencia de células cancerosas circulantes positivas para CD44v9 suele estar relacionada con la enfermedad refractaria, la recidiva y la reducción de las tasas de supervivencia en el cáncer colorrectal.^{86,92}

1.4.3. Modificaciones postraduccionales y otros ligandos de CD44

La diversidad estructural del CD44 puede verse ampliada debido a modificaciones postraduccionales que modulan la afinidad del receptor por sus ligandos, entre las cuales se incluyen: *N*-glicosilación, *O*-glicosilación y unión de GAGs en el dominio extracelular, palmitoilación en la región C-terminal próxima al dominio transmembrana, fosforilación y sulfatación en el dominio citoplasmático. Igualmente, CD44 sufre un proceso proteolítico por acción de enzimas metaloproteinasas, que resultan en fragmentos biológicamente activos de modo que, CD44 puede existir en 3 formas

distintas: receptor transmembrana, fragmento asociado a la matriz extracelular y fragmento soluble capaz de translocarse al núcleo y regular la transcripción génica de proteínas involucradas en el desarrollo del cáncer. Cuando el CD44 es escindido de la superficie celular, puede pasar a la circulación sistémica provocando un incremento de la motilidad celular, invasión y progresión tumoral. La expresión de la forma soluble de CD44 se encuentra aumentada durante procesos inmunológicos y de diseminación tumoral.^{95,96}

Algunas de estas variaciones como las glicosilaciones pueden ser de vital importancia, ya que están consideradas como reguladoras de la unión entre el CD44 y el HA. En general, a más nivel de glicosilación en la proteína, menor capacidad de unión a las cadenas de HA (menor activación). Este proceso también está involucrado en el inicio de la transducción de señales al facilitar el ensamblaje de CD44 con receptores de quinasas y factores de crecimiento. Por otro lado, la fosforilación de determinados residuos de serina en el dominio citoplasmático también es clave en la transición del estado inactivo a activo de la proteína. Este receptor de membrana, además de encontrarse constitutivamente activo o inactivo y, por lo tanto, apto o no apto para unirse al HA, puede encontrarse en estado inducible, en el que la unión con el HA no ocurre sin la intervención de factores inductores como citoquinas o anticuerpos. Los estímulos inflamatorios y/o cancerígenos normalmente causan la activación del CD44 mientras que en condiciones fisiológicas normales, el CD44 se encuentra en reposo (forma inactiva) (Figura 8).^{86,97,98}

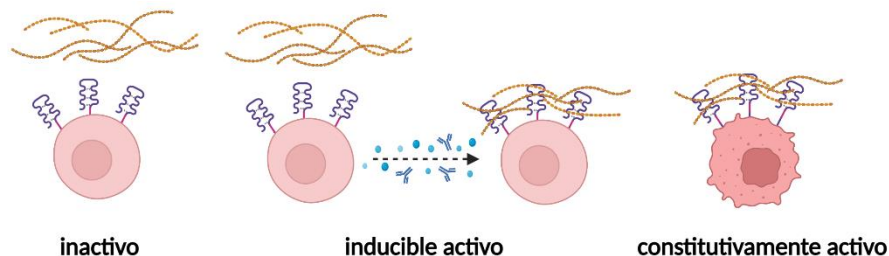


Figura 8. Estados en los que se puede encontrar el CD44: inactivo, modo de reposo en el que no se produce la unión al HA; inducible activo, se produce la unión al HA tras la actuación de estímulos externos como anticuerpos o citoquinas; y constitutivamente activo, se produce la unión al HA sin necesidad de agentes externos. Normalmente, este último estado está asociado a las células tumorales o células asociadas a otras situaciones patológicas como la inflamación.

Entre los diversos ligandos del CD44 se encuentran el condroitín sulfato, el colágeno, la fibronectina, el fibrinógeno, la heparina y la osteopontina, todos ellos GAGs. Sin embargo, el sustrato principal para este receptor de membrana es el HA, siendo necesario que el polímero, al menos, posea seis unidades de monosacárido para conseguir una unión efectiva al sitio. Además, el HA puede interactuar con varios receptores al mismo tiempo en función de la longitud de su cadena, haciendo que los fragmentos más largos de HA tengan una unión más efectiva con su receptor.^{87,99}

Las isoformas variables del CD44 difieren en el tamaño de los sitios potenciales de glicosilación en la región proximal de la membrana y en el tipo de GAGs a los que se pueden unir.⁶⁷

1.4.4. Funciones fisiológicas y patológicas de CD44

El CD44 tiene un rol fundamental en la fisiología y patología del organismo debido a su unión a múltiples ligandos tanto extracelularmente, en la membrana plasmática como a través de su dominio intracelular. Su variabilidad estructural y funcional también son claves en la modulación de sus funciones.⁸⁸

La proteína en su forma estándar tiene un papel importante en numerosos procesos fisiológicos, como la adhesión, proliferación y migración celular, el desarrollo de órganos, las funciones inmunes, la hematopoyesis, la angiogénesis, la liberación de citoquinas, la activación y migración de linfocitos a los ganglios linfáticos y la metabolización del HA (participa en su unión, internalización y degradación, siendo parte del proceso de continua renovación del polímero).^{84,93,100,101}

Además, el CD44 interviene en la transducción de señales al interactuar con distintas proteínas quinasas y otros mensajeros secundarios. El *splicing* alternativo que sufren los exones que codifican el dominio citoplasmático de la proteína origina isoformas con diferentes funciones de transducción que pueden estimular la liberación de factores de crecimiento determinados o alterar la proteína G. En concreto, el CD44 en su forma activa interactúa con la proteína tirosina quinasa Src y el inhibidor de disociación de guanósil difosfato (GDP, acrónimo del inglés *guanosine diphosphate*) Rho; regula la actividad de Rho a través de la unión alternativa a las proteínas ezrina, radixina y moesina (ERM) fosforiladas o merlina desfosforilada y; CD44 citoplasmático activa la transcripción génica a través del coactivador transcripcional CBP/p300.¹⁰²

Por otro lado, la expresión anómala de CD44 y su interacción con el HA estimulan los procesos de proliferación, adhesión, migración e invasión celular, desencadenando angiogénesis y progresión celular.^{86,88,99,100} La angiogénesis implica la creación de nuevos vasos sanguíneos que se expanden a partir de preexistentes. Esta neovascularización desencadenada por la interacción del CD44 con el HA, se ve potenciada con los efectos del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, acrónimo del inglés *vascular endothelial growth factor*), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, acrónimo del inglés *fibroblast growth factor*), la angiopoyetina, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, acrónimo del inglés *platelet derived growth factor*) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β , acrónimo del inglés *transforming growth factor β*) contribuyendo a la formación de tumores en múltiples tipos de cáncer.^{86,88}

Además, en condiciones patológicas se promueve el *splicing* alternativo y las modificaciones postraduccionales que dan lugar a isoformas del CD44 con mayor capacidad de unión al HA, lo que conduce a un aumento de la tumorigenicidad.⁸⁵ Estos eventos son concomitantes a una producción excesiva de HA, que se asocia, a su vez, con un aumento de la agresividad tumoral y un mal pronóstico de la enfermedad.

Como hemos visto previamente, la alta expresión de las isoformas de CD44 se relaciona con diversos tipos de cáncer. Hay que destacar la isoforma CD44v6 ya que es la más estrechamente relacionada con la progresión tumoral. Una sobreexpresión de la misma potencia la adhesión de células cancerosas y leucocitos, facilitando la extravasación e infiltración leucocitaria que acelera la angiogénesis y agrava la progresión del cáncer y su metástasis. Esta isoforma también se encuentra asociada a la activación de cascadas de señalización que aumentan la concentración de factores pro-inflamatorios. CD44v6 se relaciona con un pobre pronóstico en muchos tipos de cáncer, entre los que se encuentran el carcinoma colorrectal, el carcinoma intraductal, el adenocarcinoma gástrico y los cánceres de próstata, páncreas, mama, cabeza y cuello. Esta variante es ampliamente conocida como un marcador predictivo de metástasis en el cáncer de colon y de páncreas.^{86,103-105}

Se ha identificado una sobreexpresión de CD44 en la superficie de las CSCs que son esenciales en el origen de la transformación maligna y la formación de nuevos tumores en áreas metastásicas.^{106,107} Además, este receptor actúa regulando la EMT, relacionada con la modulación del inicio y desarrollo de los tumores.¹⁰⁰

Las células tumorales que circulan a través de la sangre expresan diversos receptores de superficie celular del HA como el CD44, que les permite poder unirse a las células endoteliales. Sin embargo, el HA circulante puede saturar sus receptores, generando una incapacidad por parte de las células tumorales para adherirse al endotelio. De esta forma se trasladan por el organismo ocasionando metástasis.⁶¹ Es frecuente detectar el CD44 sobreexpresado en su forma soluble en el suero de pacientes con cáncer, lo que le hace ser un marcador potencialmente interesante para el pronóstico de diferentes tipos de cáncer como cáncer de mama, pancreático, colorrectal y pulmón. Normalmente se asocia a un estado avanzado del tumor y a un pronóstico desfavorable para el paciente.^{95,108-110}

Asimismo, la supresión del receptor CD44 en ratones modificados genéticamente implica una atenuación de la angiogénesis, crecimiento tumoral y metástasis en distintos tipos de cáncer. El empleo de anticuerpos anti-CD44 ha demostrado bloquear la formación de nuevos vasos sanguíneos *in vivo* y la morfogénesis vascular *in vitro*.⁸⁸

A pesar de que es un receptor muy sensible a los cambios en el microambiente con comportamientos duales, el impacto clinicopatológico del CD44 y sus isoformas en el desarrollo de tumores hace que sea una buena diana para la terapia contra el cáncer, así como un importante marcador de su pronóstico en la mayoría de los cánceres humanos.⁸⁶

1.4.5. Biología estructural del CD44-HABD

Como hemos visto, todas las isoformas de CD44 incluyen un ectodominio funcional constante en el extremo *N*-terminal que sirve de unión para los ligandos, el HABD (Figura 9A). En esta sección vamos a detallar estructuralmente este dominio dada su importancia a nivel químico, además de que esta región por si sola es suficiente para la unión del HA independientemente del resto de la estructura del CD44.^{84,111}

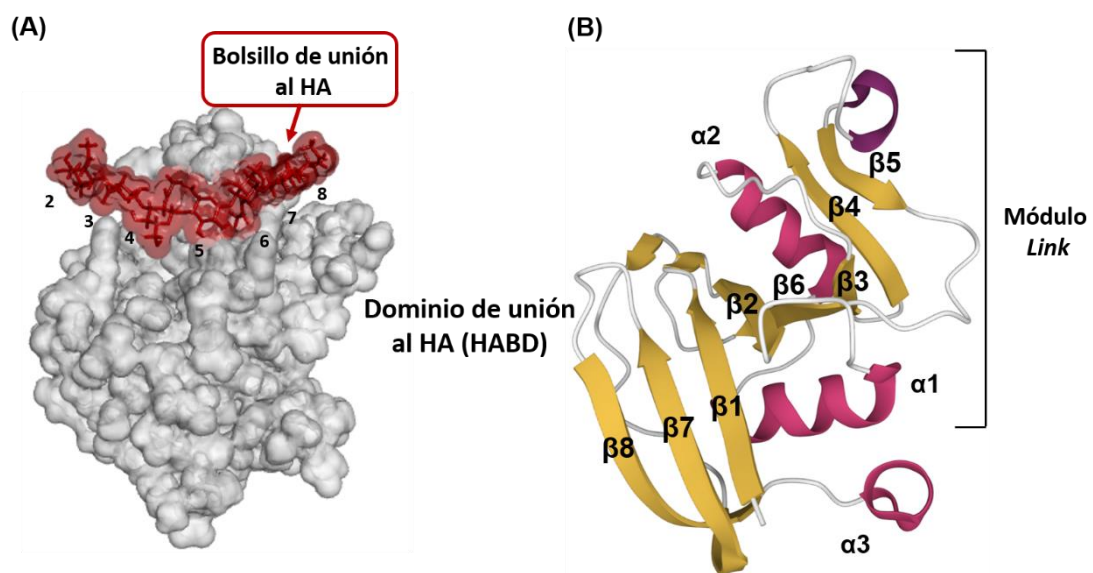


Figura 9. Estructura del CD44-HABD. **(A)** Estructura tridimensional con superficie del CD44-HABD murino en complejo con un octosacárido de HA (HA_8) (representado en rojo) donde se puede observar el bolsillo de unión al HA. **(B)** Estructura secundaria tridimensional del CD44-HABD humano donde se representa el módulo *Link*, las láminas β en amarillo, las hélices α en rosa y los bucles “*loops*” en blanco.

Gracias a los avances en biología estructural, se conoce la estructura del CD44-HABD y su interacción con el HA.^{112,113} Se ha demostrado que el CD44-HABD expresado y replegado recombinantemente es capaz de unirse al HA con una afinidad similar a la del ectodominio glicosilado del CD44 purificado de las células eucariotas.¹¹¹

La estructura cristalina del CD44-HABD humano confirma que incluye el módulo *Link* – un pliegue α/β conservado que consta de dos láminas β antiparalelas de triple cadena y dos hélices α , estabilizadas por un par de enlaces disulfuro. Además, esta estructura contiene secuencias

adicionales que proporcionan un puente disulfuro, una hélice α y varias láminas β adicionales que forman el CD44-HABD completo (Figura 9B).¹¹²

Las estructuras CD44-HABD murina y humana comparten la misma forma y plegamiento. CD44-HABD murino comparte un 86% de homología con la secuencia de la proteína humana, y un 90% de homología con la secuencia del módulo *Link*.¹¹³

La forma de unión del HA con el CD44-HABD se determinó al cristalizar un complejo del CD44-HABD murino con un HA₈. El complejo identifica un sitio de unión al HA extendido a través de un surco poco profundo (Figura 9A) unido por los *loops* β 2- α 1, α 2- β 3 y β 4- β 5.^{112,113} El surco de unión comprende dos residuos básicos (Arg45 y Arg82) y varias cadenas laterales hidrofóbicas (Ile92, Ile100-Ala103, Tyr46, Tyr83 y Tyr109) en la cara frontal del módulo *Link* que se unen al oligosacárido mediante la formación de enlaces de hidrógeno o interacciones de van der Waals.¹¹⁴ El análisis de la interacción en el complejo reveló que el sitio de reconocimiento central es la región GlcUA5-GlcNAc6 (GlcUA en la posición 5 a través de GlcNAc en la posición 6). El cambio conformacional de Arg45 y Arg82 crea una hendidura más profunda que está involucrada en el reconocimiento del HA (Figura 10). Interacciones hidrofóbicas de Ile100 y un puente disulfuro de Cys81 y Cys101 también actúan reconociendo a GlcUA5 y GlcNAc6. Diversos residuos alifáticos, junto con los hidroxilos de tirosina, presentan interacciones específicas que favorecen la unión de GlcUA7 y GlcNAc8.^{113,115} Otros estudios posteriores han encontrado que los residuos Arg150, Arg154, Lys158 y Arg162 también contribuyen a la unión del HA.^{114,116}

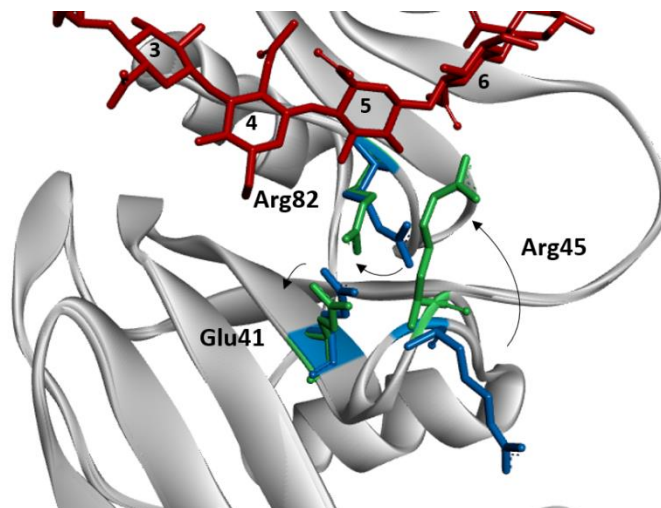


Figura 10. Estructuras tridimensionales superpuestas del CD44-HABD murino antes y después de la unión del HA₈. Se muestran algunos de los residuos clave que modifican su conformación al unirse el polisacárido (Arg45, Arg82 y Glu41). En azul se representan los residuos cuando la proteína no está unida al HA, mientras que en verde se muestran los residuos tras la unión del HA (rojo). El cambio conformacional de los residuos mencionados favorece la creación de un bolsillo óptimo para reconocer e interactuar con el HA.

La afinidad de CD44-HABD por el HA se ve reforzada por el cambio conformacional alrededor del *loop* $\beta 2\text{-}\alpha 1$ y el dominio *C*-terminal.^{113,117} El *loop* $\beta 2\text{-}\alpha 1$ centrado en Arg45 se ajusta en movimiento con los residuos Glu41, Asn43, Gly44 y Arg82 para crear más interacciones directas con el polisacárido. Un cambio en Arg45 ha sido propuesto como la principal diferencia entre el estado abierto y cerrado de CD44 inducido por la unión del HA (Figura 10). La resolución estructural del complejo CD44-HABD con HA₈ sugiere que el CD44-HABD cambia su conformación de ordenada a ser parcialmente desordenada tras la unión del HA.^{113,117-119}

En general, podemos decir que el complejo murino CD44-HABD-HA₈ revela un sitio de unión al HA extendido con un área superior a 800 Å² y una unión molecular estabilizada por un gran número de interacciones que involucran al menos siete unidades de sacárido consecutivas de HA.¹¹³

Desde un punto de vista estructural, el CD44-HABD parece carecer de bolsillos bien formados o profundos que puedan servir como sitios de unión atractivos para pequeños inhibidores. El hecho de que experimente importantes cambios conformacionales al unirse el HA lo hace ser una compleja diana terapéutica.¹¹³

A pesar de todo ello, gracias a toda la información molecular y estructural que se conoce a día de hoy, el CD44-HABD es una diana atractiva para el desarrollo de moléculas pequeñas inhibidores de la unión con el HA.

1.5. Interacción HA-CD44

Como ya hemos mencionado, la interacción entre el HA y el CD44 está implicada en un diverso número de procesos fisiológicos y patológicos, como la embriogénesis, morfogénesis, activación de la respuesta inmune innata, síntesis e internalización del HA en la célula, angiogénesis, migración celular, proliferación, inflamación y cáncer. Estos procesos se desarrollan al producirse la activación de numerosas cascadas de señalización intracelular a partir de la unión del HA al CD44.^{86,99}

La interacción HA-CD44 es fundamental para la extravasación de linfocitos T activados desde el torrente sanguíneo hasta zonas inflamadas durante un proceso multietapa. Una activación anormal de las cascadas de señalización debido a la interacción HA-CD44, así como una expresión y una regulación inadecuada del CD44 debido a factores pro-inflamatorios, pueden agravar cuadros de inflamación aguda y favorecer transformaciones malignas mediante fenómenos de proliferación y migración celular. Además, la unión entre el CD44 sobreexpresado y el HA en las CSCs produce señales para iniciar su autorrenovación y, en consecuencia, su multiplicación.^{120,121}

En el origen de las cascadas de señalización intracelulares, tiene un papel clave la fosforilación del dominio citoplasmático de CD44. Los sitios de fosforilación se encuentran activados cuando los ligandos se unen para transducir la señalización y seleccionar sus efectores descendentes. Estas interacciones y modulaciones generan múltiples funciones celulares, como la activación del citoesqueleto, la adhesión de las células tumorales, el crecimiento, la migración y la invasión, que conducen a la progresión tumoral y a la angiogénesis.^{86,122}

Aunque existe mucha información sobre los eventos de señalización desencadenados por la interacción HA-CD44, no se conocen con total precisión todas las reacciones que se producen. El conocimiento de la interacción del HA con sus receptores y los mecanismos que desencadenan son de gran interés en el desarrollo de moléculas que inhiban dicha interacción.

Algunos estudios indican que este receptor no quinasa podría dar lugar a balsas lipídicas que reunirían varios receptores, provocando las cascadas de señalización, mientras que otros sugieren que la unión del HA con el CD44 genera una barrera de señalización al limitar el acceso del ligando y la difusión del receptor a través de la membrana. Por otro lado, diversos estudios han demostrado que el grado de fragmentación del HA es clave en el desarrollo de unas u otras cascadas de señalización.^{40,123}

Desde el punto de vista de la interacción proteína ligando, esta glicoproteína presenta tres tipos de acción molecular:

- Puede mediar como un receptor de adhesión interaccionando con componentes solubles extracelulares y con la matriz extracelular. Estas interacciones pueden resultar en una señalización intracelular y promover respuestas celulares, o bien, pueden representar funciones adhesivas pasivas. El CD44 también puede servir como proteína de superficie que une enzimas y sustratos, favoreciendo, por ejemplo, la activación de factores de crecimiento y degradación de componentes de la matriz extracelular.
- Puede actuar como co-receptor que media la señalización de receptores de tirosina quinasa, como c-Met, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, acrónimo del inglés *epidermal growth factor receptor*) y otros receptores de la familia ErbB.
- Puede ejercer como conector entre la membrana plasmática y el citoesqueleto de actina mediante su unión con las proteínas ERM.⁹³

1.5.1. Vías de señalización y eventos regulados por la interacción HA-CD44

El HA interactúa de forma multivalente con el CD44 para inducir y/o estabilizar dominios de señalización en la membrana plasmática. La unión del HA al CD44 origina una interacción directa o indirecta de CD44 con diversos receptores de señalización, entre ellos; los receptores tirosina quinasa ErbB2, EGFR o c-Met; otros receptores de señalización como el receptor TGF- β y; quinasas no receptoras de la familia Src o proteínas de la familia Ras. Estos receptores impulsan diversas vías de señalización oncogénicas, como por ejemplo la vía de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK/ERK, acrónimo del inglés *mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases*), la vía fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K/AKT, acrónimo del inglés *phosphoinositide 3-kinase*) y la vía de la quinasa de adhesión focal (FAK, acrónimo del inglés *focal adhesion kinase*), que estimulan y promueven la proliferación, adhesión, supervivencia, motilidad, invasividad, quimiorresistencia, angiogénesis y cambios metabólicos de las células tumorales.^{41,86,100,124} Proteínas adaptadoras como Vav2, Grb2 y Gab1 intervienen en la interacción de CD44 con efectores como RhoA, Rac1 y Ras, que impulsan las vías de señalización intracelular anteriores. Se ha demostrado que ErbB2 probablemente forma complejos con CD44 a través de interacciones con Grb2 y Vav2, mientras que la interacción de PI3K y CD44 está mediada por Gab1 (Figura 11).^{41,100}

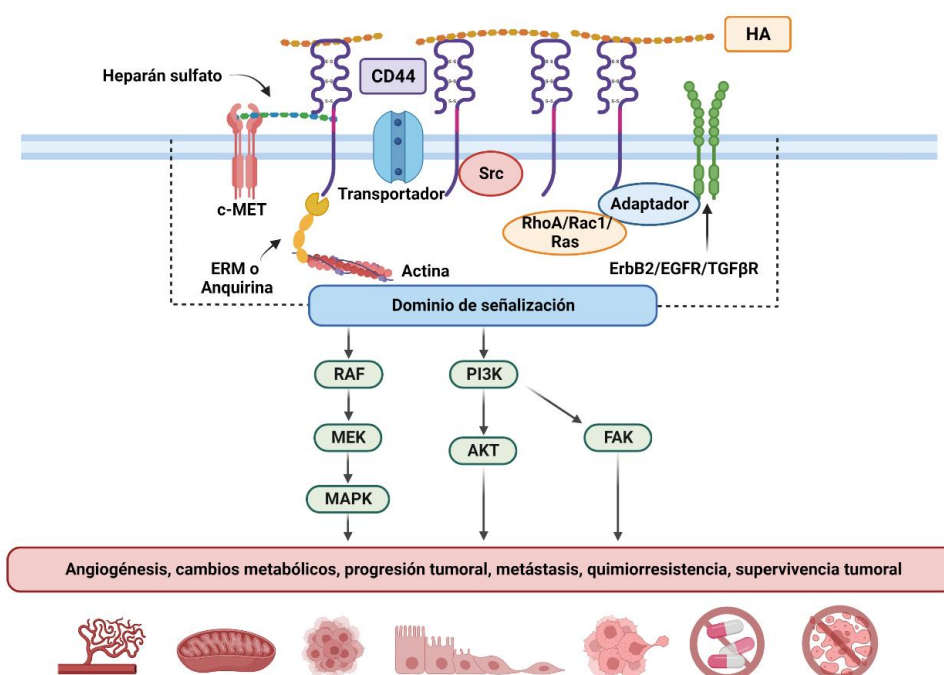


Figura 11. Principales vías de señalización en las que está implicada la interacción HA-CD44. Entre las distintas vías de señalización se encuentran, las relacionadas con proteínas quinasas, cambios en el citoesqueleto, vías intracelulares, transportadores y otros factores de transcripción. Como consecuencia de la activación de estas cascadas de señalización tienen lugar procesos patológicos como la angiogénesis, cambios metabólicos, adhesión, proliferación y migración tumoral, metástasis y resistencia a los tratamientos farmacológicos y a la apoptosis celular.

La unión del HA al CD44 estimula el desarrollo de tumores quimiorresistentes. Esta interacción aumenta la expresión de genes de resistencia a múltiples fármacos (*MDR1*, acrónimo del inglés *multidrug resistance protein 1*) a través de la activación de la vía PI3K. Los efectos estimulantes de PI3K se deben principalmente a su activación por retroalimentación positiva de la producción de HA. En concreto, se ha estudiado la variante CD44v8-v10 cuya expresión aumenta la síntesis de glutatión y la capacidad de defensa frente a ROS y la variante CD44v16 que produce un aumento de la expresión de los genes *p65*, *Bcl2* y *Snail*, que favorecen la resistencia del tumor frente a la quimioterapia. Se ha descrito que la proteína MDR1 está asociada con CD44 en los microdominios lipídicos y se puede unir a través de CD44 con el citoesqueleto de actina, de modo que la expresión de CD44 y MDR1 se regula de forma concomitante.^{91,125-127}

Por otro lado, la interacción HA-CD44 interviene en la inhibición de la muerte celular, en concreto el HA al interactuar con las variantes CD44v6 y CDC44v9 activa TGF- β , osteopontina y el factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina (HBEGF, acrónimo del inglés *heparin-binding EGF-like growth factor*) e inhibe Fas, mientras que la interacción con CD44v7-v10 inhibe la apoptosis a través de la disminución de la expresión de p53.^{41,86,91} El complejo CD44v6-ErbB2 activado por la unión del HA proporciona una fuerte resistencia a la apoptosis, a través de la estimulación de la transcripción de la ciclooxigenasa 2 (COX2) mediante PI3K y β -catenina. La prostaglandina E2 producida por la COX2 estimula la señalización de HA-CD44.⁹⁹

La interacción entre el HA y el CD44 puede inducir, en las células tumorales, la expresión y activación de varias enzimas degradadoras de la matriz extracelular pertenecientes a la familia de las MMP y además, aumentar la expresión del activador del plasminógeno de tipo uroquinasa (uPA). Esta regulación tiene un papel importante en el comportamiento de las células tumorales, permitiendo la degradación de los componentes de la matriz, la invasión y la metástasis, y también promoviendo la angiogénesis durante la progresión del tumor. La escisión intracelular de CD44 en la superficie de las células tumorales por acción de las MMP puede originar la translocación del producto citoplasmático al núcleo y producir la activación de la transcripción y de esta manera, provocar un aumento de su propia expresión contribuyendo a una mayor motilidad. Esto provoca invasión y progresión tumoral, ya que el CD44 escindido pasa a la circulación sistémica.^{85,86,100,122}

En otros casos, las modificaciones postraduccionales presentes en las regiones variantes de CD44, como por ejemplo, cadenas de heparán sulfato, unen factores de crecimiento regulatorios y producen la autofosforilación y activación de receptores tirosina quinasa como c-Met, involucrados en promover la invasión de las células tumorales mediante la activación de las vías oncogénicas Ras, PI3K, el transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) y β -catenina.^{41,99}

La interacción HA-CD44 también puede modular la activación de factores pro-angiogénicos como VEGF, TGF- β , anfiregulina, endoglina y uPA contribuyendo a la división de células cancerosas, la proliferación y la angiogénesis patológica, otra de las principales características del desarrollo tumoral. CD44 puede reclutar proteínas ERM y actuar como co-receptor para los receptores VEGFR2, promoviendo la angiogénesis y la migración celular.^{88,100,128}

Además de su acción como co-receptor o co-activador de moléculas de señalización asociadas a la membrana, la interacción HA-CD44 también induce cambios en la señalización celular y en el citoesqueleto que promueven la movilidad e invasión celular, procesos involucrados en la EMT y en la metástasis. En este caso, los filamentos de actina se unen a la cola citoplasmática de CD44 a través de miembros de la familia ERM o anquirina, proteínas que fomentan la activación del citoesqueleto, lo que favorece diversos efectos regulados por el HA como adhesión, proliferación y migración celular. Los proteoglicanos y los factores asociados unidos al HA pericelular también pueden influir en estas actividades. Además, la anquirina se encarga de la unión de CD44 al receptor inositol 1,4,5 trifosfato, favoreciendo la movilización del calcio intracelular y la modulación de eventos de adhesión y división celular. Es muy probable que la proteína supresora de tumores merlina actúe inhibiendo la interacción HA-CD44 y desplazando las proteínas ERM de la cola citoplasmática de CD44. La inhibición de merlina puede desencadenar la activación de la unión de HA-CD44, lo que a su vez conduce a la formación de los complejos de señalización mencionados anteriormente.^{41,86,100}

El CD44 también está relacionado con el cambio metabólico producido en el cáncer a consecuencia del aumento de la demanda energética. La interacción HA-CD44 promueve la localización de los transportadores CD147 y monocarboxilatos 1 y 4 (MCT1 y 4) en la membrana plasmática, favoreciendo la excreción de lactato producido en gran cantidad por las células cancerosas debido al efecto Warburg. El lactato acelera el crecimiento tumoral, promueve la angiogénesis y la metástasis y además, crea un ambiente ácido impidiendo la acción del sistema inmune.^{28,86}

En estas interacciones pueden estar involucradas tanto las isoformas CD44s como las CD44v, aunque la variante particular depende del tipo de célula y de la etapa de progresión maligna. Los mecanismos de regulación de estas interacciones en diferentes tipos y etapas tumorales no se comprenden con total exactitud a día de hoy, pero la desregulación generalizada que existe en las vías de señalización de las células tumorales hace indicar que el funcionamiento anormal de la interacción HA-CD44 tiene un papel importante en ellas, a diferencia de otros procesos fisiológicos como el desarrollo embrionario o la inflamación donde la interacción HA-CD44 suele tener un funcionamiento normal. Una posible explicación se puede atribuir al *splicing* alternativo desregulado que las células tumorales sufren dando lugar a variantes de CD44 que promuevan eventos

oncogénicos como la señalización inapropiada de Ras, la unión de osteopontina, factores de crecimiento del estroma o proteasas.⁴¹

Muchos estudios indican que CD44 se localiza, al menos en parte, en microdominios lipídicos, y se asocia directa o indirectamente con proteínas de señalización y transportadores. La mayoría de estos estudios también muestran que CD44 se activa en estos dominios en respuesta a interacciones con ligandos. Además, la endocitosis de HA y CD44 se produce a partir de estos dominios. Dada la gran cantidad de vías afectadas por CD44, la posibilidad de que ocurran interacciones indirectas y directas con una amplia variedad de efectores dentro de dichos dominios y que estos dominios sean inducidos y/o estabilizados por interacciones multivalentes del HA con el CD44 proporciona un campo importante en el que profundizar en investigaciones futuras.

Es importante resaltar que todos estos efectos tumorigénicos producidos por la interacción HA-CD44 solo ocurren en el contexto del microambiente tumoral ya que en condiciones normales no se activan las cascadas de señalización oncogénicas.^{41,100}

1.6. Papel del HA en la terapia contra el cáncer

Se han utilizado diferentes estrategias terapéuticas que se centran en el papel que desempeña el HA en el microambiente tumoral.^{36,85,129}

1.6.1. Degradación del HA por la acción de las HYALs

Estudios recientes respaldan el empleo de las HYALs como agentes antitumorales al degradar el HA en los tejidos, impidiendo su interacción con el receptor CD44. Además de demostrar en ratones una importante reducción en ciertos tipos de tumores, la sobreexpresión de HYAL revierte la resistencia a múltiples fármacos y produce cambios en el ciclo celular de los carcinomas quimiorresistentes.¹³⁰

Además, gracias a la acción de hidrolizar el HA, estas enzimas actúan disminuyendo la presión intersticial del fluido y por tanto favoreciendo la difusión y absorción de los agentes quimioterapéuticos por el tejido tumoral. Su administración junto con fármacos como la gemcitabina ha demostrado mejorar la supervivencia y disminuir de manera significativa la carga tumoral metastásica en modelos de cáncer de páncreas.¹³¹

1.6.2. Inhibición de la síntesis del HA

Se ha demostrado que existe un circuito de retroalimentación entre la síntesis del HA y la expresión de sus receptores, de forma que la disminución de HAS1 provoca una regulación negativa en la transcripción de CD44. Sin embargo, dado que las células expresan más de una HAS, inhibir la síntesis de HA empleando pequeños inhibidores es un mejor enfoque que inhibir la expresión de HAS. Un ejemplo es la 4-metilumbeliferona (4-MU) (Figura 12), un derivado cumarínico hidroxilado en la posición 7 y con un grupo metilo en la posición 4 que se encuentra de forma natural en la manzanilla o el apio y que es conocida por sus propiedades fluorescentes, que permiten medir la actividad enzimática.⁵⁶ Esta molécula ha demostrado además poder inhibir la síntesis del HA mediante el agotamiento del GlcUA necesario para la acción de las HASs y a través de la regulación negativa del mRNA de las HAS.^{132,133} La 4-MU inhibe la síntesis del HA cerca de un 80% en líneas tumorales de melanoma (A2058), mama (MCF-7 y MDA-MB-361) y ovario (SKOV-3) dando lugar a una disminución significativa de la proliferación, migración e invasión tumoral.¹³⁴ Esta molécula también bloquea la producción de HA en células de cáncer de páncreas KP1-NL y disminuye la metástasis hepática en ratones inyectados con células de cáncer de páncreas.¹³⁵

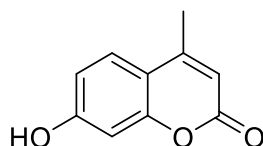


Figura 12. Estructura química de la 4-MU.

1.6.3. Fármacos dirigidos por acción del HA

El paclitaxel, un fármaco antitumoral ampliamente usado para distintos tipos de tumores, presenta un gran número de efectos adversos debido a su poca selectividad. La administración de HYTAD1-p20, un conjugado de HA y del paclitaxel, disminuye el desarrollo tumoral y la metástasis, y además mejora la solubilidad y la biodisponibilidad en vejiga y otros tipos de cáncer en comparación con el paclitaxel convencional. En este caso, el HA actúa como ligando para dirigir la acción terapéutica hacia las células tumorales con sobreexpresión de CD44.¹³⁶

1.6.4. Inactivación del HA

Pep-1, es un péptido diseñado y sintetizado mediante la tecnología *phage display* que está constituido por 12 residuos de aminoácidos (GAHWQFNALTVR) y es considerado un inhibidor específico del HA al unirse selectivamente al mismo. La interacción entre el HA y el CD44 expresado

por las células de melanoma B16-F10 se ha visto bloqueada por completo por la acción de Pep-1.^{137,138}

1.6.5. Disminución de la expresión de CD44

1.6.5.1. Terapia genética

La utilización de ARNs de silenciamiento (siRNAs, acrónimo del inglés *silencing RNA*) de CD44 inhiben la expresión post-transcripcional de CD44. Al utilizar este método para interrumpir la interacción a nivel celular se ha observado que los cambios fenotípicos que se producen solamente persisten durante una semana debido a la falta de transferencia de siRNA, a la dilución de la concentración de siRNA después de cada división celular o a la falta de estabilidad de siRNA que hace que se limite su uso en la inhibición de la progresión tumoral *in vivo*. Además, la dosis de siRNA no está definida y la inducción de respuestas por parte de la inmunidad innata es otro obstáculo que hace que el uso de siRNAs como terapia no esté claro.⁸⁵ A pesar de estos inconvenientes han demostrado impedir la progresión tumoral en modelos de cáncer de colon.¹³⁹

Otra estrategia genética es la utilización de ARN de horquilla corta (shRNAs, acrónimo del inglés *short hairpin RNA*) en un vector de expresión con el fin de suprimir la expresión de genes seleccionados.¹³⁹ Estos estudios han tenido como resultado una correlación lineal entre los niveles de expresión de CD44 y la actividad en las células. Sin embargo, no pudieron ser trasladados a modelos *in vivo* debido principalmente a la inducción de la respuesta inmune.¹⁴⁰

1.6.5.2. Productos naturales

El compuesto zerumbone, un humuleno con una cetona (Figura 13A), disminuye la expresión de CD44 inducida por EGF a través de la inhibición de la vía STAT3, siendo un fármaco prometedor en cáncer de mama.¹⁴¹ Otro producto natural, el glucósido verbascósido (Figura 13B) ha resultado disminuir en gran medida tanto el crecimiento de células de glioblastoma como el desarrollo de tumores intracraneales en un modelo de ratón con glioblastoma al reducir significativamente la expresión de CD44.¹⁴²

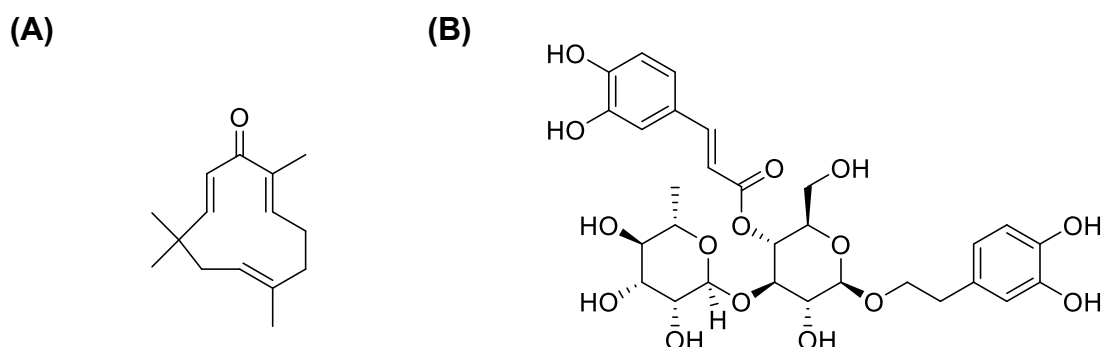


Figura 13. Estructuras químicas del zerumbone (A) y del verbascósido (B).

1.6.6. Inhibición de la interacción HA-CD44

Como se ha descrito anteriormente la interacción HA-CD44 inicia vías de transducción de señales que conducen al crecimiento de células tumorales, adhesión, migración, invasión, metástasis y angiogénesis, teniendo como consecuencia una progresión de tumores y un peor pronóstico en determinados tipos de cáncer. Por lo tanto, la inhibición de la interacción HA-CD44 supone gran interés desde el punto de vista químico farmacológico como diana antitumoral y presenta un enfoque muy prometedor contra la tumorigénesis inducida por el HA.^{36,40,51,85,99}

En consecuencia, en los últimos años varios estudios se han centrado en dilucidar los mecanismos por los que ocurre la interacción, en el cambio conformacional que lo acompaña y en la búsqueda de moléculas antitumorales cuya finalidad sea la unión a CD44 y la inhibición de la interacción HA-CD44.

1.6.6.1. Anticuerpos anti-CD44

Se han utilizado anticuerpos monoclonales contra CD44 que bloquean la unión al HA para investigar el papel del CD44 en el reclutamiento de células inmunitarias¹⁴³ y han resultado producir una disminución de la hinchazón y de la inflamación al inhibir la infiltración de células inmunitarias.¹⁴⁴ Un estudio reciente ha mostrado que los anticuerpos anti-CD44 reducen la migración celular del músculo liso vascular inducida por HA y disminuyen la producción de citoquinas pro-inflamatorias y ROS en ratones con lesiones a nivel vascular.¹⁴⁵ Por otro lado, el uso de un inmunocóncugado formado por bivatuzumab (anticuerpo monoclonal anti-CD44v6) y el fármaco mertansina (agente antimetabólico) impide la progresión tumoral en carcinomas de células escamosas de cuello y cabeza y en el cáncer de mama metastásico, pero la toxicidad hacia las células sanas ha impedido que los ensayos clínicos de fase I se completaran de manera favorable. El mecanismo de acción de este profármaco se basa en la liberación intracelular de la mertansina tras ser dirigida por el bivatuzumab hacia las células tumorales con sobreexpresión de CD44.¹⁴⁶⁻¹⁴⁸

Otros ejemplos de anticuerpos anti-CD44, IM7 y H₄C₄, han resultado disminuir el potencial invasivo en células de cáncer de mama con un fenotipo mesenquimal y reducir el crecimiento y la metástasis de células tumorales pancreáticas, respectivamente.^{149,150} Por otra parte, en la leucemia linfocítica crónica, el anticuerpo monoclonal específico para CD44, RG7356, tuvo actividad citotóxica en células B de leucemia mientras que en células B normales no mostró toxicidad.¹⁵¹

1.6.6.2. Proteínas de fusión

El desarrollo de proteínas de fusión compuestas por la región constante de inmunoglobulina G1 (IgG1) humana fusionada con el dominio extracelular de diversas variantes de CD44 han mostrado reducir la unión del HA al CD44 en estudios realizados en células de glioblastoma. Estas proteínas de fusión han resultado inhibir significativamente el crecimiento tumoral y prolongar la supervivencia a los tumores intracraneales en ratones.¹⁵²

1.6.6.3. oHA

Pequeños oHA con menos de 10 unidades de disacáridos han demostrado interrumpir la interacción HA-CD44 mostrando acción antitumoral en diferentes líneas celulares. oHA inhiben la supervivencia celular tumoral y las vías de proliferación, motilidad e invasión celular, estimulan la muerte celular por apoptosis y la expresión del gen *PTEN*, un supresor tumoral que evita la agrupación del CD44 en la membrana, bloqueando la interacción con los inductores de MMP.^{133,153-155} En líneas celulares de linfoma, el tratamiento con oHA induce la apoptosis a través de la inhibición de la producción de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3, acrónimo del inglés *phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*) y de la vía de señalización PI3K/AKT.^{155,156} En tumores malignos de la vaina nerviosa periférica, oHA inducen la ruptura de los complejos de CD44 con proteínas transportadoras de drogas, y de esta manera, actúan inhibiendo la función transportadora y disminuyendo la resistencia a fármacos quimioterapéuticos como la doxorrubicina. Estas funciones las desarrollan al impedir la activación de CD44 tras la unión del HA. En ensayos *in vivo*, la administración de oHA inhibe el crecimiento de varios tumores implantados como xenoinjertos. Además, oHA han resultado no tener toxicidad ni ser inmunogénicos por lo que pueden ser considerados buenos adyuvantes en la quimioterapia.^{153,155} Respecto a distintos tipos de células de carcinoma de ovario primario, oHA reducen la actividad de los transportadores de drogas e inhiben la tumorigénesis al evitar la asociación de los transportadores y de receptores tirosina quinasas con el CD44 en la membrana plasmática.¹⁵⁴

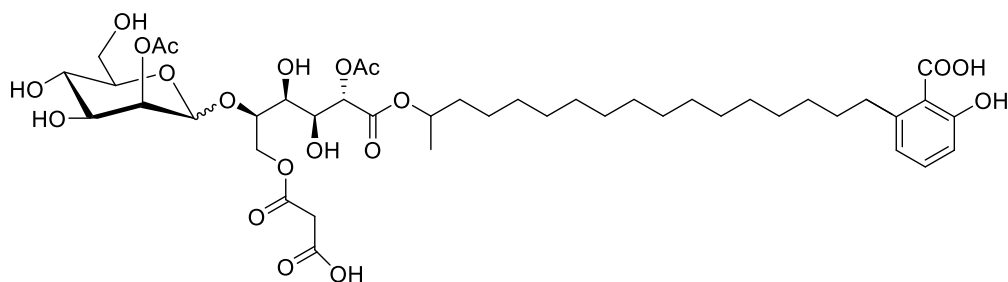
Otros enfoques estudiados incluyen oligosacáridos modificados basados en el HA como inhibidores de la interacción HA-CD44, han mostrado tener alta afinidad por el CD44 aunque no se han determinado sus propiedades a nivel biológico.¹⁵⁷⁻¹⁵⁹

1.6.6.4. Pequeñas moléculas derivadas de hongos: F-16438 y F-19848 A

En 2006, el grupo de Hosami Harada establece un método de detección de inhibidores de la interacción HA-CD44 a partir de las fracciones de membrana de las células y aísla la familia de compuestos bioactivos F-16438 (Figura 14A), derivados del hongo *Gloeoporus dichrous* SANK 30502. Estos compuestos mostraron una potente actividad (concentración inhibitoria semimáxima (IC₅₀) entre 10 y 30 μM) en un sistema libre de células y son considerados los primeros inhibidores de bajo peso molecular de la unión HA-CD44.¹⁶⁰

Este mismo grupo un año después, aisló un producto natural del hongo *Dacrymyces* sp. SANK 20204 que ha demostrado tener actividad como antagonista de la interacción HA-CD44 (F-19848 A, IC₅₀ = 24 μM, Figura 14B).¹⁶¹ Estos datos fueron complementados con otros trabajos que empleaban técnicas computacionales y que determinaron que las uniones ligando-receptor se rigen principalmente por interacciones de Van der Waals, siendo los residuos Arg41, Tyr42, Thr76, Cys77, Arg78, Tyr79, Ile96, Cys97, Ala98, Leu107 y Tyr114 en el bolsillo hidrofóbico del receptor los puntos clave para la unión a los 32 primeros átomos de la molécula.¹⁶²

(A)



(B)

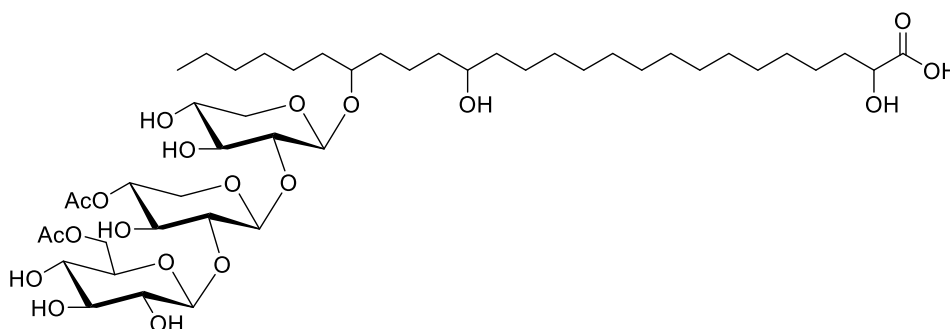


Figura 14. (A) Estructura química de uno de los compuestos representativos de la familia F-16438. (B) Estructura química de F-19848 A.

No obstante, la síntesis de esta molécula, una fusión entre un trisacárido y un ácido graso de cadena larga, no ha podido prepararse sintéticamente en el laboratorio y no tiene una estructura que pueda ser interesante como candidata a cabeza de serie para el diseño de futuras moléculas con capacidad inhibitoria.¹⁶¹

1.6.6.5. Etopósido

El etopósido es un agente citotóxico utilizado en un amplio espectro de tumores (Figura 15). Su mecanismo de acción principal se basa en la inhibición de la topoisomerasa II (TOP2), enzima que regula el enrollamiento/desenrollamiento del ADN, generando roturas transitorias de la doble cadena y eliminando así los nudos establecidos en el genoma. El etopósido estabiliza los complejos de ADN escindidos por la enzima, los cuales se acumulan y generan roturas permanentes de la doble cadena, que activan vías de recombinación y reparación, incluso también vías de muerte celular. Por tanto, el etopósido convierte la enzima TOP2 en una toxina celular que fragmenta el genoma.¹⁶³

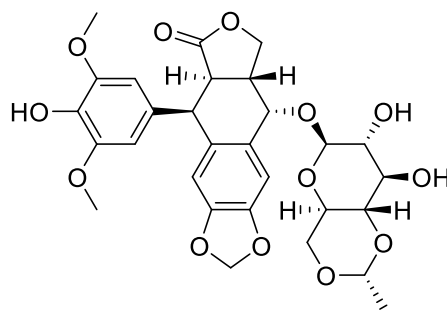


Figura 15. Estructura química del etopósido.

En 2016, a partir de un cribado virtual basado en la estructura y estudios computacionales de varias librerías de compuestos con el CD44-HABD, se identificó al etopósido como potencial inhibidor de la interacción HA-CD44. Se ha demostrado que el etopósido inhibe la interacción HA-CD44 en ensayos de competencia de ligandos con anti-CD44 y de adhesión de HA en células de cáncer de mama MDA-MB-231 con expresión positiva de CD44. El etopósido revierte la EMT y disminuye la migración celular sin inducir significativamente citotoxicidad ni muerte celular. Estos efectos son independientes a su actividad citotóxica como inhibidor de la TOP2. El hecho de que el efecto citotóxico del etopósido sea reducido parece estar atribuido a la proteína supresora de tumores p53. En las células tumorales que presentan p53 normal, las roturas de la doble cadena que genera este compuesto generan la muerte celular por apoptosis. Sin embargo, en líneas tumorales con p53 mutada (como MDA-MB-231), el efecto citotóxico del etopósido es mitigado. Además, este compuesto ha resultado disminuir la quimiorresistencia al cisplatino y la formación de mamosferas, ambos procesos ampliamente relacionados con la interacción HA-CD44.¹⁶⁴

Estos estudios permiten considerar al etopósido como un agente antitumoral a través de la inhibición de la interacción HA-CD44, pudiendo servir como base para el desarrollo de nuevos inhibidores de CD44 y resultando ser válido para estudios traslacionales futuros.¹⁶⁴

1.6.6.6. THIQs como inhibidores de la interacción HA-CD44

En 2014 se publicaron los primeros inhibidores no glucosídicos de la unión HA-CD44. Utilizando ensayos de unión biofísica, *screening* de fragmentos y mediante las estructuras cristalinas de dichos compuestos en complejo con el CD44-HABD permitieron descubrir un bolsillo inducible adyacente al surco de unión del HA de gran interés para la búsqueda de inhibidores selectivos. El análisis de los complejos seleccionados permitió determinar que todas las moléculas comparten un sitio de unión común que permite el apilamiento de las estructuras entre Arg155, Asn29, Val30, His39, Glu41 y Arg82 (Figura 16).¹⁶⁵

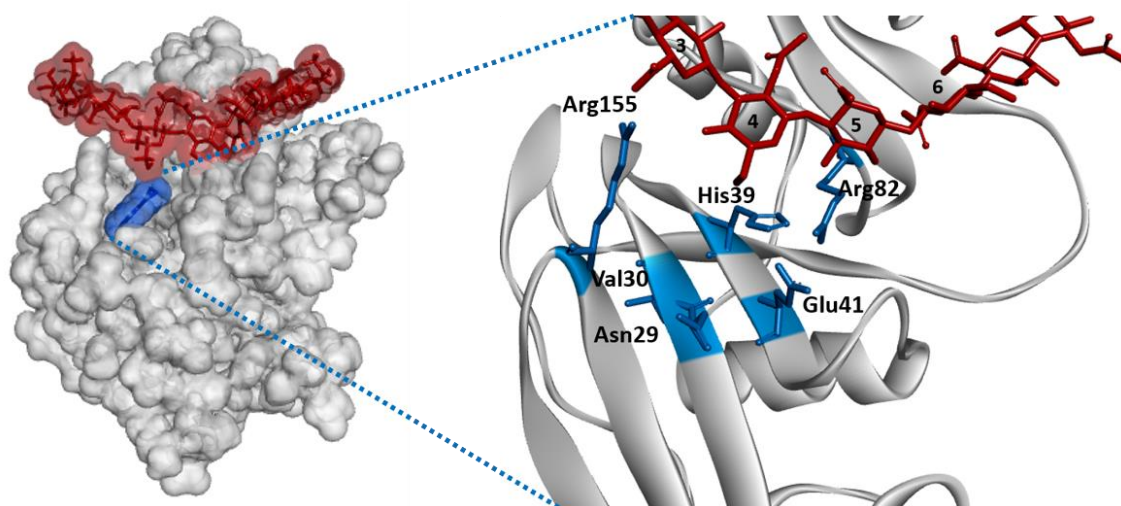


Figura 16. Estructura tridimensional del CD44-HABD donde se encuentran el bolsillo de unión al HA (rojo) y a los inhibidores (azul) (izquierda). En la derecha se encuentran representados tridimensionalmente algunos de los residuos más importantes involucrados en la unión a pequeñas moléculas.

Las interacciones producidas por la combinación de fragmentos y el diseño basado en su estructura han permitido establecer el fragmento de THIQ como un atractivo punto de partida para la optimización de cabezas de serie (Figura 17).¹⁶⁵ Es importante resaltar la existencia de un gran número de fármacos que poseen el esqueleto de THIQ. Las aplicaciones de estos fármacos pueden llegar a ser muy diversas: agentes antihipertensivos (quinapril, debrisoquina), relajantes musculares (tubocurarina, doxacurio cloruro, mivacurio cloruro, atracurio), antihistamínicos (salsolinol), antidepresivos (nomifensina, diclofenaco), antihelmínticos (praziquantel), antitusivos (noscapina), antiparkinsonianos (apomorfina), agentes para el tratamiento del síndrome de vejiga hiperactiva (solifenacina) y antitumorales (trabectedina, lurbinectedina).¹⁶⁶

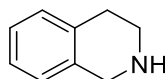


Figura 17. Estructura química de la 1,2,3,4-THIQ.

Inicialmente los compuestos **1** y **2** (Figura 18A) se consideraron de gran importancia debido a sus interacciones con el bolsillo adyacente al surco de unión del HA. Mediante cristalografía de alta resolución se observó que ambos compuestos ocupan el mismo subsitio adyacente al surco de unión del HA. Ambas moléculas inducen conformaciones alternativas de Arg155 y Asn29 para crear interacciones π - π por encima y por debajo del anillo aromático de la molécula. En el caso del compuesto **1**, una amina exocíclica de la anilina forma un enlace de hidrógeno con el oxígeno de la cadena principal de Val30 y dos enlaces de hidrógeno con moléculas de agua, mientras que la otra amina interacciona con otra molécula de agua (Figura 18B, compuesto **1**).¹⁶⁵

El compuesto **2** se une con el anillo aromático en el mismo lugar que **1**, por debajo de Arg155. Esta estructura revela una conformación preferida de media silla para el anillo de seis miembros saturado que posiciona la amina endocíclica por encima del carboxilato de Glu41 para que pueda donar un enlace de hidrógeno con este residuo (Figura 18B, compuesto **2**). Las conformaciones inducidas y apo de Arg155 y Glu41 se encuentran ocupadas en proporciones casi iguales por este complejo, por lo que la ocupación de este compuesto al igual que el anterior es inferior al 100%. Al evaluar la capacidad para inhibir la interacción HA-CD44 se observó que el compuesto **1** no presentó ninguna actividad mientras que el compuesto **2** (con estructura de THIQ) sí presentó actividad inhibitoria ($IC_{50} = 27$ mM). Además, se determinó la eficiencia del ligando sobre el bolsillo de unión (LE) y la constante de disociación (K_D) para ambos compuestos (**1**, $LE = 0,31$ kcal mol⁻¹, $K_D = 8,5$ mM) (**2**, $LE = 0,29$ kcal mol⁻¹, $K_D = 6,9$ mM).¹⁶⁵

Los parámetros de IC_{50} y K_D se obtuvieron a partir de experimentos libres de células mediante la técnica de resonancia de plasmón de superficie (SPR). Las IC_{50} fueron obtenidas a través de un ensayo con el HA inmovilizado, midiendo la unión del CD44-HABD humano usando como bloqueantes de esta unión los distintos compuestos a ensayar. Las K_D se determinaron a partir de la interacción ligando-proteína (CD44-HABD humano) sin el uso del polímero. Los datos de LE fueron obtenidos a partir de las K_D .¹⁶⁵

A partir de la comparación entre estos dos complejos con las dos estructuras iniciales, se llevó a cabo la evaluación del compuesto **3** (Figura 18A), una combinación de la THIQ de **2** que formaba enlaces de hidrógeno con Glu41, con un grupo amino exocíclico colocado sobre el carbono en posición 5 para mimetizar la interacción con Val30 que presentaba el compuesto **1**. Mediante estudios cristalográficos se ha comprobado que este compuesto se une al mismo sitio que los anteriores. La

mayor afinidad que presenta este compuesto se atribuye a la presencia de enlaces de hidrógeno con Val30 y Glu41, así como a las interacciones π - π del anillo aromático con Arg155 (Figura 18B, compuesto **3**). En este caso, el bolsillo de unión parece estar completamente ocupado por el compuesto **3**. Por otro lado, este compuesto muestra una mayor actividad sobre la inhibición de la interacción HA-CD44 ($IC_{50} = 6,7$ mM), mejora en cuatro veces la actividad mostrada por el compuesto **2**. Además, presenta una LE de $0,40$ kcal mol⁻¹ y una K_D de $0,9$ mM, mejorando en siete veces la afinidad por el bolsillo de unión hidrofóbico presentada por el compuesto **2**.¹⁶⁵

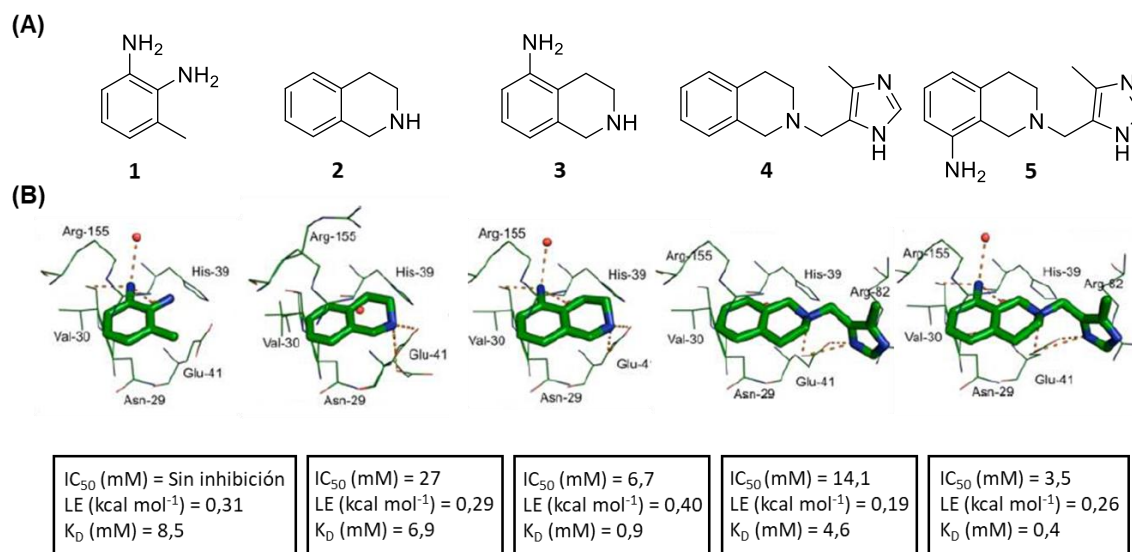


Figura 18. (A) Estructura química de los compuestos **1**, **2**, **3**, **4** y **5**. (B) Interacción de cada compuesto con el bolsillo de unión del CD44-HABD: compuesto **1**, PDB ID: 4MRE; compuesto **2**, PDB ID: 4MRF; compuesto **3**, PDB ID: 4MRG; compuesto **4**, PDB ID: 4NP2; compuesto **5**, PDB ID: 4NP3. Debajo de la estructura cristalina de cada compuesto se encuentran los parámetros de IC_{50} , LE y K_D de cada uno de ellos. Adaptación de la ref. 165.

Posteriormente, se analizaron una serie de análogos con el farmacóforo de THIQ con dos sustituyentes teniendo el objetivo de identificar compuestos que interaccionaran con el bolsillo hidrofóbico, pero que además se extendieran lo suficientemente lejos en el surco de unión del HA y pudieran competir con el HA.

El compuesto **4** difiere de los anteriores en la forma que se extiende a través del bolsillo de unión ya que presenta un grupo metilimidazol (Figura 18A). Una torsión conferida por el grupo orto-metilo provoca un giro de 90° del imidazol, permitiendo que el NH protonado del imidazol forme un enlace de hidrógeno con Glu41 (Figura 18B, compuesto **4**). La estructura cristalina de este compuesto con el bolsillo de unión revela que la THIQ se gira en el sitio de unión, de modo que el nitrógeno endocíclico se encuentra en una posición parecida en comparación con los compuestos anteriores. Pequeños cambios conformacionales con Glu41, junto con una inversión del anillo saturado y una pequeña rotación del farmacóforo de THIQ en el bolsillo de unión, hacen posible que las moléculas

con el nitrógeno endocíclico puedan unirse mediante enlaces de hidrógeno similares. El compuesto **4** presentó una buena actividad sobre la inhibición de la interacción HA-CD44 ($IC_{50} = 14,1$ mM), por lo que, el modo de unión de este compuesto y su buena actividad hace pensar que al optimizar esta molécula se mejoraría la actividad sobre la inhibición de la interacción HA-CD44. Además, este compuesto mostró una LE de $0,19$ kcal mol⁻¹ y una K_D de $4,6$ mM.¹⁶⁵

La optimización del compuesto **4** mediante la adición de una amina exocíclica en el carbono de la posición 8 de la THIQ condujo al compuesto **5** (cabeza de serie, Figura 18A). Mediante el análisis cristalográfico se observan los enlaces de hidrógeno formados con los átomos de oxígeno de los carboxilatos de Glu41 y los enlaces de hidrógeno adicionales que implica la amina exocíclica con Val30 y la unión a las moléculas de agua presentes (Figura 18B, compuesto **5**). Este compuesto presenta tanto la mayor actividad ($IC_{50} = 3,5$ mM) como la mayor afinidad por el surco hidrofóbico ($K_D = 0,4$ mM) descritas hasta ahora y una LE de $0,26$ kcal mol⁻¹.¹⁶⁵

Los estudios cristalográficos también muestran que este tipo de estructuras pueden impedir la unión simultánea del HA por exclusión estérica en el sacárido de GlcNAc: Arg155 y Asn29 giran para crear un complejo por encima y por debajo del anillo aromático del ligando, Glu41 se sitúa lejos de Arg82 para aceptar un enlace de hidrógeno de la amina secundaria de la THIQ que da lugar a la formación de un enlace de hidrógeno con el residuo Asn29 y un enlace de hidrógeno con Val30 (Figura 19).¹⁶⁵

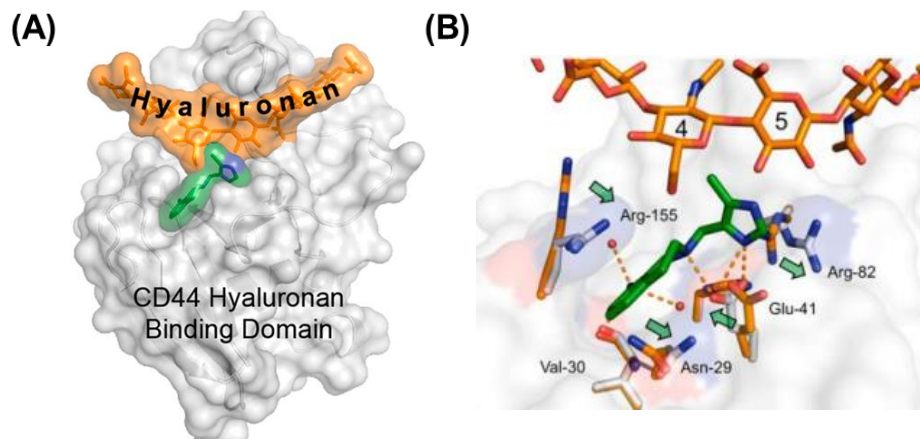


Figura 19. (A) Vista general de la estructura tridimensional CD44-HABD que muestra el bolsillo inducible para la THIQ (compuesto **5**, verde) y el sitio de unión del HA (naranja). (B) Superposición de las estructuras cristalinas THIQ-CD44 (verde, PDB ID: 4NP3) y HA₈-CD44 (naranja, PDB ID: 2JCR).¹⁶⁵

A continuación, se presentan dos análogos de THIQ incluidos en este estudio y que mantienen una estrecha relación con los objetivos de la presente tesis doctoral. Para estas estructuras se ha determinado solo la LE y K_D (Figura 20).¹⁶⁵



Figura 20. Estructura química de distintos análogos de THIQ. Adaptación de la ref. 165.

Estudios de mutación murinos han conseguido crear un nexo entre la conformación del residuo Arg45 y la conformación que adquiere el CD44 para permitir la unión de moléculas de HA.¹¹³ La inhibición por parte de THIQs estaría potenciada por su capacidad para inducir cambios conformacionales que son incompatibles con aquellos producidos por el HA. Cada una de las moléculas mencionadas anteriormente es capaz de provocar cambios conformacionales en torno a los residuos Asn29, Glu41 y Arg82, que están en contacto con el residuo Arg45. Además, la inclusión de la amina exocíclica (anillo de metilimidazol) bloquea la conformación de Arg82, anulando su desplazamiento y dificultando su unión al HA.¹⁶⁵

Estos resultados junto con el hecho de que todas las moléculas presentan afinidades de un orden milimolar, permiten considerar que las THIQs poseen un amplio rango de optimización pudiendo ser excelentes cabezas de serie para futuras investigaciones sobre este tipo de inhibidores basados en moléculas no glucosídicas relativamente pequeñas.

1.6.6.7. Otras pequeñas moléculas no glucosídicas

Otras investigaciones han planteado el uso de pequeños inhibidores no glucosídicos para la inhibición de la interacción HA-CD44 a partir de estrategias computacionales^{162,167} o mediante cribados con técnicas espectroscópicas para evaluar la afinidad a la proteína.^{168,169}

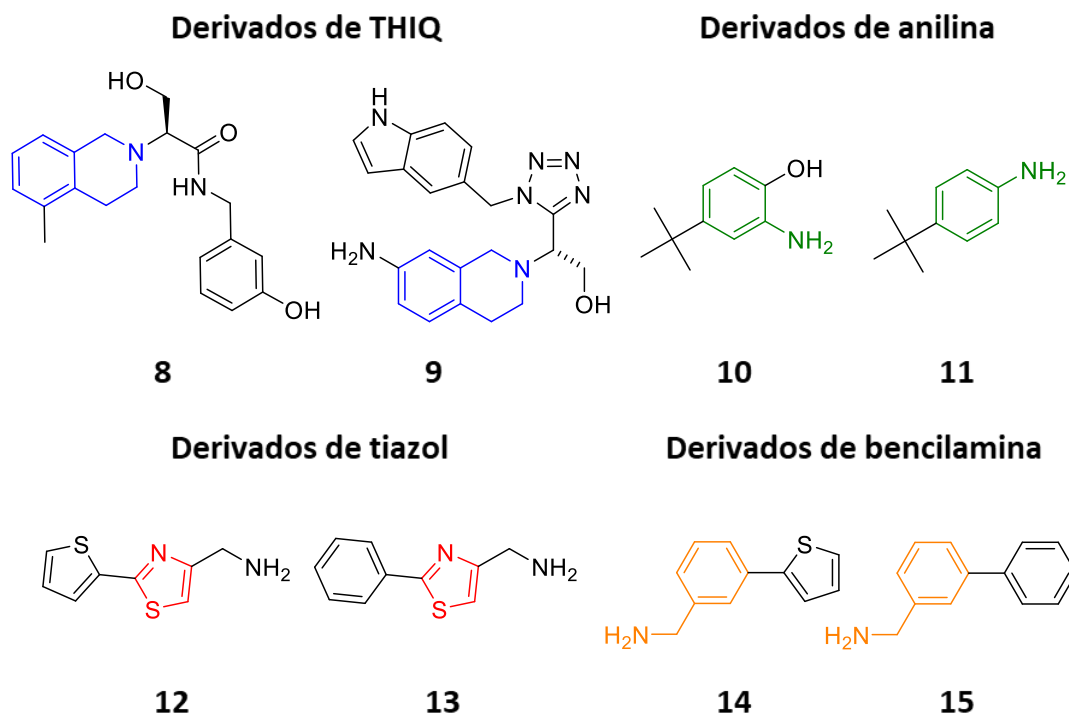


Figura 21. Estructura química de distintos análogos con potencial de inhibir la interacción HA-CD44. Los derivados de THIQ fueron estudiados mediante técnicas computacionales, mientras que el resto de estructuras fueron obtenidas a partir de cribados con estudios de espectroscopía.

Aunque no se han validado biológicamente los resultados, resultan ser prometedores para una posible optimización futura. Entre las moléculas estudiadas, se encuentran derivados de anilina, tiazol, bencilamina y THIQ (Figura 21).¹⁶⁷⁻¹⁶⁹

1.7. Nanotecnología

La investigación para el desarrollo de nuevos fármacos ha evolucionado en las últimas décadas. Sin embargo, no ha habido gran impacto clínico en la quimioterapia contra el cáncer debido a diferentes razones. Muchos de los medicamentos más potentes no presentan una buena solubilidad en agua, lo que implica restricciones en aplicaciones clínicas; por un lado, estos fármacos suelen carecer de especificidad y presentan una escasa acumulación en el tumor por lo que generan toxicidad para las células sanas y además muestran una mala farmacocinética y biodisponibilidad *in vivo*. Por otro lado, el desarrollo de resistencias a estos tratamientos es otra de las causas por las que su eficacia está limitada.^{170,171}

La quimioterapia convencional requiere dosis altas de fármaco, frecuentemente causando efectos secundarios tóxicos graves debido a una selectividad insuficiente. Por ello, la investigación actual

está enfocada a investigar sobre nuevos procedimientos para el diagnóstico precoz y una mejora de la selectividad terapéutica, además de la búsqueda de nuevos biomarcadores.¹⁷¹

En las últimas décadas, la nanotecnología se ha convertido en una herramienta esencial en el campo biomédico para superar las dificultades mencionadas.¹⁷² Las continuas mejoras en esta disciplina han permitido su aplicación en la biomedicina, dando lugar a la nanomedicina.¹⁷³ En particular, recientemente se han producido grandes avances en la aplicación de la nanomedicina en el tratamiento del cáncer, convirtiéndose en un enfoque terapéutico prometedor para superar las diversas limitaciones de la quimioterapia convencional. Una de las principales ventajas del uso de la nanomedicina es transportar y liberar específicamente al fármaco en la célula o tejido diana. Por lo tanto, se mejora la internalización de los medicamentos y su acumulación intracelular selectiva en las células tumorales haciendo que la exposición del tejido no tumoral al fármaco se reduzca y así la toxicidad de los mismos (Figura 22).^{173,174}

La nanomedicina aplicada al cáncer ha hecho una gran contribución a las estrategias de tratamiento permitiendo la liberación sitio-específica de agentes quimioterapéuticos, basándose en sus características fisicoquímicas y biológicas.¹⁷⁵ Debido a los avances en la química sintética en las últimas décadas, se han desarrollado diferentes nanomateriales orgánicos e inorgánicos, incluyendo las nanopartículas (NPs), que pueden usarse para una variedad de aplicaciones biomédicas, como la liberación controlada de fármacos, el diagnóstico del cáncer y su tratamiento o como agentes de contraste de imagen.^{175,176} El sistema de liberación de los fármacos basado en la nanomedicina y dirigido específicamente a las células tumorales, tiene varias ventajas sobre las terapias convencionales: vida útil más larga, aumento de la solubilización de fármacos, mejora en la biodistribución de los fármacos, administración de varias combinaciones de fármacos y administración de sustancias hidrofílicas e hidrófobas por vía oral, nasal, parenteral e intraocular. Además, la nanomedicina permite desarrollar nuevos métodos para superar la resistencia a la quimioterapia (Figura 22).^{170,174}

Hay diversos tipos de NPs que actualmente se emplean en una amplia variedad de aplicaciones biomédicas. Entre las NPs más utilizadas se encuentran, las de naturaleza orgánica (poliméricas, lipídicas, nanoestructuras de carbono y poliméricas-magnéticas) e inorgánica (semiconductoras, plasmónicas, de sílica y magnéticas).¹⁷⁷

Las NPs poseen unas propiedades fisicoquímicas muy características debido a su tamaño nanométrico (1-1.000 nm) y tienen la capacidad de transportar distintas moléculas bioactivas de tamaño variable, lo que permite la encapsulación o unión de distintos ligandos a su superficie. Además de controlar su tamaño, también se puede modular su forma y sus propiedades

superficiales, permitiendo mejorar la especificidad a determinados órganos, tejidos o células. Estas características permiten considerar a las NPs como nanofármacos teranósticos prometedores contra el cáncer.^{173,177-179}

Teragnosis es la combinación de técnicas terapéuticas y de diagnóstico para diagnosticar, tratar y monitorizar enfermedades simultáneamente.¹⁸⁰ Las NPs, y más concretamente las NPs poliméricas, se utilizan ampliamente como nanosistemas teranósticos debido a su elevada estabilidad, fácil adaptabilidad, mayor tiempo en la circulación sistémica y acumulación preferente en el tejido diana mediante orientación pasiva.¹⁸¹⁻¹⁸⁴ Sin embargo, la heterogeneidad tumoral puede limitar el acceso de los nanosistemas a la masa tumoral. Además, la orientación pasiva no impide que las NPs penetren en órganos sanos con endotelio permeable, lo que contribuye a su citotoxicidad. Por lo tanto, el diseño de nanosistemas con potencial de orientación activa es esencial para la seguridad y eficacia de los nanosistemas teranósticos.^{181,185}

La orientación activa consiste en orientar el transporte de NPs hacia las células diana específicas, aumentando la retención específica y acumulación de las mismas en la zona tumoral y por consiguiente generando una eficaz internalización. En el ámbito de la nanomedicina, esto puede lograrse funcionalizando los nanosistemas con ligandos específicos que se unen de forma selectiva a receptores de la superficie celular sobreexpresados o a receptores expresados de forma exclusiva en las células diana, tejidos, dominios subcelulares u órganos diana. Esta estrategia ha dado resultados prometedores en la captación celular de las NPs, lo que repercute directamente en la eficacia de los nanosistemas.^{184,186} Los ligandos más utilizados son los anticuerpos, los aptámeros y los péptidos dirigidos, siendo importante resaltar el uso del HA como ligando para realizar terapia dirigida. Este tipo de moléculas no sólo permiten abordar las limitaciones de la orientación pasiva, sino también diseñar bioherramientas potentes, no invasivas y personalizadas contra el cáncer (Figura 22).^{183,184,187-189}

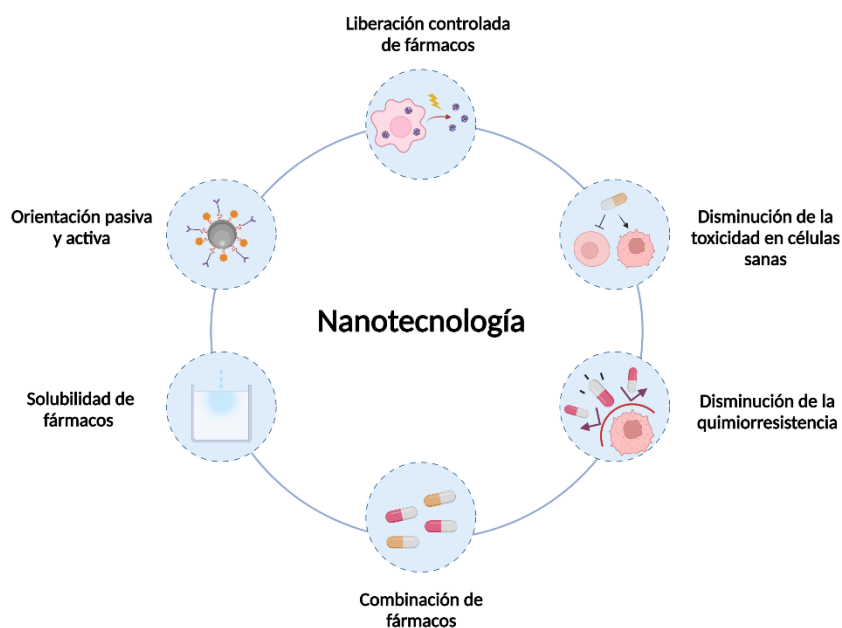


Figura 22. Ventajas y características más importantes del empleo de la nanotecnología aplicada a la terapia contra el cáncer.

1.7.1. Nanotecnología activamente dirigida hacia CD44

Las NPs activamente dirigidas hacia el CD44 sobreexpresado en las células tumorales, a través del uso del HA como ligando o mediante anticuerpos específicos, pueden evadir los mecanismos de eflujo de fármacos facilitando la entrada de los mismos en células tumorales a través de endocitosis mediada por receptores, liberando así la carga de fármaco desde el compartimento endolisosómico al citoplasma.^{185,190}

Por un lado, se han desarrollado nuevas terapias para el suministro de quimioterapéuticos basadas en NPs recubiertas de HA. El HA se ha empleado como el ligando para dirigir las NPs a las células tumorales que sobreexpresaban CD44. Por ejemplo, en un estudio reciente se han utilizado NPs tipo micela con paclitaxel, un fármaco quimioterapéutico hidrofóbico que es utilizado ampliamente contra diferentes tumores sólidos y que causa efectos secundarios significativos como la neurotoxicidad. Sin embargo, dado que la bioestabilidad de este agente antimitótico a los tumores es limitada, se utilizan dosis elevadas en la quimioterapia convencional. Esto conduce, por lo tanto, a la toxicidad sobre las células sanas, así como al aumento de la quimiorresistencia. Los estudios biológicos *in vitro* e *in vivo* realizados sobre el nanosistema combinado de HA y paclitaxel resultaron mejorar significativamente el efecto antitumoral y disminuir de forma considerable los efectos citotóxicos en comparación con el paclitaxel convencional.¹⁹⁰

Otro enfoque llevado a cabo ha sido la generación de NPs de respuesta dual para la administración simultánea de múltiples fármacos antitumorales dirigidos a los mecanismos de resistencia de las

CSC. Las NPs consistían en cuatro polímeros aprobados por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, acrónimo del inglés *food and drug administration*) para uso médico: ácido poli(láctico-co-glicósido) (PLGA), Pluronic® F127, quitosano y el HA. En este estudio, el HA se conjugó en la superficie de las NPs para dirigir las células tumorales y además, se utilizó para sustituir el alcohol de polivinilo como agente estabilizante para facilitar la liberación de los agentes terapéuticos mediante estrategias sensibles al pH y a estímulos térmicos. Las NPs transportaban mediante encapsulación doxorubicina e irinotecán para inhibir la actividad de las TOP2 y 1, respectivamente. Estas NPs mostraron tener un efecto antitumoral sobre las CSCs mamarias y prostáticas humanas superior en unas 500 veces a la terapia combinada de los dos compuestos antitumorales sin encapsular.¹⁹¹ Es importante resaltar que ambos quimioterapéuticos son fármacos eficaces para el tratamiento de pacientes con cáncer. Sin embargo, su uso está limitado por efectos secundarios agudos y crónicos, como hepatotoxicidad, nefrotoxicidad y cardiotoxicidad.¹⁹¹

También se han desarrollado nanosistemas basados en HA para la liberación específica de proteínas¹⁹² y nanodispositivos capaces de realizar una liberación controlada de antígenos con el objetivo de inducir una respuesta inmunitaria potente de gran eficacia y mejorar el efecto de las vacunas tradicionales.¹⁹³ Como en los anteriores casos, el HA se usó como molécula para dirigir el nanosistema hacia las células con sobreexpresión de CD44.

En otro estudio reciente se ha diseñado y evaluado un nanosistema polimérico de PLGA recubierto de HA que combina la quimioterapia con la terapia fotodinámica contra las CSCs de cáncer de mama que sobreexpresan CD44. Este nanosistema permite la liberación simultánea del fármaco docetaxel y del fotosensibilizador meso-tetrafenil cloro disulfonato. La terapia combinada de NPs con el fármaco y el fotosensibilizador mostraron mayor eficacia que el tratamiento con NPs terapéuticas o fotodinámicas de forma individual.¹⁹⁴ Por otro lado, se ha llevado a cabo la síntesis de NPs de poli (β -amino éster) con triptólido como agente antitumoral a liberar y con HA como ligando para llevar a cabo la orientación activa hacia las células tumorales. La estrategia de liberación se basaba en la sensibilidad al pH y la reacción de reducción-oxidación. Esta combinación tuvo efectos positivos sobre la detención de la progresión y la metástasis tumoral, consiguiendo además una reducción significativa de los efectos citotóxicos provocados por el agente terapéutico tras su uso de forma convencional.¹⁹⁵

Además de nanosistemas basados en HA para ser dirigidos hacia las células con sobreexpresión de CD44 y liberar el fármaco de forma específica (Figura 23), recientemente se ha desarrollado una estrategia que utiliza un anticuerpo contra el receptor CD44 como ligando clave para llevar a cabo la liberación selectiva del paclitaxel (Figura 23). Este trabajo se basaba en el uso de nanocápsulas

lipídicas de aceite de oliva como sistema de transporte y de liberación del agente terapéutico funcionalizadas con un anti-CD44 como ligando para realizar la orientación activa contra células tumorales de páncreas marcado con fluorescencia para permitir su seguimiento. Los resultados de este estudio indicaron alta captación del nanosistema por las células y mostraron una eficacia antitumoral cuatro veces mayor que el paclitaxel convencional. Esta estrategia terapéutica también fue validada en un modelo *in vivo*.¹⁹⁶

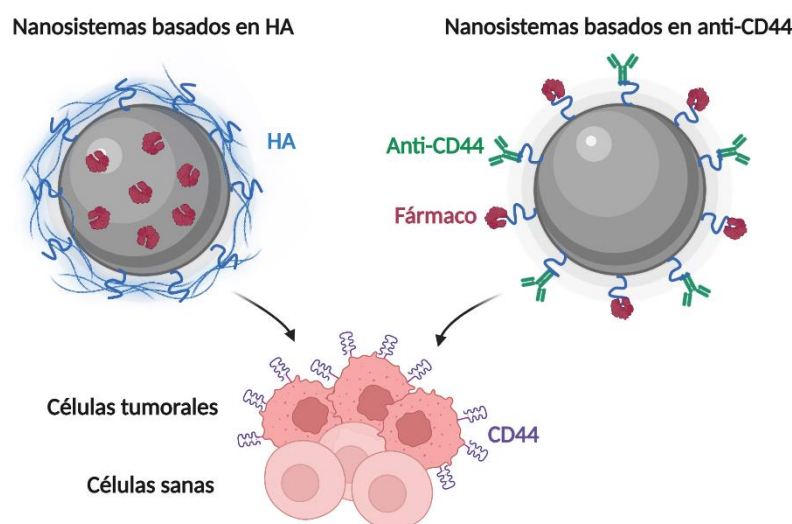


Figura 23. Nanotecnología activamente dirigida hacia CD44. La orientación activa se puede realizar mediante el recubrimiento de los nanosistemas con HA o mediante la conjugación de anticuerpos anti-CD44 a las NPs para la posterior liberación del fármaco. Tanto el HA como los anticuerpos actúan como ligandos específicos del CD44 sobreexpresado en las células tumorales.

A pesar de los importantes avances en el uso de la nanomedicina dirigida específicamente al receptor CD44, no se ha desarrollado ninguna estrategia basada en nanotecnología con el objetivo de bloquear la interacción HA-CD44 a través de la inhibición del receptor como terapia antitumoral. La nanotecnología permitiría aumentar la interacción de los inhibidores con el CD44 y podría reducir los efectos tóxicos sobre las células normales, de esta manera la terapia antitumoral basada en la inhibición de la interacción HA-CD44 sería mucho más eficiente.

1.7.2. NPs como sistema de liberación controlada y selectiva de fármacos

Las NPs nos permiten realizar una liberación sostenida de los fármacos que van conjugados a las mismas. Los fármacos se pueden liberar desde el nanosistema hasta la circulación sistémica durante un tiempo prolongado. Una vez se haya realizado la biodistribución y acumulación de las NPs en la célula o tejido diana, mediante un estímulo externo (temperatura, luz, etc) o interno (redox, procesos enzimáticos como esterasas, cambios de pH, etc) se procede a la activación y liberación del fármaco desde las NPs, esto se denomina liberación sensible a estímulos.¹⁹⁷⁻¹⁹⁹

1.7.2.1. Liberación selectiva basada en la acción de las esterasas

Dado que los procesos fisiológicos y metabólicos del cuerpo humano dependen de las enzimas, la expresión y actividad anormales de las enzimas son la base patológica de muchas enfermedades. Comparadas con las de los tejidos normales, algunas enzimas se sobreexpresan en los tejidos tumorales, mostrando así una sobreexpresión en el microambiente tumoral. Una estrategia empleada en la liberación selectiva de fármacos en nanotecnología se basa en la explotación de las enzimas sobreexpresadas en el microambiente tumoral, en concreto las esterasas, para obtener una liberación del fármaco gracias a la hidrólisis del enlace éster. En las líneas celulares tumorales, las esterasas sobreexpresadas desempeñan un papel importante en la migración, invasión, supervivencia y crecimiento tumoral *in vivo*. Las NPs que responden a las esterasas podrían ser sensibles a las células tumorales debido a la sobreexpresión de las esterasas en estas células. Se han diseñado una amplia variedad de NPs para liberación selectiva de terapias antitumorales mediada por la actividad de las esterasas.^{200,201}

Por ejemplo, se ha descrito recientemente el desarrollo de unas NPs inyectables cargadas con un inhibidor de la TOP1 humana, en concreto 7-etil-10-hidroxicamptotecina, obtenidas mediante la unión covalente del fármaco con oligo- ϵ -caprolactona para formar conjugados a través de un enlace activable por esterasas, seguido de la encapsulación de estos profármacos en matrices poliméricas exógenas. Se observó una recesión tumoral duradera en un modelo de tumor ortotópico inducido químicamente.²⁰²

1.7.2.2. Liberación selectiva basada en cambios de pH

El pH es un parámetro ampliamente conocido a la hora de diferenciar entre células normales y tumorales. Normalmente, el valor de pH de las células o tejidos normales se encuentra alrededor de 7,4. En condiciones asociadas a alguna patología el pH disminuye, es decir, tiene una tendencia a volverse más ácido. Este hecho se asocia al aumento de la producción del ácido láctico generado por la regulación anormal de la glucólisis, característica común de muchos tumores. Generalmente el valor de pH oscila entre 6 y 7 en un gran número de tumores sólidos, aunque puede sufrir variaciones. Aunque a simple vista no parezca una gran diferencia entre el valor del pH normal y el tumoral, este hecho ha permitido desarrollar una nueva estrategia en la liberación específica y selectiva de fármacos hacia las células tumorales (Figura 24).²⁰³⁻²⁰⁶

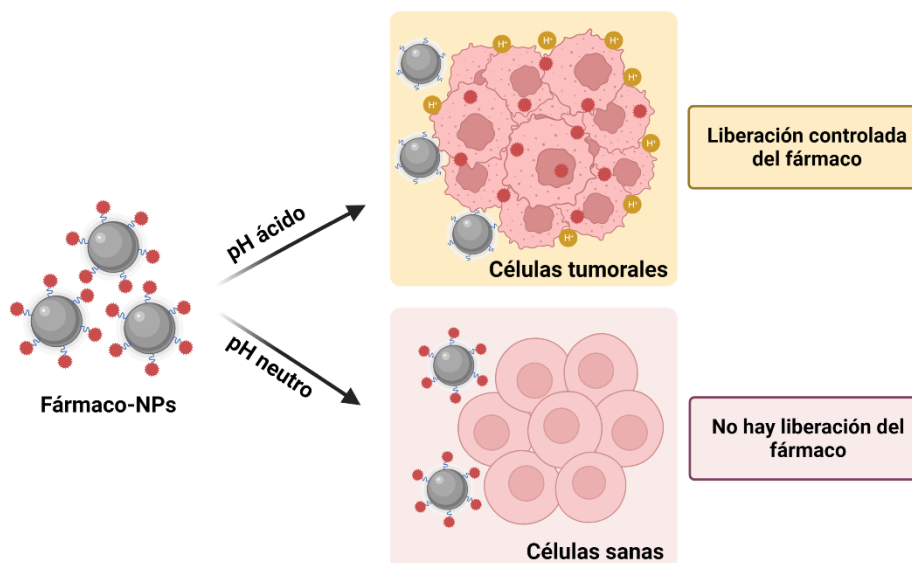


Figura 24. Estrategia de liberación selectiva de fármacos basada en la sensibilidad al pH del microambiente tumoral. El pH ácido característico de las células tumorales permite la liberación del fármaco conjugado al nanosistema favoreciendo la acción terapéutica. En cambio, el pH neutro de las células sanas va a impedir la liberación del agente antitumoral y por tanto no se van a ver afectadas.

Con esta estrategia aplicada a las NPs, surgen grandes ventajas ligadas al uso de las NPs como terapia antitumoral. Debido a la posibilidad de modificar la farmacocinética y al aumentar la especificidad del tratamiento hacia las células o tejido tumoral, se va a producir un aumento de la retención y acumulación específica de los agentes terapéuticos en la zona tumoral y esto se va a traducir en una disminución significativa de los efectos secundarios tóxicos en las células sanas. Esta estrategia también ofrece nuevas posibilidades para paliar el problema de la resistencia a la quimioterapia al poder liberar el agente terapéutico en el receptor o diana específica.^{203,206}

Existen muchos tipos de nanosistemas que han aplicado esta estrategia basada en el pH como, por ejemplo, NPs de carbonato cálcico y sílica,²⁰⁷ NPs de PLGA,²⁰⁸ polímeros,²⁰⁹ dendrímeros²¹⁰ o NPs de oro.^{211–213}

1.7.3. NPs de poliestireno

1.7.3.1. Síntesis y funcionalización de las NPs de poliestireno

El grupo de investigación NanoChemBio es un referente en la síntesis y aplicación de NPs de poliestireno multifuncionalizadas reticuladas. La síntesis inicial de estas NPs se realizó por el método de polimerización por dispersión.²¹⁴ Más tarde se describió un nuevo método de síntesis para las NPs de poliestireno amino funcionalizadas mediante un protocolo de polimerización por emulsión libre de emulsionante. Las NPs de poliestireno reticuladas se generan a partir de la polimerización del

estireno con el divinilbenceno (DVB) que actúa como agente conector de las cadenas del polímero. Este método permite obtener poblaciones monodispersas de NPs de poliestireno amino funcionalizadas reticuladas, estables en el entorno biológico, robustas, de tamaño definido (de 100 nm a 2 μm) y con morfología esférica.^{215,216}

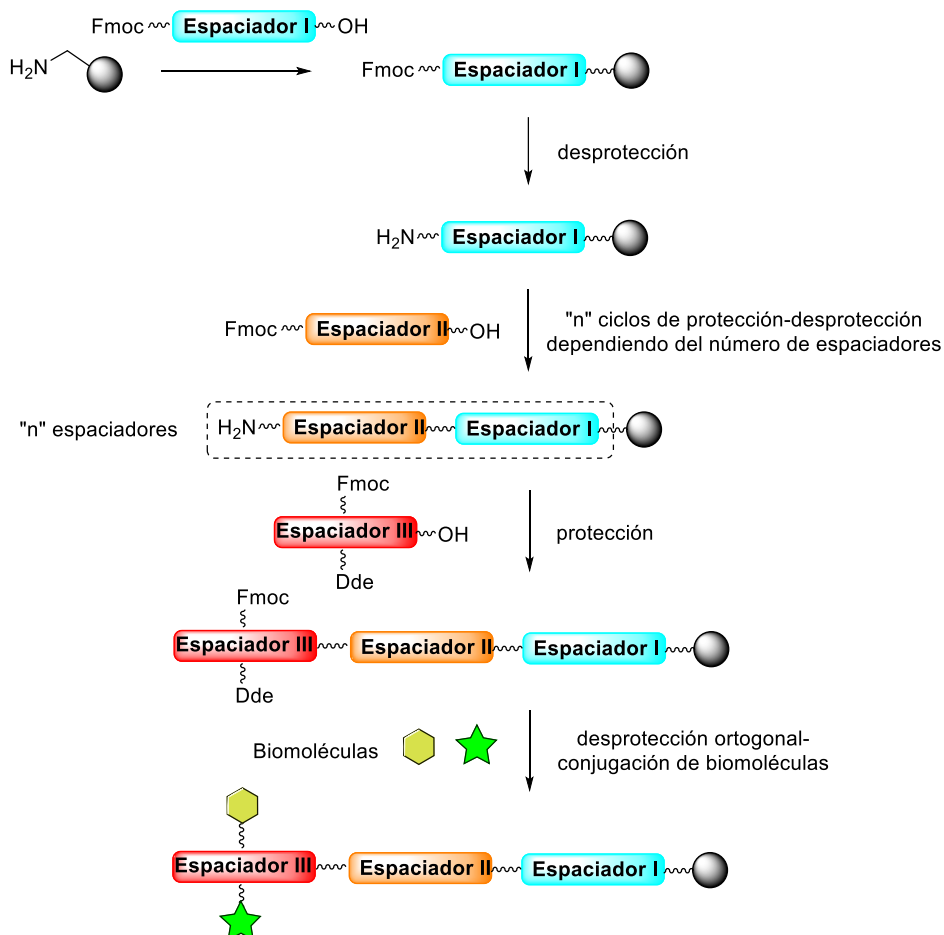
Este tipo de NPs presentan una gran versatilidad química permitiendo ser fácilmente multifuncionalizadas con distintas moléculas usando la metodología de síntesis en fase sólida de péptidos (SPPS, acrónimo del inglés *solid phase peptide synthesis*) y estrategias de protección ortogonal gracias a la amino funcionalización.²¹⁷ Esto abre un gran número de posibilidades para la aplicación de estas NPs pudiendo abordar cuestiones como la obtención de imágenes, la monitorización o el tratamiento, de forma independiente o simultáneamente, de una manera muy efectiva. Además, las NPs reticuladas ofrecen mayores ventajas sobre las NPs no reticuladas porque presentan una estabilidad mecánica mejorada en varios disolventes orgánicos como la dimetilformamida (DMF) o en disolventes hidrofílicos como el agua, lo que permite un amplio espectro de reacciones posibles que pueden llevarse a cabo sobre ellas.^{183,218}

Con este tipo de NPs, las reacciones químicas más comunes se realizan acoplado un grupo ácido, previamente activado, al grupo amino de las NPs a través de la formación de un enlace amida mediante el uso de reactivos de acoplamiento como oximas y carbodiimidas.²¹⁹ Otras reacciones de bioconjugación que se pueden llevar a cabo con las NPs de poliestireno son, conjugación de grupos cetona con hidracina a través de la formación de enlaces hidrazona o reacción de maleimidas con tioles formando tioéteres, entre otras.^{220,221}

Para cuantificar la carga de las NPs, un aminoácido con el grupo amina protegido con el grupo protector 9H-fluoren-9-il-metoxicarbonilo (Fmoc), normalmente Fmoc-glicina-OH, se acopla a las NPs mediante un enlace amida. A continuación, el grupo protector Fmoc se elimina con piperidina, permitiendo cuantificar el Fmoc midiendo el aducto dibenzofulveno-piperidina que se genera. Esta medida permite monitorizar la eficiencia de las reacciones posteriores además de determinar la carga de las NPs en cada paso a partir de la cuantificación de los grupos amino primarios de las NPs.²²² La monitorización de las reacciones también se puede llevar a cabo cualitativamente mediante el test de la ninhidrina, un ensayo que permite determinar los grupos amino libres de las NPs.²²³ Cuando el grupo amina se encuentra libre, otro aminoácido o espaciador con Fmoc puede acoplarse a las NPs. De esta manera, mediante la formación de enlaces amida y ciclos de protección-desprotección se pueden ir conjugando distintos espaciadores y moléculas (Esquema 1).²¹⁶

Por otro lado, cuando se precisa realizar una funcionalización dual de dos moléculas distintas se recurre a la conjugación de un espaciador bifuncionalizado protegido con los grupos protectores

ortogonales Fmoc y etil 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden) (Dde), concretamente se emplea la Fmoc-lisina(Dde)-OH. La ortogonalidad de estos grupos permite la introducción de dos moléculas, por ejemplo, un agente terapéutico y un fluoróforo, en diferentes puntos temporales y en las mismas NPs (Esquema 1).²²⁴



Esquema 1. Ejemplo de multifuncionalización de las NPs de poliestireno amino funcionalizadas mediante SPPS y estrategias de protección ortogonal usando como grupos protectores Fmoc y Dde.

A modo resumen, las NPs de poliestireno tienen una serie de ventajas sobre otros sistemas de liberación, incluyendo las siguientes: (a) se pueden conjugar de forma eficiente y segura una variedad de estructuras biológicamente relevantes tales como moléculas pequeñas (biosensores, fluoróforos y fármacos), péptidos, anticuerpos, proteínas y ácidos nucleicos a la superficie de las NPs a través del uso de protocolos de conjugación eficaces sin dañar el material transportado^{184,217,225–230} (Figura 25); (b) mediante este tipo de NPs se puede llevar a cabo la liberación controlada y eficiente de la carga bioactiva mediante diversos estímulos como la luz ultravioleta, la temperatura o el pH; (c) se pueden alcanzar altas concentraciones de la molécula a conjugar en las NPs; (d) las NPs marcadas fluorescentemente pueden evaluarse eficientemente mediante técnicas estándar tales como citometría de flujo y microscopía; (e) la carga de moléculas bioactivas en las NPs se puede

monitorizar, permitiendo alcanzar las cargas deseadas dependiendo de la aplicación específica; (f) una serie de líneas celulares, entre las que se incluyen células adherentes, en suspensión, primarias y células madre, han sido nanofectadas con éxito sin observar ningún tipo de efecto citotóxico; (g) cuando se desea, como en el caso del diagnóstico, la carga se puede mantener junto con las NPs, por lo que la señal no se pierde; y (h) la activación selectiva de biomoléculas puede lograrse mediante la liberación intracelular de microcatalizadores de metales como el paladio diseñados a partir de esta nanotecnología.^{183,184,216,218,226}

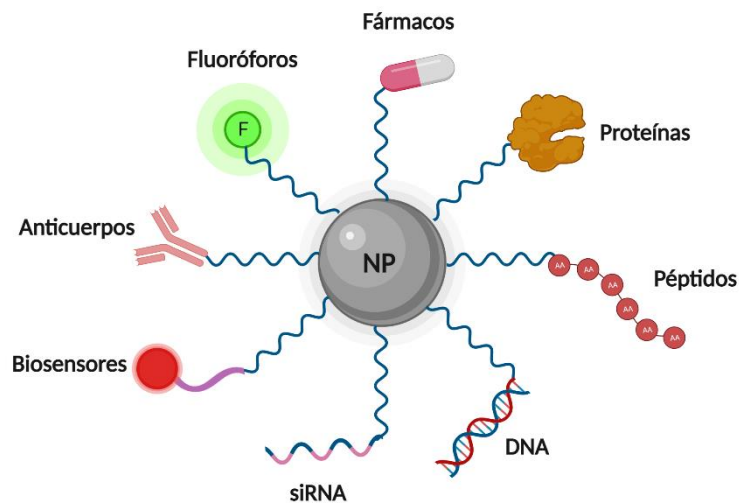


Figura 25. Tipos de biomoléculas que se pueden conjugar a las NPs de poliestireno para su aplicación en diversas ramas de la nanomedicina, como el diagnóstico, la monitorización o el tratamiento.

1.7.3.2. Caracterización fisicoquímica de las NPs de poliestireno

Una vez realizada la síntesis y funcionalización de las NPs de poliestireno, es fundamental realizar una caracterización fisicoquímica detallada de las mismas. Los parámetros más importantes a estudiar son el tamaño, morfología, estabilidad, caracterización de la superficie, concentración, carga y liberación de las moléculas conjugadas. Aunque existen varias técnicas para su determinación, no siempre es necesario usar todas. De hecho, el uso de unas u otras se hará en función de las moléculas que lleven las NPs, utilizándose a veces solas o en combinación con otras. Algunas de las técnicas más utilizadas son:

a) *Dispersión de luz dinámica (DLS, acrónimo del inglés dynamic light scattering)*. La espectroscopia de correlación de fotones o DLS es una técnica fisicoquímica que permite determinar el tamaño hidrodinámico de la población de partículas en solución. Además del tamaño, mediante esta técnica se puede determinar el índice de polidispersidad (PDI), un parámetro que presenta un rango entre 0 (población monodispersa) y 1 (población polidispersa). De esta forma, cuanto más bajo sea el PDI, más homogéneo será el tamaño de la población de NPs.^{231,232}

b) *Microscopía electrónica de barrido (SEM, acrónimo del inglés scanning electron microscopy) y de transmisión (TEM, acrónimo del inglés transmission electron microscopy)*. Estas técnicas de microscopía permiten determinar fundamentalmente el tamaño y la morfología de las NPs. Además, permiten ver si hay aglomeraciones entre la población de NPs y hacer una determinación absoluta del tamaño de partícula mediante la examinación individual de cada una.^{233,234}

c) *Potencial zeta*. Mediante este parámetro se mide y cuantifica la carga eléctrica de la superficie de las NPs. Permite obtener información sobre la estabilidad de las dispersiones de NPs, considerando una mayor estabilidad para los valores altos (± 20 mV) en los sistemas poliméricos. Además, esta medida se usa para monitorizar la eficacia de cada paso de funcionalización llevado a cabo sobre las NPs.^{234,235}

d) *Citometría de flujo y microscopía confocal y de fluorescencia*. Estas técnicas permiten caracterizar y detectar la emisión de fluorescencia de las moléculas fluorescentes conjugadas a las NPs.^{234,236,237}

También es de especial importancia tener conocimiento sobre la concentración de NPs en cada momento, mediante un ensayo basado en los principios de la turbidimetría en el que se puede obtener la densidad óptica (OD) de la suspensión de NPs a estudiar, se puede conocer las NPs por unidad de volumen. La intensidad de la luz dispersada a través de las suspensiones de NPs es directamente proporcional a la cantidad de NPs, esta determinación se puede realizar con un espectrofotómetro.²¹⁸ Respecto a la determinación de la carga y la liberación de moléculas como fármacos, se llevan a cabo una serie de cálculos para obtener la eficacia de conjugación y de liberación a partir de la realización previa de curvas de calibración estándar mediante espectrofotometría o cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, acrónimo del inglés *high performance liquid chromatography*).²²⁶

1.7.3.3. Aplicaciones de las NPs de poliestireno

Este tipo de NPs han demostrado ser completamente biocompatibles con el medio celular y gracias a su fácil manejo, estabilidad, versatilidad química y capacidad de conjugar y poder cuantificar cargas de distinto tipo, han servido para diseñar y evaluar diferentes nanosistemas multifuncionalizados con diversas aplicaciones en el campo biomédico. Algunos ejemplos son:

a) *Monitorización de la proliferación celular*. Se ha creado un método fluorescente eficaz para hacer seguimiento de la proliferación celular de diferentes líneas celulares mediante el uso de NPs marcadas fluorescentemente que se internalizaban fácilmente en las células.²³⁸

b) Transporte y liberación selectiva de ácidos nucleicos. Se han usado NPs de poliestireno para la liberación de material genético como ADN y siRNA. Las NPs con ADN permitieron transfectar con éxito células T de hibridoma posibilitando la expresión de una proteína biológicamente relevante implicada en la señalización celular. Por otro lado, las NPs conjugadas con siRNA se han usado principalmente para el silenciamiento de proteínas diana en distintas líneas tumorales sin ocasionar toxicidad.^{228,229}

c) NPs como estrategia para capturar y detectar ácidos nucleicos. Recientemente, se ha desarrollado un sistema basado en nanotecnología capaz de detectar ácidos nucleicos mediante citometría de flujo. Se ha llevado a cabo con éxito la detección de las secuencias del codón 12 de KRAS (acrónimo del inglés *kirsten rat sarcoma virus*) y del micro-ARN 122 mediante esta tecnología.²³⁹

d) Transporte y liberación de proteínas. Proteínas como la β -galactosidasa y la proteína verde fluorescente (GFP, acrónimo del inglés *green fluorescent protein*) han sido conjugadas a NPs de poliestireno y se han evaluado como sistemas de liberación, resultado ser efectivos en varias líneas celulares embrionarias y neuronales.^{240,241}

e) NPs como sensores en medios celulares.

- Sensores de pH en células. Se han diseñado y evaluado NPs marcadas fluorescentemente que actúan midiendo en tiempo real el pH intracelular en células vivas. Esta aplicación fue validada mediante técnicas físicoquímicas como espectrofluorometría, microscopía fluorescente o citometría de flujo.²⁴²
- Sensores de calcio en tiempo real. Se ha llevado a cabo la detección de modificaciones en las concentraciones de calcio intracelular mediante la conjugación a las NPs de poliestireno de un sensor molecular sensible a las variaciones de calcio citosólico. Estos estudios se han realizado en diversas líneas celulares y además se han validado en periodos de tiempos largos demostrando rapidez y una óptima sensibilidad.²⁴³
- Sensores de apoptosis. A partir de la multifuncionalización de NPs con distintos fluoróforos y con un péptido que actúa como sustrato de la caspasa 3 se realizó la validación de este nanosistema para determinar, monitorizar y medir procesos apoptóticos mediados por varias caspasas mediante citometría de flujo.²⁴⁴

f) Análisis proteómico de dianas terapéuticas. Se ha realizado la síntesis de NPs conjugadas con agentes terapéuticos con la capacidad de unirse a sus proteínas diana en el medio intracelular tras penetrar en las células. En concreto, se evaluaron con éxito NPs fluorescentes con dasatinib tras

observar la unión del ligando a su diana farmacológica (proteína quinasa Src) e inducir una reducción en la actividad *in vitro* de la misma.²²⁷

g) NPs como herramientas fluorescentes y de imagen molecular. Además de las diferentes aplicaciones donde hemos visto que las NPs marcadas con fluoróforos tienen gran utilidad, existen otros campos como la imagen molecular o tecnologías basadas en fluorescencia donde este tipo de NPs son de especial importancia. Existen muchos tipos de fluoróforos que se pueden conjugar a las NPs, carboxifluoresceína, fluoruro de dansilo, xantenos, derivados de cianina o rodaminas, entre otros.^{217,238,245}

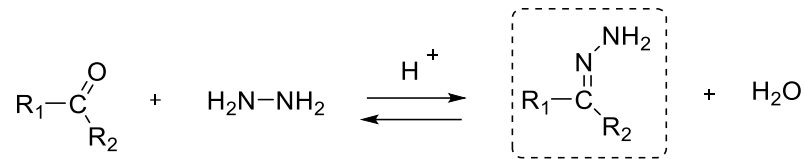
h) NPs como catalizadores intracelulares. Se han realizado importantes avances en el campo nanotecnología aplicada a la catálisis, por ejemplo, se ha sintetizado y evaluado un nanosistema con paladio que permite catalizar reacciones químicas específicas en células vivas sin mostrar toxicidad. Estas NPs con paladio pueden actuar como sistemas activadores produciendo la formación de compuestos fluorescentes a partir de otros no fluorescentes o la activación bioortogonal de profármacos evitando de esta manera los efectos adversos de los mismos.^{216,246}

i) NPs que permiten la orientación activa mediante anticuerpos específicos. Se ha desarrollado un nanosistema versátil, robusto y estable con aplicación en la orientación activa. El nanosistema se basa en NPs bifuncionalizadas conjugadas a un anticuerpo monoclonal que permite la orientación activa de (i) un fluoróforo para monitorizar el nanosistema o (ii) un agente terapéutico para estudiar las respuestas específicas de las células. Este nanosistema ha demostrado tener la capacidad de discriminar entre distintas líneas celulares en un co-cultivo celular basándose en la diferencia de los niveles de expresión de diversos receptores de la superficie celular de las células. Como receptores diana se estudiaron EGFR y CD147.¹⁸⁴

Los resultados obtenidos sugieren que esta tecnología se pueda aplicar a otros tipos de receptores celulares y a otras cargas bioactivas permitiendo dirigir específicamente el nanosistema hacia uno u otro tipo de células con diferentes niveles de expresión del receptor específico. Este estudio ofrece una herramienta terapéutica con gran potencial para la medicina personalizada.¹⁸⁴

j) NPs como sistema de liberación controlada y selectiva de fármacos. En nuestro grupo de investigación, se ha llevado a cabo la síntesis y la evaluación de un nanosistema polimérico conjugado con el agente terapéutico doxorubicina. Con este estudio se ha validado la estrategia sensible al pH que permite la liberación controlada y selectiva del fármaco.²²⁶ La estrategia para la conjugación de la doxorubicina al nanosistema se basaba en la formación de un enlace covalente, denominado hidrazona (Esquema 2), a partir de la cetona de la posición 13 de la doxorubicina con la amina de la hidracina previamente conjugada en las NPs. Este enlace tiene la característica de ser

estable en condiciones neutras, pudiendo ser fácilmente hidrolizado en el medio ácido característico del microambiente tumoral. La hidrólisis de este enlace se origina al invertir las etapas de formación del mismo.^{226,247}



Esquema 2. Reacción de la formación del enlace hidrazona a partir de un grupo cetona y una amina de la hidracina. En condiciones neutras este enlace presenta estabilidad, mientras que a valores bajos de pH se hidroliza.

Estas características del enlace hidrazona permiten poder aplicar esta estrategia química a diferentes aplicaciones biológicas como la liberación controlada y selectiva de fármacos. Los resultados biológicos *in vitro* de este estudio han mostrado que el nanosistema polimérico mejora significativamente la eficacia del fármaco convencional contra la línea MDA-MB-231 de cáncer de mama triple negativo.²²⁶

Por otro lado, tras la validación del anterior estudio, se ha desarrollado un nanodispositivo teranóstico para el cáncer de mama triple negativo trifuncionalizado con: (i) el fluoróforo cianina 7 (Cy7) como agente para monitorizar las NPs; (ii) doxorubicina como agente terapéutico; y (iii) un péptido orientador específico contra la proteína neuropilina-1, sobreexpresada en cáncer de mama triple negativo, para el direccionamiento específico del nanosistema. La validación del nanosistema se llevó a cabo tanto *in vitro* como *in vivo*.¹⁸³

Este tipo de nanosistemas se ha llevado a cabo utilizando estrategias químicas que pueden extrapolarse a otras aplicaciones, pudiendo servir de base para la creación de nuevas y potentes herramientas para la medicina de precisión contra el cáncer.

2. Objectives

This thesis presents a new antitumor treatment strategy based on the development of inhibitors of the HA-CD44 interaction and its selective release by nanotechnology.

Objective 1. To develop novel small-molecule inhibitors of the HA-CD44 interaction.

It is proposed to develop a series of heterocyclic structures derived from THIQ that reach the HA binding pocket, particularly subsites 4 and 5, (Figure 26) and that can directly compete for HA binding. Particularly, to study the influence on the biological activity of the inclusion of bulky groups or alkyl chains as well as the presence of different substituents in the THIQ scaffold.

1.1. To design and synthesize three new series of THIQ derivatives.

1.2. To characterize the synthesized structures using nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$, high-resolution mass spectrometry (HRMS) and analytical HPLC.

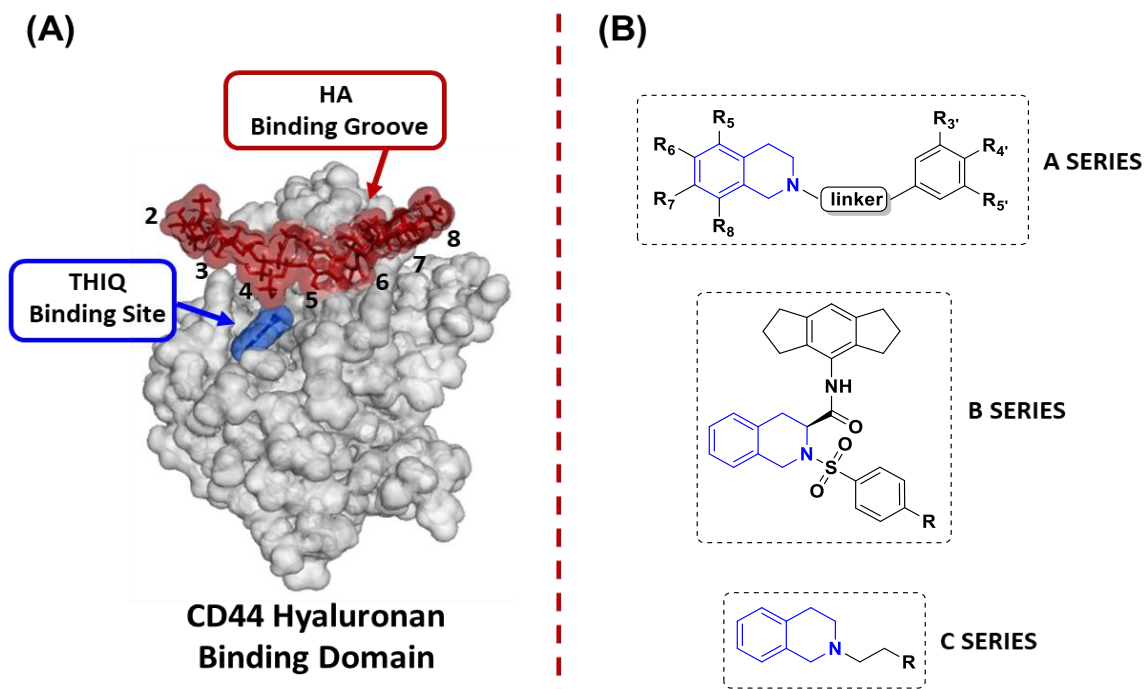


Figure 26. (A) Overview of CD44-HABD three-dimensional structure where the HA binding groove and THIQ binding site are located. (B) General structure of the designed target compounds.

Objective 2. To evaluate the activity of target compounds against cancer cells.

It is proposed to carry out a set of biological assays in order to determine the effect of the synthesized compounds on CD44+ cancer cells.

- 2.1. To study the antiproliferative effect of the synthesized compounds using fluorescent techniques.
- 2.2. To determine the apoptotic effects of the selected compounds by flow cytometry.
- 2.3. To study the effect of the most potent compound in a three-dimensional cancer model using microscopy and fluorescence-based techniques.

Objective 3. To analyze the interaction of the selected compounds with CD44.

Using cell- and protein-based studies, it is proposed to determine the interaction of the selected compounds with CD44.

- 3.1. To determine the effect of the selected compounds on the inhibition of the HA-CD44 interaction in CD44+ cancer cells by flow cytometry.
- 3.2. To analyze the interaction of the selected compounds with the CD44-HABD using computational techniques.
- 3.3. To study the interactions of the selected compounds with the CD44-HABD by STD NMR spectroscopy.
- 3.4. To validate the DMR assay for the *in vitro* characterization of standard and novel CD44 ligands.

Objective 4. To develop a novel anticancer therapy based on an HA-CD44 interaction inhibitor loaded on polymeric NPs.

Polystyrene nanospheres are used as solid support due to their remarkable cellular compatibility and easy functionalization to deliver HA-CD44 interaction inhibitors. pH-sensitive strategies or enzymatic hydrolysis are used for the controlled and selective release of therapeutic agents (Figure 27).

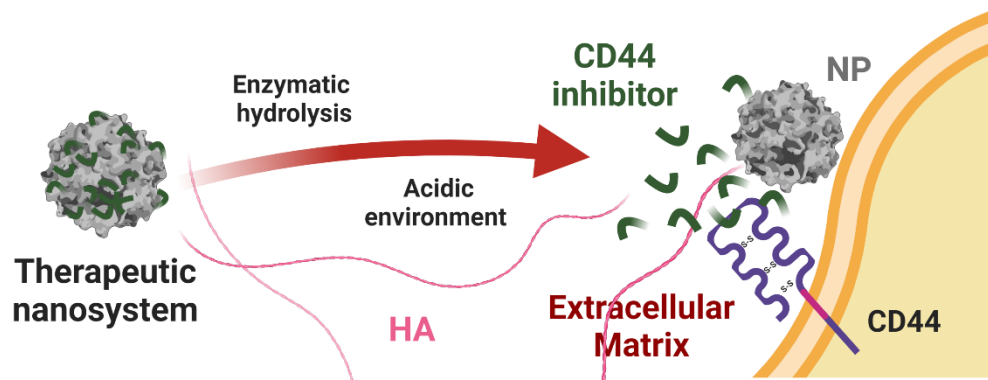


Figure 27. Schematic overview of the proposed strategy. Release of the THIQ inhibitor bound to the NPs and subsequent therapeutic activity by its binding to CD44.

4.1. To synthesize and characterize a polymeric nanosystem conjugated to a selected inhibitor.

4.2. To evaluate the efficacy of the nanosystem in terms of (i) ability of releasing the inhibitor and (ii) effects towards cancer cells.

3. Results and discussion

3.1. *N*-Aryl THIQ derivatives as HA-CD44 interaction inhibitors: design, synthesis, computational studies and antitumor effect

3.1.1. Molecular design and docking studies

It is possible to envisage derivatives incorporating the THIQ pharmacophore that extend further into the HA binding groove (Figure 28A). The selectivity of THIQ derivatives will be achieved by adding substituents to different positions in THIQ moiety. Specifically, the substituent in position 2 is an aromatic ring that is linked to the THIQ by a methylene or sulfonyl group (Figure 28B and Table 1).

Thus, a first series of twenty-eight *N*-aryl THIQ derivatives (**JE1a-JE1g**, **JE2a-JE2g**, **JE3a-JE3g** and **JE4a-JE4g**) was designed and synthesized. These structures include non-substituted THIQ (**JE1**), 5-amino THIQ (**JE2**), 8-amino THIQ (**JE3**) and 6,7-dimethoxy THIQ (**JE4**) derivatives (Figure 28B and Table 1). The aromatic moiety encompasses phenyl (a), *p*-nitrophenyl (b and f), *p*-bromophenyl (c), *p*-trifluoromethylphenyl (d), 3,4,5-trimethoxyphenyl (e) and *p*-methylphenyl (g).

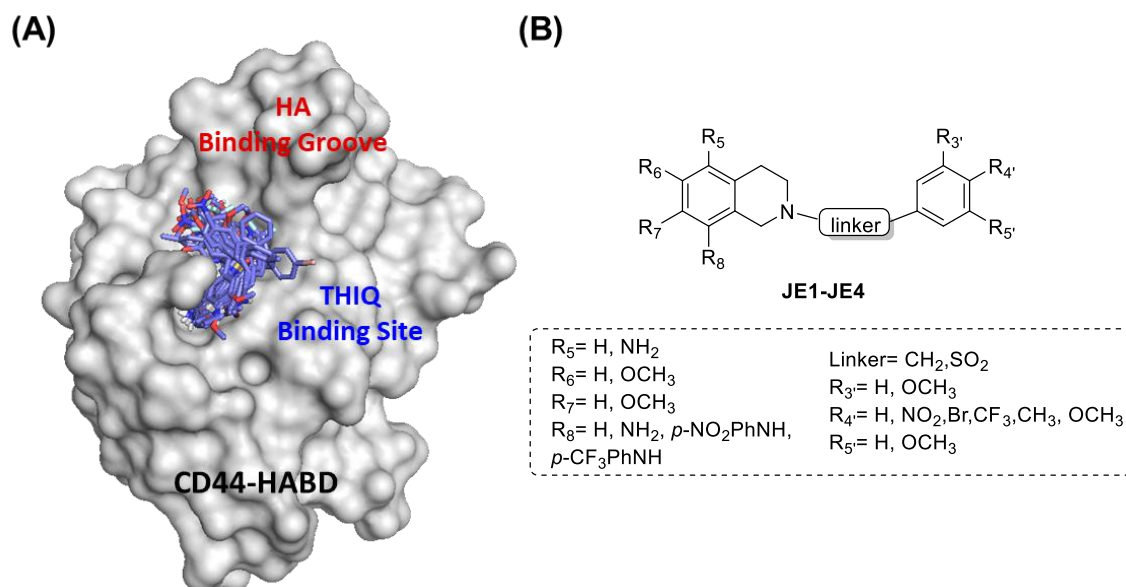
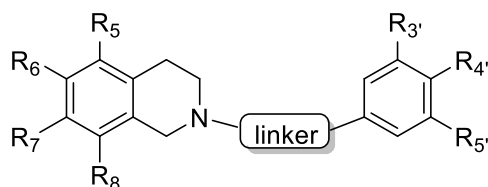


Figure 28. Design of the target compounds. (A) Molecular docking studies showing the proposed structures in the THIQ binding site close to the HA binding groove of CD44-HABD. (B) General chemical structure of the designed compounds.

First, docking studies were carried out to validate the initial hypothesis and the results demonstrated that the twenty-eight designed compounds occupy both the THIQ and HA binding sites (Figure 28). The computational studies have been carried out in collaboration with the research group of Prof. Domene at the University of Bath.

Table 1. Chemical structures of the target compounds.



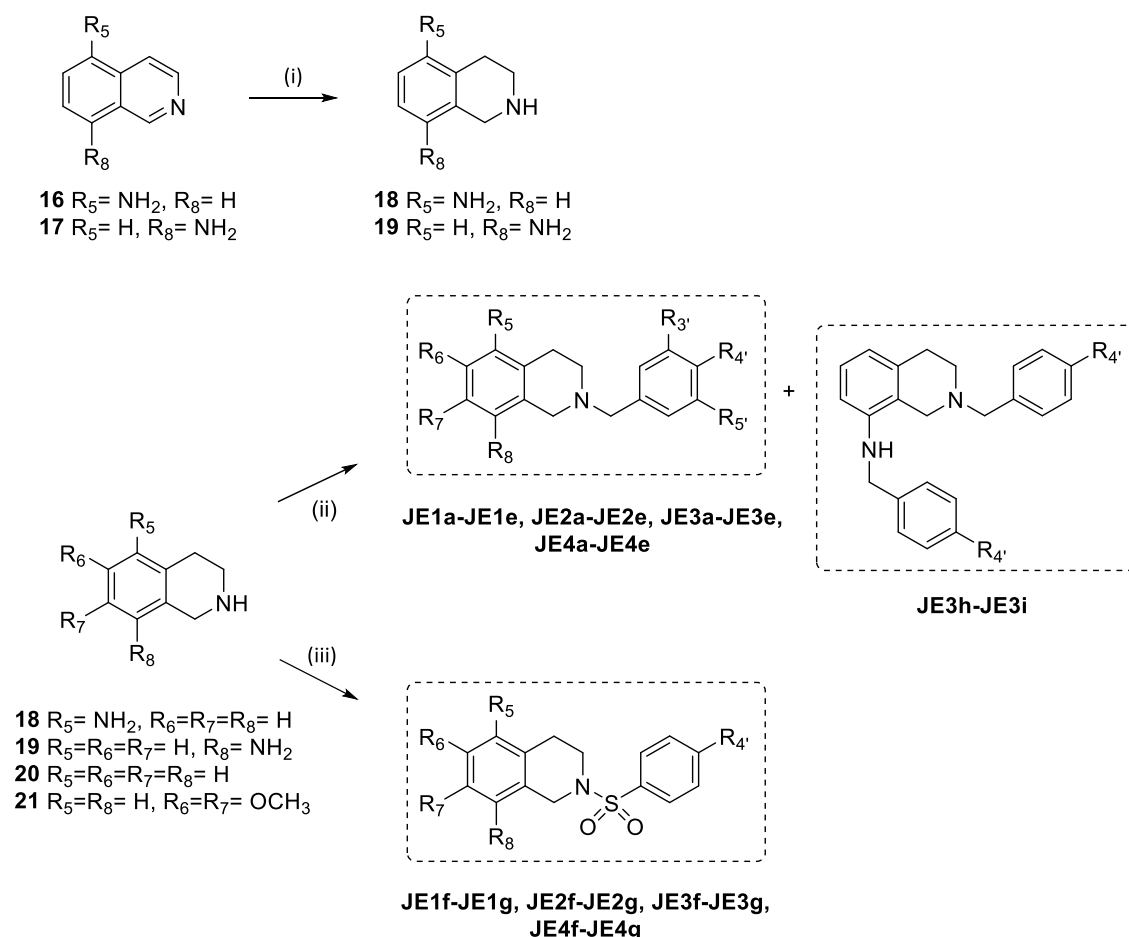
Compound	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	linker	R _{3'}	R _{4'}	R _{5'}
JE1a	H	H	H	H	CH ₂	H	H	H
JE1b	H	H	H	H	CH ₂	H	NO ₂	H
JE1c	H	H	H	H	CH ₂	H	Br	H
JE1d	H	H	H	H	CH ₂	H	CF ₃	H
JE1e	H	H	H	H	CH ₂	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
JE1f	H	H	H	H	SO ₂	H	NO ₂	H
JE1g	H	H	H	H	SO ₂	H	CH ₃	H
JE2a	NH ₂	H	H	H	CH ₂	H	H	H
JE2b	NH ₂	H	H	H	CH ₂	H	NO ₂	H
JE2c	NH ₂	H	H	H	CH ₂	H	Br	H
JE2d	NH ₂	H	H	H	CH ₂	H	CF ₃	H
JE2e	NH ₂	H	H	H	CH ₂	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
JE2f	NH ₂	H	H	H	SO ₂	H	NO ₂	H
JE2g	NH ₂	H	H	H	SO ₂	H	CH ₃	H
JE3a	H	H	H	NH ₂	CH ₂	H	H	H
JE3b	H	H	H	NH ₂	CH ₂	H	NO ₂	H
JE3c	H	H	H	NH ₂	CH ₂	H	Br	H
JE3d	H	H	H	NH ₂	CH ₂	H	CF ₃	H
JE3e	H	H	H	NH ₂	CH ₂	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
JE3f	H	H	H	NH ₂	SO ₂	H	NO ₂	H
JE3g	H	H	H	NH ₂	SO ₂	H	CH ₃	H
JE3h	H	H	H	<i>p</i> -NO ₂ PhNH	CH ₂	H	NO ₂	H
JE3i	H	H	H	<i>p</i> -CF ₃ PhNH	CH ₂	H	CF ₃	H
JE4a	H	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₂	H	H	H
JE4b	H	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₂	H	NO ₂	H
JE4c	H	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₂	H	Br	H
JE4d	H	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₂	H	CF ₃	H
JE4e	H	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₂	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
JE4f	H	OCH ₃	OCH ₃	H	SO ₂	H	NO ₂	H
JE4g	H	OCH ₃	OCH ₃	H	SO ₂	H	CH ₃	H

3.1.2. Chemical synthesis

One of the advantages of the proposed compounds is the small number of steps required to produce them from readily available and low-cost starting materials that ensure large-scale synthesis with low manufacturing costs.

The THIQ scaffold was achieved either by reduction of the 5-amino (**16**) and 8-amino (**17**) isoquinolines using platinum oxide (PtO) as catalyst (i, Scheme 3)²⁴⁸ or using commercially available THIQ (**20**) and 6,7-dimethoxy THIQ hydrochloride (**21**). The 5 and 8-amino THIQs (**18** and **19**) were obtained with a yield of 56% and 48%, respectively.

The target compounds (**JE1-JE4**) were synthesized by alkylation of the nitrogen atom of the THIQ with the corresponding aryl methyl (ii, Scheme 3) or aryl sulfonyl halide (iii, Scheme 3). The reaction was carried out in dichloromethane (DCM) or absolute EtOH using triethylamine (TEA) as the base.



Scheme 3. Synthesis of compounds **JE1-JE4**. *Reagents and conditions:* (i) H₂, PtO, AcOH, H₂SO₄ 96%, rt, 55 psi, 24 h; (ii) Method a: aryl methyl halide, TEA, DCM or EtOH, 0 °C 10 min, rt 3 h or 20 h, for compounds **JE1a-JE1e, JE2a-JE2e, JE3a-JE3e**; Method b: (**21**, TEA, EtOH, rt 1 h), aryl methyl halide, TEA, rt 3.5 h, for compounds **JE4a-JE4d**, 20 h for **JE4e**; (iii) Method a: aryl sulfonyl halide, TEA, DCM or EtOH, 0 °C 10 min, rt 1 h or 3 h, for

compounds **JE1f-JE1g**, **JE2f-JE2g** and **JE3f-JE3g**; Method b: (**21**, TEA, EtOH, rt 1 h), aryl sulfonyl halide, TEA, rt 3.5 h for **JE4f-JE4g**.

The synthesis of compounds **JE1a-JE1e** was achieved following the methodology described for **JE1a**.²⁴⁹ The reactions were carried out in DCM using two equivalents (eq.) of **20** for each eq. of the corresponding aryl methyl halide to avoid the formation of the quaternary ammonium salt as a product of the *N*-dialkylation of THIQ. The reaction time was 20 h and the target products were obtained with an average yield of 73%.

The sulfonyl derivatives **JE1f** and **JE1g** were obtained using 1 eq. of **20** and 1.2 eq. of the sulfonyl halide in DCM as described for **JE1g**.²⁵⁰ since the quaternary ammonium salt cannot be formed. 1.2 eq. of TEA was used as the base. The reaction takes place in 1 h due to the higher electrophilicity of the halide. The average yield is 81%.

To dissolve the 5-amino (**18**) and 8-amino (**19**) THIQ reagents, the solvent used in the synthesis of the amino THIQ derivatives (**JE2a-JE2e** and **JE3a-JE3e**) was absolute EtOH. Despite using 1 THIQ eq. per halide eq., quaternary ammonium salts were not isolated and the average yield was 60% (vs. 73% for compounds **JE1a-JE1e**). Only the dialkylated products at the exocyclic *N* in position 8 (**JE3h** and **JE3i**) were isolated in the reactions. For compounds **JE2a**, **JE2b**, **JE2d**, **JE3a** and **JE3c** the reaction time was 3 h but in the case of **JE2c**, **JE2e**, **JE3b**, **JE3d** and **JE3e** the reaction is not completed until 20 h. Sulfones **f** and **g** were obtained with an average yield of 86% using the same conditions as for **JE2** and **JE3**. The reaction time for these 4 compounds (**JE2f**, **JE2g**, **JE3f** and **JE3g**) was 3 h.

Finally, derivatives **JE4** were obtained following the reported protocol for **JE4a**.²⁵¹ First, the hydrochloride of 6,7-dimethoxy THIQ (**21**) (1 eq.) reacts with 1 eq. of TEA in absolute EtOH for 1 h to get the free base of THIQ. Then, the corresponding halide (1 eq.) and another eq. of the base were added. The reaction time was 3.5 h (except **JE4e**, 20 h) and the average yield is 63%.

3.1.3. Biological evaluation

To evaluate the potential CD44 mediated antitumoral activity of this series of compounds, two CD44-overexpressing tumor cell lines were initially selected, the breast adenocarcinoma MDA-MB-231 and the epithelial lung carcinoma A549 cell lines.

Flow cytometry studies using an anti-CD44 antibody labelled with fluorescein (anti-CD44-FITC) showed that both cell lines overexpress CD44 as previously reported.²⁵²⁻²⁵⁴ Thus, the analysis of the CD44 expression confirms the suitability of these cell lines to test the cytotoxic effect of HA-CD44 inhibitors. Human embryonic kidney-derived non-cancerous HEK-293 cells, with no CD44 expression, were used as negative control (Figure 29).

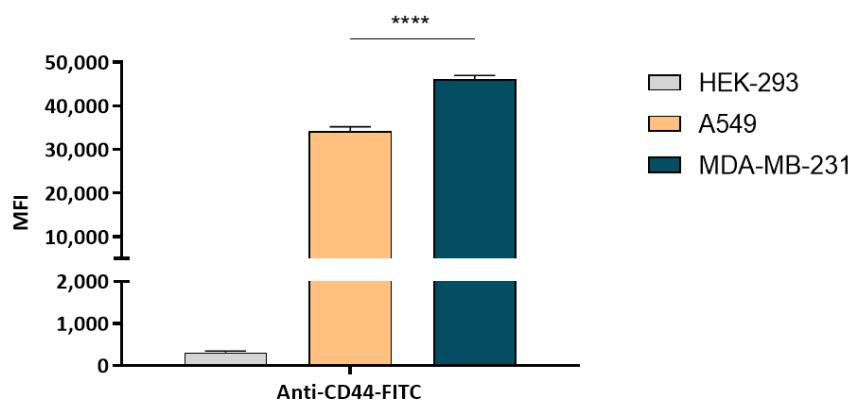


Figure 29. Evaluation of CD44 expression by flow cytometry in A549 and MDA-MB-231 cells. Bar graph showing the mean fluorescence intensity (MFI) of cell lines after incubation with anti-CD44-FITC. HEK-293 cells were used as negative control. Errors bars: \pm SD from $n = 3$; **** $p < 0.0001$ (ANOVA).

Following the selection of suitable cell lines for this study, a screening of the thirty synthesized compounds (**JE1-JE4**) was carried out as antiproliferative drugs against these two human cancer cells. The obtained results for the antiproliferative effect of compounds **JE1-JE4** are shown in Table 2 and Figure 30.

Table 2. Antiproliferative activities of the synthesized compounds **JE1-JE4** against MDA-MB-231 and A549 cells.

Compounds	EC_{50} (μ M)	
	MDA-MB-231	A549
JE1a	> 100	89.68 \pm 0.91
JE1b	> 100	61.93 \pm 0.16
JE1c	98.10 \pm 1.33	37.90 \pm 0.24
JE1d	67.91 \pm 0.95	45.15 \pm 1.22
JE1e	19.75 \pm 0.07	48.19 \pm 1.04
JE1f	51.52 \pm 0.63	> 100
JE1g	> 100	> 100
JE2a	> 100	> 100
JE2b	> 100	> 100
JE2c	> 100	69.90 \pm 1.37
JE2d	70.12 \pm 0.11	50.87 \pm 0.43
JE2e	3.37 \pm 0.08	5.35 \pm 0.12
JE2f	> 100	> 100
JE2g	> 100	> 100

JE3a	> 100	> 100
JE3b	> 100	> 100
JE3c	77.07 ± 0.06	48.74 ± 0.22
JE3d	52.15 ± 0.19	42.17 ± 1.14
JE3e	57.44 ± 0.54	72.42 ± 0.87
JE3f	> 100	> 100
JE3g	> 100	> 100
JE3h	84.84 ± 1.65	> 100
JE3i	30.81 ± 0.08	42.37 ± 0.26
JE4a	> 100	> 100
JE4b	> 100	> 100
JE4c	> 100	43.11 ± 0.87
JE4d	97.07 ± 1.98	70.07 ± 1.09
JE4e	70.32 ± 0.51	77.73 ± 0.48
JE4f	> 100	> 100
JE4g	> 100	> 100

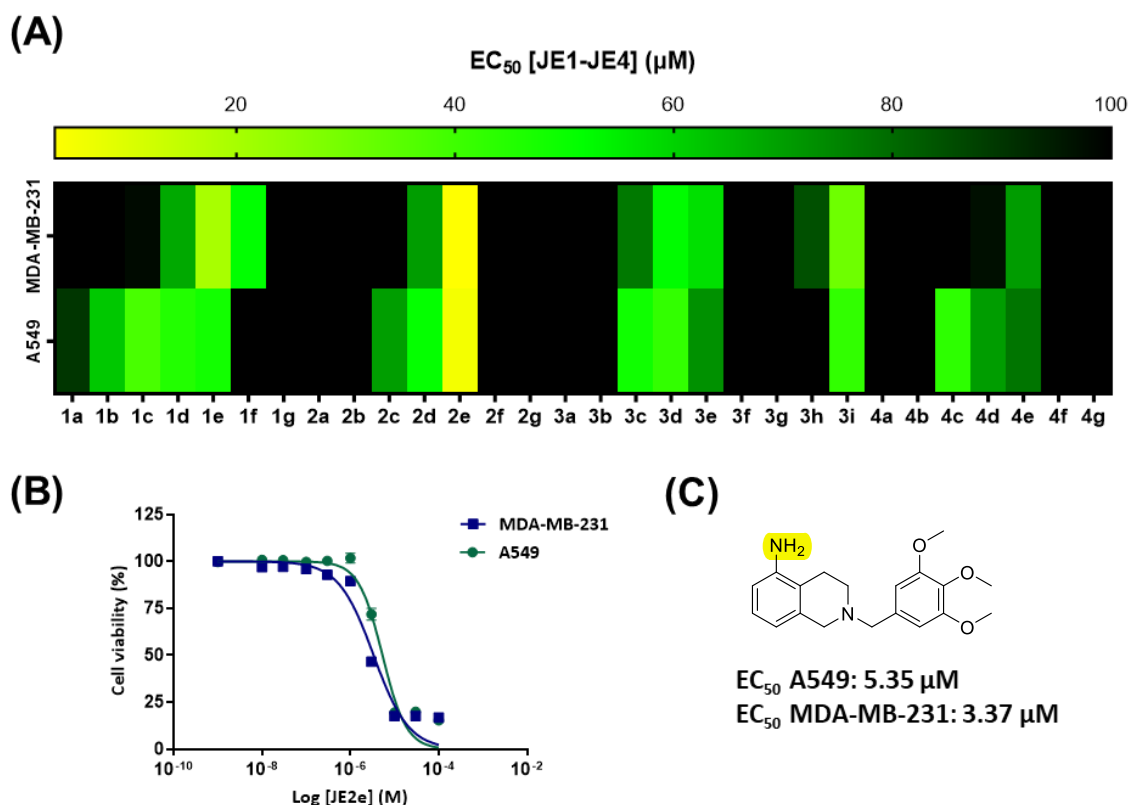


Figure 30. *In vitro* antiproliferative screening of JE1-JE4. (A) Heatmap of the half maximal efficacy concentration (EC_{50}) values of the target compounds tested after 5 days of treatment in MDA-MB-231 and A549 cells. Yellow colour indicates compounds with higher activity while dark colour indicates compounds with lower activity. Data represent the mean values of three replicates. (B) Dose-response curves for JE2e against MDA-MB-231 and A549 cells after 5 days of treatment. Error bars: \pm SD from $n = 3$. (C) Chemical structure of hit compound JE2e.

In general, all the compounds showed similar activities in both cell lines (Figure 30A).

The most active compound JE2e shows an EC_{50} of 3.97 μM in MDA-MB-231 cells (Figure 30B, C). This compound presents a 3,4,5-trimethoxybenzyl substituent at position 2 of THIQ, CH_2 as linker and NH_2 at position 5 of THIQ. Interestingly, all the compounds bearing the 3,4,5-trimethoxybenzyl (JE1e, JE2e, JE3e and JE4e) show antiproliferative activity in MDA-MB-231 cells ($\leq 70 \mu\text{M}$). The amino group at position 5 is essential for the biological activity since the non-substitution of the THIQ (JE1e), the change of its position (JE3e) or the introduction of the methoxy group in positions 6 and 7 (JE4e) lead to a significant decrease in the antiproliferative activity (JE2e>JE1e>JE3e>JE4e, EC_{50} MDA-MB-231 = 3.97>19.75>57.44>70.32 μM respectively). These four compounds preserve the same pattern of activity in A549 cells although with slightly lower values (JE2e>JE1e>JE3e>JE4e, EC_{50} A549 = 5.35>48.19>72.42>77.73 μM respectively).

The compounds that bear 4-trifluoromethylbenzyl (JE1d, JE2d, JE3d and JE4d) show modest antiproliferative activity in both cell lines with the best values in A549 (EC_{50} MDA-MB-231 = 52.15-

97.07 μM and EC_{50} A549 = 42.17-70.07 μM). Likewise, the 4-bromobenzyl (**JE1c**, **JE2c**, **JE3c** and **JE4c**) show a notable increase in activity against A549 cells (EC_{50} MDA-MB-231 = 77.07-100 μM and EC_{50} A549 = 37.90-69.90 μM).

Surprisingly and interestingly, the subside product **JE3i** has antiproliferative activity in both MDA-MB-231 and A549 cells (EC_{50} MDA-MB-231 = 30.81 μM and EC_{50} A549 = 42.37 μM).

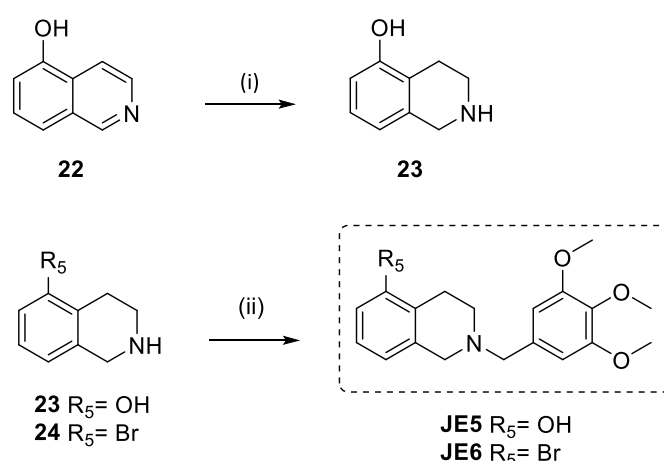
Respect to the linker, compounds bearing sulfonyl group (**JE1f**, **JE1g**, **JE2f**, **JE2g**, **JE3f**, **JE3g**, **JE4f** and **JE4g**) do not show antiproliferative activities ($\geq 100 \mu\text{M}$) except compound **JE1f** (EC_{50} MDA-MB-231 = 51.52 μM) (Table 2 and Figure 30).

3.1.4. Hit to lead optimization

3.1.4.1. Molecular design, synthesis and antiproliferative activity

Taking as a model the structure of the hit compound (**JE2e**), it was decided to synthesize derivatives that present different substituents at position 5 of THIQ but preserve the trimethoxybenzyl moiety at position 2. Specifically, derivatives with OH and Br substituents (**JE5** and **JE6** respectively, Scheme 4) were synthesized in order to study the interactions of these groups in the THIQ binding pocket.

The 5-hydroxy THIQ acetate (**23**) was obtained by reduction of the 5-hydroxyisoquinoline²⁵⁵ (**22**) (97%) while the 5-bromo THIQ (**24**) is commercially available as hydrochloride. Both THIQ salts (1 eq.) react with 1 eq. of TEA in absolute EtOH for 1 h and then, 1 eq. the 3,4,5-trimethoxybenzyl chloride and 1 eq. of TEA were added (Scheme 4). The reaction time was 20 h and yields were 24% and 74%, respectively.



Scheme 4. Synthesis of compounds **JE5-JE6**. *Reagents and conditions:* (i) H_2 , PtO, AcOH, H_2SO_4 96%, rt, 55 psi, 24 h; (ii) (**23** for **JE5** and **24** for **JE6**, TEA, EtOH, rt 1 h), 3,4,5-trimethoxybenzyl chloride, TEA, rt 20 h.

Lead compounds **JE5** and **JE6** were evaluated in MDA-MB-231 cells since our CD44 expression analysis shows higher levels in this line than in A549 one (Figure 29).

Both derivatives were more active than **JE2e** with EC_{50} values of 0.79 and 1.77 μM , respectively (Figure 31). Thus, the replacement of the amino in position 5 of the THIQ by either hydroxyl or bromo substituent leads to a significant increase in the antiproliferative effect. Derivative **JE6** is 2-fold more active than hit **JE2e**, while lead compound **JE5** is 4-fold more active.

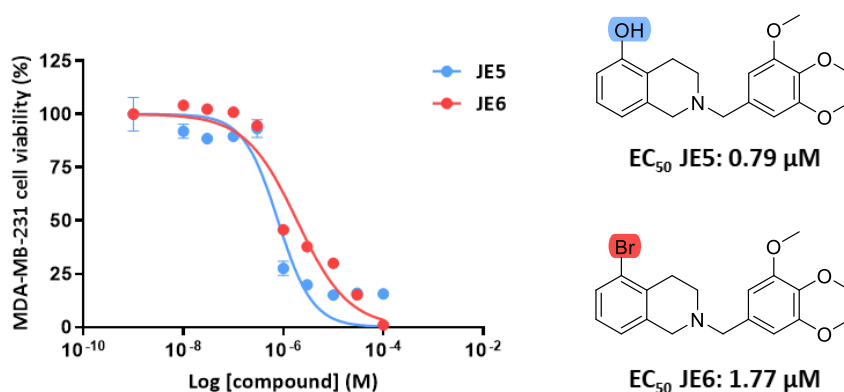


Figure 31. Dose-response curves of target compounds **JE5** and **JE6** against MDA-MB-231 cells after 5 days of treatment. Error bars: \pm SD from $n = 3$.

3.1.4.2. Assessment of CD44-binding capacity

To validate target molecules **JE2e**, **JE5** and **JE6** as CD44 inhibitors, a competitive binding assay using flow cytometry was performed. For this approach, a previously reported procedure was applied with slight modifications.²⁵⁶ As fluorescent ligand, fluorescein-labelled HA (HA-FITC), which has a high capacity to bind the CD44 receptor was used. As shown in Figure 32, it was observed that pre-treatment of overexpressing CD44 cells, MDA-MB-231, with **JE2e**, **JE5** and **JE6** (4 °C, 30 min, 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$) caused a significant reduction of the fluorescent intensity ranging between 1.5 for compound **JE6** and 1.8-fold for compound **JE2e**, compared to HA-FITC-incubated cells (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). These results suggest that these molecules displace HA-FITC binding (Figure 32) and are effective in blocking HA-CD44 binding.

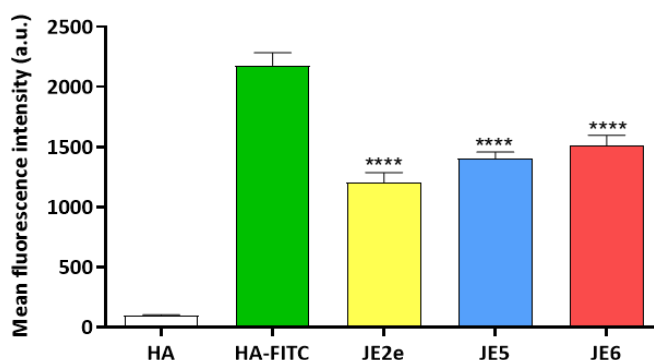


Figure 32. HA-CD44 competitive assay. Mean fluorescence of MDA-MB-231 cells after treatment with **JE2e**, **JE5** and **JE6** for 30 min at 4 °C. Following the treatment, the cells were incubated for 15 min at 4 °C with HA-FITC and analyzed by flow cytometry. Cells incubation with HA-FITC and HA not fluorescently labelled were used as positive and negative controls, respectively. Errors bars: \pm SD from $n = 3$; **** $p < 0.0001$ (ANOVA).

3.1.4.3. Computational studies

Compounds **JE5** and **JE6** were subsequently docked on CD44-HABD as previously carried out for **JE2e**. Molecular modelling results showed that compounds **JE5** and **JE6** bind CD44-HABD in a similar way to compound **JE2e**. The THIQ moiety of the 3 compounds is located at the THIQ binding site, while the trimethoxybenzyl group is placed and expanded along the HA binding site (Figure 33A).

The results of the docking study of the **JE2e** with CD44-HABD specifically show the formation of two hydrogen bonds with the NH_2 group of position 5 of the THIQ. One of the hydrogen atoms of the NH_2 presents a hydrogen bond with the oxygen of the backbone of Val30 with a distance of 2.3 Å and an angle of 108.4°. The other hydrogen can also form a hydrogen bond with the same oxygen of the Val30 backbone (Figure 33B). Nevertheless, the angle of this second hydrogen bond is smaller than the previous one (99.1°) with a distance of 2.5 Å. In this case, the strongest bond is the first one, because the smaller the bond angle, the lower the bond strength.²⁵⁷

Concerning compound **JE5**, the oxygen of the OH group in position 5 of the THIQ moiety present a hydrogen bond with the nitrogen of the Arg155 backbone. However, due to the angle (distance: 2.8 Å, angle: 90.9°), the strength of this possible hydrogen bond would be lower than the one in **JE2e** (Figure 33B).

Finally, compound **JE6** that bears a bromo atom in position 5 of the THIQ do not show any hydrophobic interactions with these residues (Figure 33B).

In relation to the trimethoxybenzyl substituents, **JE2e** and **JE5** position this moiety in a similar manner in the HA binding groove, while in **JE6** this group is rotated to the left with respect to the previous ones (Figure 33A).

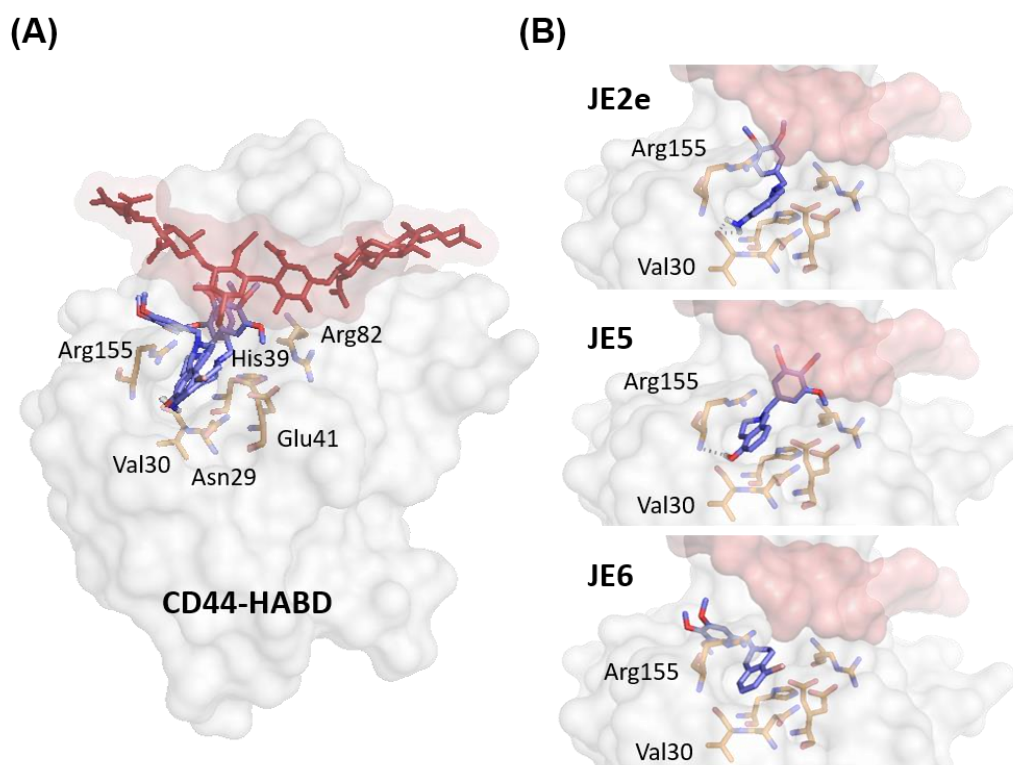


Figure 33. Molecular docking studies of **JE2e**, **JE5** and **JE6** with CD44-HABD. **(A)** Selected poses of compounds **JE2e**, **JE5** and **JE6** in the THIQ binding site, expanding along the HA binding groove. **(B)** Individual selected poses for each compound showing the formation of hydrogen bonds with the CD44-HABD residues.

The selected poses from the docking studies serve as the basis for molecular dynamics (MD) simulations. As during docking, the receptor is rigid and the solvent is only explicitly considered, the size of the conformational space sampled is limited. To correct some of these limitations, these three systems were further subjected to MD simulations.

In all the replicas, comparable values to the resolution of the crystal structure were obtained for the root mean square deviation (RMSD) of the backbone of the α -helical and β -sheet components of the protein, indicating that the structure of CD44-HABD is structurally stable during the simulations.

Some shallow pockets in the neighbourhood of the initial binding site could accommodate the trimethoxybenzyl group of the inhibitors **JE2e**, **JE5**, and **JE6**. In the simulations with **JE2e**, the ligand leaves its original binding sites rather quickly. In the simulations with **JE5**, the ligand leaves in two of the simulations while in the other three replicas, it remains to explore different areas of the protein surface. When **JE6** is considered, only in one occasion, the ligand departs from the protein surface and returns to the surface of CD44-HABD after 75 nanoseconds (ns). In the cases of **JE6** and **JE5**, the ligands occupy at times the space described to be occupied by HA, in particular, in the vicinity of Arg155, Asn29 and Val30. This suggests a competition might be established between any of these

ligands and the HA for this area of the protein when it comes to establishing intermolecular interactions.

JE6 interacts *via* the trimethoxybenzyl ring with the protein through residue Arg155 and a cluster formed by Glu41, Asn29 and Thr31, and alternately, with residues Cys81 and Thr80. Subsequently, the contacts with Cys81 and Thr80 are lost, and the ligand remains attached to the protein only through the interactions of the trimethoxybenzyl ring. As time progresses, other interactions with nearby residues e.g. Glu41, Asn29 and Thr31 are established until the ligand finally loses contact with the protein and departs to the solution or alternatively, wanders around returning to a position similar to the original docking pose.

In the simulations of **JE5**, only in one replica out of five, after the initial departure from the surface of the protein, the ligand returns and occupies a similar position at the initial docking pose. In all the simulations, random excursions of the ligand to the protein surface are observed. In two of the replicas, the interactions are similar to those described for **JE6**.

In contrast, the **JE2e** ligand departs to the solution in the first 35 ns of all five replicas, and only in one of them, it returns back to the protein surface protein establishing transient contacts with different residues described in Table 3 and Figure 34.

Many of the interactions observed between each of the three ligands and the protein are identical and the only apparent difference is the length of such interactions (Table 3 and Figure 34).

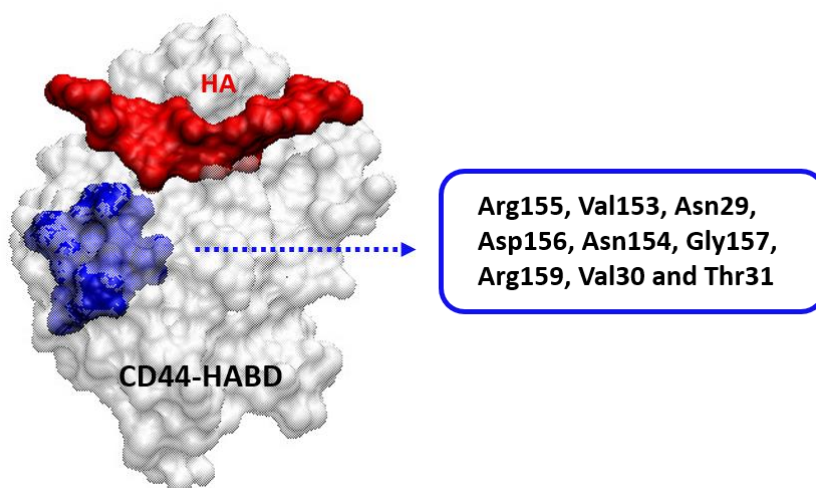


Figure 34. Location of the cluster (in blue) composed by the nine residues found in the three systems considered that establish interactions with **JE2e**, **JE5** and **JE6**. The cluster is depicted in the structure from PDB ID: 5BZK. Once the dynamics is considered, the movement of the protein side chains and loops displace the cluster closer to where the HA is observed.

Table 3. Contacts between the protein and each ligand examined over a combined trajectory of all the five replicas. A contact between the protein and the ligand is considered when any atom of the protein is closer than a 4 Å cut-off distance to any atom of the ligand. The percentage corresponds to the amount of simulation time when the contact is observed. Only those contacts observed > 10% of the simulation time are reported. Arg155, Val153, Asn29, Asp156, Asn154, Gly157, Arg159, Val30 and Thr31 are the nine residues of the protein found to establish interactions with all the three ligands studied; some of these interactions are the most lasting ones of those established during the simulations.

JE2e	4 Å	JE5	4 Å	JE6	4 Å
PROA-ARG-155	21%	PROA-ARG-155	23%	PROA-ARG-155	57%
PROA-VAL-153	18%	PROA-THR-31	19%	PROA-VAL-153	47%
PROA-ASN-154	17%	PROA-ASP-156	19%	PROA-ASN-29	45%
PROA-ASN-29	17%	PROA-ASN-29	18%	PROA-ASP-156	42%
PROA-VAL-30	15%	PROA-ASN-154	18%	PROA-ASN-154	38%
PROA-GLY-157	15%	PROA-VAL-153	18%	PROA-GLY-157	35%
PROA-ASP-156	14%	PROA-VAL-30	18%	PROA-ARG-159	31%
PROA-ARG-159	13%	PROA-GLY-157	18%	PROA-VAL-30	25%
PROA-VAL-137	12%	PROA-GLU-41	16%	PROA-THR-31	23%
PROA-THR-31	11%	PROA-HSD-39	16%	PROA-GLU-41	21%
PROA-PRO-141	11%	PROA-ARG-50	16%	PROA-LYS-71	15%
PROA-PHE-60	11%	PROA-PHE-85	14%	PROA-ASP-27	15%
PROA-ASN-125	10%	PROA-ARG-159	14%	PROA-LEU-72	15%
PROA-ASP-139	10%	PROA-LEU-64	14%	PROA-SER-75	15%
PROA-LEU-111	10%	PROA-ALA-54	13%	PROA-ASN-43	14%
PROA-PHE-38	10%	PROA-ALA-53	13%	PROA-LEU-74	14%
		PROA-CYS-57	13%	PROA-GLY-107	13%
		PROA-TYR-119	11%	PROA-LYS-42	13%
		PROA-LEU-111	10%	PROA-ARG-94	12%
				PROA-ILE-95	12%
				PROA-ASP-68	12%
				PROA-THR-106	11%
				PROA-ARG-45	10%

3.1.4.4. Apoptotic studies

To investigate the mechanism of action by which compounds **JE2e**, **JE5** and **JE6** exert their antitumor effect, their apoptotic activity was evaluated. Annexin V/propidium iodide (PI) staining was used to determine viable, necrotic and apoptotic cells. EC₅₀ and EC₅₀ times two were the concentrations at which the selected compounds were tested on the CD44+ MDA-MB-231 cancer cell line. After 24 h of treatment, cells were labelled for further analysis by flow cytometry. No significant apoptotic effect was observed at both concentrations of the compounds compared to the positive control (H₂O₂, 2 mM) (Figure 35). These results suggest that apoptosis is not the mechanism by which these compounds exert their antiproliferative effect.

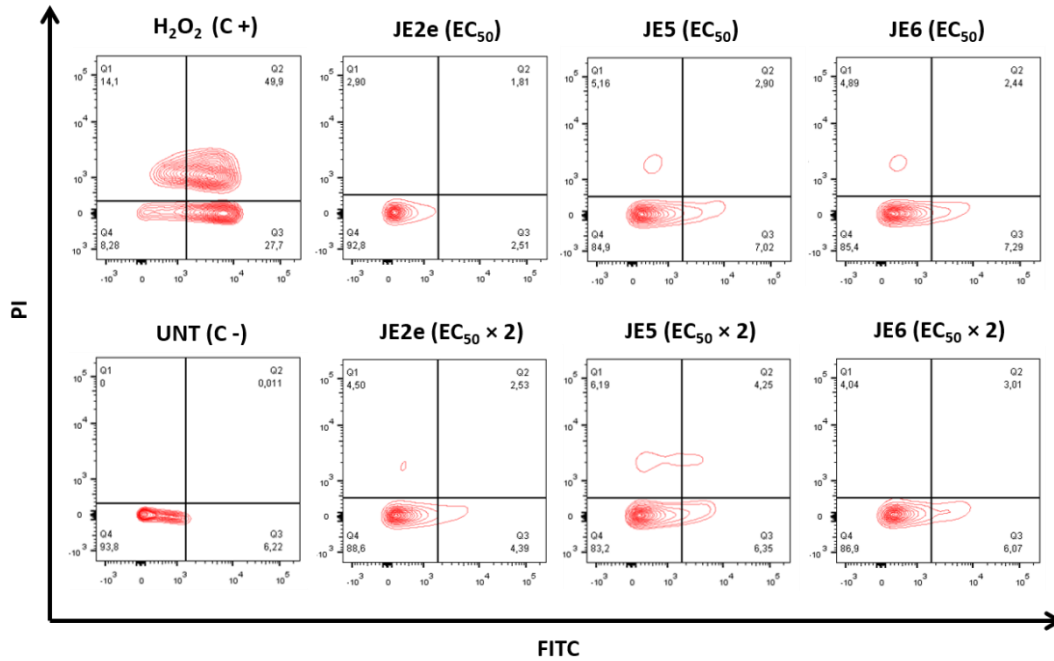
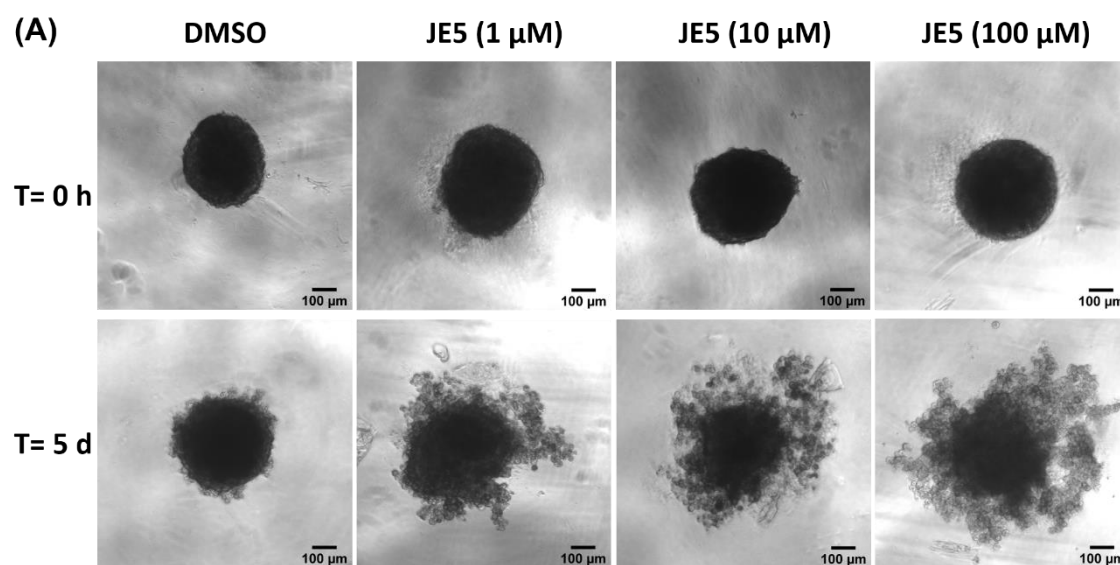


Figure 35. Effect of **JE2e**, **JE5** and **JE6** on MDA-MB-231 cell apoptosis. Representative scatter plots of PI (y-axis) versus FITC (x-axis) of cells after treatment with **JE2e**, **JE5** and **JE6** (EC₅₀ and 2 × EC₅₀) for 24 h. The cells were analyzed after double staining with Annexin V-FITC/PI by flow cytometry. Dot plots of H₂O₂ (2 mM, treatment of 4 h) and untreated cells were represented as the positive and negative control, respectively. Q1-4 quadrants represent necrotic (Annexin V-FITC-, PI+), late (Annexin V-FITC+, PI+), and early (Annexin V-FITC+, PI-) apoptotic and viable (Annexin V-FITC-, PI-) cells, respectively.

3.1.4.5. Three-dimensional cancer model evaluation

Three-dimensional spheroids are established models for evaluating bioactive compounds as they resemble the complex tissue environment and architecture found in tumors.²⁵⁸ After a first screening in 2D monolayer cultures, the effect of lead **JE5** was evaluated using these 3D models. To this end, MDA-MB-231 cells were cultured in 3D spheroids and treated with **JE5** at a range of concentrations (1-100 μM) for 5 days. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was used as negative control. As shown in Figure 36A, the exposure to **JE5** altered the integrity of MDA-MB-231 spheroids even at the lowest concentration tested (1 μM) with a high number of dead cells detached from the spheroid core. A complete disaggregation was observed after 5 days of treatment with 100 μM.

Additionally, the MDA-MB-231 spheroid viability was monitored (Figure 36B). Treatment with **JE5** significantly reduces the viability compared to DMSO. This decrease in viable cells occurs in a dose-dependent manner.



(B)

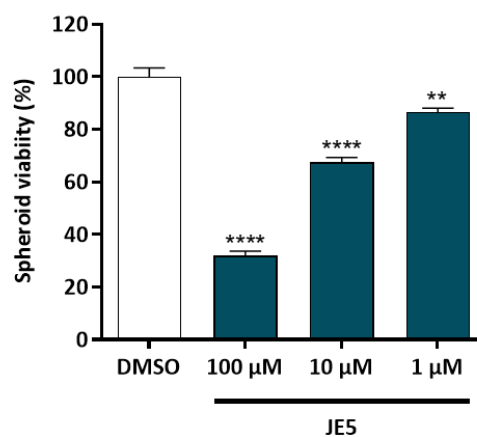


Figure 36. MDA-MB-231 spheroids assay. (A) Images of spheroids treated with DMSO and JE5 (1, 10 and 100 μM) at time zero (top) and after 5 days (bottom) of treatment. Scale bar: 100 μm . (B) Quantification of the spheroid viability after 5 days of treatment with JE5 (1, 10 and 100 μM). DMSO was used as a control. Errors bars: $\pm\text{SD}$ from $n = 3$; ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ vs. control group (ANOVA).

3.2. Design and synthesis of 3-(indacen-4-ylcarbamoyl)-2-arylsulfonyl THIQ derivatives as antiproliferative agents

3.2.1. Molecular design

The synthesis of the compounds was carried out as part of the international training research stay at the Department of Chemical and Pharmaceutical Sciences of the University of Ferrara under the supervision of Prof. Preti.

The B series bears the THIQ scaffold and includes two bulky substituents at its 2 and 3 positions in order to block HA binding to CD44-HABD by steric hindrance (see Figure 26, section 2). Thus, sixteen target compounds featuring the arylsulfonyl moiety at position 2 and the indacenyl carboxamide at position 3 of the THIQ have been synthesized (Figure 37A). A reported inhibitor of inflammasome NLRP3 (**MCC950**, Figure 37B) that contains the bulky substituent indacenyl carboxamide decreases the expression of CD44 in head and neck squamous cell carcinoma cell lines.²⁵⁹

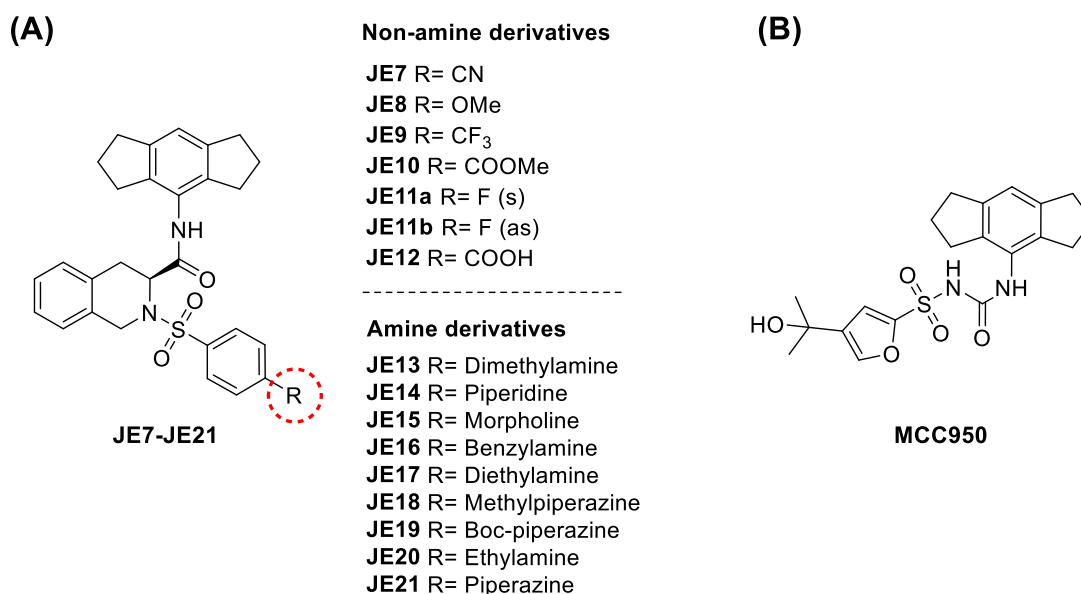


Figure 37. (A) General structure of the compounds **JE7-JE21**. (B) Chemical structure of the NLRP3 inhibitor **MCC950**.

The substituent at the *para* position of the arylsulfonyl moiety includes nitrile (**JE7**), ether (**JE8**), fluoro derivatives (**JE9**, **JE11a** and **JE11b**), ester (**JE10**), acid (**JE12**) (non-amine derivatives) and a large group of amine derivatives (**JE13-JE21**) (Figure 37A) in order to study and compare the

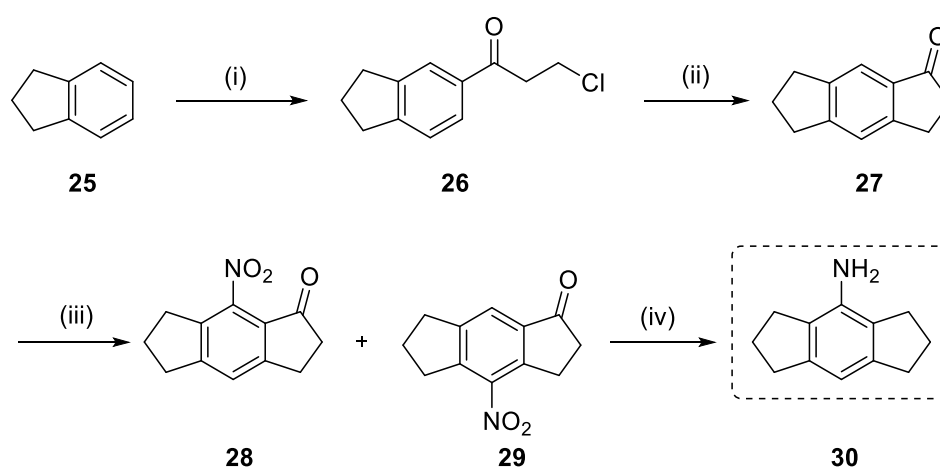
interactions with the CD44-HABD residues of the different amines and substituents of the rest of the structures of this series.

Target compounds (**JE7-JE21**) have not been previously reported then full characterization has been carried out. Intermediate compounds (**25-47**) have been characterized by ^1H NMR and mass spectrometry (see **Materials and Methods**, section 4.3).

3.2.2. Chemical synthesis

3.2.2.1. Synthesis of indacenamine intermediate **30**

The synthetic methodology used to prepare indacenamine **30** is detailed in Scheme 5.

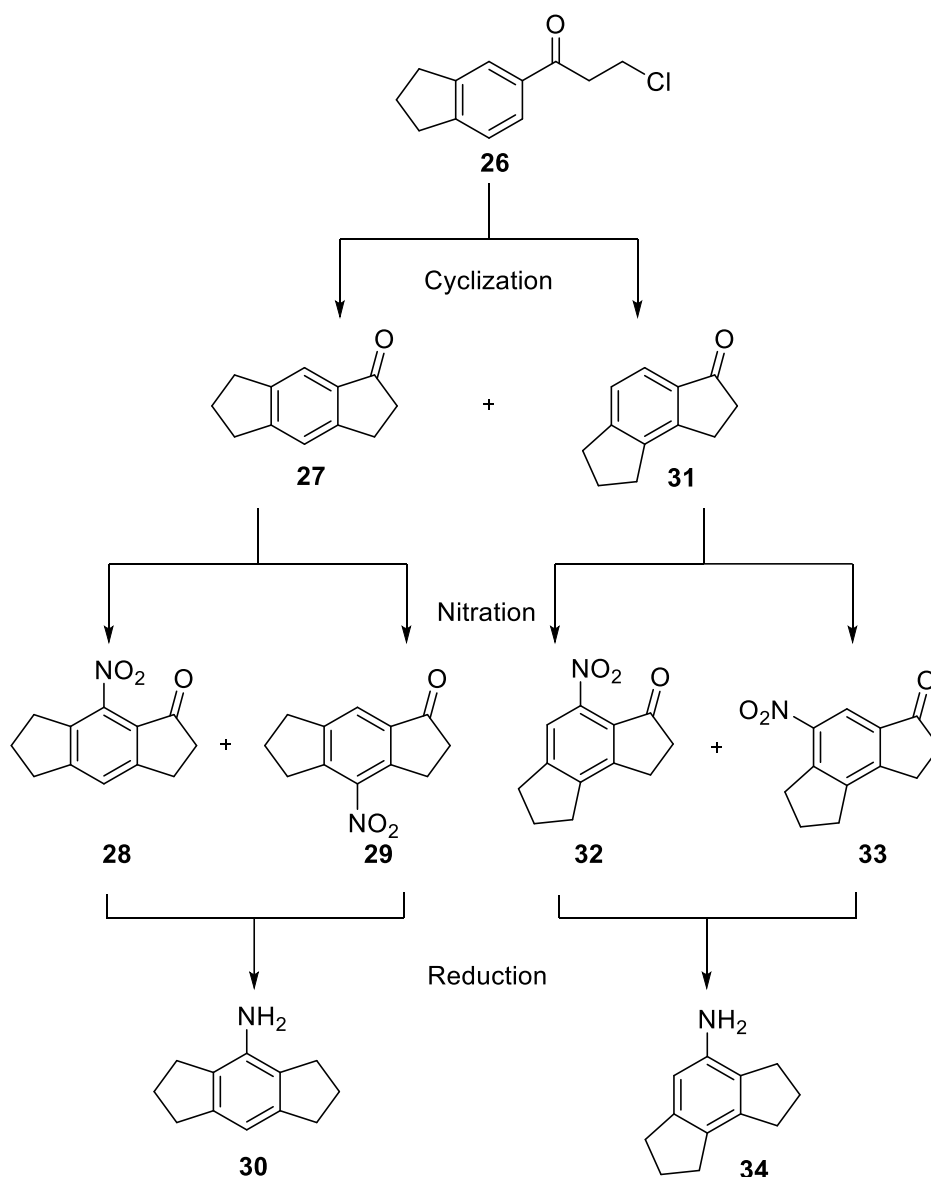


Scheme 5. Synthetic route for the preparation of indacenamine **30**. *Reagents and conditions:* (i) 3-chloropropanoyl chloride, AlCl_3 , DCM, $-10\text{ }^\circ\text{C}$, rt 16 h; (ii) H_2SO_4 96%, $55\text{ }^\circ\text{C}$, 16 h; (iii) H_2SO_4 96%, HNO_3 70%, $0\text{ }^\circ\text{C}$, 2-3 h; (iv) $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$, H_2 , methanesulfonic acid (MSA), MeOH, rt 24 h.

The preparation of intermediate **30** was carried out in four synthetic steps by adapting the protocol described by D. Savka et al.²⁶⁰ with slight modifications. Firstly, the indane **25** was converted into propanone **26** via Friedel-Crafts acylation using 3-chloropropanoyl chloride, AlCl_3 as catalyst and DCM as solvent. Then, intermediate **26** was cyclized by heating in H_2SO_4 96% to afford ketone **27**. Nitration of compound **27** with H_2SO_4 96% and HNO_3 70% acid gave the nitroketones **28** and **29** that were finally reduce to the target indacenamine **30** by hydrogenation using palladium hydroxide on carbon (20% wt) as catalyst system in MSA and MeOH.

Besides the synthesis of indacenamine **30** shown in Scheme 5, it is interesting to note that its asymmetric isomer **34** can also be obtained.²⁶¹ Scheme 6 shows the synthesis of both isomers of indacenamine (**30** and **34**). Briefly, when ketone **27** was formed after the cyclization of chloroketone **26** by heating with H_2SO_4 (51% yield), the formation of asymmetric regioisomer **31** was also observed

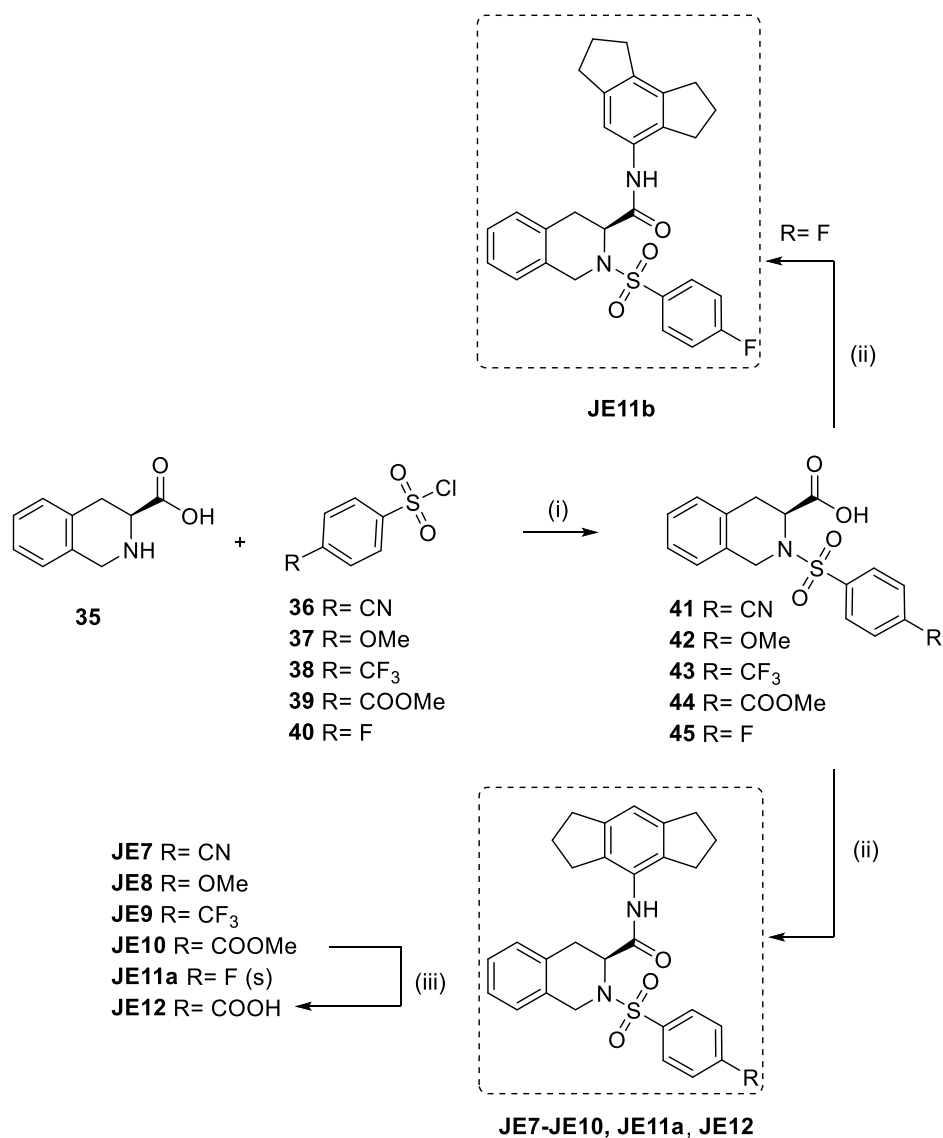
with a yield of 20% (both compounds were chromatographically isolated). Subsequently, nitration of the ketones **27** and **31** gave rise to the symmetrical nitro isomers **28** and **29** and asymmetrical nitro isomers **32** and **33**, respectively. Finally, by reducing both isomeric mixtures, the symmetrical **30** and asymmetrical **34** indacenamines were obtained separately. Asymmetrical intermediate **34** was used to obtain one of the products (**JE11b**). The average yield of the nitration and reduction steps was 55%.



Scheme 6. Detailed synthetic route for the obtention of isomers **30** and **34**.

3.2.2.2. Synthesis of non-amine compounds **JE7-JE12**

Target compounds **JE7-JE12** were prepared through a two-step synthetic approach using as starting material commercial 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid **35** (Scheme 7).

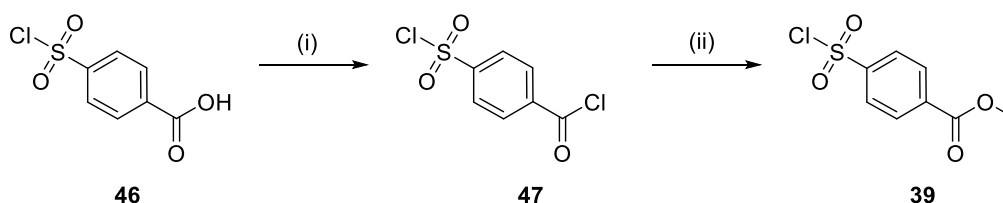


Scheme 7. Synthesis of compounds **JE7-JE12**. *Reagents and conditions:* (i) Tetrahydrofuran (THF), H₂O, K₂CO₃, rt 30 min; (ii) **30** (**34** for **JE11b**), HATU, DIPEA, DMF, 0 °C, rt 1h; (iii) LiOH, MeOH, H₂O, rt 24 h.

Nucleophilic substitution between THIQ **35** and the appropriate arylsulfonyl chloride derivative **36-40** using K₂CO₃ as base and THF/H₂O as solvents gave arylsulfonyl THIQ carboxylic acid intermediates **41-45** with an average yield of 55% (i, Scheme 7). During the optimization of the reaction conditions, it was observed that K₂CO₃ (a stronger inorganic base than NaHCO₃) allowed the complete deprotonation and dissolution of the THIQ carboxylic acid, which improved the reactions compared to when NaHCO₃ was used. Carboxamides **JE7-JE11** were obtained through a coupling reaction of analogs **41-45** with indacenamine **30** using HATU as coupling reagent and DIPEA as base in DMF (compound **JE11b** was afforded using asymmetric indacenamine **34**) (ii, Scheme 7). The reaction time was 1 h and the targets compounds were obtained with an average yield of 41%. In addition,

the saponification²⁶² of ester **JE10** using LiOH as a base in MeOH and water afforded carboxylic acid **JE12** (56% yield) (Scheme 7).

For the preparation of intermediate **44**, methyl ester **39** previously synthesized from commercially available benzoic acid **46**, was used. As shown in Scheme 8, chlorination of **46** under reflux using thionyl chloride in dichloroethane (DCE) and subsequent esterification of acyl chloride **47** in MeOH gave the desired methyl benzoate **39** (73% yield).²⁶³



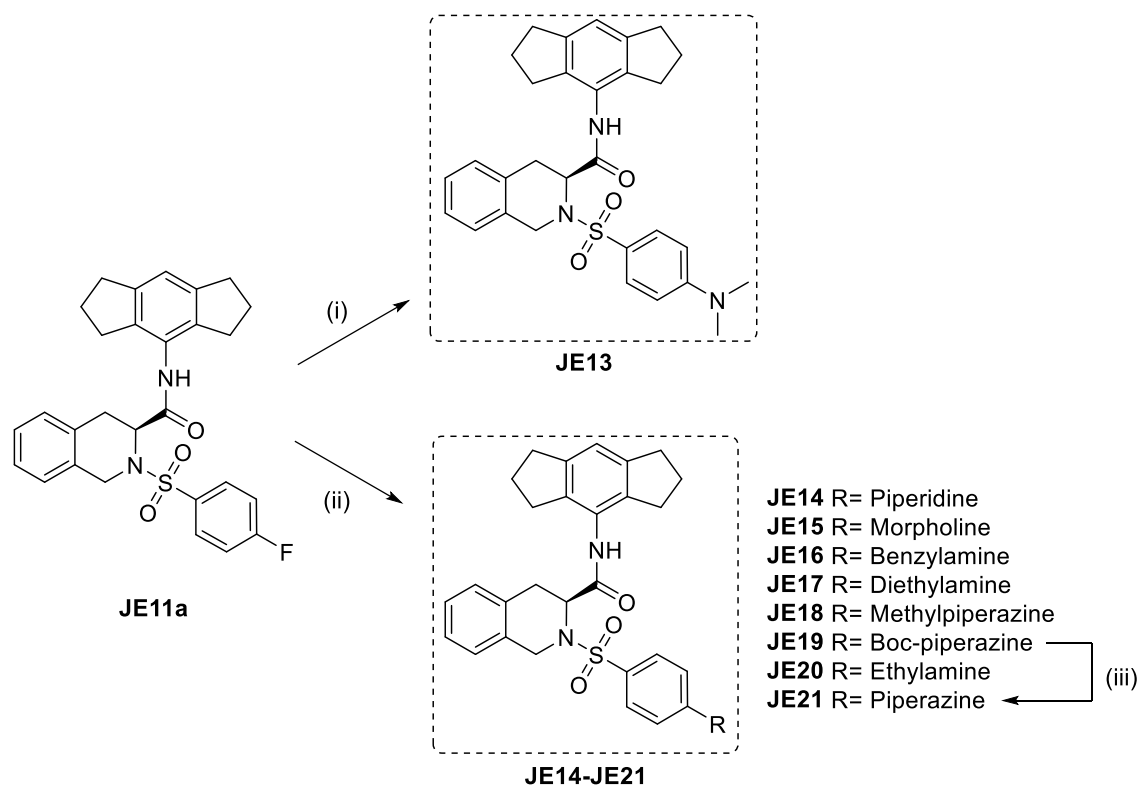
Scheme 8. Synthesis of intermediate **39**. *Reagents and conditions:* (i) SOCl₂, DCE, reflux, 1 h; (ii) ice-cold MeOH/ H₂O, 0 °C 5 min, rt 10 min.

3.2.2.3. Synthesis of amine compounds JE13-JE21

Fluoro carboxamide **JE11a** was used as the starting material to generate the amine derivatives **JE13-JE21** through a nucleophilic substitution (Scheme 9).

When the reactions were carried out with DMF, we found that although the target products were formed, the by-product **JE13** was also obtained as the mayor product (57%), due to the DMF degradation at high temperature into dimethylamine (Scheme 9).²⁶⁴ Therefore, the solvent was changed to avoid the formation of by-products that would decrease the yield and make the purification of the compounds more difficult. An attempt was made to carry out the reactions with piperidine and morpholine using dioxane, but the result was not good as this solvent did not allow the formation of the target products. In contrast, when DMSO was used as the solvent to carry out the reactions, it proved to be the optimal solvent allowing high yields to be obtained.

Thus, compounds **JE14-JE20** were provided by the reaction of derivative **JE11a** with different primary and secondary amines using DMSO at 120 °C obtaining an average yield of 83%. Additionally, piperazine **JE21** was synthesized by treating the Boc-protected amine **JE19** with a solution of HCl 4N in dioxane in good yield (52%) (Scheme 9).



Scheme 9. Synthesis of amine compounds **JE13-JE21**. Reagents and conditions: (i) DMF, 120 °C 10 h; (ii) Corresponding amine, DMSO, 120 °C 1-24 h; (iii) HCl 4N in dioxane, rt 30 min.

3.2.3. Antiproliferative studies

The antiproliferative activity of target compounds **JE7-JE21** was evaluated against the CD44+ MDA-MB-231 cancer cell line. Cell viability was performed using PrestoBlue™ assay after treating cells with **JE7-JE21**. Each compound was tested in a range of concentrations from 0.01 to 100 μM for 5 days (Table 4 and Figure 38).

Table 4. Antiproliferative activities of the compounds **JE7-JE21** against MDA-MB-231 cells.

Compounds	R	EC ₅₀ (μM)
JE7	CN	39.43 \pm 0.54
JE8	OMe	6.51 \pm 0.08
JE9	CF ₃	42.23 \pm 1.95
JE10	COOMe	12.35 \pm 0.46
JE11a	F (s)	6.02 \pm 0.29
JE11b	F (as)	11.37 \pm 0.18
JE12	COOH	85.85 \pm 1.05

JE13	Dimethylamine	19.15 ± 0.30
JE14	Piperidine	46.88 ± 0.77
JE15	Morpholine	31.05 ± 0.54
JE16	Benzylamine	> 100
JE17	Diethylamine	17.81 ± 0.33
JE18	Methylpiperazine	5.47 ± 0.08
JE19	Boc-piperazine	> 100
JE20	Ethylamine	15.43 ± 0.66
JE21	Piperazine	4.11 ± 0.05

All compounds show EC₅₀ values < 100 μM, except benzylamine **JE16** and Boc-protected piperazine **JE19**.

The four most potent compounds (< 10 μM) are **JE8**, **JE11a**, **JE18**, and **JE21**, which show an activity of 6.51, 6.02, 5.47 and 4.11 μM, respectively. The amine derivatives **JE18** and **JE21** have in common the presence of the piperazine group at the *para* position of the arylsulfonyl moiety. This indicates that when piperazine is protected with the Boc group (compound **JE19**), it results in a significant decrease in activity. Methoxy (**JE8**) and fluorine (**JE11a**) compounds also present high biological activities. Interestingly, the asymmetric isomer with fluorine (**JE11b**) is shown to be half as active (11.37 μM) as its symmetric isomer.

Among the compounds with activity from 10 to 20 μM, the ester **JE10** with an activity of 12.35 μM stands out. Furthermore, the acyclic amines **JE13**, **JE17** and **JE20** show similar activities.

The analogs with activity between 30 and 50 μM, it is worth mentioning that the morpholine derivative (**JE15**) with an EC₅₀ of 31.05 μM. Compounds **JE7** (-CN), **JE9** (-CF₃), and piperidine **JE14** present EC₅₀ values of 39.43, 42.23, 46.88 μM, respectively (Table 4 and Figure 38).

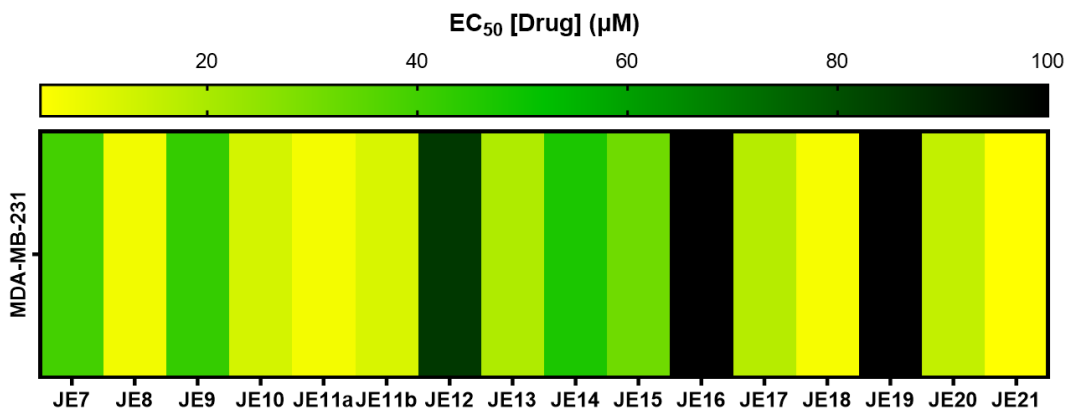


Figure 38. Heatmap of EC₅₀ values of the final compounds tested. Yellow colour indicates compounds with higher activity while dark colour indicates compounds with lower activity. Data represent the mean values of three replicates.

In summary, the non-amine compounds that show the most activity are the fluorine, methoxy and ester analogs (**JE11a>JE8>JE11b>JE10**, EC₅₀ MDA-MB-231 = 6.02>6.51>11.37>12.35 µM respectively). Furthermore, if we analyze the best biological activities of the amine compounds, we can conclude that the piperazine-containing analogs are the most active, followed by the compounds bearing acyclic amines (**JE21>JE18>JE20>JE17>JE13**, EC₅₀ MDA-MB-231 = 4.11>5.47>15.43>17.81>19.15 µM respectively) (Figure 39).

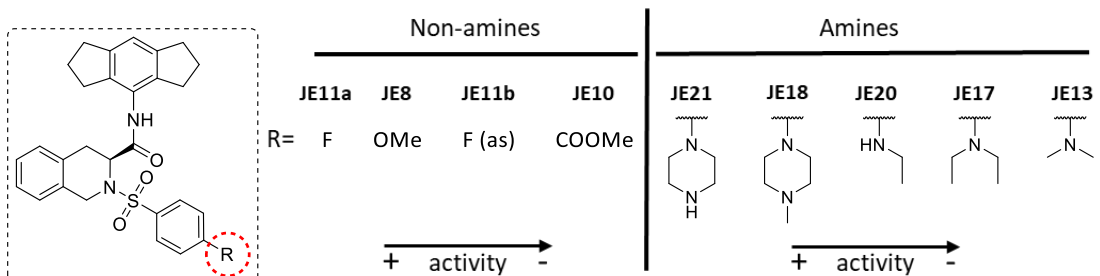
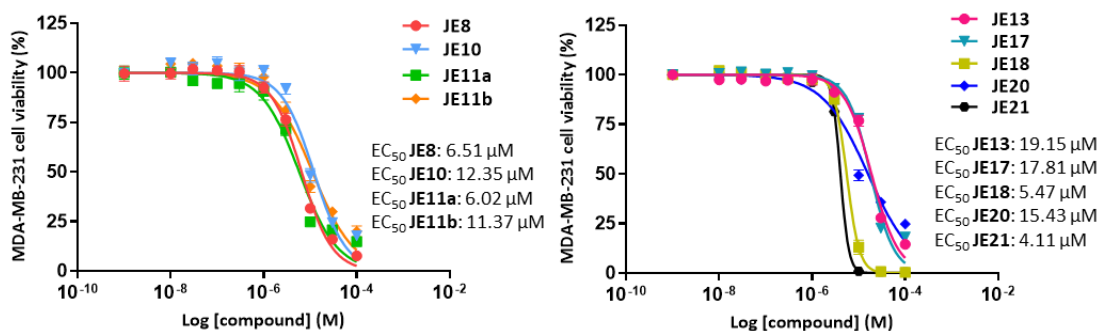


Figure 39. Dose-response curves of most active analogs on MDA-MB-231 cancer cell line. Non-amines compounds are shown on the left, and amine derivatives are on the right. Error bars: ±SD from n = 3.

To determine the inhibition capacity of the HA-CD44 interaction, compounds that show the highest biological activity will be tested by the competitive binding assay using flow cytometry previously used in the previous section. Other cell-based assays, such as apoptosis or spheroid viability, can also be accomplished to further investigate the mechanism by which they exert their antiproliferative activity.

3.3. Design, synthesis and biological evaluation of an HA-CD44 interaction inhibitor loaded on polymeric NPs

3.3.1. Design, synthesis and biological evaluation of *N*-alkyl THIQ derivatives

As described in section 1.6.6.6, **6** showed a significant affinity for the isolated protein CD44-HABD.¹⁶⁵ Thus, the C series containing the THIQ moiety and an alkyl chain was designed in order to study how it can intervene with HA-CD44 interaction.

Four compounds with an alkyl chain at position 2 of THIQ have been synthesized. The alkyl chain bears different functional groups, including, methylketone (**JE22**), methylester (**JE25**), methanoic acid (**JE24**) or methylalcohol (**JE23**). The reported methylester **6** (**JE25**) has also been included in this series (Figure 40).

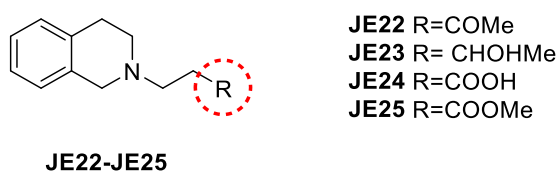
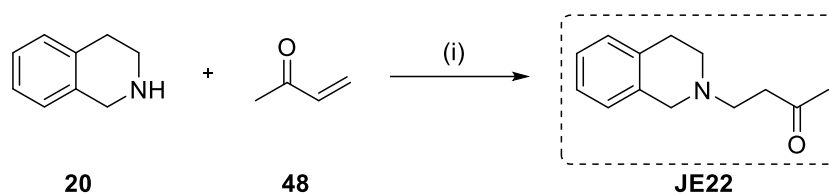


Figure 40. General structure of the *N*-alkyl THIQ derivatives **JE22-JE25**.

Furthermore, based on the broad expertise of our group in the functionalization of NPs for the selective delivery of biomolecules,^{183,184,216,226,227,238} the aim was to implement a nanotechnology strategy to enhance the efficiency of the THIQ derivatives targeting CD44 to achieve a potential antitumor treatment.

Ester functional group of the reported CD44 inhibitor (**JE25**, Figure 40)¹⁶⁵ was replaced by a ketone (**JE22**), alcohol (**JE23**) or acid (**JE24**) (Figure 40) to allow the conjugation to the nanospheres via the acid pH-sensitive hydrazone bond (**JE22**) or by ester-type bond (**JE23** and **JE24**). These nanodevices selectively release these THIQ derivatives as specific inhibitors of the HA-CD44 interaction by the acidic tumor microenvironment or through the effect of esterase enzymes (see Figure 27, section 2).

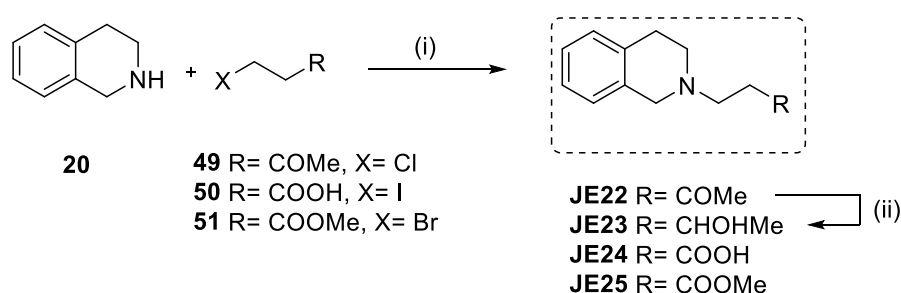
The initial preparation of compound **JE22** was carried out following the protocol described in the previous work of K. Jones et al. with slight modifications.²⁴⁹ Compound **JE22** was obtained through a Michael reaction between THIQ **20** and methyl vinyl ketone **48** using DCM as solvent and CuBr (I) as a catalyst. The reaction time was 64 h at rt and the yield obtained was 76% (Scheme 10).



Scheme 10. Synthesis of compound **JE22**. *Reagents and conditions:* (i) CuBr (I), DCM, 0 °C 5 min, rt 64 h.

Although the compound was obtained with a good yield (76%), another methodology was also employed to reduce the reaction time. Compound **JE22** was therefore synthesized via nucleophilic substitution between THIQ **20** and β -haloketone **49** during 5 h at rt. TEA was used as a base and DCM as solvent.²⁴⁹ The reaction yield was 100%, thus resulting in a significant improvement over the previous methodology.

This procedure was used to obtain the other derivatives (**JE24** and **JE25**) in this series. THIQ alkylation was performed with β -haloacid **50** for **JE24** and with β -haloester **51** in the **JE25** case. For compound **JE24**, the methodology was the same except for the solvent used, which was absolute EtOH to improve the solubility of the reaction. The reaction time for compound **JE24** was 3 h and for compound **JE25** was 20 h. The average yield obtained was 73%. In addition, the reduction of ketone **JE22** gave rise to alcohol **JE23** using NaBH₄ as reducing agent²⁶⁵ in MeOH for 24 h at rt (86% yield) (Scheme 11).



Scheme 11. Synthesis of compounds **JE22-JE25**. *Reagents and conditions:* (i) TEA, DCM (absolute EtOH for **JE24**), 0 °C 5 min, rt 5 h for compound **JE22**, 3 h for **JE24** and 20 h for **JE25**; (ii) NaBH₄, MeOH, rt 24 h.

In the search for analogs with antitumor activity, cell viability assays were first carried out on CD44+ MDA-MB-231 cancer cell line to determine the antiproliferative activity of the target compounds. Cell viability was performed using PrestoBlue™ reagent after treating cells for 5 days with derivatives. Target compounds (**JE22-JE25**) were evaluated ranging 0.01 to 100 μ M concentrations (Table 5).

Table 5. Antiproliferative activities of the target compounds **JE22-JE25** against MDA-MB-231 cells. Data represent the mean values of three replicates.

Compounds	R	EC ₅₀ (μM)
JE22	COMe	8 ± 0.13
JE23	CHOHMe	> 100
JE24	COOH	> 100
JE25	COOMe	> 100

Surprisingly, ketone **JE22** is the only compound that shows significant activity (EC₅₀ = 8 μM), in contrast to compounds **JE23**, **JE24** and **JE25** which present no activity. This indicates that the ketone moiety is essential for the activity, whereas ester, acid or alcohol functional groups result in a decrease in biological activity.

Given the results obtained, compound **JE22** was therefore chosen for conjugation to NPs and further biological studies.

3.3.2. Study of the effect of structural modification of THIQ on CD44 interaction by computational studies

To assess whether the ketone does not affect the interaction with the CD44, a computational study was performed. For this purpose, the protein-ligand interactions between the murine CD44-HABD and **JE22** at an atomist level were analyzed. MD simulations using the crystallized CD44-HABD with **JE25** derivative were performed using the same protocols after substituting one residue by the other (Figure 41A,B). A typical setup of the MD simulations with an explicit solvent is shown in Figure 41A for the protein with one of the ligands.

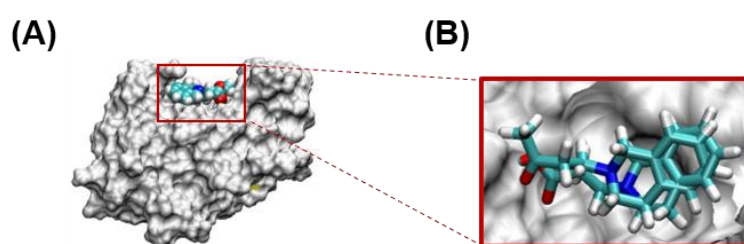


Figure 41. (A) Murine CD44-HABD in MSMS representation in white, and **JE25** in Van der Waals representation at the position where it is found in the crystal structure PDB id 5BZK, used as starting point of the MD simulations. (B) Relative positions of **JE22** and **JE25** ligands at the start of the MD simulations. The **JE22** molecule was aligned using the position of the **JE25** ligand in the crystal structure PDB id 5BZK.

In all the runs, the RMSD of the C α atoms of the α -helical and β -sheet components of the protein from the original crystallographic structure attained comparable values to the resolution of the

crystal and remained almost flat during the rest of the simulations, indicating that CD44 was structurally stable (Figure 42).

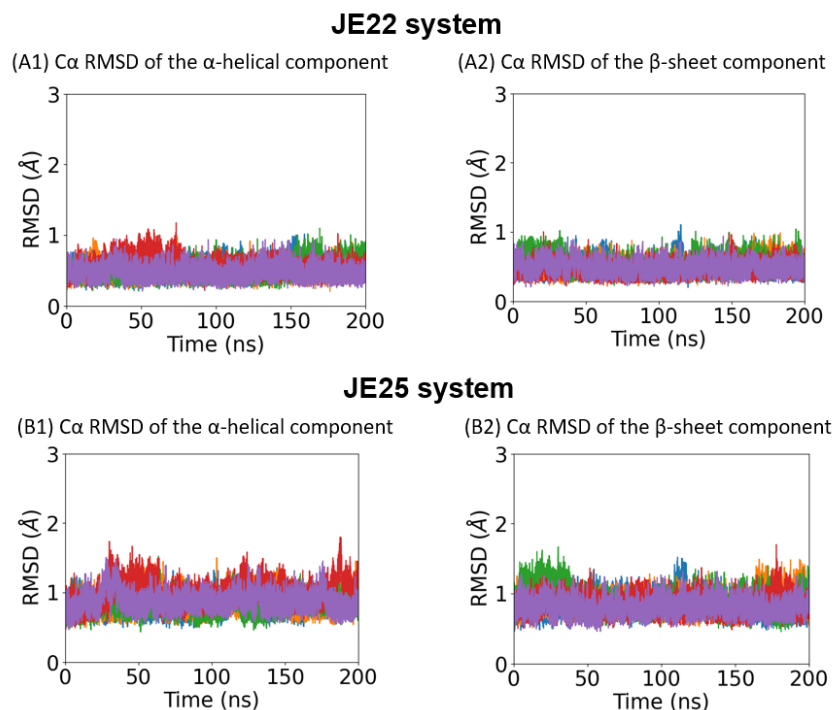


Figure 42. Evolution of the $\text{C}\alpha$ RMSD deviation of different structural elements of CD44 from the initial structure as a function of time for the system with (A) JE22 or (B) JE25. Contributions from the α -helical (A1 & B1) and β -sheet (A2 & B2) components of the protein in each replica are shown in different colour.

The time evolution of ligand-protein interactions is presented in Figure 43 for each of the five replicas considered for each of the two systems amounting to 2 μs of dynamics. It was found that the behaviour of both ligands is similar and stabilized binding poses are observed only in a fraction of the trajectories.

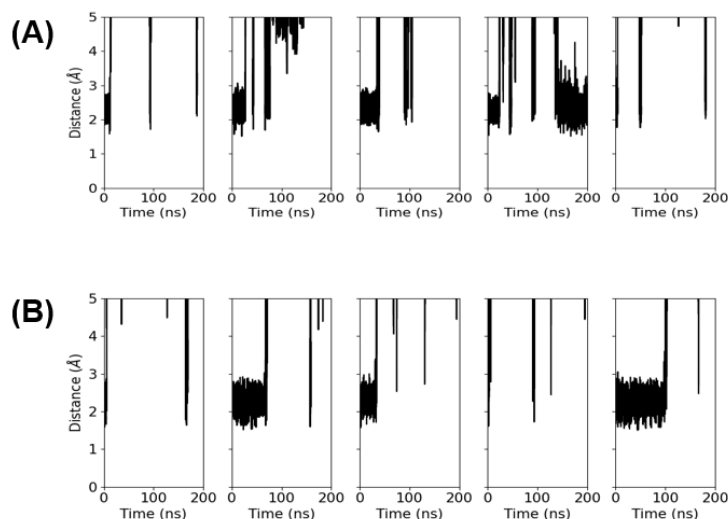


Figure 43. Evolution in time of the minimum distance between any atom of the ligand, either **(A) JE22** or **(B) JE25**, and any atom of the binding site composed by Asn29, Thr31, Glu41, Thr80, Cys81, Arg82 and Arg155, for each of the five replicas.

JE22 leaves its original binding site at a shallow pocket on the surface of CD44 in all the trajectories: after 25, 40 and over 100 ns of dynamics and almost immediately in the remaining two replicas. The ligand interacts via the benzyl ring with the protein through residue Arg155 and a cluster formed by Glu41, Asn29 and Thr31, and on the other side with residues Cys81 and Thr80. Subsequently, the contacts with Cys81 and Thr80 are lost and the ligand remains attached to the protein only through the interactions of the benzyl ring. As time progresses, other interactions with nearby residues e.g., Glu41, Asn29 and Thr31 are established until the ligand finally loses contact with the protein and departs to the solution. In the case of **JE25**, only in one replica, after the initial departure from the protein surface, the ligand comes back and lands again in a similar position. In all the simulations, random excursions of the ligand to the protein surface are recorded. The atomic interactions are similar to those described for **JE22** in one of the two main poses.

To characterize the influence of the ligand in the structure of the protein, the normalized probability densities of the of the C α atom RMSD of the protein from the original structure when any atom of either ligand is found at less 3 Å from the protein were computed (Figure 44). It can be observed that the densities are almost identical in the case of the **JE25** system, implying that the presence or absence of the ligand at the binding pocket is not reflected in changes in the structure of the protein. In the case of the system with the ketone THIQ derivative **JE22**, two populations are characterized but like in the previous case, the overall shape of the distribution is identical with one exception; a higher peak appears when **JE22** is not interacting with the protein; analysis of the trajectories indicates that this difference is not correlated to the presence or absence of the ligand.

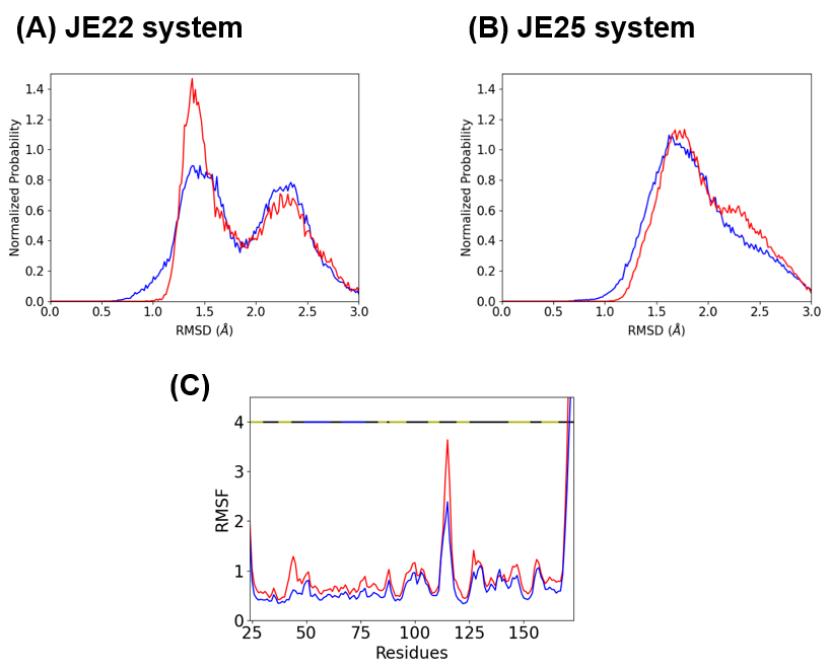


Figure 44. (A and B) Normalized probability density of the C α RMSD of the protein with respect to the first frame of the simulation, when any atom of either ligand is at less than 3 Å (blue) from the protein or when the ligand is further than 3 Å from the protein (red). (C) Root mean square fluctuation (RMSF) values of the protein using as a reference the starting frame of the simulation in the two representative situations described in (A). The different structural elements are indicated in the horizontal bar above the RMSF data; helices are in blue, loops, coils and turns in black, and β -sheet in yellow. The peak in red in (A) does not correlate with the presence or absence of the ligand in the binding site; it is a result of the movement of some loop.

In order to further characterize the multiple poses observed in the MD trajectories of either ligand, a cluster analysis was performed using principal component analysis (PCA) and the distances between (i) the center of mass of the N and O atoms of **JE22** or **JE25** and (ii) the center of mass of N and O atoms of residues Asn29, Thr31, Thr80, Cys81, Arg82, and Arg155. These residues are those that have at least one atom within 3 Å from the ligand at the beginning of the simulation. The data were filtered, and only when the minimum distance between the protein residues and either **JE22** or **JE25** was less than 3 Å, they were kept. Subsequently, a PCA was performed over the resulting multidimensional matrix of distances. 95% of the variance of the data was explained with the sum of the eight first principal components (PCs) (Figure 45A,B). Clustering was just performed with only the first two PCs that amounted to ~70% of the variance. This analysis was performed with a Kmeans algorithm using four clusters as initial guess; two of the clusters were rather localized and the others two were disperse (Figure 45C,D).

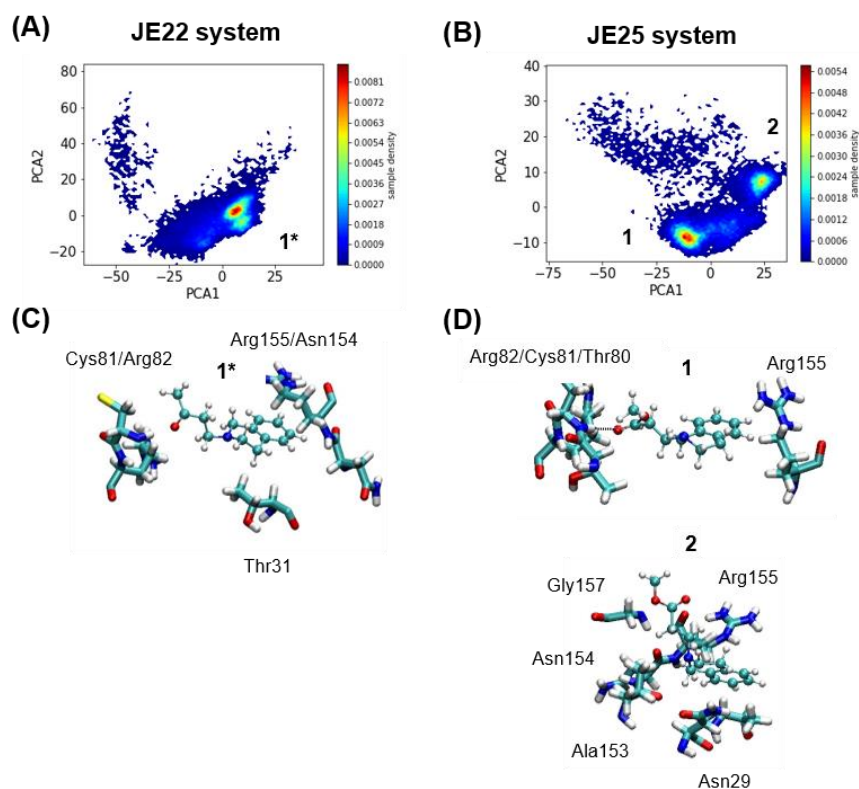


Figure 45. Computational analysis. (A,B) Comparison of MD-resolved ligand binding poses (**1*** for **JE22** system and **1** and **2** for the **JE25** system). Probability density of the first two principal of the multidimensional matrix built with the distances between either the nitrogen and oxygen atoms of (A) **JE22** or (B) **JE25**, and any of the nitrogen or oxygen atoms of the residues that define the **JE25** binding pocket. The binding pocket where **JE25** is found crystallographically is formed by residues Asn29, Thr31, Glu41, Thr80, Cys81, Arg82, and Arg155; any of these residues have at least one atom at 3 Å of the ligand. (C,D) Representative structures of each cluster are shown in panels (C,D) for **JE22** and **JE25** systems, respectively. The residues from the protein where there is at least an atom within 2.5 Å of the ligand are shown in licorice representation.

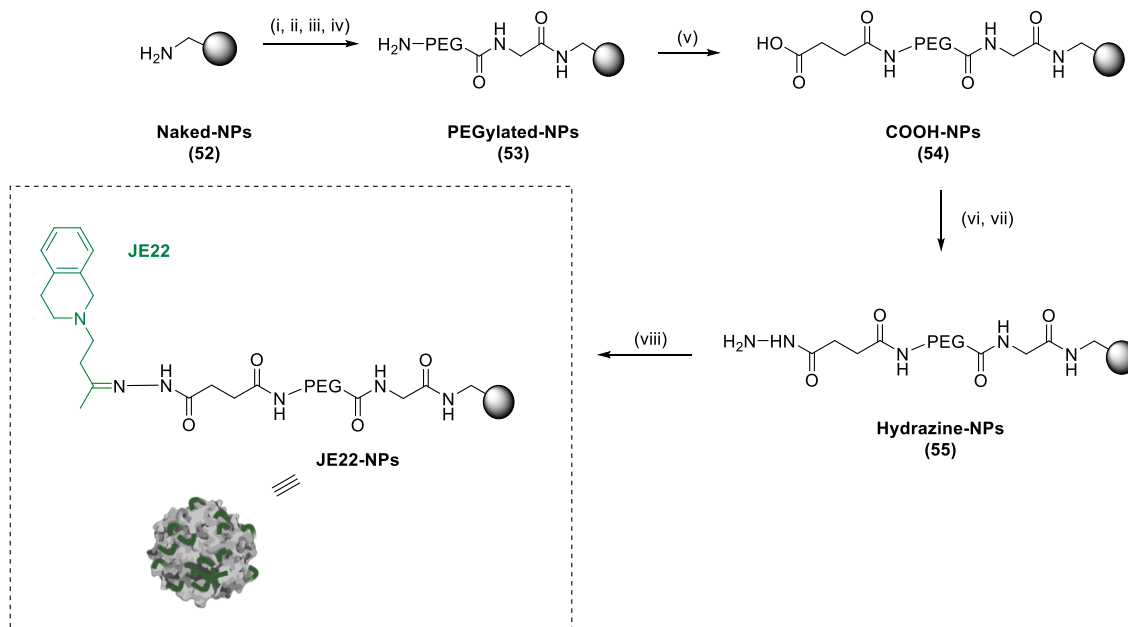
These computational studies have demonstrated that **JE22** binds to murine CD44-HABD in an almost identical fashion than **JE25** derivative, which is found in the reported crystallographic structure.¹⁶⁵ Based on these results, it can be confirm that the designed THIQ ketone derivative **JE22** is a good candidate to interact with CD44 receptor.

These computational studies have been carried out in collaboration with the research group of Prof. Domene at the University of Bath.

3.3.3. Synthesis and physicochemical characterization of the nanodevice to target CD44

3.3.3.1. Preparation of JE22-NPs

Following a previously described protocol, a monodisperse population of amino-functionalized polystyrene NPs cross-linked with DVB were synthesized by dispersion polymerization, using vinyl benzyl amine hydrochloride (VBAH) as the monomer to functionalize the NP with the amino groups.²¹⁶ Following an Fmoc solid-phase protocol, **Naked-NPs (52)** (0.064 mmol g⁻¹ of amino groups) were PEGylated to obtained **PEGylated-NPs (53)** (100% yield). The PEGylation increases the biocompatibility of the NPs and reduces unfavourable interactions between NPs and the bioactive cargoes.²⁶⁶ The modified THIQ derivative of CD44 inhibitor (**JE22**) was synthesized as described in Scheme 10. Ketone moiety to allow for conjugation to the NP by hydrazone formation was achieved by the Michael addition of THIQ to methyl vinyl ketone, employing DCM as solvent and CuBr (I) as a catalyst²⁴⁹ (76% yield) as previously mentioned (Scheme 10). The structure of the obtained compound **JE22** was confirmed by NMR and mass spectra. Then, drug loading was carried out by conjugation of the CD44 inhibitor **JE22** via hydrazone bond.¹⁸³ For this purpose, carboxylated nanoparticles **COOH-NPs (54)** were prepared using succinic anhydride; then, **hydrazine-NPs (55)** were prepared by treatment with hydrazine, and the selective conjugation to the ketone group of THIQ derivative **JE22** was carried out to yield **JE22-NPs** (Scheme 12).



Scheme 12. Preparation of **JE22-NPs**. *Reagents and conditions.* (i) Fmoc Gly-OH, Oxyme, DIC, DMF, 2 h 60 °C; (ii) 20% Piperidine/DMF, 3 × 20 min 25 °C; (iii) Fmoc-PEG-OH, Oxyme, DIC, DMF, 2 h 60 °C; (iv) 20% Piperidine/DMF, 3 × 20 min 25 °C; (v) Succinic anhydride, DIPEA, DMF, 2 h 60 °C; (vi) Oxyme, DIC, DMF, 4 h 25 °C; (vii) Hydrated hydrazine 55% v/v, DMF, 15 h 25 °C; (viii) **JE22**, trifluoroacetic acid (TFA), MeOH, 15 h 25 °C.

3.3.3.2. Physicochemical characterization of JE22-NPs

The size distribution of the NPs loaded with THIQ ketone derivative **JE22-NPs** and **52** were measured by DLS (Figure 46A). A monodisperse population was observed with a hydrodynamic diameter of 382.5 ± 0.9 nm (PDI = 0.13) (Figure 46A). TEM analysis revealed the spherical shape of these NPs and corroborated their size (Figure 46C). The zeta potential of **JE22-NPs** and **52** was also determined. The value for the new nanoformulation was slightly negative (-24.1 mV \pm 0.7) in water (Figure 46B).

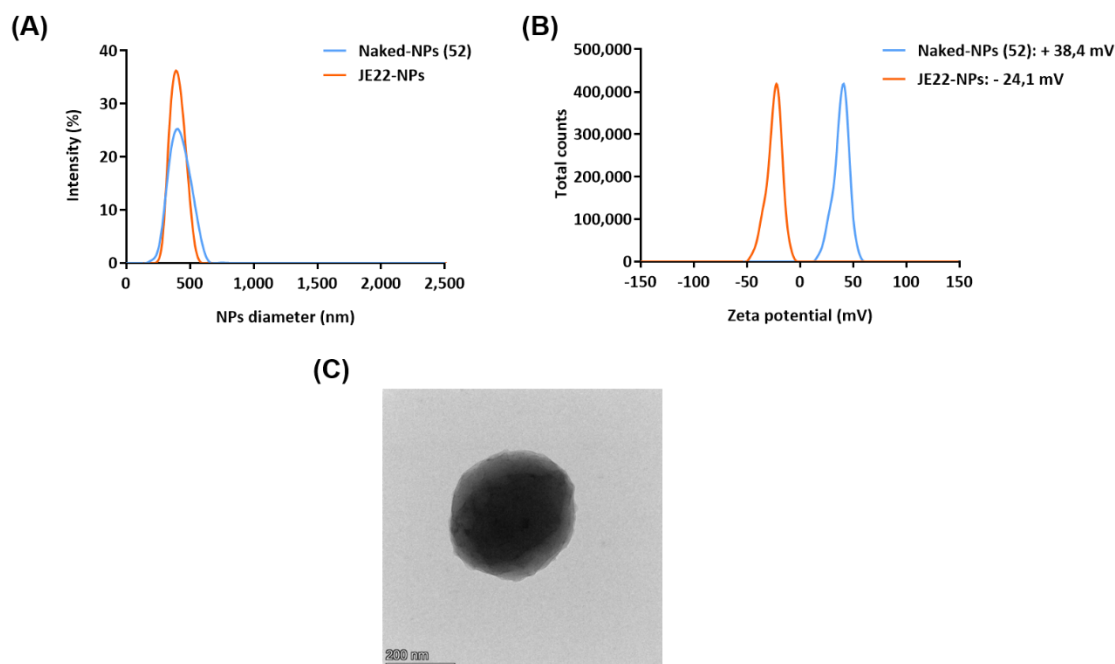


Figure 46. Characterization of **JE22-NPs**. (A) Hydrodynamic diameter values by DLS. (B) Zeta potential values. (C) Image of **JE22-NPs** obtained by TEM.

Next, the stability of **JE22-NPs** was evaluated in different conditions at 4 °C and 37 °C following guidelines provided by the European Nanomedicine Characterization lab. The size of these nanodevices was measured by DLS after 24 h in several sterile media: ultrapure water (Milli-Q grade, H₂O mq), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), NaCl 10 mM, NaCl 154 mM, and phosphate buffered saline (PBS) pH = 7, showing a constant size distribution (Figure 47A). It was observed that neither the temperature nor the composition of the vehicle affected the stability of these NPs. These results were corroborated by the zeta potential analysis (Figure 47B). Overall, the stability of these particles was confirmed, which is a key point for future translation of this nanodevice.

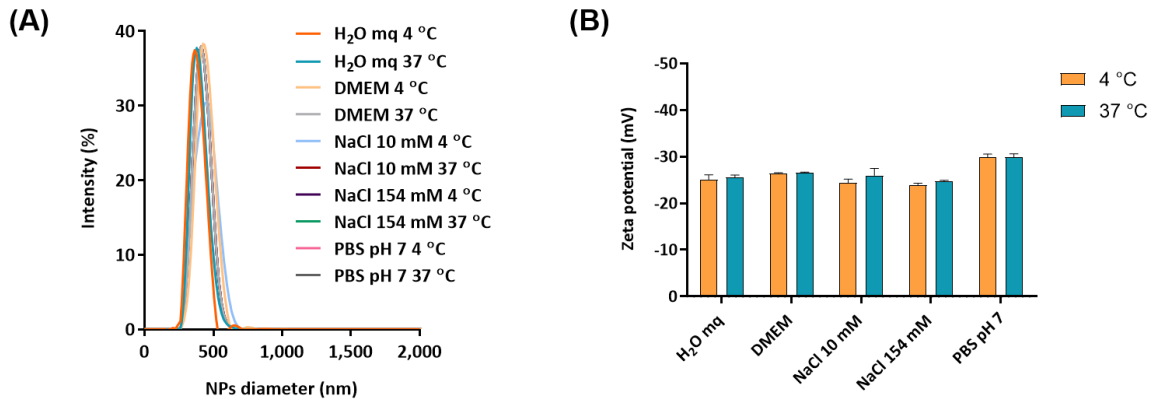


Figure 47. Stability study of JE22-NPs. DLS analysis (A) and zeta potential (mV) values (B) of JE22-NPs for 24 h at 4 °C and 37 °C in sterile ultrapure H₂O mq, DMEM, NaCl 10 mM, NaCl 154 mM, and PBS pH = 7. Data represent the mean ±SD of three independent experiments.

3.3.3.3. Determination of JE22-NPs concentration by spectrophotometric method

The concentration of NPs (NPs/μL) was determined by a spectrophotometric method based on the turbidimetry of the NP suspension.²¹⁸ The standard calibration curve was obtained for NPs of 385 nm from samples with a known concentration of **Naked-NPs (52)**. The calibration curve is fitted to a linear regression model, by which the number of NPs per μL corresponding to one OD600 unit for each size could be determined. Therefore, based on the calibration curves obtained using initial batches of NPs suspensions, the number of NPs in final batches can be determined by measuring their OD at 600 nm (Figure 48).

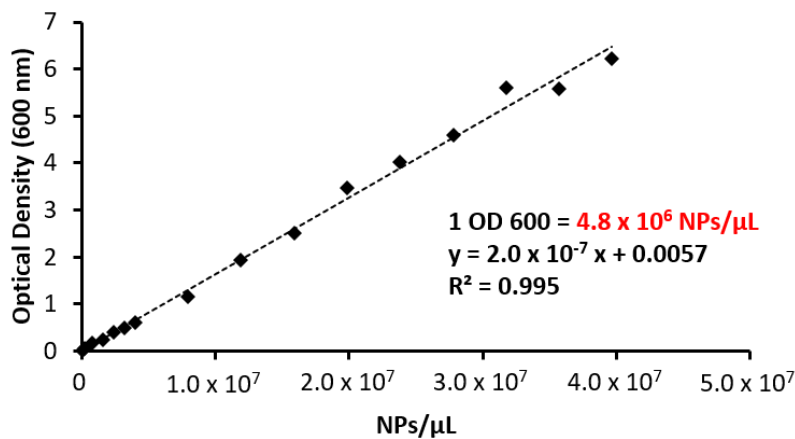


Figure 48. Calibration standard curve of concentration of NPs (OD600). The concentration of NPs at an OD600 nm is 4.8 × 10⁶ NPs/ μL.

3.3.3.4. Efficiency of conjugation and drug release of JE22-NPs

The quantification of the remaining amount of drug in the supernatant of the reaction can give information about the efficiency of the conjugation of anti-CD44 derivative **JE22** to the NPs. For this purpose, an absorbance analysis was performed at different concentrations and a calibration curve of **JE22** was generated measuring a set of standard samples by UV spectroscopy (A_{254} nm) (Figure 49A,B). Then, the LC value was determined by considering the amount of conjugated **JE22** with respect to the number of NPs, and this approach is more accurate than NP weight.²⁶⁷ To this aim, the number of NPs per volume was determined using an accurate spectrophotometric method that was previously developed.²¹⁸ The concentration of nanoparticles **JE22-NPs** was estimated as 8.52×10^{11} NPs/mL (Figure 48). The drug LC is related to the number of NPs; thereafter, the LC per NP can be calculated. A LC of 1.14×10^7 molecules of **JE22** per NP was estimated. This value corresponds to 1.89×10^{-8} nmol of CD44 inhibitor **JE22** per NP (Figure 49C).

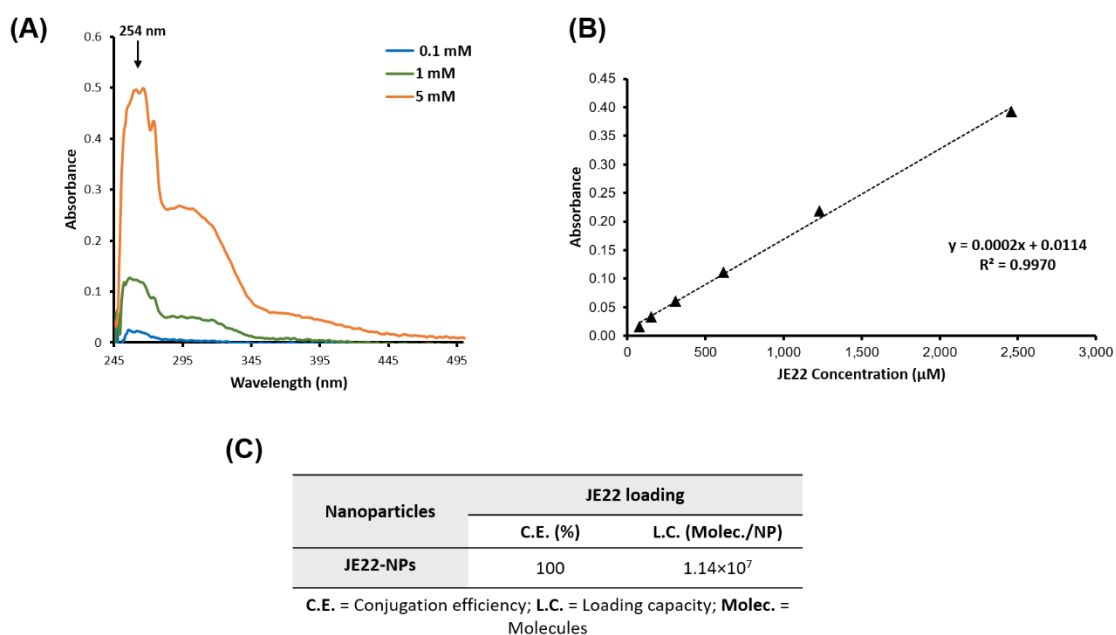


Figure 49. Evaluation of drug loading of **JE22-NPs**. (A) Spectrophotometry determination of selected wavelength of **JE22**. (B) Calibration standard curve of **JE22** obtained by spectrophotometry. (C) Determination of CE and LC of **JE22** per NP.

To determine the value of drug dose with accuracy and precision is of extreme relevance for the clinical translation of nanomedicine. The CE was determined by considering the drug conjugated with respect to the total amount of free amine groups on the NP surface, which was 100% for **JE22-NPs** (Figure 49C). This high efficiency is remarkable compared to drug-loading strategy based on encapsulation.²⁶⁸

To achieve selective release at the target site, a pH-sensitive stimuli discharge strategy was implemented. Based on the fact that there is slightly acidic pH at the tumor microenvironment, a cleavable bond that responds to acidic pH was implemented. To release the drug in acidic conditions, **JE22** was covalently conjugated to NPs by a hydrazone bond sensitive to pH = 5-6 as previously reported.²⁶⁷ The pH-responsive release of THIQ derivative **JE22** in vitro was determined by HPLC. Using standard samples, a calibration curve of **JE22** was performed (Figure 50A). A comparison of the percentage of the released drug with respect to the amount of CD44 inhibitor conjugated to the **JE22-NPs** was done. Release profiles were obtained for five days at pH = 5 and pH = 7.4 by HPLC analysis (Figure 50B).

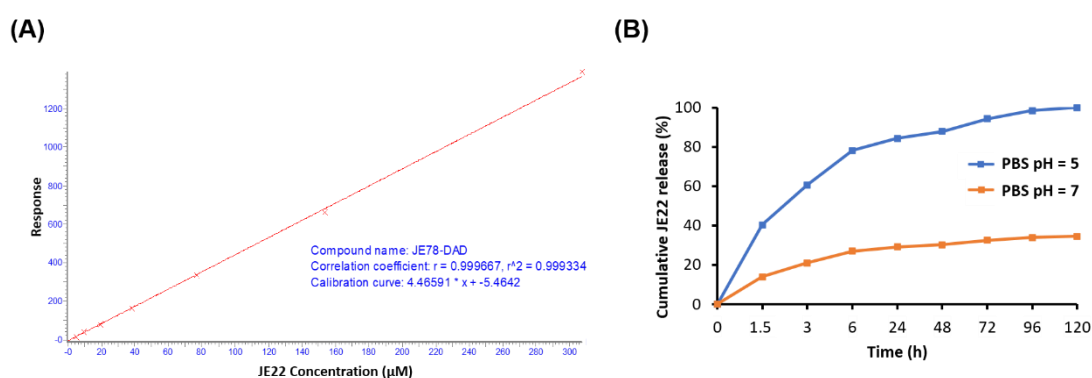


Figure 50. Evaluation of **JE22** release from **JE22-NPs**. (A) Calibration curve of **JE22** acquired by HPLC. (B) Cumulative **JE22** release. **JE22-NPs** were incubated for 120 h in PBS at pH = 5 and pH = 7.4 at 37 °C. Results are expressed with the values of the mean \pm standard error of the mean (SEM).

As expected, the pH-sensitive cleavage of the hydrazone linker resulted in the exponential sustained release of **JE22** in an acidic environment (PBS pH = 5) (Figure 50B, blue line). An accumulative release was achieved for up to 5 days (120 h). A significant release was observed within 6 h of incubation at pH = 5 with a release rate of $78\% \pm 0.6$. Then, the maximum release value of 100% was achieved by a sustained release for up to 120 h. Non-significant size change was observed following incubation at pH = 5 for this period (Figure 51). On the other hand, the amount of drug released from the nanodevice was minimal at physiological environment (PBS pH = 7.4), ($\sim 20\%$ within 6 h of incubation). This result demonstrates that a significant amount of the drug remained attached to the NPs (Figure 50B, orange line). This result pointed out the realistic stability and selectivity of the **JE22-NPs**. It is important to remark that the pH value of the medium has a clear effect on the release efficiency of the drug, which validates the drug release strategy designed in this approach. Then, the efficient release of the drug in a sustained manner in acidic conditions could be a key feature to improve the therapeutic efficacy of **JE22-NPs** in the tumor site.

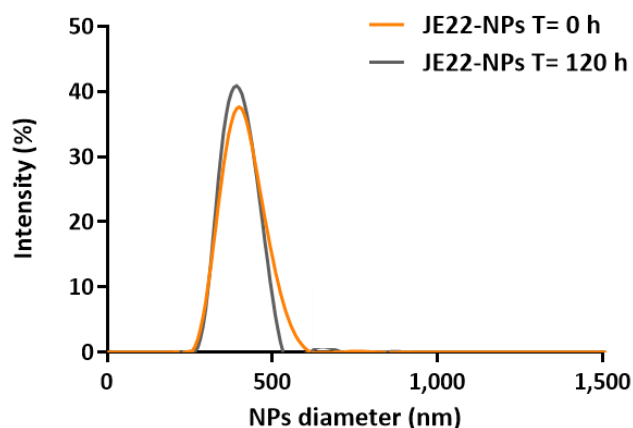
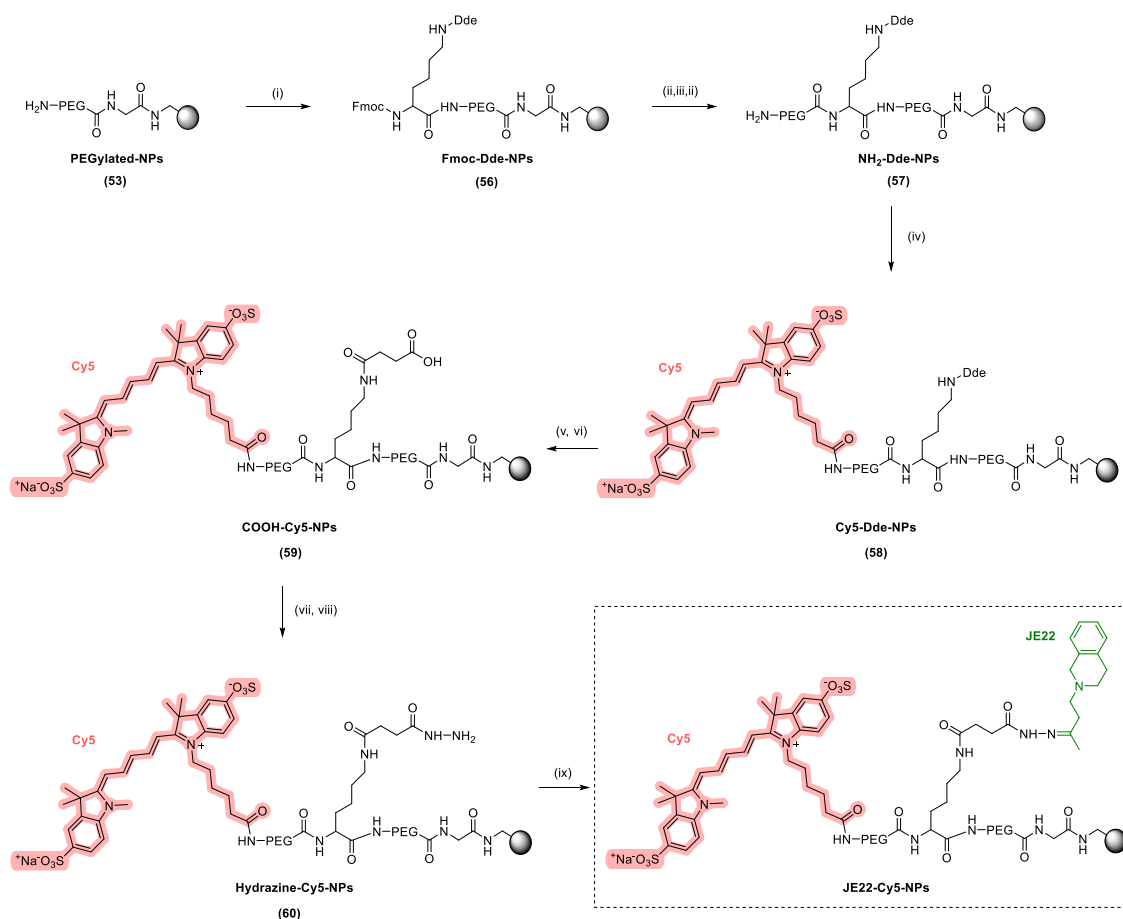


Figure 51. DLS analysis of **JE22-NPs** before and after incubation in PBS pH = 5 for 5 days.

3.3.4. Synthesis and characterization of the fluorescent nanodevice

3.3.4.1. Preparation of JE22-Cy5-NPs

In order to study the cellular localization of the **JE22-NPs**, a nanosystem bifunctionalized with the therapeutic agent **JE22** and a cyanine derivative (Cy5, excitation 651 nm and emission 670 nm) was designed and prepared. The fluorophore Cy5 was chosen as it is a traditional far-red-fluorescent dye widely used in bioimaging. Therapeutic and fluorescent NPs were successfully synthesized using standard protocols based on Fmoc solid-phase chemistry with oxyme and DIC as coupling reagents. The initial loading of NPs ($0.064 \text{ mmol g}^{-1}$ of amino groups) was determined by conjugation of the Fmoc-Gly-OH amino acid. Following the synthetic steps described in section 3.3.3.1. and by monitoring the efficiency in each step using the ninhydrin test,²⁶⁹ **PEGylated-NPs (53)** were afforded. An orthogonal strategy based on the full orthogonality between Fmoc and Dde protecting groups using Fmoc-Lys(Dde)-OH as key reagent²²⁴ was performed to generate **Fmoc-Dde-NPs (56)**, thus enabling an efficient bifunctionalization of **JE22** and Cy5 molecules to NPs in a controlled way. Through a Fmoc deprotection and a second PEGylation-deprotection step, **NH₂-Dde-NPs (57)** were obtained. Then, the fluorophore Cy5 was conjugated to **57** by amide bond formation using DIPEA as a base and anhydrous DMF as solvent²²⁹ to yield **Cy5-Dde-NPs (58)**. In the other arm of the lysine scaffold, Dde deprotection was achieved by treatment with hydrazine in DMF and **COOH-Cy5-NPs (59)** were obtained using succinic anhydride. Treatment of **59** with hydrazine in DMF gave **Hydrazine-Cy5-NPs (60)**, to which compound **JE22** was conjugated via a hydrazone-type bond giving rise to target **JE22-Cy5-NPs** (Scheme 13).



Scheme 13. Synthesis of **JE22-Cy5-NPs**. *Reagents and conditions.* (i) Fmoc-Lys(Dde)-OH, Oxyme, DIC, DMF, 2 h 60 °C; (ii) 20% Piperidine/DMF, 3 × 20 min 25 °C; (iii) Fmoc-PEG-OH, Oxyme, DIC, DMF, 2 h 60 °C; (iv) Sulfo-Cy5-NHS, DIPEA, anhydrous DMF, 15 h 25 °C; (v) 2% Hydrazine/DMF, 3 × 7 min 25 °C; (vi) Succinic anhydride, DIPEA, DMF, 2h 60 °C; (vii) Oxyme, DIC, DMF, 4 h 25 °C; (viii) Hydrated hydrazine 55 % v/v, DMF, 15 h 25 °C; (ix) **JE22**, TFA, MeOH, 15 h 25 °C.

3.3.4.2. Physicochemical characterization of JE22-Cy5-NPs

Size distribution was determined by DLS observing a monodisperse population (hydrodynamic diameter of 385.7 ± 0.7 nm with a low PDI of 0.07); these results show that the fluorophore and **JE22** labelling does not affect their monodispersity (Figure 52A). The zeta potential value of **JE22-Cy5-NPs** in water was slightly negative (-36.8 mV \pm 0.6), as compared to **52**, which was $+38.4$ mV \pm 0.8 (Figure 52B). TEM analysis corroborated the size and revealed the spherical shape and smooth surface without any aggregation of these NPs (Figure 52C).

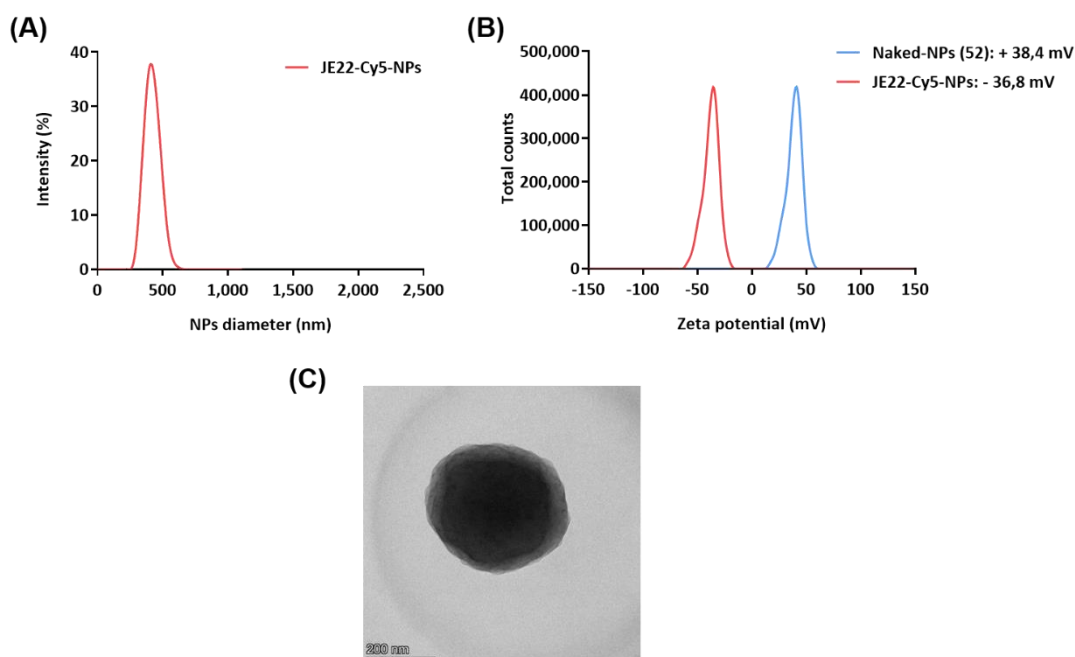


Figure 52. Characterization of **JE22-Cy5-NPs**. (A) Hydrodynamic diameter values by DLS. (B) Zeta potential values. (C) Image of **JE22-Cy5-NPs** obtained by TEM.

3.3.4.3. Efficiency of conjugation of JE22 and Cy5 for JE22-Cy5-NPs

The efficiency of fluorophore conjugation to the NPs was assessed using fluorescence-based techniques. Figure 53A shows a representative dot plot of the flow cytometry analysis showing the increase in APC fluorescence of the **JE22-Cy5-NPs** nanosystem concerning unloaded NPs (**Naked-NPs**, 52). This result was supported by confocal laser microscopy (Figure 53B). Additionally, a calibration curve of Cy5 was performed measuring a set of standard samples by UV spectroscopy (A_{650} nm) (Figure 53C) to calculate the remaining amount of dye in the supernatant of the reaction. The concentration of **JE22-Cy5-NPs** (9.43×10^{11} NPs/mL) was calculated according to the spectrophotometric method described in section 3.3.3.3. In this way, and following the previously described formulas in section 3.3.3.4, CE (98.2%) and LC (1.13×10^7 molecules of Cy5 per NP) parameters were determined. **JE22** loading was also estimated for these NPs, achieving a CE of 100% and LC of 9.45×10^6 molecules of **JE22** per NP (Figure 53D), with similar results to those of **JE22-NPs**.

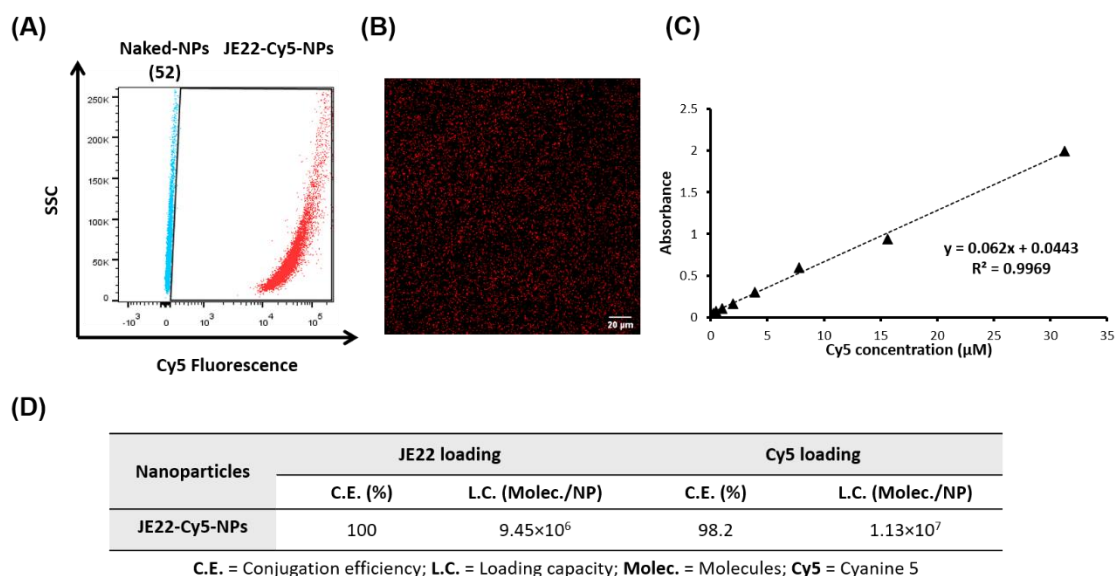


Figure 53. Characterization and evaluation of drug and fluorophore loading of **JE22-Cy5-NPs**. (A) Scatter plot analysis representative of **Naked-NPs (52)** (blue) and **JE22-Cy5-NPs** (red). (B) Confocal laser microscopy analysis (63× magnification, 20 μm scale bar, APC channel). (C) Calibration standard curve of Cy5 obtained by spectrophotometry. (D) Determination of CE and LC of **JE22** and Cy5 per NP.

3.3.5. Evaluation of efficiency of the designed nanodevice JE22-NPs for antitumor activity.

Assessment of biological activity of JE22-NPs

In order to assess the biological activity of this nanodevice to target CD44, in agreement with previous studies,^{252,253} two breast cancer cell lines expressing different levels of CD44 were selected: MDA-MB-231 with a high level and MCF-7 with a low level of CD44 expression, respectively. Analysis of CD44 expression by flow cytometry using an anti-CD44-FITC confirms the suitability of these cell lines for testing CD44 inhibition. Human embryonic kidney-derived non-cancerous cells (HEK-293) without CD44 expression were used as negative control (Figure 54).

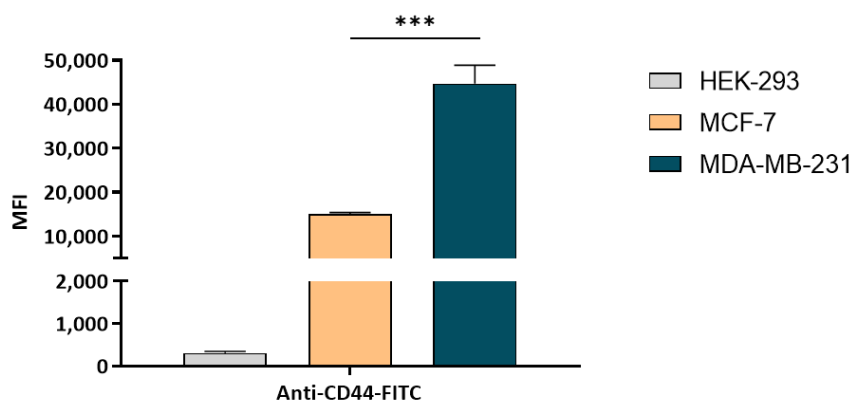


Figure 54. Flow cytometry analysis of the expression of CD44 in MDA-MB-231 and MCF-7 cells. Representative bar graph comparing the MFI of cancer cell lines after incubation with anti-CD44-FITC. HEK-293 cell line was used as negative control. Error bars: \pm SD from $n = 3$; *** $p < 0.001$ (ANOVA).

The EC_{50} of this therapeutic nanodevice **JE22-NPs** in MDA-MB-231 cells was determined. For this purpose, cell viability was monitored using fluorescent resazurin assay. EC_{50} values were calculated from the generated 10-point semilog dose-response curves (Figure 55). Initially, MDA-MB-231 cells were treated for 120 h with increasing concentrations of **JE22** in solution (0.001 to 100 μ M) to determine the range of doses of inhibitor required to achieve the antiproliferative activity. Free **JE22** has an EC_{50} value of 8 μ M in MDA-MB-231 cells (Figure 55A). Then, a range of different concentrations of **JE22-NPs** (312-40,000 NPs/cells, that corresponds to 0.6-72 nM) were incubated for 120 h with MDA-MB-231 cells. The EC_{50} value for therapeutic NPs (**JE22-NPs**) was calculated to be 49 nM (Figure 55C), which corresponds to 27,367 NPs/cell (Figure 55D). This value indicated that the nanosystem offers a 150-fold reduction of the amount of **JE22** required to have the same effect than the free form has in tumor cells overexpressing CD44.

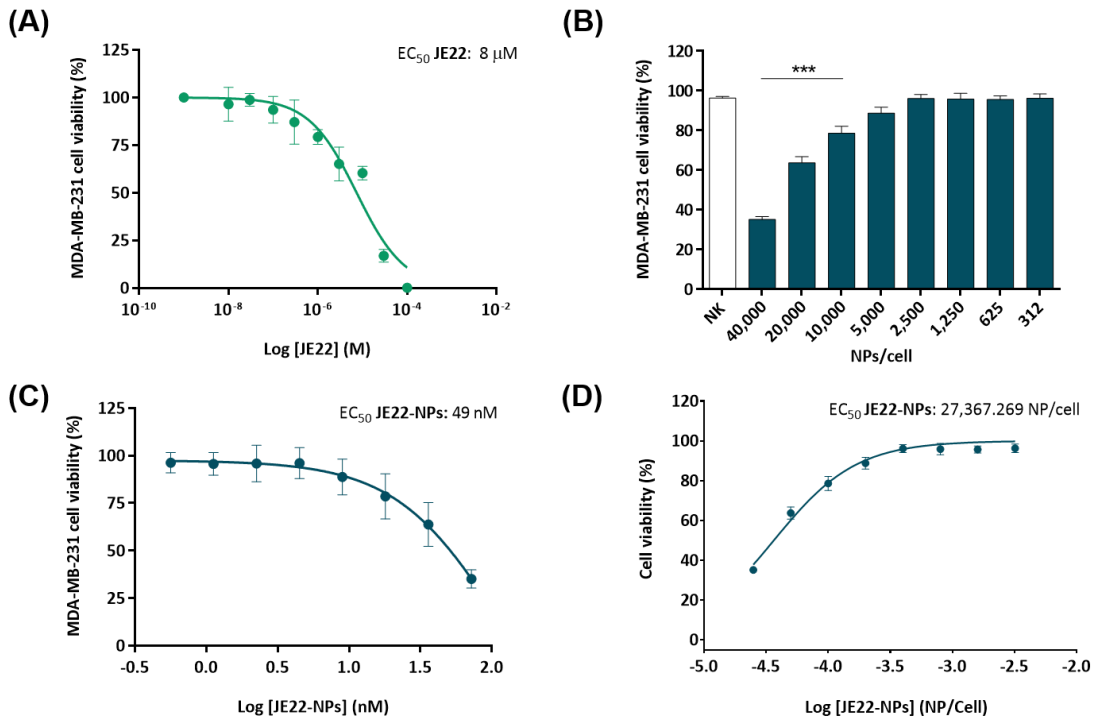


Figure 55. Evaluation of cell viability of the designed nanodevice **JE22-NPs**. **(A)** Dose–response curves for **JE22** against MDA-MB-231 cells after 5 days of treatment. Error bars: ±SD from $n = 3$. **(B)** Bar graph showing the effect of **JE22-NPs** on cell viability of MDA-MB-231 cell line. A standard range of added NPs per cell (NPs/cell) to evaluate cell viability was used (from 312 to 40,000). Calculation of the NPs/cell was based on the number of NPs per volume (Figure 48). **Naked-NPs (52)** (NK) were used as control. Data represent the mean ±SD of three independent experiments; *** $p < 0.001$ (ANOVA). **(C, D)** Dose-response curve (percentage of cell viability versus concentration) of MDA-MB-231 cells after treatment with **JE22-NPs**, represented in molarity (nM) **(C)** and in NPs/cell **(D)**. EC₅₀ value was obtained by the logarithm *versus* normalized response: variable slope using the GraphPad software.

In addition, treatment of CD44 low-expression MCF-7 cells with **JE22-NPs** show no significant reduction of cell viability (Figure 56), reinforcing the selective effect of the nanodevice against CD44.

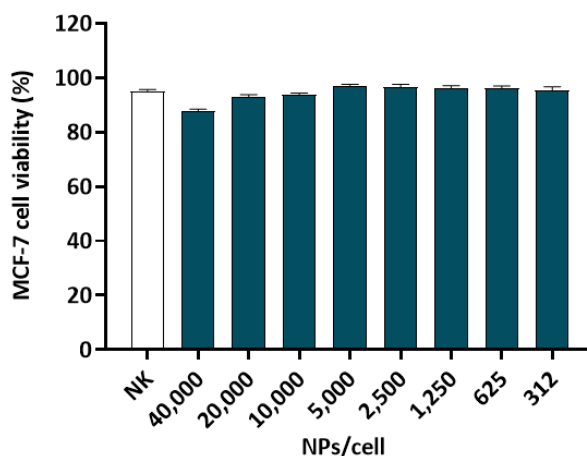


Figure 56. Bar graph showing the effect of **JE22-NPs** on cell viability of MCF-7 cell line. A range of NPs from 312 to 40,000 was tested. **Naked-NPs (52)** (NK) were used as control. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments.

To further verify the selectivity of the nanodevice targeting the CD44 receptor in the MDA-MB-231 cancer cell line, a competitive binding experiment was performed. Cells were preincubated with the anti-CD44 antibody before treatment with **JE22-NPs**, showing a significant decrease of the antiproliferative effect respect to cells without pretreatment (Figure 57). These results showed that pretreating cells with the antibody effectively blocked CD44 cell-binding sites, preventing the recognition of epitopes from the nanodevices, showing that therapeutic effect of **JE22-NPs** is linked to CD44 recognition.

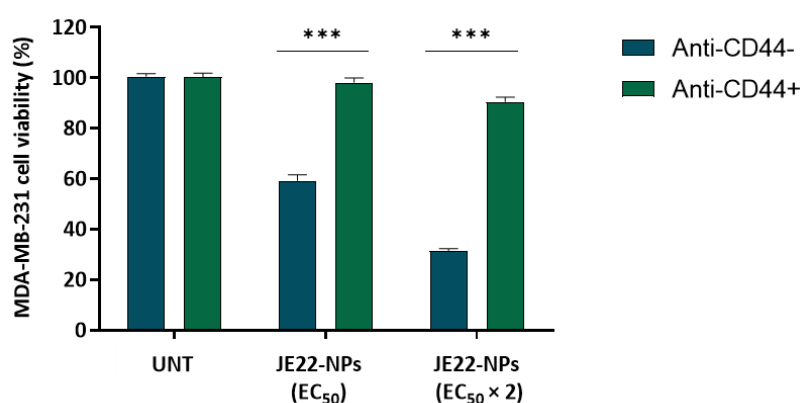


Figure 57. MDA-MB-231 cell viability after treatment with **JE22-NPs** (EC₅₀ and EC₅₀ × 2) preincubated with anti-CD44 antibody (Anti-CD44+, 2.5 μ M, 40 min). Untreated cells (UNT) and cells treated with **JE22-NPs** without preincubation with anti-CD44 antibody (Anti-CD44-) were used as controls. Error bars: \pm SD from $n = 3$; *** $p < 0.001$ (ANOVA).

Based on the fact that tumor tissues are characterized by an acidic extracellular pH as a result of the altered cancer cell metabolism compared to normal tissues, a chemical strategy was applied to

achieve the release of the drug from the nanodevice in acidic conditions. To mimic the acidic tumor microenvironment, bicarbonate-free DMEM buffered with 10 mM of piperazine-*N,N'*-bis(2-ethanesulfonic acid) (PIPES) was used to fix a slightly more acidic external medium. First, it was tested whether cell viability could be affected after the incubation of MDA-MB-231 cells with pH = 5 DMEM media. After 1.5 h of incubation, no signs of cell death were observed, although a significant reduction of cell viability was obtained after 3 and 6 h of incubation (Figure 58A). In order to test the effect of this selective release in the antiproliferative effect, a comparative experiment was performed incubating the cells in standard conditions (DMEM medium, pH = 7.4) and in the presence of DMEM buffered with PIPES to guarantee a slightly more acidic external medium (pH = 5). The results indicate that cytotoxic activities have pH dependence. Remarkably, **JE22-NPs** showed to be more cytotoxic at acidic extracellular pH = 5 following only 1.5 h of incubation compared to under conventional conditions (pH = 7.4) for 5 days (Figure 58B). This result is in agreement with the maximum peak of release of compound by HPLC analysis. A sustained drug release under physiological conditions can occur due to the acidification of culture media overtime.²⁷⁰ As expected, the pH does not have any significant effect in cell viability when cells are treated with **Naked-NPs (52)**. These results suggest that specific release in acidic conditions is crucial for the therapeutic activity of this compound.

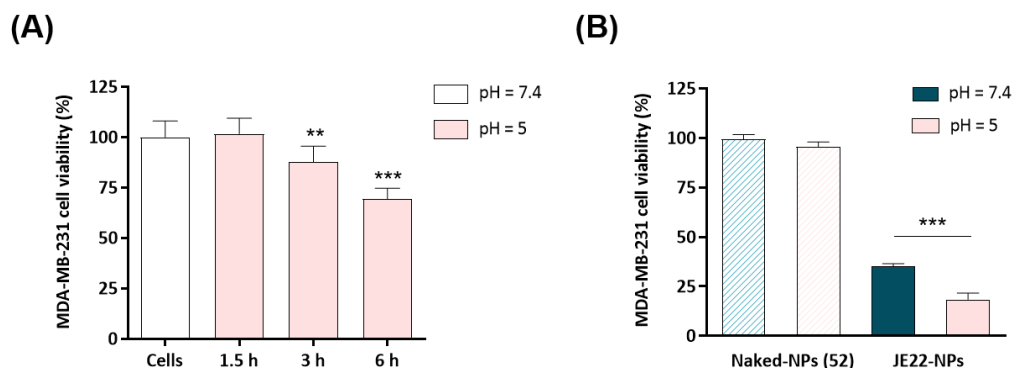


Figure 58. Evaluation of cell viability of the designed nanodevice **JE22-NPs** under acidic conditions. **(A)** Viability of MDA-MB-231 cells incubated for 1.5, 3 and 6 h with DMEM media at pH = 5. Error bars: \pm SD from $n = 3$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ (ANOVA). **(B)** Therapeutic effect representation by bar graph of **JE22-NPs** at pH = 7.4 versus cell viability at pH = 5. Cell viability was tested after 5 days. **Naked-NPs (52)** were used as control. The experiments were carried out in triplicate, and the results are expressed with the values of the mean \pm SD; *** $p < 0.001$ (ANOVA).

Finally, the cytotoxic effect of this nanodevice for non-cancerous cells was evaluated. Non-cancerous cell line HEK-293 has been used to analyze the cell viability of **JE22-NPs**. No sign of death was observed after treatment of the normal cells with the nanodevice (Figure 59).

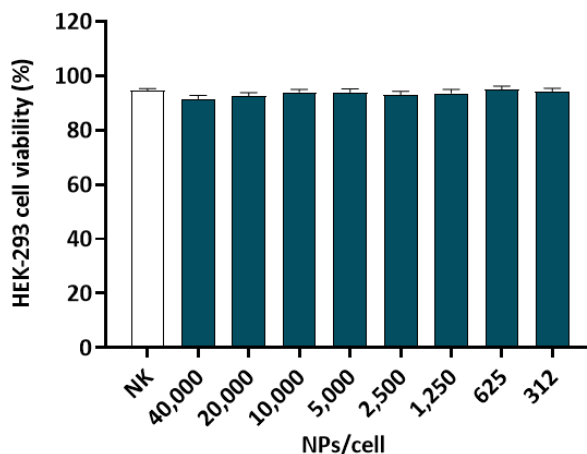


Figure 59. Bar graph showing the effect of **JE22-NPs** on cell viability of HEK-293 cell line. A range of NPs from 312 to 40,000 was tested. **Naked-NPs (52)** (NK) were used as control. Data represent the mean \pm SD of three independent experiments.

Overall, the NPs were toxic to CD44+ cells and non-toxic to CD44- and non-cancerous cells.

3.3.6. Evaluation of efficiency of the designed nanodevice for the inhibition of CD44 receptor binding

3.3.6.1. Analysis of the interaction of the designed nanodevice JE22-NPs with CD44+ cells by confocal microscopy

A confocal microscopy approach was carried out to study the location of the NPs loaded with **JE22** on the surface of the CD44+ cells. MDA-MB-231 cells were immunolabeled with a fluorescently tagged primary anti-CD44 antibody (anti-CD44-FITC).²⁷¹ Then, cells were treated with **JE22-NPs** labelled with fluorophore Cy5 (**JE22-Cy5-NPs**) to track them by fluorescence microscopy. It can be observed that the extracellular location of the **JE22-Cy5-NPs** is on the cellular surface where CD44 receptor is expressed (Figure 60).

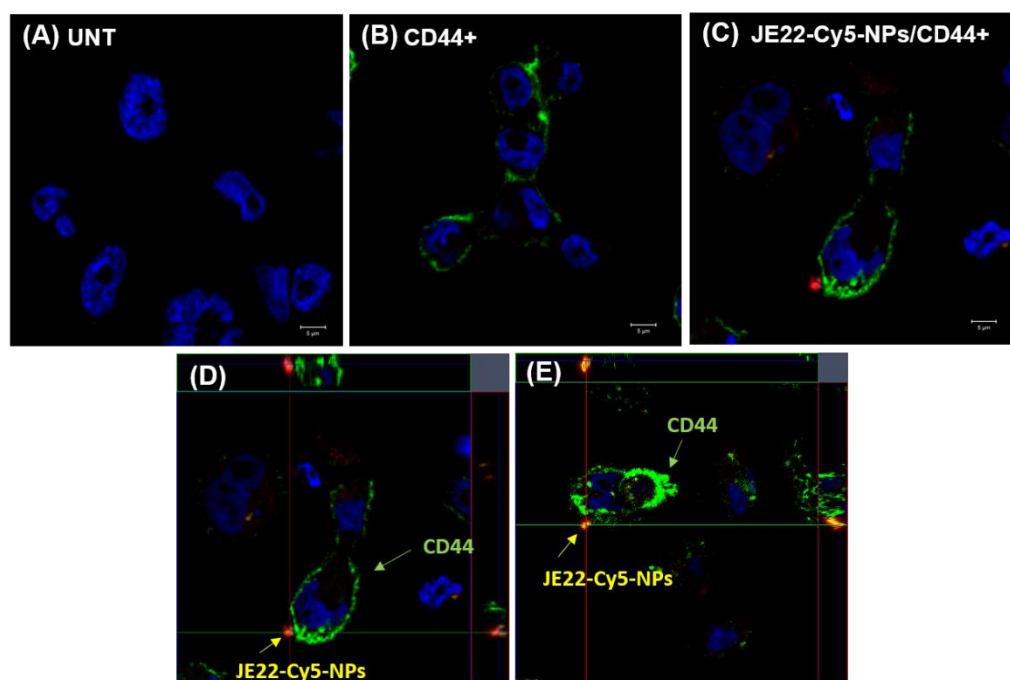


Figure 60. Confocal microscopy analysis of MDA-MB-231 (CD44+) cells treated with **JE22-Cy5-NPs**. CD44-labeled cells treated with **JE22-Cy5-NPs** fluorescently labeled with Cy5 were analyzed (C) (Scale bar: 5 μ m). The cells were incubated for 30 min with 1,000 NPs/cell. Untreated cells (A) and cells labelled with anti-CD44-FITC (B) were used as controls (Scale bar: 5 μ m). Images with an increase of 63 \times show a composition of the three channels used: blue, DAPI for the nucleus; green, FITC for anti-human CD44; and red, APC for **JE22-Cy5-NPs**. (D, E) Confocal microscopy orthogonal (xy, xz, and yz) view representing the planes of intersection at the position of green cross line. The maximum intensity projection of the z-stack is shown blue for nuclei (DAPI), green for anti-human CD44 (FITC), and red for **JE22-Cy5-NPs** (APC).

3.3.6.2. Assessment of CD44-binding capacity

To assess the CD44-binding capacity of the THIQ derivative **JE22** in solution and conjugated to the nanodevice, a competitive binding assay was performed using a fluorescent-labeled derivative of HA as natural ligand of CD44 (HA-FITC), which has high capacity of binding the CD44 receptor. For this purpose, a previously reported method was followed with slight modifications.²⁵⁶ Briefly, cells overexpressing CD44, MDA-MB-231 cells, were pre-incubated with **JE22** and **JE22-NPs** at 4 $^{\circ}$ C, and physiological pH for 30 min to allow for their binding to CD44 receptor on the cell surface. Then, cells were incubated with HA-FITC at 4 $^{\circ}$ C for 15 min, and fluorescence analyzed by flow cytometry. Anti-CD44 antibody was used as positive control. Cells incubated with unlabeled HA were used as negative control. As observed in Figure 61, pre-incubation with **JE22** displaced HA-FITC binding, yielding a statistically significant reduction of the fluorescence intensity (1.3-fold reduction) compared to the cells incubated with HA-FITC and cells pretreated with anti-CD44 monoclonal antibody (2.20-fold reduction). It is remarkably the fact that, as expected, when cells were pretreated with the designed nanodevice **JE22-NPs**, no significant displacement was observed. This

result reinforces the initial hypothesis that brought to the design of a pH-sensitive strategy to release the CD44 inhibitor from the nanodevice at the acidic tumor microenvironment to enhance the efficient interaction with the CD44 receptor and to significantly reduce HA binding.

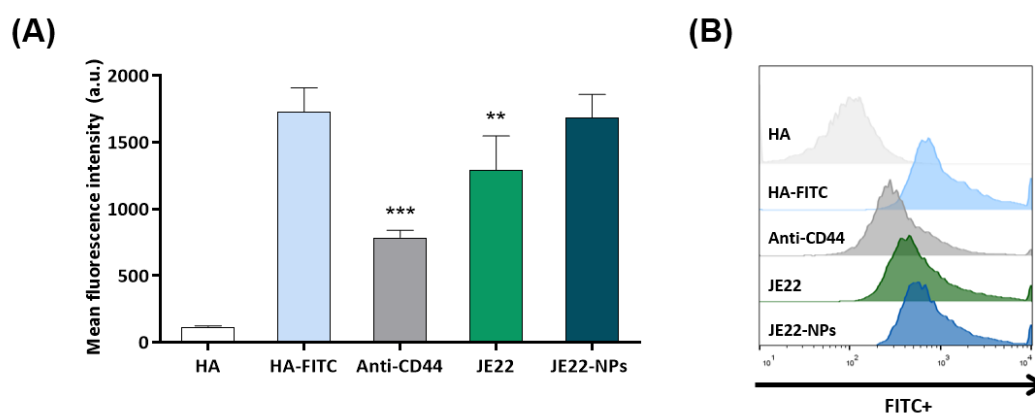


Figure 61. Inhibition of the HA-CD44 interaction by flow cytometry. **(A)** Mean fluorescence of MDA-MB-231 cells analyzed by flow cytometry after treatment for 30 min at 4 °C with **JE22-NPs**, **JE22**, and anti-CD44 followed by incubation with HA-FITC for 15 min at 4 °C. Cells treated with unlabelled HA and HA-FITC were used as the negative and positive control, respectively. Error bars: \pm SD from $n = 3$; $p < 0.01$, **; $p < 0.001$, *** (ANOVA). **(B)** Flow cytometry overlay histograms of HA-FITC competitive assay binding to MDA-MB-231 cells.

3.3.6.3. Influence of JE22-NPs in migration of CD44+ cells

Cell migration participates in numerous physiological and pathological processes. Previous studies have shown that CD44 proteins can stimulate tumor cell proliferation, motility, and invasion.²⁷²

To detect whether this nanodevice can decrease the migration of CD44+ cells and, consequently, modify any mesenchymal behaviour, a scratch-wound healing migration assay was performed to determine whether **JE22-NPs** compared to free **JE22** could halt migration of MDA-MB-231 cells, as would be expected for a CD44 inhibitor.¹⁶⁴ After making the wound, MDA-MB-231 cells were treated with CD44 inhibitor **JE22** free and conjugated to nanodevice **JE22-NPs** for 24 h and compared with untreated cells (0.1% v/v DMSO) and cells treated with the nanodevice without drugs (**Naked-NPs**, **52**), respectively. Cells treated with THIQ derivative **JE22** in solution significantly reduced cell motility; wound closure was reduced to $15.09 \pm 4.90\%$ compared with cells treated with DMSO ($30.21 \pm 6.06\%$). Remarkably, when MDA-MB-231 cells were treated with **JE22** conjugated to the nanodevice **JE22-NPs**, cell migration reduction was significantly higher than with **JE22** in solution ($4.89 \pm 2.77\%$) (Figure 62). The fact that the concentration used in this assay is lower than the EC_{50} (20,000 NPs) (Figure 55B) suggests that the migration effect could be independent of the cytotoxic effect.

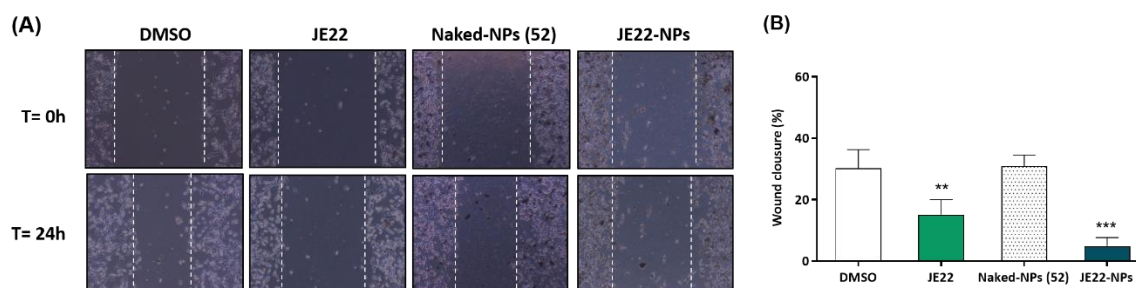


Figure 62. Scratch-wound migration assay. (A) Snapshots of the scratch-wound area of MDA-MB-231 cells treated with DMSO, **JE22**, **Naked-NPs (52)**, and **JE22-NPs** at time zero (top) and after 24 h (bottom). White lines highlight the gap created by the scratch. (B) Bar graph showing the percentage of wound closure of MDA-MB-231 cells after treatment with **JE22** and **JE22-NPs** compared to untreated cell control (DMSO) and cells treated with **Naked-NPs (52)**, respectively. Error bars: \pm SD from $n = 3$; $p < 0.01$, **, $p < 0.001$, *** (ANOVA).

3.3.6.4. Apoptotic activity of JE22-NPs

To rule out that the observed delay in gap closure was caused by **JE22**-induced cell death, cell viability was examined by Annexin V/PI staining after treatment. Annexin V/PI staining is a widely used method to study apoptotic cells. Annexin V/PI significantly regulates the viable, necrotic, and apoptotic cells through differences in plasma membrane permeability and integrity.²⁷³ First, the apoptotic effect of **JE22** was studied against CD44+ MDA-MB-231. Even at four times the EC_{50} concentration of the drug, no crucial apoptotic effect was observed (Figure 63A). These results suggest that apoptosis is not the mechanism by which **JE22** induces cell death. Then, the apoptotic effect of the **Naked-NPs (52)** and **JE22-NPs** was analyzed to check that no apoptotic effect is caused by the nanocarrier itself. As expected, the concentration of nanoparticles **JE22-NPs** that was used in this assay (20,000 NPs) did not induce significant apoptosis or necrosis in either MDA-MB-321 cells (Figure 63A) or MCF-7 (Figure 63B). However, gap closure was inhibited at the same concentration (Figure 62). These results reinforce the fact that the migration effect could be independent of the cytotoxic effect of **JE22-NPs**.²⁷⁴

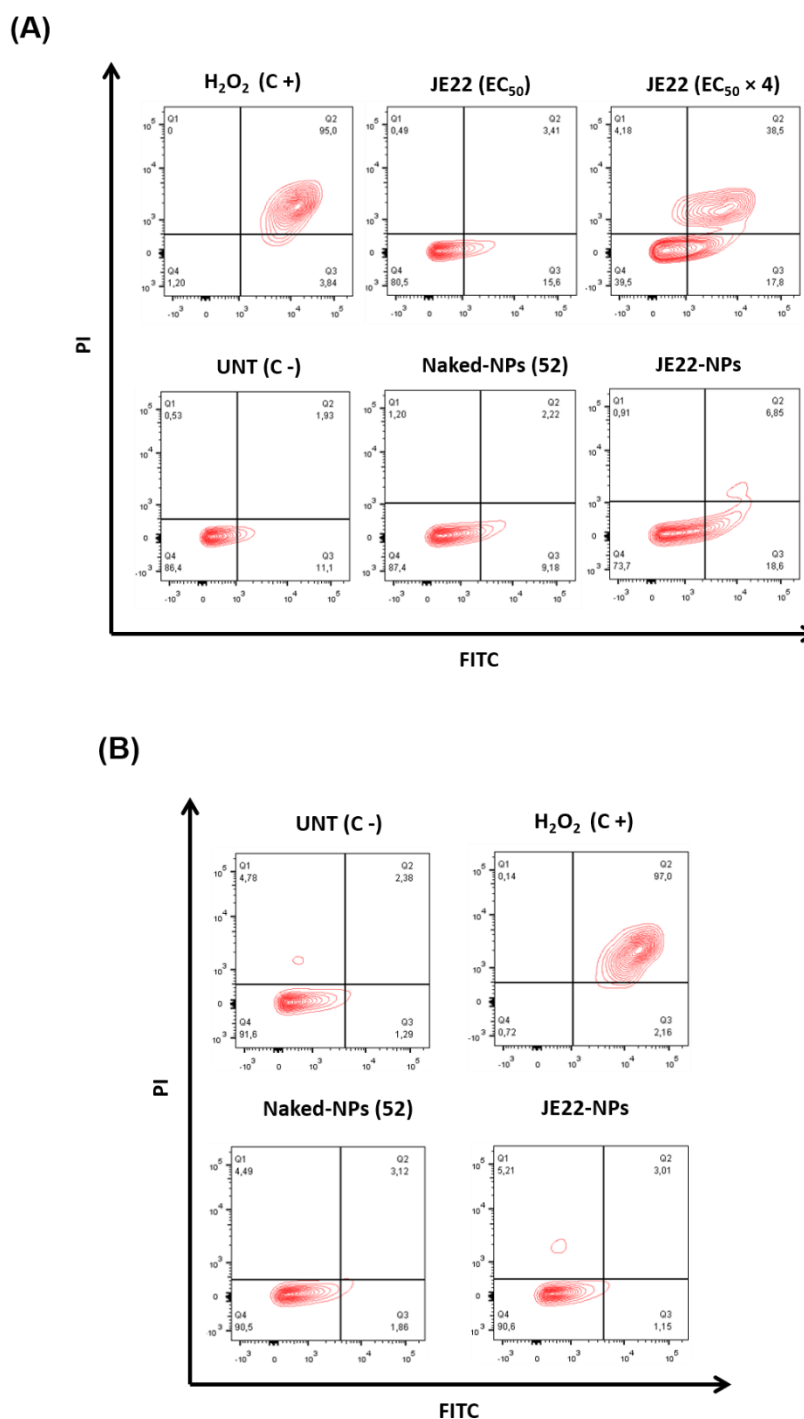


Figure 63. Effect of **JE22** and **JE22-NPs** on MDA-MB-231 apoptosis **(A)** and effect of **JE22-NPs** on MCF-7 cell apoptosis **(B)**. Representative scatter plots of PI (y-axis) versus FITC (x-axis) of cells after treatment with **JE22-NPs** (20,000 NPs/cell), **JE22** (EC_{50} and $4 \times EC_{50}$), and **Naked-NPs (52)** (20,000 NPs/cell) for 24 h. Number of NPs was determined by spectrophotometric analysis (Figure 48). The cells were analyzed after double staining with Annexin V-FITC/PI by flow cytometry. Dot plots of H_2O_2 (2 mM, treatment of 4 h) and untreated cells were represented as the positive and negative control, respectively. Q1-4 quadrants represent necrotic (Annexin V-FITC-, PI+), late (Annexin V-FITC+, PI+), and early (Annexin V-FITC+, PI-) apoptotic and viable (Annexin V-FITC-, PI-) cells, respectively.

3.3.7. In-depth study of the mechanism of action of compound JE22

Given the promising results mentioned above, a series of assays were carried out to further investigate the interaction of **JE22** with CD44-HABD. STD NMR studies were performed. For this purpose, the isolated protein was first obtained. In addition, DMR experiments were developed in MDA-MB-231 cells.

3.3.7.1. Preparation of CD44-HABD

This section was developed at the Institute for Biocomputation and Physics of Complex Systems (BIFI) of the University of Zaragoza as part of a research training stay in collaboration with the research group of Prof. Hurtado.

3.3.7.1.1. Heterologous production of CD44-HABD in bacterial cells

The human (*Hs*) and mouse (*Mm*) CD44-HABD amino acid sequences that have been used in this project are shown in Table 6.

Table 6. Amino acid sequences of *Hs*CD44 and *Mm*CD44 constructs.^{111,165}

Construct	Amino acid sequence
<i>Hs</i>CD44 (20-175)	AQIDLNITCRFAGVFHVEKNGRYSISRTEAADLCKAFNST LPTMAQMEKALSIGFETCRYGFIEGHVVIPRIHPNSICAA NNTGVYILTSNTSQYDTYCFNASAPPEEDCTSVTDLPNA FDGPITITIVNRDGTRYVQKGEYRTNPEDIYPSNPT
<i>Mm</i>CD44 (25-174)	QIDLNVTCRYAGVFHVEKNGRYSISRTEAADLCQAFNST LPTMDQMKLALSKGFETCRYGFIEGNVVIPRIHPNAICA ANHTGVYILVTSNTSHYDTYCFNASAPPEEDCTSVTDLP NSFDGPVTITIVNRDGTRYSKKGEYRTHQEDIDAS

A technique for protein expression in *Escherichia coli* (*E. coli*) periplasm, which is widely used in the host laboratory, was performed. pHEN6c-*Hs*CD44-His (20-175) and pHEN6c-*Mm*CD44-His (25-174) plasmids were used to facilitate the export of the protein to the periplasm which provides for large amounts of soluble and folded protein. *E. coli* strain W6K was used due to its larger periplasm allows to increase the amount of protein in this compartment. Expression tests of the constructs were made in this strain and no expression was observed after analyzing the results of polyacrylamide gels stained with coomassie blue.

As the periplasmic expression of the protein did not produce the desired level of expression, previously described protocols using inclusion bodies were implemented, which allow for the extraction of the protein in an insoluble and unfolded form.^{111,165} Three new constructions were

created for this purpose: pET15b-His-PP-*Hs*CD44 (20-175), pET15b-His-PP-*Mm*CD44 (25-174) and pET30a-His-PP-*Hs*CD44 (20-175). Expression tests of these constructs were performed by varying some parameters such as induction temperature, induction time and isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) concentration in the *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (general strain) and Rosetta (DE3) pLysS (strain for the expression of sensitive proteins and more difficult to express) strains. Based on the data collected, it was concluded that the amount of protein expressed was not sufficient to carry out the purification process and further steps.

Since an overexpression of protein was not observed in inclusion bodies either, a final attempt was made to obtain sufficient protein expression in prokaryotic cells. A new construct (pMALP2x-His-PP-*Hs*CD44 (20-175)) containing CD44-HABD fused to the maltose-binding protein (MBP) fusion protein was used in order to obtain the soluble protein in the cytoplasm of *E. coli*. In this case, the BL21 Gold strain of *E. coli* was used. This construct seemed to work but when cleaving the MBP from CD44-HABD, the yield was very low and therefore very little native protein could be obtained, insufficient for subsequent assays. Further optimization is therefore required to overcome the limitation of this low level of expression, which poses a challenge in proceeding with the experiment.

3.3.7.1.2. Production and isolation of CD44-HABD from mammalian cells

As several constructs were tested in *E. coli* and none were positive, it was decided to use a more complex expression system that involves the use of mammalian cells. Although the mammalian cell expression system has some drawbacks, such as being a slower and more expensive process compared to the bacterial cell expression system, it makes it possible to obtain proteins with a greater degree of similarity to their native form.²⁷⁵ This method allows the expression of proteins with complex posttranslational modifications or with several disulfide bonds,²⁷⁵ as is the case of CD44-HABD. Furthermore, an important advantage over the inclusion bodies-bacterial expression system is that the proteins obtained from mammalian cells do not need to undergo refolding.

For this process based on the use of eukaryotic cells, HEK293F cells were used together with the pHLSec-12Hist-GFP-TEV-*Hs*CD44 (20-175) plasmid (Figure 64A).

Due to the fact that CD44-HABD was fused to a GFP (that increases the solubility of the protein) and a histidine tag (required for purification by nickel affinity chromatography), it was needed to use the tobacco etch virus (TEV) protease to cleavage and isolate CD44-HABD from the rest of the construct (see **Materials and Methods**, section 4.4.4).

Following this methodology, it was possible to successfully express, purify and obtain the soluble protein in its native state (glycosylated) and in a pure enough form to be used in further

experiments. The glycosylated protein was obtained, which is the closest form to that found in humans (Figure 64B).

It is important to highlight that as far we know this is the first time that human CD44-HABD has been obtained in mammalian cells, previously it had only been produced in bacterial cells. This represents a great advance for the better understanding of the protein in its most similar form to that existing in humans.

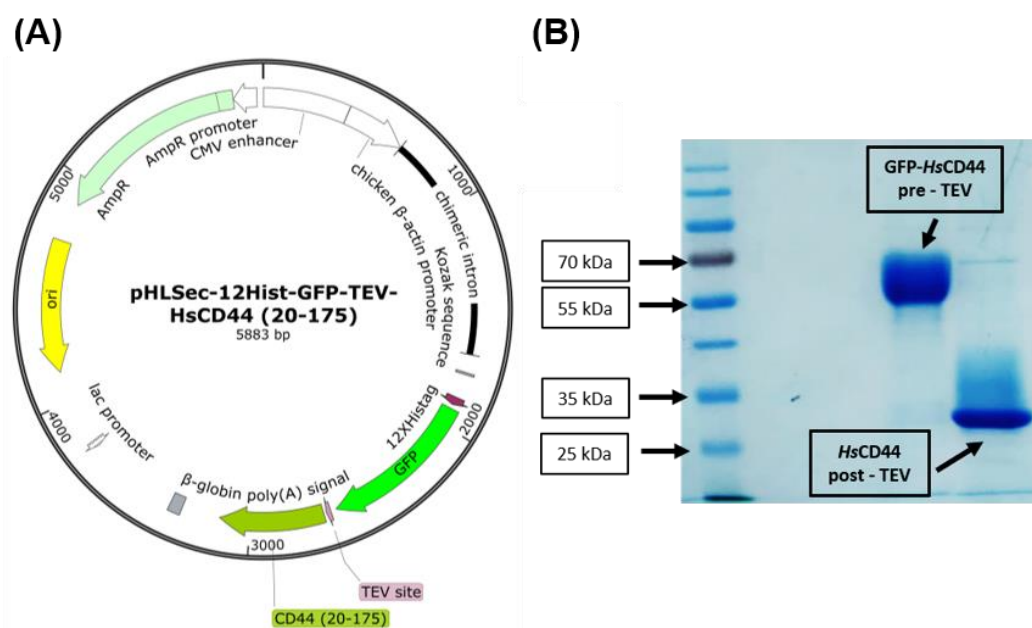


Figure 64. (A) Plasmid encoding for the Hist-GFP-TEV-HsCD44 (20-175) construct. (B) Polyacrylamide gel showing HsCD44-HABD before and after cleavage by TEV protease.

3.3.7.2. STD NMR spectroscopy studies

This analysis was performed in collaboration with the research group of Prof. Angulo at the Chemical Research Institute (CSIC-University of Sevilla).

3.3.7.2.1. General considerations

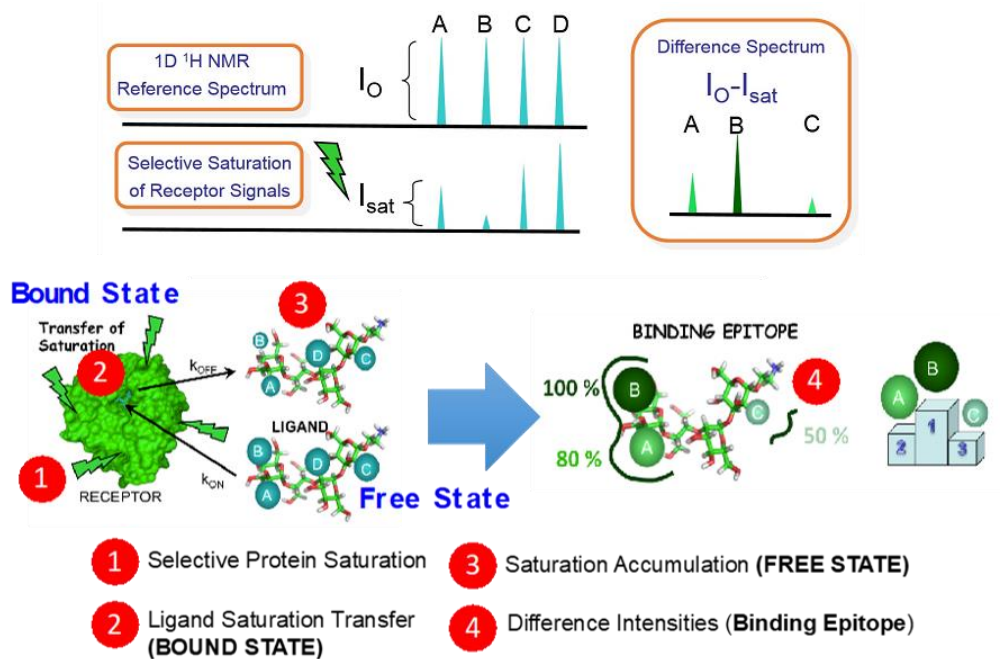
Among all the existing ligand-observed NMR techniques for screening of biological targets with collections of small molecules, STD NMR spectroscopy is one of the most robust methodologies, optimum for detection of weak/medium affinity protein-ligand complexes in solution. Compared to other NMR techniques, one of the main advantages of STD NMR is the possibility of gaining quantitative data to produce 3D molecular models of the complexes.^{276,277}

In its simplest implementation, via 1D ¹H-NMR spectroscopy, a perturbation (saturation) is selectively produced on the protein NMR signals which is eventually transferred to those ligand hydrogens in close contact with the protein, due to the spatial proximity of ligand and protein

protons in the bound state, efficiently transferring the saturation from the protein to the ligand protons. The ligand signals are then reduced in intensity in the spectrum, and subtraction from a reference 1D spectrum (without saturation) leads to difference signals (Figure 65).²⁷⁷

Ligand protons that are in close contact with the receptor protein receive a higher degree of saturation, and as a result stronger STD NMR signals can be observed. Protons that are either less or not involved in the binding process reveal no STD NMR signals.²⁷⁷

Signals in the STD NMR spectrum hence indicates binding, making these experiments very useful in screening of ligands from mixtures of compounds for a given protein target. STD NMR spectroscopy is highly appropriate to study weak/medium protein-ligand interactions as it relies on an efficient transfer of the saturation by the ligand from the bound to the free state, in a process that is optimum when the chemical exchange between both states is fast in the relaxation time scale (i.e. weak affinity) (Figure 65).²⁷⁷



Intensities in the difference spectrum reflect **proximity to the protein surface** in the bound state (hot spots or “**binding epitope mapping**”)

Figure 65. Schematic representation of the STD NMR experiment. Adapted from ref. 277.

STD NMR is in fact one of the favorite techniques for screening of protein ligands by ¹H-NMR spectroscopy, particularly at the first stages of drug development when only fragments with weak/medium affinity have been identified.²⁷⁷

From the point of view of structural analysis, besides a screening tool, STD NMR can also provide information about the binding mode of the ligands. The intensities observed in the difference

spectrum indeed report on proximity of the ligand protons to the protein in the bound state. Quantification of the intensities allows us to identify the structural requirements (i.e. areas of close contacts with the surface of the protein in the bound state) of the ligand for contacting the receptor (the so-called group epitope mapping, GEM).^{277,278}

In this way, STD NMR is typically used to validate 3D structures of complexes, by verifying the agreement of generated 3D models (e.g. from docking calculations) with the experimental data,²⁷⁹ either qualitatively (agreement with the pattern of STD signals), or quantitatively (back-calculations of theoretical STD intensities from the 3D model by CORCEMA-ST).²⁸⁰

3.3.7.2.2. STD NMR spectroscopy applied to CD44-HABD and JE22

The interaction of **JE22** with the glycosylated CD44-HABD has been studied through STD NMR spectroscopy by Jonathan Ramírez Cárdenas.

Preliminary results are very encouraging, and show that this small molecule interacts with CD44-HABD (Figure 66). **JE22** makes closer spatial contact with the CD44-HABD in the amine nitrogen region, with the aromatic part appearing to have less contact with the protein surface in the bound state. It can be postulated that this aromatic part of the ligand must be more exposed to the solvent, while the opposite side is more internalized in the binding pocket.

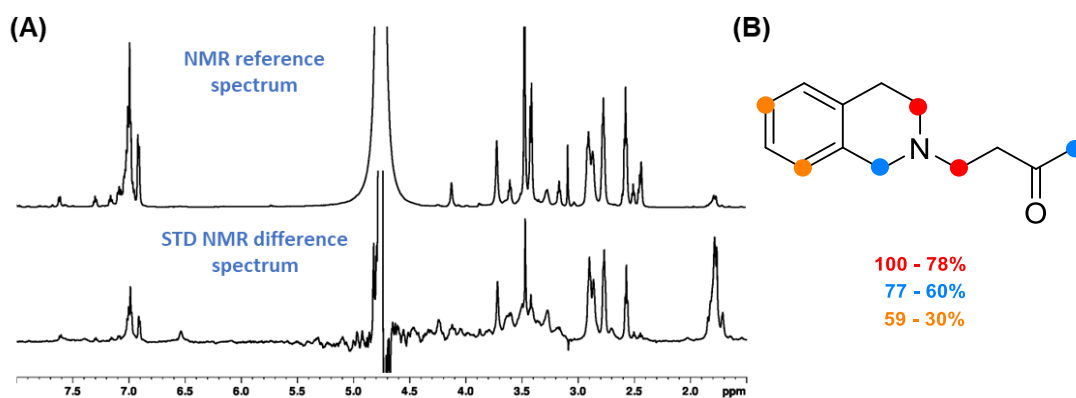


Figure 66. Binding of **JE22** to glycosylated CD44 in solution as detected by STD NMR. (A) Top: 1D ^1H -NMR reference spectrum; bottom: 1D STD NMR difference spectrum at 1s saturation time. Small residual STD signals in the region centered at 3.5 parts per million (ppm) arise from the glycans attached to the protein. (B) STD NMR binding epitope mapping.

Further experiments will be carried out to determine whether **JE22** competes with HA for the binding to CD44 using this technique.

3.3.7.3. DMR studies

This section was developed at the Department of Neuroscience and Rehabilitation, section of Pharmacology of the University of Ferrara as part of the international training research stay in the research group of Prof. Ruzza.

3.3.7.3.1. General considerations

DMR assay is a label free assay that provides a holistic view of cellular responses after receptor activation. It uses an optical biosensor to detect cellular changes after stimulation. This biosensor, also called resonant waveguide grating, is a grating structure embedded in the bottom of a plate, where adherent cells are directly cultured. When illuminated with broadband light, these grating surfaces reflect a narrow band of light that depends by the OD of the zone (150 nm, DMR detecting zone) above the sensor. DMR is measured as picometers (pm) shift of the outgoing occurring wavelengths. This technique allows the measurement of the entire spectrum of cellular responses leading to a 'dynamic mass redistribution' within 150 nm from the adherent cellular surface. Mass movements toward the sensor induce positive wavelength shifts (p-DMR), whereas movements away from the surface cause negative shifts of the reflected wavelength (n-DMR) at the bottom of the biosensor (Figure 67).^{281,282}

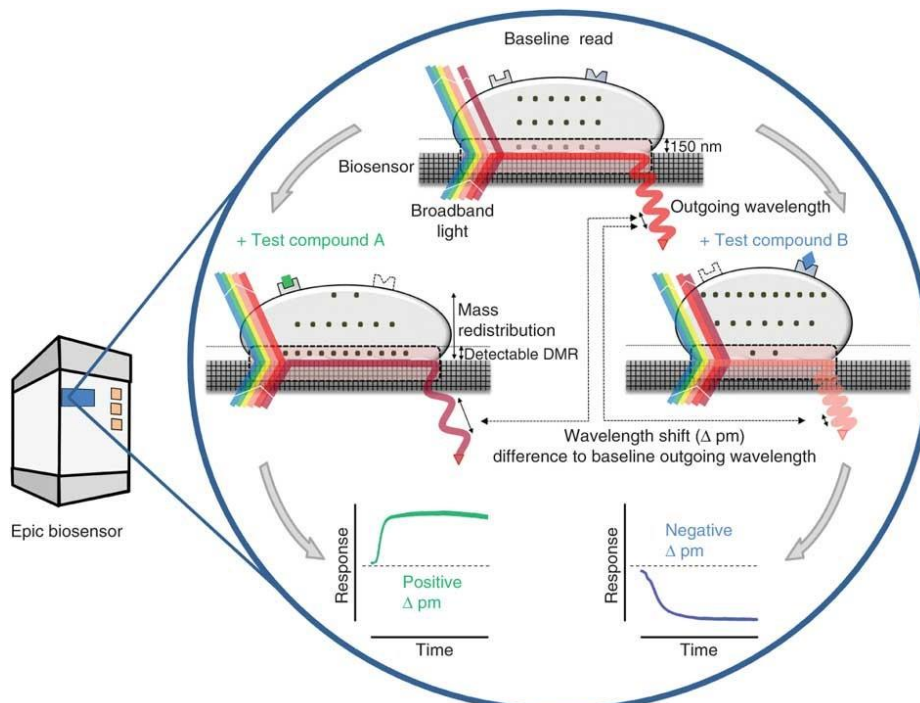


Figure 67. DMR detection technology. The DMR signal is detected by passing broadband polarized light through a biosensor and then recording a change in the wavelength of the outgoing light depending on the OD of the cell mass on the biosensor. This information is transformed into a cumulative response (Δpm) over time that reflects the set of processes occurring in living cells.²⁸¹

Importantly, compared to binding experiments and classical assays used to test ligands, the DMR technology offers the following advantages: i) it is a functional assay that provides a comprehensive view of all the intracellular events that take place when different biomolecules change their location in a cell and/or a change of cell shape occurs after the receptor activation; ii) it allows real-time monitoring of the action of ligands on cells; iii) it is a non-invasive and label free assay, thus cells are naïve and no artificial labels are needed; iv) it is enough sensitive to be used with several cells from primary cultures; and v) it is characterized by high reproducibility and it can be performed in 384 wells plate, thus suitable for the screening of several compounds.^{281,282}

This assay is routinely used in Prof. Ruzza laboratories for pharmacological studies of new ligands targeting several G protein couple receptors such as opioid or histamine receptors.²⁸³⁻²⁸⁵

This innovative cellular assay used in the *in vitro* pharmacological characterization of ligands has not previously used to study CD44 and thus, it could become a new tool for the scientific community to study CD44 inhibitors.

3.3.7.3.2. Validation of the DMR assay for the *in vitro* characterization of standard and novel CD44 ligands

The label free DMR assay was applied to the study of **JE22** in the human breast cancer cell line MDA-MB-231. HA was used as endogenous CD44 ligand and etoposide as a positive control for CD44 inhibition.

LMW-HA concentration response curve (CRC). To set up a functional assay to study CD44 antagonist, some efforts were first made to establish the method using standard CD44 agonists: HMW-HA (875 kDa) and LMW-HA (50 kDa).

Based on several pilot experiments in which different experimental conditions (different plate coatings and HAs) were tested, the following conclusions were reached:

- Fibronectin coating on culture surfaces allowed to improve attachment, spreading and proliferation of this cell line respect poly-D-lysine coating or no coating.
- LMW-HA was selected as the standard agonist at a concentration of 2,500 µg/mL. HMW-HA was discarded mainly due to solubility problems.
- Due to the variability of the first results, probably as a consequence of the loss of the receptor over time, we decided to work by thawing cells every week from a new batch.

In MDA-MB-231 cells, LMW-HA was able to evoke a concentration dependent DMR response at the concentrations tested. Anyway, the CRC could not be completed and potency was not calculated

(Figure 68). These results indicate that LMW-HA evoked a DMR signal through the activation of the CD44 receptor. Further experiments will be carried out on a CD44- cell line to corroborate this outcome.

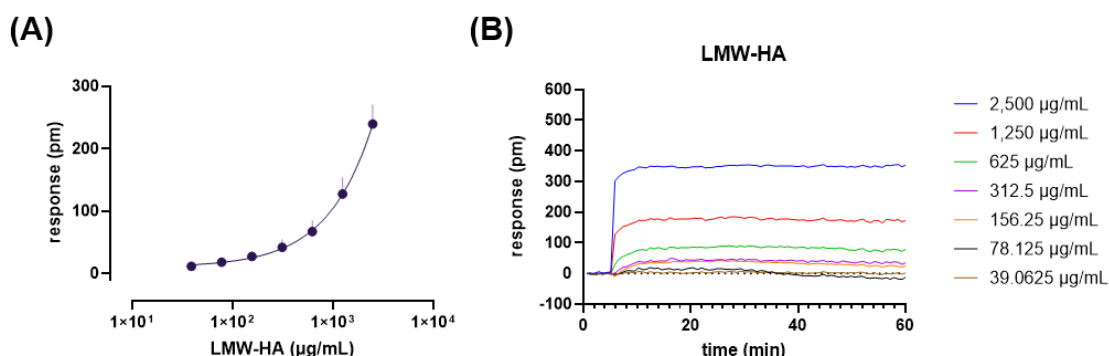


Figure 68. DMR assay in MDA-MB-231 cells, CRC to LMW-HA. Sigmoidal curve of LMW-HA is displayed in (A), while representative raw DMR tracings are shown in (B). Data are the mean \pm SEM of at least three experiments performed in duplicate.

CD44 ligands, agonism experiments. In a first series of experiments, the putative CD44 ligands etoposide and **JE22** were tested in agonism experiments to determine whether they showed DMR signal *per se*, in the absence of HA. Etoposide and **JE22** produced a low DMR response only at the higher concentration tested (1 mM) (Figure 69). These assays made it possible to select a suitable concentration for the subsequent antagonism experiments.

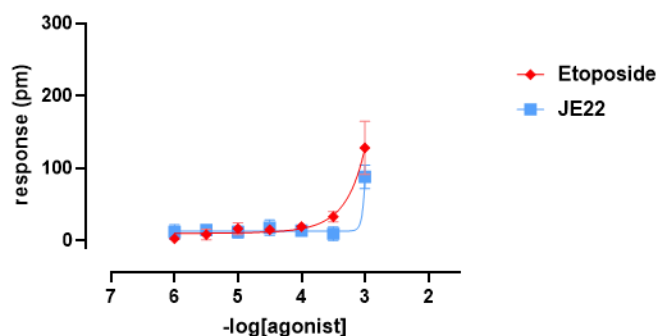


Figure 69. DMR assay in MDA-MB-231 cells, CRCs to etoposide and **JE22**. Data are the mean \pm SEM of three experiments performed in duplicate.

CD44 ligands, antagonism experiments. Finally, antagonism experiments were performed using a fixed compound concentration of 100 μM . This concentration has been chosen, basing on agonism experiments, as the first concentration at which all the compounds were inactive *per se*. In these experiments the CRC to LMW-HA has been carried out in the absence and in the presence of CD44 ligands. A tendency to reduce LMW-HA signal has been recorded with etoposide and, partially with **JE22** under the present experimental conditions (Figure 70).

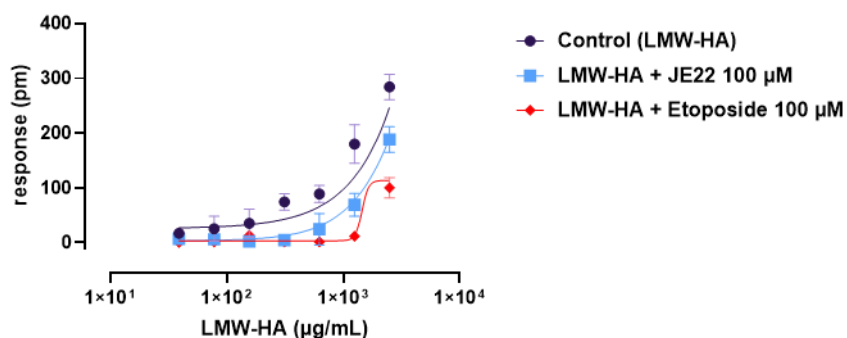


Figure 70. DMR assay in MDA-MB-231 cells, CRCs to LMW-HA in the absence and in the presence of 100 µM etoposide and **JE22**. Etoposide was used as a control. Data are the mean \pm SEM of three experiments performed in duplicate.

The present study allows us to record a DMR signal produced by LMW-HA in MDA-MB-231 cells. Under the same experimental conditions, compounds etoposide and **JE22** produced a weak DMR response at 1 mM. In antagonism experiment while etoposide was able to counteract LMW-HA signal, **JE22** showed modest activity under the present experimental conditions.

These are preliminary results and further studies are needed to fully pharmacologically characterize these CD44 ligands.

Additionally, some important limitations should be taken into account in considering these results:

- 1) The selectivity of LMW-HA, **JE22** and etoposide for the CD44 receptor has not been demonstrated. The DMR response evoked by LMW-HA could be due also to the activation of targets different from CD44.
- 2) The DMR signal produced by LMW-HA in MDA-MB-231 cells were not robust and reproducible across the different experiments. This fact may be due to the variability of CD44 receptor expression as cell passages are performed.

In summary, these results are very encouraging then it is important to perform further experiments to validate the results and to establish the specificity of the interaction between **JE22** and CD44 receptor.

4. Materials and methods

4.1. General

All chemical reagents were supplied by Sigma-Aldrich, Thermo Fisher Scientific, VWR International Ltd and Fluorochem. Gibco (Thermo Fisher Scientific) was the supplier for the biological products including fetal bovine serum (FBS), trypsin-EDTA, DMEM, 1% penicillin/streptomycin, and L-glutamine. Unlabelled HA (50 KDa) and HA-FITC (50 KDa) were purchased from HAWorks LLC. Anti-CD44-FITC and CD44 monoclonal antibodies (MA5-15462, 8E2F3) were purchased from Miltenyi Biotec and Invitrogen, respectively.

4.1.1. Chemistry

Analytical thin layer chromatography (TLC) was performed using Merck Kieselgel 60 F₂₅₄ aluminium plates and visualized by UV light (254 nm). Evaporation was carried out *in vacuo* in a Büchi rotary evaporator, and the pressure controlled by a Vacuubrand CVCII apparatus. Purifications were carried out through preparative layer chromatography or by flash column chromatography using silica gel 60 with a particle size of 0.040-0.063 mm (230-440 mesh ASTM). Melting points were taken in open capillaries on a Stuart Scientific SMP3 electrothermal melting point apparatus and are uncorrected.

NMR spectra were recorded on 400/500 MHz ¹H and 100/126 MHz ¹³C NMR with a Varian Direct Drive or BRUKER Avance NEO spectrometers at ambient temperature. Chemical shifts (δ) are reported in ppm relative to the residual solvent peak. The multiplicity of each signal is given as s (singlet), d (doublet), dd (double doublet), t (triplet), q (quadruplet) and m (multiplet). *J* values are given in Hz. Samples were solved in deuterated solvents (CDCl₃, CD₃OD or DMSO). Spectra were analyzed and interpreted using MestreNova 12 software. High-resolution electrospray ionization time-of-flight (ESI-TOF) mass spectra were carried out on a Waters LCT Premier Mass Spectrometer. The samples studied were dried in a Gallencamp oven at reduced pressure with P₂O₅ inside. These analyses were performed at the Centre for Scientific Instrumentation of the University of Granada.

An Eppendorf Thermomixer® agitator was used for conjugations, while centrifugations were performed in an Eppendorf centrifuge.

4.1.2. Biology

A NuAire NU-4750E US AutoFlow incubator was used for cell culture. Cell-based experiments were carried out in a TELSTAR BIO II Class II A laminar flow cabinet. Flow cytometry assays were performed on a FACSCanto II system using the Flowjo[®] 10 software for analysis. TEM was performed on a LIBRA 120 PLUS Carl Zeiss SMT microscope. Cell viability was carried out using a GloMax-Multi Detection System to measure fluorescence. Spheroids and wound healing images were acquired using an Olympus CKX53 microscope, and wound areas were measured using ImageJ[®] software. Confocal microscopy images were obtained using a Zeiss LSM 710 confocal laser scanning microscope and ZEN 2012 program Blue Edition for image acquisition.

4.1.2.1. Cell culture

Human breast carcinoma MDA-MB-231 and MCF-7 cells, lung carcinoma epithelial A549 and human embryonic kidney-derived non-cancerous cells HEK-293 (provided by the Cell Bank the Center of Scientific Instrumentation of the University of Granada, obtained from American Type Culture Collection) were cultured in DMEM with serum (10% FBS), L-glutamine (2 mM), and 1% penicillin/streptomycin and incubated in a tissue culture incubator at 37 °C, 5% CO₂ and 95% relative humidity. Cells were frequently tested negative for mycoplasma infection.

4.1.2.2. Flow cytometry analysis of CD44 expression

Adherent MDA-MB-231, MCF-7, A549 and HEK-293 cells were trypsinized and counted in order to have 8×10^5 cells/ependorf tube. Cells were centrifuged, supernatant removed and pellets resuspended in a blocking buffer (98 μ L). Anti-CD44-FITC antibody (Miltenyi Biotec) was added (2 μ L) and cells incubated in dark and ice for 10 min. Cells were centrifuged, pellets resuspended in PBS and samples analyzed by flow cytometry using FACSCanto II and Flowjo[®] 10 software.

4.1.2.3. Cell viability assays

Target compounds were dissolved in DMSO and stored at -20 °C. For each experiment, the stock solution (100 mM) was further diluted in culture media to obtain the desired concentrations. MDA-MB-231 (2,000 cells/well) and A549 cells (1,500 cells/well) were seeded in a 96-well plate format and incubated for 24 h before treatment. Each well was then replaced with fresh media, containing target compounds (0.01-100 μ M) and incubated for 5 days. Untreated cells (DMSO, 0.1% v/v) were used as control to detect any undesirable effects of culture conditions on cell viability. Each condition was performed in triplicates. PrestoBlue[™] cell viability reagent (10% v/v) was added to each well and the plate incubated for 120 min. Fluorescence emission was detected using a GloMax-

Multi Detection System (excitation filter at 540 nm and emission filter at 590 nm). All conditions were normalized to the untreated cells (100%) and the curve fitted using GraphPad Prism using a sigmoidal variable slope curve. The EC₅₀ value is expressed as the mean ±SD of three independent experiments.

For viability assays of **JE22-NPs**, MDA-MB-231 and MCF-7 cells were plated at 2,000 cells/well and HEK-293 cells were plated at 1,000 cells/well. After 24 h, cells were nanofected with different ratios of **JE22-NPs** (40,000, 20,000, 10,000, 5000, 2,500, 1,250, and 625 NPs/cell). Untreated cells, cells incubated with **Naked-NPs (52)** (40,000 NPs/cell), and NPs in culture medium in the absence of cells were used as controls. Each condition was performed in triplicate. Cell viability was tested at day 5 using PrestoBlue™ reagent and curve fitted as previously described. For viability assays of **JE22-NPs** at acidic conditions, cells were treated with 40,000 NPs/cell in DMEM media at pH = 5. DMEM media at pH = 5 were prepared by replacing NaHCO₃ with PIPES buffer (10 mM) and adjusting the pH with NaOH. Untreated cells, cells incubated with **Naked-NPs (52)** (40,000 NPs/cell), and NPs in culture medium in the absence of cells were used as control. After 1.5 h of incubation, media were replaced with pH = 7.4 DMEM media and cell viability was tested at day 5 as described above. Each condition was performed in triplicates.

4.1.2.4. HA-FITC binding assay

Adherent MDA-MB-231 cells were trypsinized, counted, and diluted in DMEM in order to have 5×10^4 cells/ependorf tube. Cells were centrifuged for 5 min, and pellets were resuspended in DMEM media containing **JE22-NPs** (40,000 NPs/cell) or compounds **JE2e**, **JE5**, **JE6** or **JE22** (120 µg/mL). Anti-CD44 antibody was used as control (120 µg/mL). Samples were incubated at 4 °C for 30 min. Then, cells were centrifuged for 5 min, and pellets were resuspended in DMEM media containing HA-FITC (20 µg/mL) and incubated at 4 °C for 15 min. Cells incubated with unlabelled HA were used as the negative control, whereas cells incubated with HA-FITC served as the positive control. After incubation, cells were centrifuged and resuspended in PBS, and samples were analyzed by flow cytometry (FACSCanto II). Flowjo® 10 software was used for data analysis. Results are expressed as the MFI ±SD of three independent experiments.

4.1.2.5. Apoptosis assay

MDA-MB-231 and MCF-7 cells (only for NPs) were seeded at 5×10^4 cells/well in a 24-well plate. After 24 h, cells were treated with **JE2e** (EC₅₀ = 3.37 µM and $2 \times$ EC₅₀ = 6.74 µM), **JE5** (EC₅₀ = 0.79 µM and $2 \times$ EC₅₀ = 1.58 µM), **JE6** (EC₅₀ = 1.77 µM and $2 \times$ EC₅₀ = 3.54 µM), **JE22** (EC₅₀ = 8 µM and $4 \times$ EC₅₀ = 32 µM), **JE22-NPs** at 20,000 NPs/cell (36 nM) and **Naked-NPs (52)** (20,000 NPs/cell) for 24 h. Cells

incubated in the absence of the apoptosis inducing agent were used as the negative control, whereas cells incubated with H₂O₂ (2 mM) for 4 h at 37 °C served as the positive control. The experiments were performed using the Annexin V-FITC detection kit (Tali Apoptosis Kit -Annexin V Alexa Fluor 488 and PI) according to the manufacturer's instructions, and the samples were analyzed by flow cytometry with a FACSCanto II flow cytometer. Flowjo[®] 10 software was used for data treatment. The analysis was performed in three independent assays.

4.1.2.6. Statistical analysis

One-way ANOVA analysis was performed using the statistical analysis software Sigmastat 3.5 and GraphPad 8.0.

4.2. Experimental section of chapter 3.1

4.2.1. Computational

4.2.1.1. Systems set up

The crystal structure of the murine CD44-HABD at 1.4 Å resolution (PDB ID: 5BZK)¹⁶⁵ was used as a starting point for the computational work. The binding modes of the set of compounds employed in this study were investigated by docking and subsequently, a selection underwent MD simulations. The geometries of each ligand were first built in GaussView6 software, and the ground state geometries of the neutral compounds were optimized with the GAUSSIAN package first at the Hartree-Fock level of theory using the 6-31G (d, p) basis set and subsequently, using the B3LYP functional using the same basis set.

4.2.1.2. Molecular docking calculations

Docking was performed on **JE1-JE6** using AutoDock4.0.²⁸⁶ Crystal water molecules were removed from the PDB file. Protonation states of the protein were assigned using PropKa.²⁸⁷ AutoDock4.2 was used for all docking calculations. The Lamarckian genetic algorithm (LGA) and an empirical free energy function were used to search the conformational and orientation space of the inhibitors while keeping the protein structure rigid.²⁸⁸

Docking parameters included an initial population of 150 randomly placed individual ligands, a maximum number of 25 million energy evaluations, a maximum of 27,000 generations, mutation and crossover rates of 0.02 and 0.80, respectively, and an elitism value of 1. AutoTors, as implemented in Autodock Tool Kit²⁸⁹ was used to define the ligand torsional degrees of freedom. The grid maps representing the protein during the docking process were calculated with AutoGrid 4.2, with a grid dimension of 60 × 60 × 60 grid points, a spacing of 0.375 Å, and the center of the box was placed at the CD44-HABD binding site reported in some crystal structures (PDB entries: 4MRF, 4MRG, 4NP2, 4NP3, 5BZK, 5BZL, 5BZJ, 5BZM, 5BZQ, 5BZR and 5BZS). Ten independent runs were carried out for each ligand, and the docking solutions were clustered by RMSD, using a threshold of 2 Å. The search methods employed are stochastic and a set of optimal docked conformations is predicted. To evaluate the docking protocol used, a comparison with poses observed in some of the available crystal structures negative controls were considered. The poses resulted were analyzed using two approaches: (1) The docking results were visually inspected, (negative controls). The

conformations with comparable orientations for each ligand were then selected. (2) The docking results were clustered spatially and classified considering the lowest energy for each ligand. The solutions obtained were highly clusterized which is an indication that the conformational search procedure is exhaustive enough to ensure coverage of the accessible conformational space.

4.2.1.3. MD simulations

The software NAMD2.14²⁹⁰ was used to perform the MD simulations of compounds **JE2e**, **JE5** and **JE6**. The chemistry at Harvard macromolecular mechanics (CHARMM) 36 parameters were used for the protein and ions,^{291,292} and the transferable intermolecular potential with 3 points (TIP3P) model was used for water.²⁹³ The charges and parameters for the ligands were compiled using the CHARMM-GUI ligand modeller interface²⁹⁴ that generates the ligand force field parameters and topology files by searching for small molecules in the verified CHARMM force field library or using the CHARMM general force field (CGenFF). The protein was inserted in a water box of 90 × 90 × 90 Å³ dimensions and KCl was added up to a final concentration of 150 mM. The final systems were composed of ~45,000 atoms.

Five independent replicas were considered per system and each of them was run for 200 ns. In total, 3 μs of trajectories were analyzed after disregarding the equilibration period. The same equilibration protocol was used for all the simulations, consisting of 10,000 steps of energy minimization, followed by 10 ns of dynamics in the constant-temperature, constant-pressure ensemble (NPT) with timestep equal to 1 fs and 200 ns of dynamics in the NPT ensemble with timestep equal to 1 fs. In the course of the equilibration, restraints on the heavy atoms of the protein were gradually reduced to zero in four stages of 50 ps (1.0, 0.5 0.25 and 0.1 kcal mol for the backbone and 0.5, 0.25 0.125 and 0.05 kcal mol for the sidechain). Restraints on heavy atoms of the ligand were also released in a similar way (1.0, 0.5 0.25 and 0.1 kcal mol run for 50 ps each). Long-range electrostatic interactions were calculated with the Particle Mesh Ewald method using a grid spacing of 1.0 Å²⁹⁵ and NAMD defaults for spline and κ values. A 12 Å cut-off was applied to non-bonded forces. Both electrostatics and van der Waals forces were smoothly switched off between the switching distance of 10 Å and the cut-off distance of 12 Å, using the default switching function in NAMD. The multi-time step algorithm Verlet-l/r-RESPA was used to integrate the equations of motion.²⁹⁶ The temperature was controlled at 298 K by coupling to a Langevin thermostat with a damping coefficient of 1 ps⁻¹.²⁹⁷ A pressure of 1 atm was maintained by coupling the system to a Langevin piston,²⁹⁸ with a damping constant of 25 ps and a period of 50 ps. Analysis of the trajectories was performed using tcl scripts written in-house.

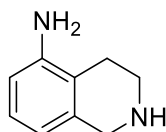
4.2.2. Chemistry and characterization

18,²⁴⁸ **23**,²⁵⁵ **19**,²⁴⁸ **JE1a**,²⁴⁹ **JE1g**²⁵⁰ and **JE4a**,²⁵¹ were synthesized as reported. Although compounds **JE1c**,²⁹⁹ **JE1d**,³⁰⁰ **JE1f**,³⁰¹ **JE4b**,³⁰² **JE4c**,³⁰³ **JE4e**,³⁰⁴ **JE4f**,³⁰⁵ and **JE4g**³⁰⁶ are reported, they were synthesized following the described protocols for **JE1a**,²⁴⁹ **JE1g**²⁵⁰ and **JE4a**.²⁵¹

4.2.2.1. General procedure for the synthesis of 5-amino (**18**), 8-amino (**19**) and 5-hydroxy (**23**) THIQ intermediates

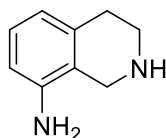
To a solution of aminoisoquinoline (**16** or **17**) or 5-hydroxyisoquinoline (**22**) (1 eq.) in glacial AcOH (0.057 mL/mmol) and H₂SO₄ (96%) (0.054 mL/mmol) was added PtO (0.06 eq.) and hydrogenated at 55 psi for 24 h. The mixture was filtered under vacuum over celite and the filtrate was neutralized with a saturated solution of K₂CO₃ and extracted with DCM. The organic layer was washed twice with a saturated solution of NaCl, dried (anhydrous Na₂SO₄), filtered and concentrated under vacuum. The crude was purified by crystallization with diethyl ether to give the intermediate product. Compound **23** was isolated as acetate salt.

1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-amine (**18**)

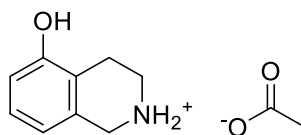


Brown solid (315 mg, 56%). **Mp**: 147-149 °C. **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 6.92 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.61 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.45 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 3.90 (s, 2H), 3.14 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H), 2.56 (t, *J* = 6.2 Hz, 2H). **¹³C NMR** (126 MHz, CD₃OD) δ 146.32, 136.37, 127.26, 120.72, 117.37, 114.32, 48.94, 44.43, 24.47. **HRMS (m/z)**: calcd. for C₉H₁₃N₂ (M + H)⁺: 149.1079; found: 149.1085.

1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-8-amine (**19**)



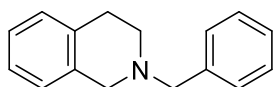
Brown solid (243 mg, 48%). **Mp**: 115-117 °C. **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 6.90 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.55 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.48 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 3.75 (s, 2H), 3.00 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.75 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H). **¹³C NMR** (126 MHz, CD₃OD) δ 144.79, 136.04, 127.60, 121.37, 120.25, 114.31, 44.42, 43.93, 29.83. **HRMS (m/z)**: calcd. for C₉H₁₃N₂ (M + H)⁺: 149.1079; found: 149.1086.

1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-ol acetate (23)

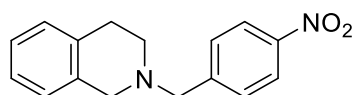
Brown solid (1.04 g, 97%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ 9.1 (s, 2H), 6.80 (dd, $J = 7.9, 7.5$ Hz, 1H), 6.52 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.39 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 3.71 (s, 2H), 3.3 (s, 1H), 2.84 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 2.38 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H), 1.79 (s, 3H).

4.2.2.2. General procedure for the synthesis of compounds JE1a-JE1e

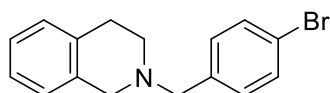
To a solution of **20** (2 eq.) and TEA (1 eq.) in DCM (2 mL/mmol), the corresponding halide (1 eq.) was added for 10 min at 0 °C. The mixture was stirred at rt for 20 h. Then, it was washed with a saturated NaCl solution (3 x 20 mL), dried (anhydrous Na_2SO_4), filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography using Hexane/Ethyl acetate (AcOEt) (8:2) as eluent, except for **JE1e** which was purified using Hexane/AcOEt (1:1).

N-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (JE1a)

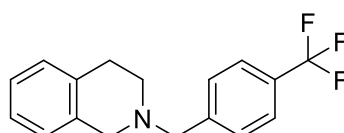
Yellow oil (971 mg, 87%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.44 (d, $J = 7.32$ Hz, 2H), 7.38 (t, $J = 7.34$ Hz, 2H), 7.32 (d, $J = 7.10$ Hz, 1H), 7.20 – 7.10 (m, 3H), 7.02 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 3.71 (s, 2H), 3.66 (s, 2H), 2.93 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H), 2.77 (t, $J = 5.9$ Hz, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 138.42, 134.93, 134.40, 129.09, 128.70, 128.30, 127.10, 126.61, 126.08, 125.56, 62.81, 56.14, 50.65, 29.18. **HRMS (m/z)**: calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$: 224.1361; found: 224.1437.

2-(4-nitrobenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (JE1b)

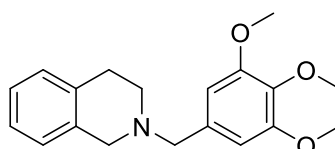
Yellow solid (1.218 g, 90%). **Mp**: 62–63 °C. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.21 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.64 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.18 – 7.12 (m, 3H), 6.99 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 3.85 (s, 2H), 3.72 (s, 2H), 2.97 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H), 2.85 (t, $J = 5.7$ Hz, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 147.56, 133.76, 133.55, 130.60, 129.87, 128.91, 126.73, 126.71, 126.09, 123.82, 61.45, 55.77, 50.75, 28.65. **HRMS (m/z)**: calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$: 269.1212; found: 269.1310.

2-(4-bromobenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (JE1c)

White solid (1.520 g, 84%). **Mp:** 72-74 °C. **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 7.47 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.32 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.18 – 7.09 (m, 3H), 6.99 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 3.70 (s, 2H), 3.68 (s, 2H), 2.94 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.81 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H). **¹³C NMR** (126 MHz, CDCl₃) δ 136.53, 133.93, 133.33, 131.68, 131.05, 128.87, 126.75, 126.59, 125.99, 121.47, 61.59, 55.65, 50.49, 28.65. **HRMS (m/z):** calcd. for C₁₆H₁₇BrN (M + H)⁺: 302.0466; found: 302.0564.

2-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (JE1d)

White solid (230 mg, 86%). **Mp:** 64-68 °C. **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 7.60 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.54 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H), 7.19 – 7.09 (m, 3H), 7.00 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 3.75 (s, 2H), 3.65 (s, 2H), 2.92 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.76 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H). **¹³C NMR** (126 MHz, CDCl₃) δ 142.92, 134.73, 134.35, 129.24, 128.87, 126.70, 126.37, 125.81, 125.41, 125.37, 123.07, 62.31, 56.26, 50.87, 29.26. **HRMS (m/z):** calcd. for C₁₇H₁₇F₃N (M + H)⁺: 292.1235; found: 292.1309.

2-(3,4,5-trimethoxybenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (JE1e)

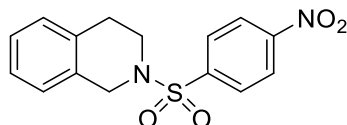
White solid (31 mg, 20%). **Mp:** 87-89 °C. **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 7.12 – 7.08 (m, 3H), 7.02 – 6.99 (m, 1H), 6.74 (s, 2H), 3.84 (s, 6H), 3.77 (s, 3H), 3.64 (s, 2H), 3.63 (s, 2H), 2.92 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 2.77 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H). **¹³C NMR** (126 MHz, CD₃OD) δ 154.48, 138.36, 135.45, 135.15, 134.70, 129.65, 127.62, 127.47, 126.86, 107.77, 63.89, 61.10, 57.05, 56.59, 51.74, 29.60. **HRMS (m/z):** calcd. for C₁₉H₂₄NO₃ (M + H)⁺: 314.1756; found: 314.1755.

4.2.2.3. General procedure for the synthesis of compounds JE1f and JE1g

A solution of **20** (1 eq.) and TEA (1.2 eq.) in DCM (20 mL/mmol) was cooled to 0 °C. The corresponding halide (1.2 eq.) was added to the mixture and stirred for 10 min. The reaction was then stirred for 1 h at rt. It was washed with water (1 x 10 mL) and saturated NaCl solution (3 x 10

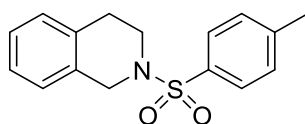
mL), dried (anhydrous Na₂SO₄), filtered and concentrated under vacuum. The crude was purified by flash column chromatography using a Hexane/AcOEt (5:1 → 1:1) solvent gradient as eluent.

2-((4-nitrophenyl)sulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (JE1f)



Yellow solid (194 mg, 61%). **Mp:** 180-182 °C. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.35 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 8.01 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.19 – 7.13 (m, 2H), 7.10 – 7.01 (m, 2H), 4.35 (s, 2H), 3.47 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.92 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 150.25, 143.10, 132.83, 131.02, 129.03, 128.82, 127.21, 126.72, 126.37, 124.46, 47.51, 43.84, 28.71. **HRMS (m/z):** calcd. for C₁₅H₁₅N₂O₄S (M + H)⁺: 319.0674; found: 319.0733.

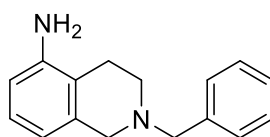
2-tosyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (JE1g)



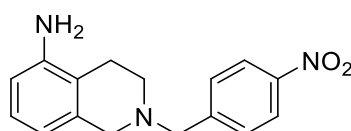
White solid (312 mg, 100%). **Mp:** 148-150 °C. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.73 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.32 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.16 – 7.11 (m, 2H), 7.09 – 7.06 (m, 1H), 7.04 – 7.01 (m, 1H), 4.25 (s, 2H), 3.36 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.93 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.42 (s, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 143.78, 133.44, 133.20, 131.78, 129.82, 128.92, 127.87, 126.84, 126.48, 126.45, 47.67, 43.85, 29.00, 21.65. **HRMS (m/z):** calcd. for C₁₆H₁₈NO₂S (M + H)⁺: 288.0980; found: 288.1082.

4.2.2.4. General procedure for the synthesis of 5-amino (JE2a-JE2g) and 8-amino (JE3a-JE3i) derivatives

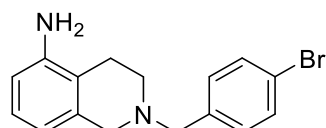
A solution of **18** or **19** (1 eq.) and TEA (1.2 eq.) in absolute EtOH (3 mL/mmol) was cooled to 0 °C. The corresponding phenylmethyl or phenylsulfonyl halide (1 eq.) was added and stirred for 10 min. Subsequently, the reaction was stirred at rt for 3 h for compounds **JE2a**, **JE2b**, **JE2d**, **JE2f**, **JE2g**, **JE3a**, **JE3c**, **JE3f** and **JE3g** and 20 h for compounds **JE2c**, **JE2e**, **JE3b**, **JE3d** and **JE3e**. The mixture was concentrated under vacuum and the residue was purified by flash column chromatography using a Hexane/AcOEt (3:1 → 1:1) solvent gradient as eluent, except compounds **JE2e** and **JE3e** which were purified using a mixture of DCM/MeOH (9.9:0.1 → 9.6:0.4) solvent gradient as eluent.

2-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-amine (JE2a)

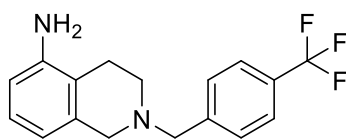
Yellow oil (53 mg, 66%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ 7.42 – 7.38 (m, 2H), 7.38 – 7.33 (m, 2H), 7.33 – 7.29 (m, 1H), 6.90 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 6.59 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.40 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 3.69 (s, 2H), 3.58 (s, 2H), 2.81 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H), 2.62 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CD_3OD) δ 146.12, 138.26, 135.79, 130.85, 129.42, 128.56, 127.46, 120.43, 117.60, 114.41, 63.52, 57.31, 51.54, 24.98. **HRMS (m/z)**: calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_2$ ($M + \text{H}$) $^+$: 239.1548; found: 239.1533.

2-(4-nitrobenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-amine (JE2b)

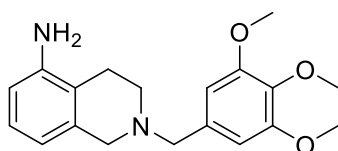
Yellow solid (105 mg, 55%). **Mp**: 144-146 °C. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO) δ 8.22 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.66 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.80 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 6.45 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.21 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 4.78 (s, 2H), 3.76 (s, 2H), 3.47 (s, 2H), 2.71 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H), 2.48 (t, $J = 6.0$ Hz, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO) δ 147.13, 146.60, 145.96, 134.79, 129.59, 125.83, 123.43, 117.99, 114.20, 111.65, 60.77, 55.88, 50.46, 24.28. **HRMS (m/z)**: calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_2$ ($M + \text{H}$) $^+$: 284.1399; found: 284.1376.

2-(4-bromobenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-amine (JE2c)

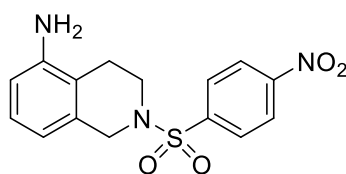
Yellow oil (74 mg, 69%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ 7.49 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.32 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.89 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 6.58 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 6.39 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 3.64 (s, 2H), 3.55 (s, 2H), 2.78 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H), 2.61 (t, $J = 6.2$ Hz, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CD_3OD) δ 146.13, 137.83, 135.76, 132.63, 132.51, 127.47, 122.28, 120.38, 117.59, 114.41, 62.66, 57.30, 51.56, 25.04. **HRMS (m/z)**: calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{BrN}_2$ ($M + \text{H}$) $^+$: 317.0653; found: 317.0663.

2-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-amine (JE2d)

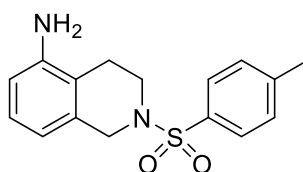
Yellow solid (68 mg, 66%). **Mp:** 70-72 °C. **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 7.65 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.60 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.89 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.59 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.40 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 3.76 (s, 2H), 3.58 (s, 2H), 2.80 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.62 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H). **¹³C NMR** (126 MHz, CD₃OD) δ 146.13, 143.48, 135.80, 131.13, 130.53, 127.46, 126.27, 126.25, 120.40, 117.58, 114.41, 62.84, 57.44, 51.71, 25.12. **HRMS (m/z):** calcd. for C₁₇H₁₈F₃N₂ (M + H)⁺: 307.1422; found: 307.1425.

2-(3,4,5-trimethoxybenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-amine (JE2e)

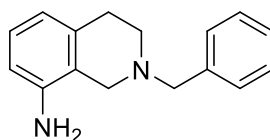
White solid (61 mg, 55%). **Mp:** 145-147 °C. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO) δ 6.80 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.65 (s, 2H), 6.44 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.23 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.76 (s, 2H), 3.75 (s, 6H), 3.65 (s, 3H), 3.53 (s, 2H), 3.45 (s, 2H), 2.66 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 2.45 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO) δ 152.80, 145.96, 136.29, 135.11, 134.35, 125.83, 118.23, 114.30, 111.61, 105.54, 61.90, 60.00, 56.07, 55.81, 50.25, 24.30. **HRMS (m/z):** calcd. for C₁₉H₂₅N₂O₃ (M + H)⁺: 329.1865; found: 329.1846.

2-((4-nitrophenyl)sulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-amine (JE2f)

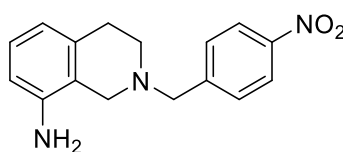
Orange solid (92 mg, 82%). **Mp:** 201-203 °C. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO) δ 8.42 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 8.09 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 6.86 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.48 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.35 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.89 (s, 2H), 4.17 (s, 2H), 3.40 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO) δ 149.93, 146.16, 141.77, 131.48, 128.93, 126.39, 124.57, 116.66, 113.88, 112.26, 47.58, 43.49, 23.51. **HRMS (m/z):** calcd. for C₁₅H₁₆N₃O₄S (M + H)⁺: 334.0862; found: 334.0838.

2-tosyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-amine (JE2g)

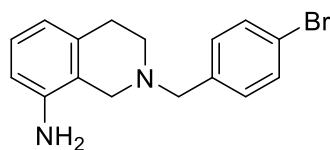
White solid (84 mg, 82%). **Mp:** 182-184 °C. **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 7.72 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.33 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.03 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.74 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.62 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H), 4.18 (s, 2H), 3.37 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.74 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.42 (s, 3H). **¹³C NMR** (126 MHz, CDCl₃) δ 143.91, 140.93, 133.14, 133.08, 129.87, 127.94, 127.20, 120.34, 119.18, 115.32, 47.95, 43.56, 24.42, 21.67. **HRMS (m/z):** calcd. for C₁₆H₁₉N₂O₂S (M + H)⁺: 303.1167; found: 303.1156.

2-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-8-amine (JE3a)

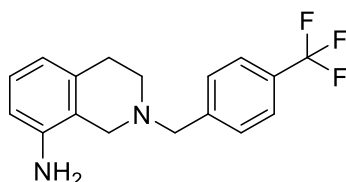
Yellow solid (47 mg, 58%). **Mp:** 90-92 °C. **¹H NMR** (500 MHz, CD₃OD) δ 7.41 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.35 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.28 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 6.90 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.55 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.50 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 3.75 (s, 2H), 3.50 (s, 2H), 2.82 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.68 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H). **¹³C NMR** (126 MHz, CD₃OD) δ 144.75, 138.45, 135.67, 130.79, 129.41, 128.50, 127.69, 121.04, 119.73, 114.22, 63.89, 53.12, 50.73, 30.09. **HRMS (m/z):** calcd. for C₁₇H₁₈N₂F₃ (M + H)⁺: 307.1402; found: 307.1422.

2-(4-nitrobenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-8-amine (JE3b)

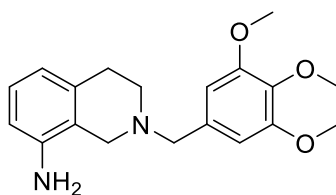
Yellow solid (43 mg, 45%). **Mp:** 138-140 °C. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO) δ 8.21 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.66 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.82 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.43 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.33 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.66 (s, 2H), 3.81 (s, 2H), 3.32 (s, 2H), 2.73 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 2.62 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO) δ 147.12, 146.55, 144.48, 134.14, 129.56, 126.02, 123.36, 118.86, 116.41, 111.62, 61.18, 51.78, 49.77, 29.29. **HRMS (m/z):** calcd. for C₁₆H₁₈N₃O₂ (M + H)⁺: 284.1371; found: 284.1399.

2-(4-bromobenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-8-amine (JE3c)

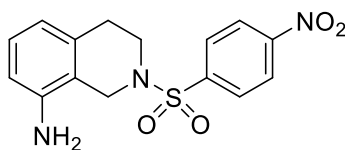
Yellow oil (63 mg, 60%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ 7.50 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 7.34 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H), 6.90 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 6.55 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 6.50 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 3.71 (s, 2H), 3.47 (s, 2H), 2.83 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 2.68 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CD_3OD) δ 144.74, 138.03, 135.64, 132.57, 132.51, 127.71, 122.21, 121.03, 119.75, 114.25, 63.05, 53.05, 50.88, 30.16. **HRMS (m/z):** calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{Br}$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$: 317.0647; found: 317.0653.

2-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-8-amine (JE3d)

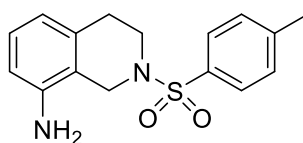
Yellow oil (60 mg, 58%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ 7.65 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.62 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 6.91 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 6.56 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 6.51 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 3.84 (s, 2H), 3.51 (s, 2H), 2.84 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 2.72 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CD_3OD) δ 144.74, 143.58, 135.62, 131.07, 130.63, 127.73, 126.28, 125.79, 120.98, 119.76, 114.28, 63.18, 53.12, 51.06, 30.20. **HRMS (m/z):** calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{F}_3$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$: 307.1402; found: 307.1422.

2-(3,4,5-trimethoxybenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-8-amine (JE3e)

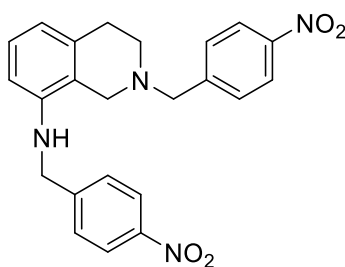
Yellow solid (20 mg, 63%). **Mp:** 127-129 °C. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, DMSO) δ 6.81 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 6.67 (s, 2H), 6.43 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.32 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 4.68 (s, 2H), 3.76 (s, 6H), 3.64 (s, 3H), 3.60 (s, 2H), 3.34 (s, 2H), 2.70 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H), 2.56 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, DMSO) δ 152.75, 144.52, 136.23, 134.42, 134.37, 125.97, 119.23, 116.45, 111.60, 105.52, 62.18, 59.94, 55.78, 51.99, 49.38, 29.34. **HRMS (m/z):** calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_3$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$: 329.1848; found: 329.1865.

2-((4-nitrophenyl)sulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-8-amine (JE3f)

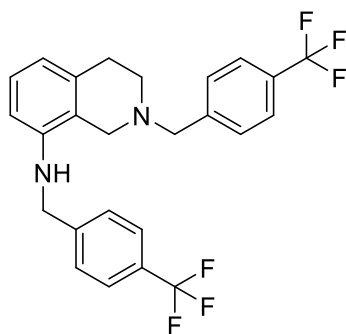
Orange solid (90 mg, 80%). **Mp:** 216-218 °C. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO) δ 8.44 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 8.15 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 6.85 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.47 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.33 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 5.02 (s, 2H), 3.98 (s, 2H), 3.30 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.78 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO) δ 149.99, 144.66, 141.51, 132.98, 129.07, 126.83, 124.54, 116.39, 115.19, 112.17, 44.10, 43.14, 28.57. **HRMS (m/z):** calcd. for C₁₅H₁₆N₃O₄S (M + H)⁺: 334.0832; found: 334.0862.

2-tosyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-8-amine (JE3g)

White solid (126 mg, 100%). **Mp:** 260-262 °C. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO) δ 7.78 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.45 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 6.85 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 6.47 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 6.32 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 4.99 (s, 2H), 3.88 (s, 2H), 3.16 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.76 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H), 2.41 (s, 3H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO) δ 144.68, 143.49, 133.11, 132.72, 129.73, 127.63, 126.69, 116.37, 115.56, 112.12, 44.15, 43.18, 28.68, 20.98. **HRMS (m/z):** calcd. for C₁₆H₁₉N₂O₂S (M + H)⁺: 303.1167; found: 303.1167.

N,2-bis(4-nitrobenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-8-amine (JE3h)

Orange solid (14 mg, 10%). **Mp:** 170-172 °C. **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 8.18 (dd, *J* = 17.0, 8.6 Hz, 4H), 7.61 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.48 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.00 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 6.61 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 6.28 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H), 4.49 (s, 2H), 3.87 (s, 2H), 3.52 (s, 2H), 2.92 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H), 2.76 (t, *J* = 5.6 Hz, 2H). **¹³C NMR** (126 MHz, CDCl₃) δ 147.45, 147.37, 147.35, 146.52, 146.46, 143.42, 135.12, 129.45, 127.71, 127.10, 124.04, 123.83, 118.96, 108.22, 62.23, 52.07, 50.03, 47.58, 29.79. **HRMS (m/z):** calcd. for C₂₃H₂₃N₄O₄ (M + H)⁺: 419.1719; found: 419.1745.

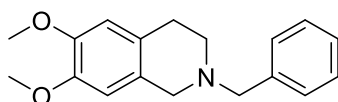
N,2-bis(4-(trifluoromethyl)benzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-8-amine (JE3i)

Yellow solid (14 mg, 10%). **Mp:** 123-125 °C. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ 7.64 (q, $J = 8.4$ Hz, 4H), 7.56 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.48 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.88 (t, $J = 7.8$ Hz, 1H), 6.44 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 6.26 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 4.45 (s, 2H), 3.86 (s, 2H), 3.58 (s, 2H), 2.84 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H), 2.72 (t, $J = 5.8$ Hz, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CD_3OD) δ 146.61, 145.33, 143.63, 135.46, 131.06, 128.44, 127.75, 126.90, 126.87, 126.27, 126.23, 124.75, 124.71, 120.36, 118.68, 109.33, 63.15, 53.21, 50.79, 47.84, 30.30. **HRMS (m/z):** calcd. for $\text{C}_{25}\text{H}_{23}\text{F}_6\text{N}_2$ ($M + H$) $^+$: 465.1765; found: 465.1785.

4.2.2.5. General procedure for the synthesis of compounds JE4a-JE4g, JE5 and JE6

A solution of **21** or **23** or **24** (1 eq.) and TEA (1 eq.) in absolute EtOH (3 mL/mmol) was stirred at rt for 1 h. Then, the corresponding halide (1 eq.) and a second eq. of TEA were added and the reaction mixture was stirred at rt for 3.5 h or 20 h for **JE4e**, **JE5** and **JE6**. The EtOH was removed under vacuum and the residue was dissolved in DCM and washed with a saturated NaCl solution (3 x 10 mL), dried (anhydrous Na_2SO_4), filtered and concentrated under vacuum. The reaction crude was purified by flash chromatography using a Hexane/AcOEt (3:1 \rightarrow 1:1) solvent gradient as eluent.

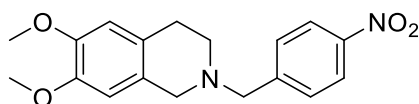
Once the reaction time has ended, for compounds **JE4b**, **JE4f** and **JE4g** a suspension with a high amount of solid was observed and filtered under vacuum. This solid turned out to be the target compound. The filtering followed the same procedure as described above, their purification enabled to obtain a small additional amount of the target compound. The yield of the reaction indicated for each of the compounds is the result of both fractions.

2-benzyl-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (JE4a)

Yellow solid (732 mg, 59%). **Mp:** 110-112 °C. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.41 – 7.31 (m, 2H), 7.34 – 7.29 (m, 2H), 7.28 – 7.22 (m, 1H), 6.58 (s, 1H), 6.47 (s, 1H), 3.82 (s, 3H), 3.79 (s, 3H), 3.67 (s, 2H), 3.53

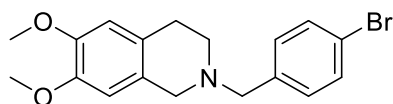
(s, 2H), 2.86 – 2.77 (m, 2H), 2.75 – 2.66 (m, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 147.45, 147.14, 138.37, 129.09, 128.25, 127.06, 126.67, 126.18, 111.40, 109.47, 62.74, 55.88, 55.86, 55.65, 50.76, 28.68. **HRMS (m/z)**: calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{22}\text{NO}_2$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$: 284.1572; found: 284.1654.

6,7-dimethoxy-2-(4-nitrobenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (JE4b)



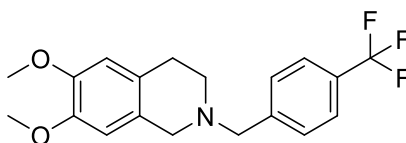
Yellow solid (60 mg, 55%). **Mp**: 116-118 °C. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.20 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.65 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 6.61 (s, 1H), 6.47 (s, 1H), 3.86 (s, 2H), 3.84 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.65 (s, 2H), 2.95 – 2.80 (m, 4H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 148.06, 147.72, 147.66, 147.60, 130.01, 125.47, 124.64, 123.83, 111.55, 109.50, 61.19, 56.07, 55.20, 50.77, 28.04. **HRMS (m/z)**: calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_4$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$: 329.1423; found: 329.1489.

2-(4-bromobenzyl)-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (JE4c)

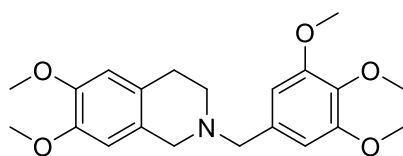


Yellow solid (263 mg, 67%). **Mp**: 108-110 °C. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.48 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.36 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 6.60 (s, 1H), 6.46 (s, 1H), 3.83 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.77 (s, 2H), 3.67 (s, 2H), 2.95 – 2.85 (m, 4H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 148.13, 147.72, 132.78, 131.82, 131.38, 131.36, 131.09, 130.80, 111.51, 109.54, 56.08, 56.07, 50.32, 47.16, 29.83, 25.77. **HRMS (m/z)**: calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{BrNO}_2$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$: 362.0677; found: 362.0787.

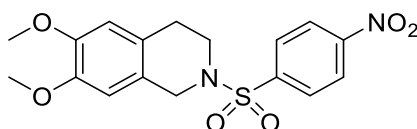
6,7-dimethoxy-2-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (JE4d)



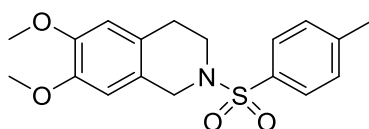
Yellow solid (54 mg, 61%). **Mp**: 106-108 °C. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.60 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.55 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 6.61 (s, 1H), 6.48 (s, 1H), 3.84 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.78 (s, 2H), 3.60 (s, 2H), 2.90 – 2.84 (m, 2H), 2.83 – 2.77 (m, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 147.88, 147.52, 142.00, 129.48, 128.38, 125.82, 125.67, 125.47, 125.43, 122.97, 111.56, 109.56, 61.80, 56.05, 55.41, 50.78, 28.34. **HRMS (m/z)**: calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{NO}_2$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$: 352.1446; found: 352.1536.

6,7-dimethoxy-2-(3,4,5-trimethoxybenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (JE4e)

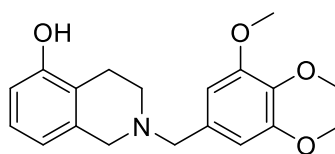
White solid (120 mg, 49%). **Mp:** 116-117 °C. **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 6.64 (s, 2H), 6.61 (s, 1H), 6.51 (s, 1H), 3.87 – 3.82 (m, 15H), 3.61 (s, 2H), 3.57 (s, 2H), 2.82 (t, *J* = 5.7 Hz, 2H), 2.72 (t, *J* = 5.8 Hz, 2H). **¹³C NMR** (126 MHz, CDCl₃) δ 153.06, 147.64, 147.26, 136.88, 133.40, 126.16, 126.13, 126.01, 111.50, 109.61, 106.30, 62.91, 60.72, 55.97, 55.92, 55.78, 55.51, 50.63, 28.11. **HRMS (m/z):** calcd. for C₂₁H₂₇NO₅ (M + H)⁺: 374.1967; found: 374.1974.

6,7-dimethoxy-2-((4-nitrophenyl)sulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (JE4f)

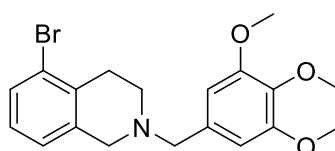
White solid (293 mg, 67%). **Mp:** 118-120 °C. **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 8.35 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 8.01 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.54 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 4.27 (s, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.81 (s, 3H), 3.44 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.83 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H). **¹³C NMR** (126 MHz, CDCl₃) δ 150.27, 148.26, 148.06, 143.19, 128.82, 124.77, 124.46, 122.76, 111.52, 108.95, 56.10, 56.04, 47.23, 43.89, 28.31. **HRMS (m/z):** calcd. for C₁₇H₁₉N₂O₆S (M + H)⁺: 379.0886; found: 379.0955.

6,7-dimethoxy-2-tosyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (JE4g)

White solid (323 mg, 86%). **Mp:** 142-144 °C. **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 7.71 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.31 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 6.54 (s, 1H), 6.50 (s, 1H), 4.16 (s, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.80 (s, 3H), 3.32 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.83 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H), 2.41 (s, 3H). **¹³C NMR** (126 MHz, CDCl₃) δ 147.97, 147.82, 143.73, 133.47, 129.78, 127.84, 125.13, 123.53, 111.45, 109.10, 56.05, 56.01, 47.35, 43.90, 28.54, 21.63. **HRMS (m/z):** calcd. for C₁₈H₂₂NO₄S (M + H)⁺: 348.1191; found: 348.1258.

2-(3,4,5-trimethoxybenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-ol (JE5)

White solid (43 mg, 24%). **Mp:** 196-200 °C. **¹H NMR** (500 MHz, DMSO) δ 9.25 (s, 1H), 6.91 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 6.66 (s, 2H), 6.61 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 6.48 (d, J = 7.6 Hz, 1H), 3.76 (s, 6H), 3.66 (s, 3H), 3.53 (d, J = 20.1 Hz, 4H), 2.63 (s, 4H). **¹³C NMR** (126 MHz, DMSO) δ 155.28, 153.26, 136.77, 136.65, 134.75, 121.61, 126.42, 117.38, 112.37, 105.99, 62.39, 60.43, 56.26, 56.14, 50.53, 24.07. **HRMS (m/z):** calcd. for $C_{19}H_{24}NO_4$ (M + H)⁺: 330.1693; found: 330.1681.

5-bromo-2-(3,4,5-trimethoxybenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (JE6)

White solid (174 mg, 74%). **Mp:** 88-91 °C. **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 7.40 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 7.02 – 6.95 (m, 2H), 6.62 (s, 2H), 3.86 (s, 6H), 3.85 (s, 3H), 3.62 (s, 2H), 3.61 (s, 2H), 2.86 (t, J = 5.9 Hz, 2H), 2.76 (t, J = 6.0 Hz, 2H). **¹³C NMR** (126 MHz, CDCl₃) δ 153.34, 137.59, 137.12, 134.45, 134.14, 130.31, 127.10, 125.89, 125.41, 105.72, 62.73, 61.00, 56.34, 56.28, 50.70, 30.43. **HRMS (m/z):** calcd. for $C_{19}H_{23}BrNO_3$ (M + H)⁺: 392.0861; found: 392.0843.

4.2.3. Biology**4.2.3.1. Spheroids assay**

MDA-MB-231 spheroids were originated using the centrifugal forced-aggregation technique. Briefly, cells were separated from the flasks using trypsin, washed with PBS, resuspended, and counted. 5,000 cells per well/100 μ L were seeded in ultra-low attachment round bottom 96-well plates. Plates were centrifuged at 290 g for 3 min and placed in a tissue culture incubator. After 24 h, 50 μ L of complete medium containing 18 μ g/mL of collagen was added to each well to get the optimal concentration of collagen (6 μ g/mL). Then, plates were centrifuged at 100 g for 3 min and placed back for 3 days in the incubator until the complete formation of spheroids. On day 5, spheroids were treated with **JE5** at various concentrations (1 μ M, 10 μ M and 100 μ M) and DMSO (0.1% v/v) was used as vehicle control. Each condition was performed in three biological replicates.

On day 10 (5 days after treatment), a cell viability assay of 3D spheroids was performed. PrestoBlue™ cell viability reagent (10% v/v) was added to each well and the plates were incubated for 6 h. Following this, the plates were centrifuged at 290 g for 3 min and fluorescence emission was determined using a GloMax-Multi Detection System (excitation filter at 540 nm and emission filter at 590 nm). The data were exported to Microsoft Excel and GraphPad Prism for analysis.

In addition, spheroids were imaged at time zero and after 5 days of treatment using an Olympus CKX53 microscope (4× objective magnification) and processed with ImageJ® software.

4.3. Experimental section of chapter 3.2

4.3.1. Chemical materials and methods

Analytical TLC was performed on silica gel Macherey-Nagel poligram SIL/UV 254 of 0.25 mm and monitoring with 254/365nm UV lamp.

Flash chromatography was performed using Isolera One (BiotageSweden) or traditional flash chromatography with silica gel 60 (40-63 μm). ^1H , ^{13}C , DEPT NMR spectra were recorded on a VARIAN 500 MHz instrument. Chemical shifts (δ) are reported in ppm, using the peak of tetramethylsilane as an internal standard in deuterated solvents and coupling constants (J) are reported in Hz. Following abbreviations are used for multiplicity: s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet) and dd (double doublet). Mass spectral analyses were performed by ESI MICROMASS ZMD 2000 electrospray mass spectrometer.

For analytical profiles, a Beckmann System Gold 168 HPLC was used equipped with a Kinetex column 5 μm EVO C18 100 \AA (250 x 4.6 mm) and a variable wavelength UV detector fixed to 220 nm. Analyses were carried out using $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ as eluent containing 0.1% v/v TFA, at a flow rate of 0.7 mL/min. The gradient elution was from 30 to 100% of solution B in 20 min for all compounds except for **JE12**, which was from 0 to 100% of solution B in 25 min.

Compounds were purified by preparative reversed-phase HPLC using a Waters Delta Prep 3000 system with a Jupiter column C18 (250 x 30 mm, 300 \AA , 15 μ spherical particle size). The column was perfused at a flow rate of 20 mL/min with a mobile phase containing solvent A (100/0.1 of $\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$) and solvent B (40/60/0.1 of $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}/\text{TFA}$) and a linear gradient programmed following the analytical profile of the crude material.

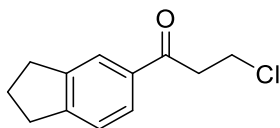
These analyses were performed at the Department of Chemical and Pharmaceutical Sciences of the University of Ferrara.

4.3.2. Synthesis of intermediate 30

4.3.2.1. Synthesis of 3-chloro-1-(2,3-dihydro-1*H*-inden-5-yl) propan-1-one (26)

A solution of 2,3-dihydro-1*H*-indene (**25**) (5.2 mL, 42.3 mmol) and 3-chloropropanoyl chloride (4 mL, 42.3 mmol) in DCM (16 mL) was added dropwise to a solution of AlCl_3 (6.2 g, 46.5 mmol) in DCM (70 mL) at -10°C over 30 min. The mixture was stirred at rt for 16 h and quenched with cold HCl (3 N,

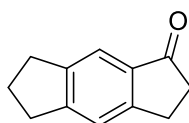
1200 mL) at -10 °C over 45 min. The organic layer was then extracted with DCM (3 x 30 mL), dried (anhydrous Na₂SO₄), filtered and concentrated under vacuum. The resulting grey solid was used in the next step without further purification.



Grey solid (8.9 g, 56%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.82 (s, 1H), 7.76 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 7.31 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 3.92 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.44 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.97 (t, *J* = 7.5 Hz, 4H), 2.13 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H). MS (ESI): calcd. for C₁₂H₁₄ClO (M+H)⁺: 209.0655; found: 209.2343.

4.3.2.2. Synthesis of 3,5,6,7-tetrahydro-s-indacen-1(2H)-one (27)

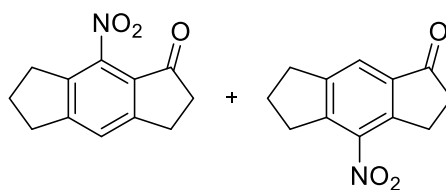
A solution of **26** (8.9 g, 42.4 mmol) in concentrated H₂SO₄ (96%) (50 mL) was stirred at 55 °C for 16 h. The reaction was quenched by adding the mixture carefully to 250 mL of water/ice. The organic layer was extracted with AcOEt (3 x 30 mL), dried (anhydrous Na₂SO₄), filtered and concentrated under vacuum. The residue was purified by flash chromatography using Hexane/AcOEt (6:1) as eluent to afford the symmetrical isomer **27**.



Yellow solid (3.7 g, 51%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.42 (s, 1H), 7.37 (s, 1H), 3.05 – 3.00 (m, 2H), 2.98 – 2.83 (m, 4H), 2.64 – 2.58 (m, 2H), 2.14 – 2.00 (m, 2H). MS (ESI): calcd. for C₁₂H₁₃O (M+H)⁺: 173.0888; found: 173.1872.

4.3.2.3. Synthesis of 8-nitro-3,5,6,7-tetrahydro-s-indacen-1(2H)-one (28) and 4-nitro-3,5,6,7-tetrahydro-s-indacen-1(2H)-one (29)

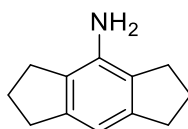
27 (3.7 g, 21.5 mmol) was dissolved in concentrated H₂SO₄ (96%) (23 mL). HNO₃ (70%) (1.8 mL, 43 mmol) was added to the solution dropwise at 0 °C over 1 h. The mixture was stirred at 0 °C for 1 h. Then, the reaction mixture was slowly added to water/ice (46 mL) and DCM (27 mL) at 0 °C. The mixture was filtered over celite and then the organic layer was extracted with DCM (3 x 15 mL) and washed with a saturated NaHCO₃ solution (3 x 15 mL). The combined organic extracts were dried (anhydrous Na₂SO₄), filtered and concentrated under vacuum. The resulting yellow solid was a mixture of **28** and **29** that was purified by flash chromatography using a solvent gradient of Hexane/AcOEt (6:1 → 1:1) as eluent.



Yellow solid (2.1 g, 54%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.43 (s, 1H), 3.14 – 3.10 (m, 2H), 3.00 – 2.95 (m, 4H), 2.79 – 2.73 (m, 2H), 2.20 – 2.15 (m, 2H). **MS (ESI)**: calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{NO}_3$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 218.0739; found: 218.2705.

4.3.2.4. Synthesis of 1,2,3,5,6,7-hexahydro-s-indacen-4-amine (30)

To a solution of **28** and **29** (523 mg, 2.4 mmol) in MeOH (5.8 mL), MSA (172.1 μL , 2.7 mmol) and $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$ (20% wt., 130.7 mg) were added. The mixture was stirred under hydrogen (1 atm) at rt for 24 h. Then, it was filtered over celite and the filtrate was washed with water (20 mL). Subsequently, the pH was adjusted to 10.6 with a solution of NaOH 2N. The resulting mixture was filtered and crystallized with heated ethanol/water (9:1) to obtain the target product.

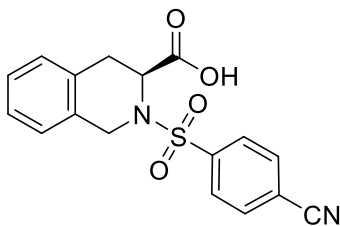


Brown solid (248 mg, 59%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 6.67 (s, 1H), 3.93 – 3.68 (m, 2H), 2.89 (t, $J = 7.4$ Hz, 4H), 2.73 (t, $J = 7.3$ Hz, 4H), 2.27 – 1.96 (m, 4H). **MS (ESI)**: calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}$ ($\text{M}+\text{H}^+$): 174.1204; found: 174.3070.

4.3.3. General procedure for the synthesis of intermediates 41-45

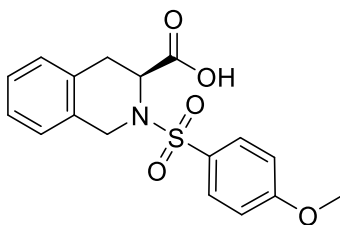
To a solution of THIQ carboxylic acid (**35**) (1 eq.) in THF (3 mL/mmol), water (15 mL/mmol) and K_2CO_3 (2 eq.) were added. A solution of appropriately substituted *para* phenyl sulfonyl chloride (**36-40**) (1 eq.) in THF (5 mL/mmol) was added to the mixture for 30 min. After the reaction was complete, as indicated by MS (ESI) and TLC, THF was removed under vacuum and AcOEt (15 mL) was then added. The aqueous layer was acidified to pH 4-5 using HCl 1M and the mixture was then extracted with AcOEt (2 x 15 mL), dried (anhydrous Na_2SO_4), filtered and concentrated under reduced pressure. For the isolation of some intermediates, it was necessary to purify them by flash chromatography using a gradient of DCM/MeOH.

(S)-2-((4-cyanophenyl)sulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid (41)



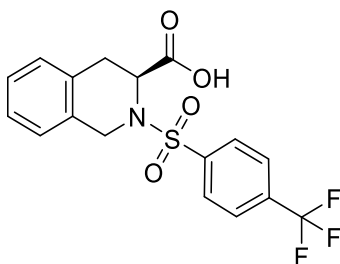
Yellow solid (329 mg, 68%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.95 – 7.91 (m, 2H), 7.77 – 7.73 (m, 2H), 7.22 – 7.14 (m, 2H), 7.11 – 7.03 (m, 2H), 5.00 (dd, $J = 5.5, 3.9$ Hz, 1H), 4.71 (d, $J = 15.3$ Hz, 1H), 4.44 (d, $J = 15.3$ Hz, 1H), 3.27 – 3.16 (m, 2H). **MS (ESI)**: calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$ (M-H) $^-$: 341.0674; found: 341.2670.

(S)-2-((4-methoxyphenyl)sulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid (42)

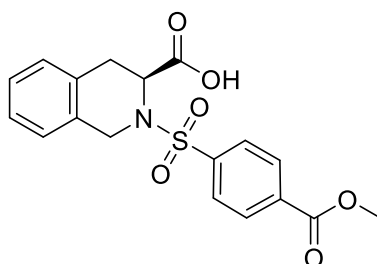


Flash chromatography: DCM/MeOH (9:1). White oil (80 mg, 18%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.68 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.03 – 6.97 (m, 2H), 6.94 (d, $J = 4.4$ Hz, 1H), 6.91 – 6.88 (m, 1H), 6.81 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 4.68 (s, 1H), 4.50 – 4.38 (m, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.06 (d, $J = 14.9$ Hz, 1H), 2.92 – 2.84 (m, 1H). **MS (ESI)**: calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{NO}_5\text{S}$ (M+H) $^+$: 348.0827; found: 348.3010.

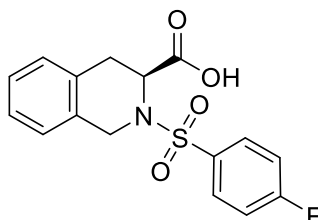
(S)-2-((4-(trifluoromethyl)phenyl)sulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid (43)



Yellow oil (164 mg, 30%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.94 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 7.72 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.20 – 7.11 (m, 2H), 7.10 – 6.99 (m, 2H), 4.99 (t, $J = 4.3$ Hz, 1H), 4.69 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H), 4.44 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H), 3.19 (s, 2H). **MS (ESI)**: calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{F}_3\text{NO}_4\text{S}$ (M-H) $^-$: 384.0596; found: 384.5418.

(S)-2-((4-(methoxycarbonyl)phenyl)sulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid (44)

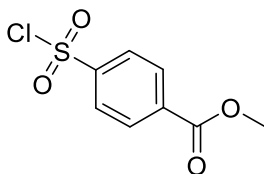
Yellow oil (210 mg, 65%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.15 – 8.11 (m, 2H), 7.92 – 7.87 (m, 2H), 7.20 – 7.11 (m, 2H), 7.09 – 7.02 (m, 2H), 5.01 (t, $J = 4.7$ Hz, 1H), 4.70 (d, $J = 15.5$ Hz, 1H), 4.47 (d, $J = 15.4$ Hz, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.19 (d, $J = 4.6$ Hz, 2H). **MS (ESI)**: calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{NO}_6\text{S}$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 376.0777; found: 376.3370.

(S)-2-((4-fluorophenyl)sulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylic acid (45)

Yellow solid (1.8 g, 93%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.85 – 7.79 (m, 3H), 7.20 – 6.98 (m, 5H), 4.99 – 4.92 (m, 1H), 4.68 (d, $J = 7.0$ Hz, 1H), 4.49 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H), 3.19 – 3.14 (m, 2H). **MS (ESI)**: calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{FNO}_4\text{S}$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 336.0628; found: 336.3921.

4.3.4. Synthesis of 4-chlorosulfonyl benzoic acid methyl ester intermediate (39)

To a solution of 4-chlorosulfonyl benzoic acid (**46**) (300 mg, 1.4 mmol) in DCE (0.56 mL), thionyl chloride (1.1 mL, 15.1 mmol) was added. The mixture was heated under reflux for 1 h. After the formation of the acyl chloride intermediate **47**, the mixture was concentrated in vacuo, cooled, and then ice-cold MeOH (2.3 mL) was added. The suspension was stirred at 0 °C for 5 min and rt for 10 min. Then, after the addition of ice-cold water (2.3 mL), a brown solid was precipitated to obtain the ester **39** without additional purification.

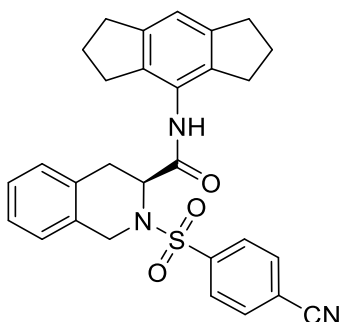


Brown solid (234 mg, 73%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.21 (d, $J = 2.2$ Hz, 2H), 8.15 (d, $J = 2.2$ Hz, 2H), 3.90 (s, 3H).

4.3.5. General procedure for the synthesis of indacenyl tetrahydroisoquinoline carboxamide derivatives JE7-JE11b

HATU (1.1 eq.) and DIPEA (1.1 eq.) were added to a solution of the corresponding carboxylic intermediates **41-45** (1.1 eq.) in DMF (4 mL/mmol) at 0 °C. A solution of indacenamine **30** (**34** for **JE11b**) (1 eq.) in DMF (3 mL/mmol) was added dropwise to the reaction. The mixture was stirred at rt for 1 h. After the reaction was complete, DMF was evaporated, and the resulting solid residue was solved in AcOEt (20 mL). The organic layer was then washed with a solution of $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ 10% (1 x 10 mL), with a solution of NaHCO_3 5% (1 x 10 mL) and finally with a saturated NaCl solution (1 x 10 mL). The organic extracts were dried (anhydrous Na_2SO_4), filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography and preparative HPLC to give compounds **JE7-JE11b** as white/yellow solids.

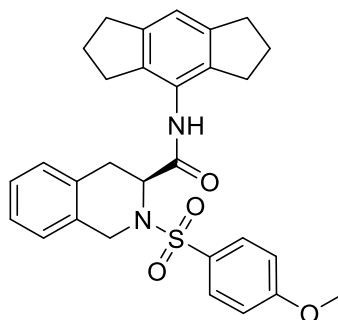
(S)-2-((4-cyanophenyl)sulfonyl)-N-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-s-indacen-4-yl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxamide (JE7)



Flash chromatography: Hexane/AcOEt (4:1 \rightarrow 1:1). Preparative HPLC. White solid (140 mg, 48%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.97 – 7.92 (m, 2H), 7.89 (s, 1H), 7.80 – 7.76 (m, 2H), 7.24 – 7.16 (m, 2H), 7.15 – 7.09 (m, 2H), 6.97 (s, 1H), 4.67 (d, $J = 14.5$ Hz, 1H), 4.60 (dd, $J = 6.5, 4.2$ Hz, 1H), 4.36 (d, $J = 14.5$ Hz, 1H), 3.33 (dd, $J = 15.5, 4.3$ Hz, 1H), 2.83 (t, $J = 7.4$ Hz, 4H), 2.74 (dd, $J = 15.4, 6.5$ Hz, 1H), 2.61 – 2.41 (m, 4H), 2.04 – 1.93 (m, 4H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 167.59, 144.19, 141.30, 137.71, 133.17, 133.02, 131.75, 128.79, 128.57, 128.43, 127.89, 127.36, 126.40, 119.31, 117.24, 117.12,

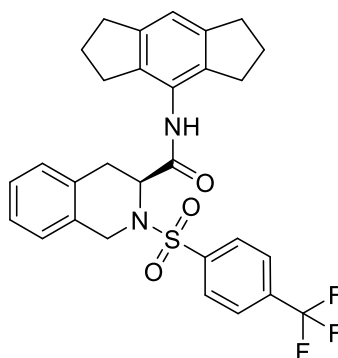
57.35, 46.80, 33.05, 30.93, 30.50, 25.65. **MS (ESI)**: calcd. for $C_{29}H_{28}N_3O_3S$ (M+H)⁺: 498.1773; found: 498.6568. **Analytical HPLC**: retention time (t_R) = 21.13 min.

(S)-N-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-s-indacen-4-yl)-2-((4-methoxyphenyl)sulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxamide (JE8)



Isolera One flash chromatography: Hexane/AcOEt (3:1). Preparative HPLC. White solid (27 mg, 25%). **¹H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.04 (s, 1H), 7.84 – 7.79 (m, 2H), 7.22 – 7.11 (m, 4H), 7.01 – 6.96 (m, 2H), 6.94 (s, 1H), 4.68 (d, J = 14.0 Hz, 1H), 4.61 (dd, J = 6.2, 3.3 Hz, 1H), 4.22 (d, J = 13.9 Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.35 (dd, J = 15.2, 3.3 Hz, 1H), 2.81 (t, J = 7.3 Hz, 4H), 2.64 – 2.56 (m, 1H), 2.54 – 2.34 (m, 4H), 2.00 – 1.91 (m, 4H). **¹³C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ 168.37, 163.68, 144.76, 144.02, 141.38, 137.75, 132.40, 133.59, 130.04, 128.47, 128.25, 127.23, 126.47, 119.06, 114.73, 57.34, 55.84, 46.80, 33.06, 31.06, 30.44, 25.65. **MS (ESI)**: calcd. for $C_{29}H_{31}N_2O_4S$ (M+H)⁺: 503.1926; found: 503.6023. **Analytical HPLC**: t_R = 21.77 min.

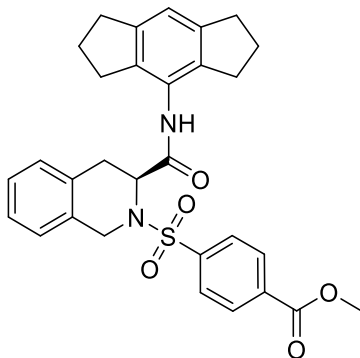
(S)-N-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-s-indacen-4-yl)-2-((4-(trifluoromethyl)phenyl)sulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxamide (JE9)



Isolera One flash chromatography: Hexane/AcOEt (6:1). Preparative HPLC. White solid (100 mg, 45%). **¹H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 7.97 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.94 (s, 1H), 7.76 (d, J = 8.2 Hz, 2H), 7.23 – 7.15 (m, 2H), 7.14 – 7.09 (m, 2H), 6.96 (s, 1H), 4.68 (d, J = 14.3 Hz, 1H), 4.64 (dd, J = 6.4, 4.0 Hz, 1H), 4.32 (d, J = 14.2 Hz, 1H), 3.34 (dd, J = 15.4, 4.0 Hz, 1H), 2.83 (t, J = 7.4 Hz, 4H), 2.70 (dd, J = 15.3, 6.4

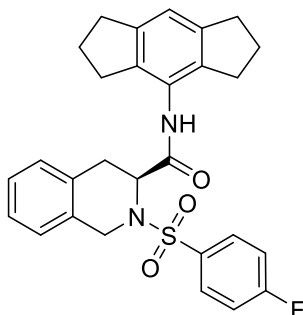
Hz, 1H), 2.60 – 2.39 (m, 4H), 2.05 – 1.92 (m, 4H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 167.79, 144.15, 140.60, 139.03, 137.74, 133.18, 131.86, 128.55, 128.49, 128.35, 127.96, 127.33, 126.66, 126.63, 126.43, 119.25, 57.41, 46.82, 33.06, 30.98, 30.49, 25.65. **MS (ESI)**: calcd. for C₂₉H₂₈F₃N₂O₃S (M+H)⁺: 541.1694; found: 541.5710. **Analytical HPLC**: t_R = 23.10 min.

(S)-methyl 4-((3-((1,2,3,5,6,7-hexahydro-s-indacen-4-yl)carbamoyl)-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)sulfonyl)benzoate (JE10)



Flash chromatography: Hexane/AcOEt (5:1 → 2:1). Preparative HPLC. Yellow solid (130 mg, 53%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.17 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.93 (d, *J* = 8.2 Hz, 3H), 7.21 – 7.08 (m, 4H), 6.95 (s, 1H), 4.70 (d, *J* = 14.1 Hz, 1H), 4.64 (dd, *J* = 6.3, 3.6 Hz, 1H), 4.29 (d, *J* = 14.2 Hz, 1H), 3.97 (s, 3H), 3.34 (dd, *J* = 15.3, 3.6 Hz, 1H), 2.82 (t, *J* = 7.4 Hz, 4H), 2.62 (dd, *J* = 15.3, 6.5 Hz, 1H), 2.57 – 2.37 (m, 4H), 2.01 – 1.92 (m, 4H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 167.89, 165.52, 144.11, 140.79, 137.76, 134.68, 133.22, 131.91, 130.69, 128.56, 128.44, 127.99, 127.87, 127.33, 126.44, 119.20, 57.37, 52.91, 46.82, 33.05, 30.96, 30.47, 25.65. **MS (ESI)**: calcd. for C₃₀H₃₁N₂O₅S (M+H)⁺: 531.1875; found: 531.6537. **Analytical HPLC**: t_R = 22.45 min.

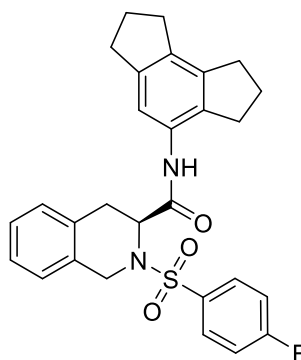
(S)-2-((4-fluorophenyl)sulfonyl)-N-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-s-indacen-4-yl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxamide (JE11a)



Flash chromatography: Hexane/AcOEt (6:1 → 1:1). Preparative HPLC. Yellow solid (630 mg, 57%). ¹H NMR (500 MHz, DMSO) δ 9.54 (s, 1H), 8.07 – 8.01 (m, 2H), 7.48 (t, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.31 – 7.24 (m,

4H), 7.03 (s, 1H), 4.79 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H), 4.76 – 4.68 (m, 2H), 3.25 – 3.11 (m, 2H), 2.88 (t, $J = 7.3$ Hz, 4H), 2.60 – 2.49 (m, 4H), 2.06 – 1.96 (m, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO) δ 168.48, 143.21, 138.01, 135.09, 133.20, 132.59, 130.74, 130.65, 129.50, 128.29, 127.31, 126.83, 126.54, 118.41, 116.92, 116.70, 55.51, 45.85, 32.85, 32.76, 30.38, 25.44. **MS (ESI)**: calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{FN}_2\text{O}_3\text{S}$ (M+H) $^+$: 491.1726; found: 491.6199. **Analytical HPLC**: $t_{\text{R}} = 22.12$ min.

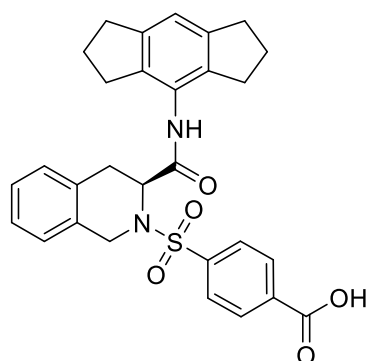
(S)-2-((4-fluorophenyl)sulfonyl)-N-(1,2,3,6,7,8-hexahydro-as-indacen-4-yl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxamide (JE11b)



Flash chromatography: Hexane/AcOEt (6:1 \rightarrow 1:1). Preparative HPLC. Yellow solid (180 mg, 15%). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.23 (s, 1H), 7.83 – 7.78 (m, 2H), 7.52 (s, 1H), 7.19 – 7.05 (m, 6H), 4.60 (t, $J = 3.1$ Hz, 1H), 4.56 (s, 1H), 4.44 (d, $J = 15.0$ Hz, 1H), 3.33 (dd, $J = 15.5, 4.1$ Hz, 1H), 2.89 – 2.59 (m, 9H), 2.13 – 2.00 (m, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 167.81, 146.20, 143.63, 140.61, 136.82, 133.07, 132.81, 131.76, 131.35, 130.54, 130.45, 128.52, 128.30, 127.10, 126.23, 116.84, 116.62, 115.02, 57.17, 46.47, 32.89, 31.79, 31.03, 29.89, 25.71, 25.10. **MS (ESI)**: calcd. for $\text{C}_{28}\text{H}_{28}\text{FN}_2\text{O}_3\text{S}$ (M+H) $^+$: 491.1436; found: 491.6199. **Analytical HPLC**: $t_{\text{R}} = 23.35$ min.

4.3.6. Synthesis of (S)-4-((3-((1,2,3,5,6,7-hexahydro-s-indacen-4-yl)carbamoyl)-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)sulfonyl)benzoic acid (JE12)

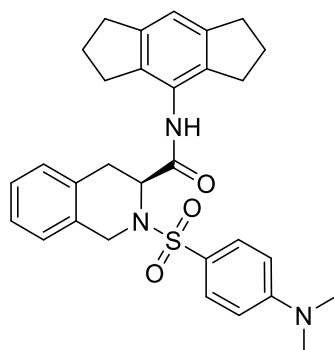
To a solution of **JE10** (33 mg, 0.062 mmol) in methanol (2.5 mL), a LiOH solution (1.6 mg, 0.131 mmol) in H_2O (0.5 mL) was added. The resulting mixture was stirred at rt for 24h. MeOH was removed under vacuum and the residue was solved in H_2O (1 mL) and basified using a solution of NaHCO_3 5 %. The basic aqueous layer was washed with AcOEt (2 x 10 mL) and then acidified with HCl 1M. The organic layer was extracted with AcOEt, washed with a saturated NaCl solution, dried (anhydrous Na_2SO_4), filtered and concentrated under vacuum. The crude material was purified by preparative HPLC to provide benzoic acid **JE12** as a white solid.



Preparative HPLC. White solid (18 mg, 56%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.26 – 8.21 (m, 2H), 8.01 – 7.97 (m, 3H), 7.23 – 7.10 (m, 4H), 6.96 (s, 1H), 4.76 – 4.68 (m, 2H), 4.27 (d, $J = 14.1$ Hz, 1H), 3.34 (dd, $J = 15.3, 3.6$ Hz, 1H), 2.82 (t, $J = 7.4$ Hz, 4H), 2.67 (dd, $J = 15.4, 6.3$ Hz, 1H), 2.56 – 2.36 (m, 4H), 2.02 – 1.93 (m, 4H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 168.83, 168.30, 144.20, 141.30, 137.89, 133.79, 133.11, 131.95, 131.27, 128.58, 128.54, 128.04, 127.62, 127.46, 126.50, 119.48, 57.40, 46.91, 33.03, 31.15, 30.40, 25.64. **MS (ESI)**: calcd. for $\text{C}_{29}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 517.1719; found: 517.6341. **Analytical HPLC**: $t_{\text{R}} = 22.90$ min.

4.3.7. Synthesis of (S)-2-((4-(dimethylamino)phenyl)sulfonyl)-N-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-s-indacen-4-yl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxamide (JE13)

To a solution of **JE11a** (50 mg, 0.1 mmol) in DMF (0.5 mL), the appropriate amine (44 μL , 0.51 mmol) was added and the mixture was stirred at 120 $^\circ\text{C}$ for 24 h. After testing the reaction by MS (ESI) and TLC, it was observed the formation of the by-product **JE13**, due to the DMF degradation. DMF was removed and water was added to the residue. The organic layer was extracted with AcOEt (3 x 5 mL), washed with a saturated NaCl solution, dried (anhydrous Na_2SO_4), filtered and concentrated under reduced pressure. The carboxamide **JE13** was purified using flash chromatography and preparative HPLC.



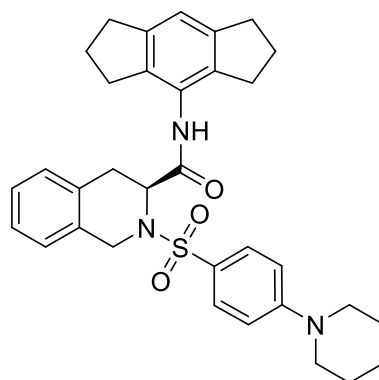
Flash chromatography: Hexane/AcOEt (4:1 \rightarrow 1:1). Preparative HPLC. White solid (30 mg, 57%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 8.11 (s, 1H), 7.74 – 7.69 (m, 2H), 7.23 – 7.10 (m, 4H), 6.93 (s, 1H), 6.72 –

6.67 (m, 2H), 4.67 (d, $J = 13.8$ Hz, 1H), 4.63 (dd, $J = 6.2, 2.9$ Hz, 1H), 4.18 (d, $J = 13.7$ Hz, 1H), 3.36 (dd, $J = 15.1, 3.0$ Hz, 1H), 3.06 (s, 6H), 2.80 (t, $J = 7.4$ Hz, 4H), 2.58 (dd, $J = 14.9, 6.2$ Hz, 1H), 2.53 – 2.32 (m, 4H), 2.00 – 1.90 (m, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 168.69, 143.94, 137.76, 133.84, 132.73, 129.70, 129.61, 128.40, 128.21, 128.07, 127.14, 126.48, 121.96, 118.94, 111.41, 65.99, 57.29, 46.76, 40.29, 33.04, 31.14, 30.41, 25.64. **MS (ESI)**: calcd. for $\text{C}_{30}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 516.2243; found: 516.6479. **Analytical HPLC**: $t_{\text{R}} = 23.20$ min.

4.3.8. General procedure for the synthesis of amine derivatives JE14-JE20 with the general structure of indacenyl tetrahydroisoquinoline carboxamide

To a solution of **JE11a** (1 eq.) in DMSO (5 mL/mmol), the appropriate amine (5 eq.) was added and the mixture was stirred at 120 °C until the MS (ESI) and TLC analysis showed the consumption of the starting material (1-24 h). After the reaction was completed, water was added (5 mL) and the organic fraction was extracted with AcOEt (3 x 5 mL). To remove DMSO traces, the organic layer was washed with water (2 x 5 mL) and a saturated NaCl solution. Then, the organics extracts were dried (anhydrous Na_2SO_4), filtered and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by flash chromatography using a gradient of AcOEt/Hexane or DCM/MeOH. For further purification, preparative HPLC was performed to give amines **JE14-JE20** as white/yellow solids.

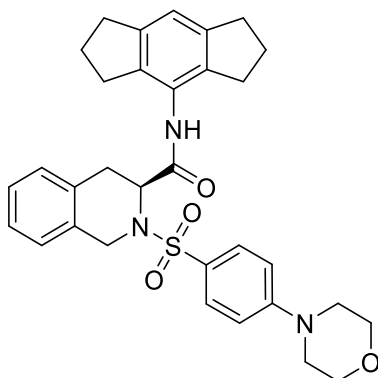
(S)-N-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-s-indacen-4-yl)-2-((4-(piperidin-1-yl)phenyl)sulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxamide (**JE14**)



Flash chromatography: Hexane/AcOEt (3:1 \rightarrow 1:1). Preparative HPLC. White solid (42 mg, 74%). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.08 (s, 1H), 7.70 (d, $J = 9.0$ Hz, 2H), 7.21 – 7.10 (m, 4H), 6.94 – 6.87 (m, 3H), 4.68 – 4.60 (m, 2H), 4.19 (d, $J = 13.8$ Hz, 1H), 3.39 – 3.31 (m, 5H), 2.80 (t, $J = 7.3$ Hz, 4H), 2.60 (dd, $J = 15.1, 6.3$ Hz, 1H), 2.54 – 2.32 (m, 4H), 2.00 – 1.89 (m, 4H), 1.68 (s, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 143.98, 137.77, 137.13, 133.82, 132.68, 129.74, 128.84, 128.43, 128.20, 128.11, 127.17, 126.49,

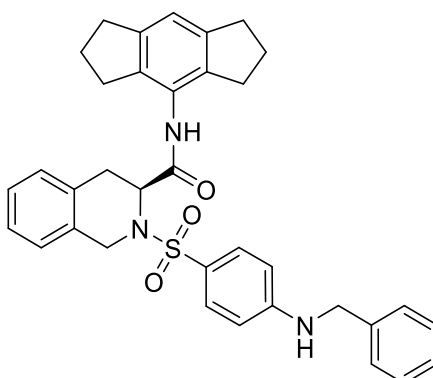
118.97, 115.08, 114.15, 57.31, 48.88, 46.77, 33.06, 31.13, 30.43, 25.65, 25.33, 24.29. **MS (ESI):** calcd. for $C_{33}H_{38}N_3O_3S$ (M+H)⁺: 556.2556; found: 556.6042. **Analytical HPLC:** t_R = 23.65 min.

(S)-N-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-s-indacen-4-yl)-2-((4-morpholinophenyl)sulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxamide (JE15)



Preparative HPLC. White solid (53 mg, 93%). **¹H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.05 (s, 1H), 7.77 – 7.73 (m, 2H), 7.21 – 7.09 (m, 4H), 6.94 (d, J = 9.2 Hz, 3H), 4.67 (d, J = 13.9 Hz, 1H), 4.62 (dd, J = 6.2, 3.1 Hz, 1H), 4.20 (d, J = 13.9 Hz, 1H), 3.90 – 3.85 (m, 4H), 3.36 (dd, J = 15.1, 3.1 Hz, 1H), 3.33 – 3.28 (m, 4H), 2.80 (t, J = 7.3 Hz, 4H), 2.60 (dd, J = 15.0, 6.3 Hz, 1H), 2.54 – 2.33 (m, 4H), 1.99 – 1.90 (m, 4H). **¹³C NMR** (126 MHz, $CDCl_3$) δ 168.49, 154.06, 144.01, 137.76, 133.69, 132.53, 129.71, 128.45, 128.18, 128.14, 127.22, 126.48, 125.77, 119.03, 114.27, 66.49, 57.33, 47.76, 46.79, 33.05, 31.13, 30.43, 25.65. **MS (ESI):** calcd. for $C_{32}H_{36}N_3O_4S$ (M+H)⁺: 558.2348; found: 558.7640. **Analytical HPLC:** t_R = 22.18 min.

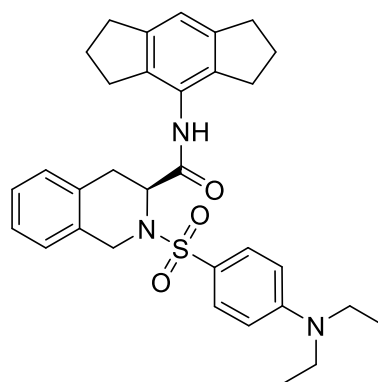
(S)-2-((4-(benzylamino)phenyl)sulfonyl)-N-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-s-indacen-4-yl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxamide (JE16)



Flash chromatography: Hexane/AcOEt (4:1 → 1:1). Preparative HPLC. White solid (48 mg, 81%). **¹H NMR** (500 MHz, $CDCl_3$) δ 8.09 (s, 1H), 7.68 – 7.64 (m, 2H), 7.40 – 7.27 (m, 5H), 7.23 – 7.09 (m, 4H), 6.93 (s, 1H), 6.66 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 4.65 (d, J = 13.9 Hz, 1H), 4.60 (dd, J = 6.2, 3.1 Hz, 1H), 4.37 (s,

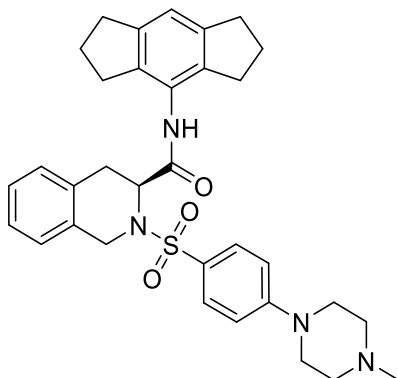
2H), 4.19 (d, $J = 13.9$ Hz, 1H), 3.35 (dd, $J = 15.1, 3.2$ Hz, 1H), 2.80 (t, $J = 7.4$ Hz, 4H), 2.60 (dd, $J = 15.0, 6.2$ Hz, 1H), 2.54 – 2.34 (m, 4H), 1.98 – 1.92 (m, 4H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 168.61, 149.28, 143.98, 141.55, 141.43, 137.77, 134.76, 133.77, 132.66, 129.98, 129.06, 128.42, 128.19, 128.11, 128.00, 127.72, 127.65, 127.26, 127.16, 126.48, 125.50, 118.98, 118.90, 57.29, 46.76, 31.10, 30.43, 25.65. **MS (ESI):** calcd. for $\text{C}_{35}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 578.2399; found: 578.6619. **Analytical HPLC:** $t_{\text{R}} = 23.17$ min.

(S)-2-((4-(diethylamino)phenyl)sulfonyl)-N-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-s-indacen-4-yl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxamide (JE17)



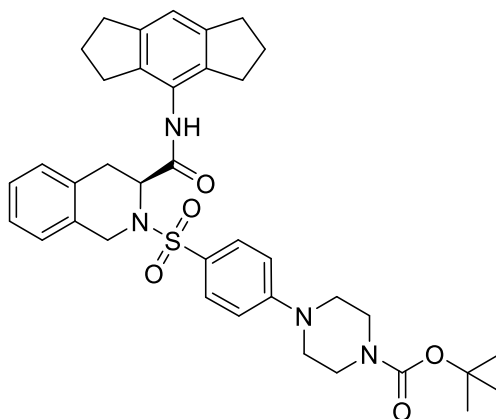
Flash chromatography: Hexane/AcOEt (5:1 \rightarrow 2:1). Preparative HPLC. White solid (33 mg, 60%). ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8.13 (s, 1H), 7.69 – 7.64 (m, 2H), 7.21 – 7.10 (m, 4H), 6.92 (s, 1H), 6.65 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 4.69 – 4.60 (m, 2H), 4.20 (d, $J = 13.7$ Hz, 1H), 3.43 – 3.37 (m, 4H), 3.34 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 2.80 (t, $J = 7.4$ Hz, 4H), 2.64 (dd, $J = 15.0, 6.2$ Hz, 1H), 2.54 – 2.34 (m, 4H), 2.00 – 1.89 (m, 4H), 1.19 (t, $J = 7.1$ Hz, 6H). ^{13}C NMR (126 MHz, CDCl_3) δ 168.76, 151.03, 143.95, 137.76, 134.14, 133.91, 132.85, 129.99, 128.37, 128.23, 128.03, 127.10, 126.49, 118.93, 110.95, 57.30, 46.75, 44.89, 33.05, 31.17, 30.43, 25.65, 12.42. **MS (ESI):** calcd. for $\text{C}_{32}\text{H}_{38}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 544.2556; found: 544.6929. **Analytical HPLC:** $t_{\text{R}} = 24.45$ min.

(S)-N-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-s-indacen-4-yl)-2-((4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)sulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxamide (JE18)



Flash chromatography: DCM/MeOH (9.5:0.5). Preparative HPLC. White solid (55 mg, 95%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.07 (s, 1H), 7.72 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H), 7.22 – 7.10 (m, 4H), 6.94 – 6.86 (m, 3H), 4.70 – 4.58 (m, 2H), 4.19 (d, *J* = 13.8 Hz, 1H), 3.45 – 3.30 (m, 5H), 2.80 (t, *J* = 7.3 Hz, 4H), 2.70 – 2.55 (m, 5H), 2.54 – 2.30 (m, 7H), 2.01 – 1.87 (m, 4H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 168.55, 154.06, 143.98, 137.77, 133.73, 132.58, 129.70, 128.75, 128.44, 128.17, 127.43, 127.19, 126.48, 119.00, 114.23, 57.33, 54.58, 47.03, 46.78, 45.94, 33.05, 31.14, 30.43, 25.65. **MS (ESI):** calcd. for C₃₃H₃₉N₄O₃S (M+H)⁺: 571.2665; found: 571.6873. **Analytical HPLC:** t_R = 16.87 min.

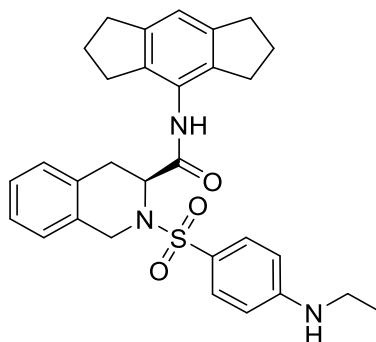
tert-butyl(S)-4-(4-((3-((1,2,3,5,6,7-hexahydro-s-indacen-4-yl)carbamoyl)-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)sulfonyl)phenyl)piperazine-1-carboxylate (JE19)



Flash chromatography: Hexane/AcOEt (5:1 → 2:1). White solid (60 mg, 89%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.09 (s, 1H), 7.74 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.22 – 7.10 (m, 4H), 6.95 – 6.87 (m, 3H), 4.70 – 4.61 (m, 2H), 4.18 (d, *J* = 13.8 Hz, 1H), 3.66 – 3.52 (m, 4H), 3.38 – 3.28 (m, 5H), 2.80 (t, *J* = 7.3 Hz, 4H), 2.61 (dd, *J* = 15.0, 6.2 Hz, 1H), 2.50 – 2.32 (m, 4H), 1.99 – 1.90 (m, 4H), 1.49 (s, 9H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 168.97, 154.78, 153.95, 144.04, 137.82, 133.63, 132.57, 129.77, 128.42, 128.23, 127.95, 127.25, 126.50, 125.16, 119.15, 114.43, 114.32, 80.59, 57.32, 47.39, 46.80, 33.04, 31.19, 30.39,

28.55, 25.64. **MS (ESI)**: calcd. for $C_{37}H_{45}N_4O_5S$ (M+H)⁺: 657.3032; found: 657.6893. **Analytical HPLC**: t_R = 24.53 min.

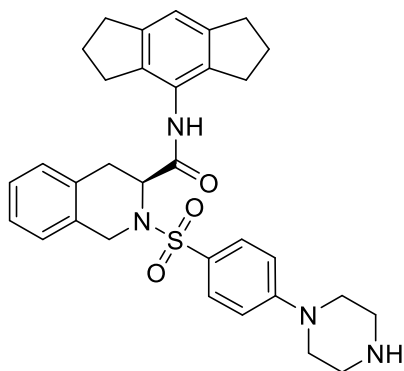
(S)-2-((4-(ethylamino)phenyl)sulfonyl)-N-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-s-indacen-4-yl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxamide (JE20)



Flash chromatography: Hexane/AcOEt (6:1 → 3:1). Preparative HPLC. White solid (58 mg, 87%). **¹H NMR** (500 MHz, CDCl₃) δ 8.24 (s, 1H), 7.71 – 7.66 (m, 2H), 7.24 – 7.13 (m, 4H), 6.94 (s, 1H), 6.64 – 6.58 (m, 2H), 4.71 – 4.65 (m, 2H), 4.11 (d, J = 13.5 Hz, 1H), 3.32 (dd, J = 15.1, 2.9 Hz, 1H), 3.27 – 3.18 (m, 2H), 2.79 (t, J = 7.5 Hz, 4H), 2.69 – 2.60 (m, 1H), 2.48 – 2.28 (m, 4H), 2.05 – 1.94 (m, 4H), 1.29 (t, J = 7.2 Hz, 3H). **¹³C NMR** (126 MHz, CDCl₃) δ 170.90, 152.31, 144.16, 138.09, 133.51, 132.84, 130.11, 128.35, 127.42, 127.25, 127.11, 126.57, 122.46, 119.60, 112.14, 57.30, 46.90, 38.16, 32.99, 31.38, 30.22, 25.61, 14.58. **MS (ESI)**: calcd. for $C_{30}H_{34}N_3O_3S$ (M+H)⁺: 516.2243; found: 516.6802. **Analytical HPLC**: t_R = 22.17 min.

4.3.9. Synthesis of (S)-N-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-s-indacen-4-yl)-2-((4-(piperazin-1-yl)phenyl)sulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxamide (JE21)

Compound **JE19** (39 mg, 0.06 mmol) was dissolved in an HCl 4N solution in dioxane (6 mL). The reaction was stirred for 30 min at rt until the complete removal of Boc protecting group. The mixture was crystallized with diethyl ether (2 mL) and the precipitate was filtered under vacuum. The solid product was purified by preparative HPLC to give target carboxamide **JE21** as a white solid.



Preparative HPLC. White solid (30 mg, 52%). ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.07 (s, 1H), 7.78 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.23 – 7.10 (m, 4H), 6.95 – 6.89 (m, 3H), 4.67 (d, *J* = 14.0 Hz, 1H), 4.61 (dd, *J* = 6.2, 3.4 Hz, 1H), 4.19 (d, *J* = 13.8 Hz, 1H), 3.56 (s, 4H), 3.31 (s, 5H), 2.80 (t, *J* = 7.4 Hz, 4H), 2.65 (dd, *J* = 15.1, 6.0 Hz, 1H), 2.55 – 2.34 (m, 4H), 2.00 – 1.90 (m, 4H). ¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 169.06, 153.10, 144.14, 137.85, 133.48, 132.45, 129.88, 128.41, 128.35, 127.86, 127.45, 127.33, 126.50, 119.30, 115.53, 57.42, 46.82, 45.14, 43.14, 33.03, 31.22, 30.40, 25.64. **MS (ESI):** calcd. for C₃₂H₃₇N₄O₃S (M+H)⁺: 557.2508; found: 557.6636. **Analytical HPLC:** t_R = 14.90 min.

4.4. Experimental section of chapter 3.3

4.4.1. Computational

4.4.1.1. Systems set up

The crystal structure of the murine CD44-HABD at 1.4 Å resolution (PDB ID: 5BZK)¹⁶⁵ was used as a starting point for the computational work. The protein was inserted in a water box of 90 × 90 × 90 Å³ dimensions, and KCl was added up to a final concentration of 150 mM using the CHARMM-GUI Solution Builder server.^{307–309} Two independent systems were built with the **JE25** and **JE22** ligands, respectively. The **JE22** molecule was aligned using the position of the **JE25** ligand present in PDB id 5BZK. The final systems were composed of 66,000 atoms. Five different replicas were run for each system.

4.4.1.2. MD simulations

The CHARMM36 force field^{292,310} was used to model the protein, standard CHARMM parameters were used for ions, and the TIP3P model for H₂O.²⁹³ The charges and parameters for the ligands were searched using the CHARMM-GUI ligand modeler interface²⁹⁴ that generates the ligand force field parameters and necessary structure files by inspecting small molecules in the verified CHARMM force field library or using the CGenFF.³¹¹ The results suggested optimizing the charges and certain dihedral angles as the penalties were high. Geometry, charge, and dihedral optimization were performed for the two ligands according to the following standard protocol. The parameters and partial charges for **JE25** and **JE22** were optimized using the FTK plugin of Visual molecular dynamics (VMD) software as an input generator and a refinement tool. CGenFF 36 parameters used are reported in Tables 7 to 14, and atom types in Figure 71. The equilibrium bonds and angles were obtained after geometry optimization at the MP2/6-31+G(d) level of theory. The target data for the charge validation/optimization was obtained from the optimization of the distances and interaction energies between water molecules and the ligand following the standard CHARMM protocol.²⁹⁴ For the charge optimization, the aliphatic hydrogen atoms were constrained to a partial charge of 0.09 and the aromatic hydrogens of the benzene ring were constrained to 0.115. Bond, angles and improper force constants did not required optimization considering the penalties reported by CHARMM-Gui in the 'Ligand reader and modeler for CHARMM Force Field generation of small molecules' module. Quantum mechanics (QM) interaction-energy calculations were performed at

the MP2/6-31+G(d) level of theory, with diffuse basis functions on non-H atoms (C, O) to correctly estimate interaction energies for an overall system charge. The resulting QM potential energy surface (PES) was used as the reference benchmark, and CHARMM MM partial charges were fitted onto this QM PES with the MCSA algorithm. Torsional potential optimization was done by QM PES scans of magnitude $\chi = 90^\circ$ in intervals of 15 degrees. The dihedrals optimized in the **JE25** ligand were [OG302-CG202-CG321-CG321], [CG321-CG202-OG302-CG331], [CG2R61-CG321-CG321-NG301], [CG2R61-CG321-NG301-CG321], [CG2R61-CG321-NG301-CG321] and [CG321-CG321-NG301-CG321]. The dihedrals optimized in the **JE22** ligand were [CG205-CG321-CG321-NG301], [CG2R61-CG321-CG321-NG301], [CG2R61-CG321-NG301-CG321], [CG321-CG321-NG301-CG321] and [CG331-CG205-CG321-CG321]. The MCSA dihedral fitting procedure for the dihedrals to the QM PES was done with a linear combination of potentials with periodicities $n = 1, 2$ and 3 . The dihedrals were fitted to reproduce the minima on the PES (Figure 71, Tables 7-14, and Figure 72).

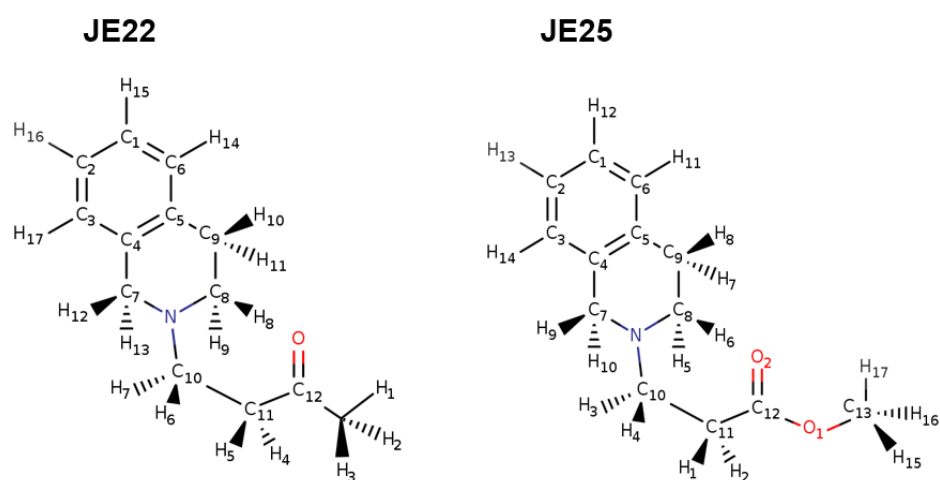


Figure 71. Chemical structures of the **JE22** and **JE25** ligands with the nomenclature used in the CHARMM force-field parameterization.

Table 7. CHARMM force field parameterization of **JE25**. CGenFF 36 atom types and final partial charges.

Name	Type	Partial Charge	Name	Type	Partial Charge
C1	CG2R61	-0.111	N	NG301	-0.378
C2	CG2R61	-0.111	O1	OG302	-0.491
C3	CG2R61	-0.116	O2	OG2D1	-0.626
C4	CG2R61	-0.217	H1/H2	HGA2	0.090
C5	CG2R61	-0.189	H3/H4	HGA2	0.090
C6	CG2R61	-0.113	H10/H9	HGA2	0.090
C7	CG321	0.120	H5/H6	HGA2	0.090

C8	CG321	-0.046	H8/H7	HGA2	0.090
C9	CG321	-0.055	H17/H16/H15	HGA3	0.090
C10	CG321	0.020	H14	HGR61	0.115
C11	CG321	0.348	H13	HGR61	0.115
C12	CG202	0.340	H12	HGR61	0.115
C13	CG331	-0.003	H11	HGR61	0.115

Table 8. CHARMM force field parameterization of **JE22**. CGenFF 36 atom types and final partial charges.

Name	Type	Partial Charge	Name	Type	Partial Charge
C1	CG2R61	-0.109	N	NG301	-0.395
C2	CG2R61	-0.123	O	OG302	-0.451
C3	CG2R61	-0.140	H1/H2/H3	HGA2	0.110
C4	CG2R61	0.021	H4/H5	HGA2	0.104
C5	CG2R61	-0.024	H6/H7	HGA2	0.092
C6	CG2R61	-0.122	H8/H9	HGA2	0.096
C7	CG321	-0.051	H10/H11	HGA2	0.099
C8	CG321	-0.038	H12/H13	HGA2	0.096
C9	CG321	-0.192	H14	HGR61	0.117
C10	CG321	-0.065	H15	HGR61	0.110
C11	CG321	-0.123	H16	HGR61	0.114
C12	CG202	0.296	H17	HGR61	0.099
C13	CG331	-0.228			

Table 9. CHARMM force field parameterization of **JE25**. MP2 equilibrium bond lengths in Å (b_0) and force constants (K_b) in $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{Å}^{-2}$.

Bonds	K_b ($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{Å}^{-2}$)	b_0 (Å)
CG202 CG321	200.0	1.522
CG202 OG2D1	750.0	1.220
CG202 OG302	150.0	1.334
CG2R61 CG2R61	305.0	1.375
CG2R61 CG321	230.0	1.490
CG2R61 HGR61	340.0	1.080

CG321 CG321	222.5	1.530
CG321 NG301	200.0	1.450
CG321 HGA2	309.0	1.111
CG331 OG302	340.0	1.430
CG331 HGA3	322.0	1.111

Table 10. CHARMM force field parameterization of **JE22**. MP2 equilibrium bond lengths in Å (b_0) and force constants (K_b) in kcal·mol⁻¹·Å⁻².

Bonds	K_b (kcal·mol ⁻¹ ·Å ⁻²)	b_0 (Å)
CG205 CG321	330.0	1.500
CG205 CG331	330.0	1.500
CG205 OG2D3	700.0	1.230
CG2R61 CG2R61	305.0	1.375
CG2R61 CG321	230.0	1.490
CG2R61 HGR61	340.0	1.080
CG321 CG321	222.5	1.530
CG321 NG301	200.0	1.450
CG321 HGA2	309.0	1.111
CG331 HGA3	322.0	1.111

Table 11. CHARMM force field parameterization of **JE25**. CGenFF 36 bond angles in degrees (b_0) and force constants (K_b) in kcal·mol⁻¹·rad⁻².

Angles	K_b (kcal·mol ⁻¹ ·rad ⁻²)	b_0 (degrees)
CG321 CG202 OG21	70.0	125.0
CG321 CG202 OG302	55.0	109.0
OG2D1 CG202 OG302	90.0	125.9
CG2R61 CG2R61 CG2R61	40.0	120.0
CG2R61 CG2R61 CG321	45.8	120.0
CG2R61 CG2R61 HGR61	30.0	120.0
CG202 CG321 CG321	52.0	108.0
CG202 CG321 HGA2	33.0	109.5
CG2R61 CG321 CG321	51.8	107.5
CG2R61 CG321 NG301	73.0	109.0

CG2R61 CG321 HGA2	49.3	107.5
CG321 CG321 NG301	57.0	107.0
CG321 CG321 HGA2	26.5	110.1
NG301 CG321 HGA2	32.4	109.0
HGA2 CG321 HGA2	35.5	109.0
OG302 CG331 HGA3	60.0	109.5
HGA3 CG331 HGA3	35.5	108.4
CG321 NG301 CG321	70.0	112.0
CG202 OG302 CG331	40.0	109.6

Table 12. CHARMM force field parameterization of **JE22**. CGenFF 36 bond angles in degrees (b_0) and force constants (K_b) in $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{rad}^{-2}$.

Angles	K_b ($\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{rad}^{-2}$)	b_0 (degrees)
CG321 CG205 CG331	35.0	115.6
CG321 CG205 OG2D3	75.0	122.2
CG331 CG205 OG2D3	75.0	122.2
CG2R61 CG2R61 CG2R61	40.0	120.0
CG2R61 CG2R61 CG321	45.8	120.0
CG2R61 CG2R61 HGR61	30.0	120.0
CG205 CG321 CG321	60.0	113.8
CG205 CG321 HGA2	50.0	109.5
CG2R61 CG321 CG321	51.8	107.5
CG2R61 CG321 NG301	73.0	109.0
CG2R61 CG321 HGA2	49.3	107.5
CG321 CG321 NG301	57.0	107.0
CG321 CG321 HGA2	26.5	110.1
NG301 CG321 HGA2	32.4	109.0
HGA2 CG321 HGA2	35.5	109.0
CG205 CG331 HGA3	50.0	109.5
HGA3 CG331 HGA3	35.5	108.4
CG321 NG301 CG321	70.0	112.0

Table 13. CHARMM force field parameterization of **JE25**. CGenFF 36 torsion parameters with force constants (K_b) in kcal·mol⁻¹. n is the periodicity.

Torsions	K_b (kcal·mol ⁻¹)	n	δ (degrees)
CG2R61 CG2R61 CG321 CG321	0.230	2	180.0
OG302 CG202 CG321 HGA2	0.000	3	0.0
CG321 CG2R61 CG2R61 CG321	2.400	2	180.0
HGR61 CG2R61 CG2R61 HGR61	2.400	2	180.0
NG301 CG321 CG321 HGA2	0.160	3	0.0
HGA2 CG321 CG321 HGA2	0.220	3	0.0
CG2R61 CG2R61 CG321 HGA2	0.002	6	0.0
OG2D1 CG202 CG321 HGA2	0.000	6	180.0
CG2R61 CG2R61 CG2R61 CG2R61	3.10	2	180.0
CG2R61 CG2R61 CG2R61 CG321	3.10	2	180.0
CG321 CG2R61 CG2R61 HGR61	2.40	2	180.0
HGA2 CG321 NG301 CG321	0.10	3	0.0
CG2R61 CG2R61 CG321 NG301	1.00	2	180.0
HGA3 CG331 OG302 CG202	0.00	3	0.0
CG2R61 CG321 CG321 HGA2	0.04	3	0.0
CG202 CG321 CG321 HGA2	0.195	3	0.0
CG2R61 CG2R61 CG2R61 HGR61	4.20	2	180.0
OG302 CG202 CG321 CG321	0.166	2	180.0
CG321 CG321 NG301 CG321	0.4190	2	0.0
CG321 CG321 NG301 CG321	0.914	3	0.0
CG321 CG202 OG302 CG331	2.528	2	180.0
OG21 CG202 OG302 CG331	1.602	1	180.0
OG21 CG202 OG302 CG331	1.922	2	180.0
OG2D1 CG202 CG321 CG321	0.492	6	0.0
CG2R61 CG321 NG301 CG321	1.094	1	0.0
CG2R61 CG321 NG301 CG321	2.292	2	0.0
CG2R61 CG321 CG321 CG321	0.344	3	0.0
CG2R61 CG321 CG321 NG301	0.059	3	0.0
CG202 CG321 CG321 NG301	2.366	3	180.0
CG202 CG321 CG321 NG301	0.411	3	0.0

Table 14. CHARMM force field parameterization of **JE22**. CGenFF 36 torsion parameters with force constants (K_b) in kcal·mol⁻¹. n is the periodicity.

Torsions	K_b (kcal·mol ⁻¹)	n	δ (degrees)
OG2D3 CG205 CG321 HGA2	0.000	3	0.0
HGR61 CG2R61 CG2R61 HGR61	2.400	2	180.0
NG301 CG321 CG321 HGA2	0.16	3	0.0
OG2D3 CG205 CG331 HGA3	0.000	3	0.0
HGA2 CG321 CG321 HGA2	0.220	3	0.0
CG2R61 CG2R61 CG321 HGA2	0.002	6	0.0
CG2R61 CG2R61 CG2R61 CG2R61	3.10	2	180.0
OG2D3 CG205 CG321 CG321	0.75	1	180.0
OG2D3 CG205 CG321 CG321	0.18	2	180.0
OG2D3 CG205 CG321 CG321	0.065	3	180.0
OG2D3 CG205 CG321 CG321	0.030	6	0.0
CG2R61 CG2R61 CG2R61 CG321	3.10	2	180.0
CG205 CG321 CG321 HGA2	0.195	3	0.0
CG321 CG2R61 CG2R61 HGR61	2.40	2	180.0
HGA2 CG321 NG301 CG321	0.10	3	0.0
CG331 CG205 CG321 HGA2	0.10	3	0.0
CG321 CG205 CG331 HGA3	0.10	3	0.0
CG2R61 CG321 CG321 HGA2	0.04	3	0.0
CG202 CG321 CG321 HGA2	0.195	3	0.0
CG2R61 CG2R61 CG2R61 HGR61	4.20	2	180.0
CG331 CG205 CG321 CG321	2.179	1	0.0
CG331 CG205 CG321 CG321	0.193	2	180.0
CG331 CG205 CG321 CG321	0.252	3	0.0
CG331 CG205 CG321 CG321	0.096	6	180.0
CG331 CG205 CG321 CG321	0.332	1	180.0
CG331 CG205 CG321 CG321	0.843	2	0.0
CG331 CG205 CG321 CG321	0.085	3	180.0
CG331 CG205 CG321 CG321	0.428	6	0.0
CG321 CG321 NG301 CG321	1.991	1	180.0
CG321 CG321 NG301 CG321	0.048	3	0.0
CG321 CG321 NG301 CG321	0.660	1	0.0

CG321 CG321 NG301 CG321	2.200	2	0.0
CG321 CG321 NG301 CG321	1.121	3	0.0
CG205 CG321 CG321 NG301	1.375	3	180.0
CG321 CG2R61 CG2R61 CG321	0.037	2	180.0
CG2R61 CG321 NG301 CG321	0.002	2	180.0
CG205 CG321 CG321 NG301	0.362	3	180.0
CG2R61 CG321 NG301 CG321	0.503	1	180.0
CG2R61 G321 NG301 CG321	0.86	2	180.0
CG2R61 CG321 NG301 CG321	0.338	3	0.0
CG2R61 CG321 CG321 NG301	0.288	3	180.0
CG2R61 CG2R61 CG321 CG321	0.018	2	180.0
CG2R61 CG2R61 CG321 CG321	0.829	2	0.0
CG2R61 CG2R61 CG321 N301	0.150	2	0.0
CG2R61 CG2R61 CG321 NG301	0.938	2	0.0

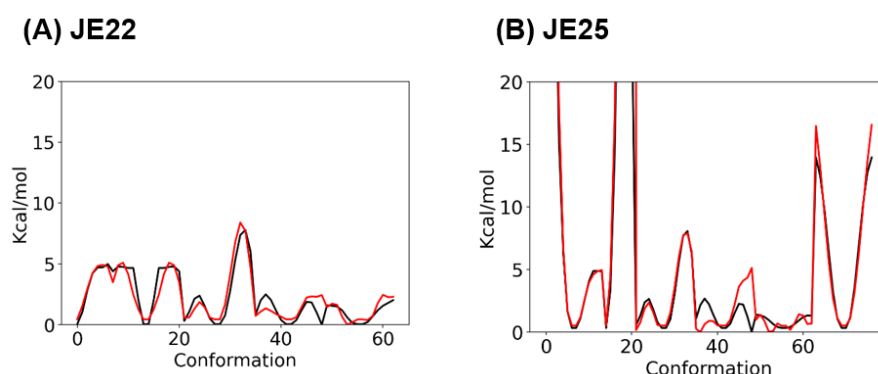


Figure 72. Comparison of the PES from QM calculations in black and the fitted torsions in red for some the torsional angles of (A) JE22 and (B) JE25 optimized.

The protocol for the validation and optimization of the few parameters with high penalties was the same as CGenFF using the FFTK plugin tool of VMD as an input generator and refinement tool. The target data were generated with several quantum *ab initio* methods in Gaussian16. The penalty score returned for every bonded parameter and charge was used to guide the selective optimization of the charges and some dihedral angles; bonds, angles, and improper force constants did not require any optimization.

The same equilibration protocol was used for all the simulations, consisting of 10,000 steps of energy minimization, followed by 10 ns of dynamics in the NPT ensemble with timestep equal to 1 fs and 10 ns of dynamics in the NPT ensemble with timestep equal to 2 fs. In the course of the

equilibration, restraints on the heavy atoms of the protein were gradually reduced to zero in four stages of 50 ps (1.0, 0.5 0.25 and 0.1 kcal mol for the backbone and 0.5, 0.25 0.125 and 0.05 kcal mol for the sidechain). Restraints on heavy atoms of the ligand were also released in a similar way (1.0, 0.5 0.25 and 0.1 kcal mol run for 50 ps each). Long-range electrostatic interactions were calculated with the Particle Mesh Ewald method using a grid spacing of 1.0 Å³¹² and NAMD defaults for spline and κ values. A 12 Å cut-off was applied to non-bonded forces. Both electrostatics and van der Waals forces were smoothly switched off between the switching distance of 10 Å and the cut-off distance of 12 Å, using the default switching function in NAMD. A Verlet neighbour list with pair-list distance of 16 Å was used to evaluate non-bonded neighbouring forces within the pair-list distance.²⁹⁶ The temperature was controlled at 298 K by coupling to a Langevin thermostat with a damping coefficient of 1 ps⁻¹. A pressure of 1 atm was maintained by coupling the system to a Langevin piston, with a damping constant of 25 ps and a period of 50 ps.³¹³ The lengths of covalent bonds involving hydrogen atoms were constrained by the Shake algorithm to use a 2-fs time-step.³¹⁴ The multi-time step algorithm Verlet-l/r-RESPA62^{315,316} was used to integrate the equations of motion. The software NAMD2.14³¹⁷ was used to perform the MD simulations. Each replica was run for 200 ns. In total, 2 μs of dynamics were analyzed after disregarding the equilibration period.

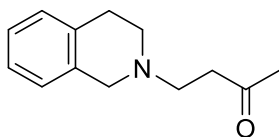
The analysis was performed using in-house python scripts and the pyemma (<http://emma-project.org/latest>) and mdtraj (<https://www.mdtraj.org>) analysis tools.

4.4.2. Chemistry and characterization

JE22²⁴⁹ was synthesized as reported. Although compounds **JE23**³¹⁸ and **JE25**¹⁶⁵ are reported, compound **JE23** was synthesized following the protocol below²⁶⁵ whereas **JE25** was synthesized following the described protocol for **JE1a**.²⁴⁹

4.4.2.1. Synthesis of 4-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)butan-2-one (JE22) (Michael addition)

To a solution of methyl vinyl ketone (**48**) (0.66 mL, 7.88 mmol) and CuBr (I) (11 mg, 0.078 mmol) in DCM (25 mL), THIQ **20** (1 mL, 7.88 mmol) was added dropwise at 0 °C. The reaction mixture was stirred for 30 min at 0 °C and then, 64 h at rt. It was concentrated and the residue was purified by flash chromatography using a gradient of Hexane/AcOEt as eluent (3:1 → 1:1).

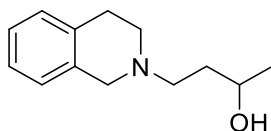


Light-yellow oil (1.211 g, 76%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.16 – 7.06 (m, 3H), 7.01 (d, J = 5.8 Hz, 1H), 3.69 (s, 2H), 2.96 – 2.85 (m, 4H), 2.84 – 2.76 (m, 4H), 2.20 (s, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 207.61, 133.83, 133.73, 128.77, 126.68, 126.53, 125.93, 55.80, 52.33, 50.89, 41.41, 30.32, 28.67.

HRMS (m/z): calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NO}$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$: 204.1310; found: 204.1392.

4.4.2.2. Synthesis of 4-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)butan-2-ol (JE23)

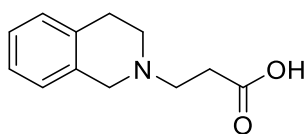
To a solution of **JE22** (0.5 g, 2.5 mmol) in MeOH (5 mL), NaBH_4 (0.15 g, 3.75 mmol) was added for 5 min at 0 °C. The reaction was stirred at rt for 24 h. The mixture was poured into H_2O and MeOH was removed under vacuum. Then, it was extracted with AcOEt (3 x 15 mL), washed with a saturated NaCl solution (1 x 10 mL), dried (anhydrous Na_2SO_4), filtered and concentrated under vacuum. No purification step was needed.



Orange oil (472 mg, 91%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.19 – 7.06 (m, 3H), 7.06 – 6.98 (m, 1H), 4.06 – 3.94 (m, 1H), 3.76 (d, J = 14.9 Hz, 1H), 3.64 (d, J = 14.9 Hz, 1H), 3.02 – 2.94 (m, 1H), 2.93 – 2.87 (m, 2H), 2.86 – 2.77 (m, 1H), 2.76 – 2.69 (m, 1H), 2.68 – 2.59 (m, 1H), 1.81 – 1.68 (m, 1H), 1.62 – 1.54 (m, 1H), 1.19 (d, J = 6.2 Hz, 3H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 134.09, 134.05, 128.60, 126.55, 126.31, 125.74, 69.74, 57.53, 56.37, 50.61, 33.67, 28.90, 23.46. **HRMS (m/z):** calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_{20}\text{NO}$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$: 206.1545; found: 206.1558.

4.4.2.3. Synthesis of 3-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)propanoic acid (JE24)

To a solution of THIQ **20** (1 eq.) and TEA (1 eq.) in absolute EtOH (3 mL/mmol), 3-iodopropanoic acid **50** (1.2 eq.) was added for 5 min at 0 °C. It was stirred at rt for 3 h. Then, the mixture was washed with a saturated NaCl solution (3 x 10 mL), dried (anhydrous Na_2SO_4), filtered and concentrated under vacuum. Purification was carried out by preparative layer chromatography using a mixture of DCM/MeOH (9:1) as eluent.

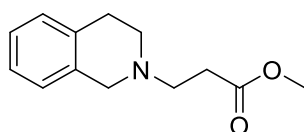


Yellow oil (57 mg, 18%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 11.72 (s, 1H), 7.24 – 7.01 (m, 4H), 3.93 (s, 2H), 3.17 – 2.84 (m, 6H), 2.60 (t, $J = 6.3$ Hz, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 174.15, 132.62, 131.32, 128.78, 127.20, 126.72, 126.46, 77.37, 77.37, 77.05, 76.73, 54.14, 52.42, 49.35, 30.42, 27.35. **HRMS (m/z)**: calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{NO}_2$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$: 206.1181; found: 206.1186.

4.4.2.4. General procedure for the synthesis of compounds JE25 and JE22 (Nucleophilic substitution)

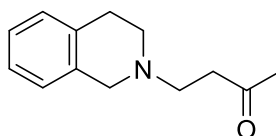
To a solution of THIQ **20** (2 eq.) and TEA (1 eq.) in DCM (3 mL/mmol), the corresponding halide **51** or **49** (1 eq.) was added for 5 min at 0 °C. It was stirred at rt for 20 h for compound **JE25** and 5 h for compound **JE22**. Then, the mixture was washed with a saturated NaCl solution (3 x 10 mL), dried (anhydrous Na_2SO_4), filtered and concentrated under vacuum. Purification was carried out by flash chromatography using a solvent gradient of Hexane/AcOEt (4:1 \rightarrow 1:2) as eluent.

methyl 3-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)propanoate (JE25)



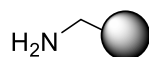
Light-yellow oil (417 mg, 100%). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 7.16 – 7.07 (m, 3H), 7.03 – 6.99 (m, 1H), 3.71 (s, 2H), 3.69 (s, 3H), 2.94 – 2.89 (m, 4H), 2.81 (t, $J = 6$ Hz, 2H), 2.66 (t, $J = 6$ Hz, 2H). $^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 172.82, 133.92, 133.88, 128.77, 126.69, 126.47, 125.89, 55.63, 53.15, 51.84, 50.71, 32.28, 28.72. **HRMS (m/z)**: calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NO}_2$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$: 220.1338; found: 220.1316.

4-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)butan-2-one (JE22)



Light-yellow oil (422 mg, 100%). Characterization in **4.4.2.1.** section.

4.4.2.5. Synthesis of Naked-NPs (52)



Polyvinylpyrrolidone (PVP) (Mw 29,000, 1 eq.) was dissolved in 92% EtOH/8% H₂O for a final volume of 10 mL, and deoxygenated via argon bubbling. Azobisisobutyronitrile (AIBN) (25 eq.) was dissolved in styrene (freshly washed, 0.5 mL) with VBAH (24 eq.) and DVB (freshly washed, 4.65 μL).²¹⁶ The dispersion was deoxygenated with argon bubbling before addition to the PVP/EtOH solution. The mixture was stirred under argon for 1 h before heating to 68 °C for 15 h. NPs were obtained by centrifugation (11,000 g, 15 min) and washed with MeOH (2 × 10 mL) and H₂O (2 × 10 mL). Finally, NPs were stored in H₂O (10 mL) at 4°C.

Particle size distribution: mean diameter: 382.5 nm, PDI = 0.13.

Loading (Ninhydrin): 0.064 mmol/g.

Number of particles per gram: 1.42×10^{13} .

4.4.2.6. Characterization of Naked-NPs (52)

4.4.2.6.1. Solid content (SC) of the emulsion (%)

A known mass of a suspension of polystyrene NPs (0.5-1 mg, suspended in H₂O) was placed in a watch glass, covered with aluminum foil, dried at 25 °C for 15 h, weighed and reweighed to give the mass of NPs. The SC was then calculated according to the following equation:

$$\% SC = \frac{M}{V_S} \times 100$$

where M = mass of NPs (mg), V_s = Volume of suspension (μL).

SC: 3%, 3 mg of NPs in 100 μL of solution.

4.4.2.6.2. Calculation of number of particles per gram

$$N = \frac{6 \times 10^{12}}{\pi \times \rho \times d^3}$$

where N = Number of particles/g for dry powder, ρ = Density of solid spheres (g/cm³), which is 1 g/cm³ for polystyrene, d = Mean diameter (nm).

Result: N = 1.42×10^{13} NPs per gram.

4.4.2.6.3. Calculation of loading of NPs using Fmoc NPs test

Fmoc-(x)-NPs (where x is Fmoc-PEG-OH or Fmoc-Lys(Dde)-OH) were resuspended in 1 mL of 20% piperidine in DMF (3 × 20 min) after which the beads were washed by centrifugation three times, the supernatants combined and the loading was calculated according to the following equation:

$$\text{Loading} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right) = \frac{(A_{302} \times V)}{(\epsilon_{302} \times d \times W)} \times 1000$$

where A_{302} = Absorbance measured at 302 nm, V_{mL} = Volume of combined supernatants, ϵ_{302} = Molar Extinction Coefficient ($7800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) and W_{mg} = Mass of beads.

Result: Loading (Fmoc test): 0.064 mmol/g

4.4.2.6.4. Qualitative ninhydrin test

The reaction control was determined by qualitative ninhydrin test. 12 μL samples of NPs in MeOH (3% SC) in a 0.5 mL capacity eppendorf were washed with MeOH and centrifuged, after which 6 μL of reagent A (4 % w/v phenol in absolute EtOH mixed with 0.65 % w/v KCN in H_2O and diluted in piperidine) and 2 μL of reagent B (0.05 % w/v ninhydrin in absolute EtOH) were added. The beads were mixed well and heated at 100 °C for 3 min. Blue-stained resin beads indicate the presence of primary amines.

4.4.2.7. Determination of NPs concentration (NPs/ μL) by spectrophotometric method

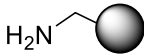
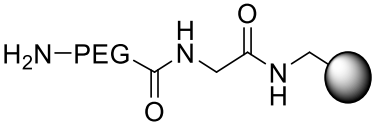
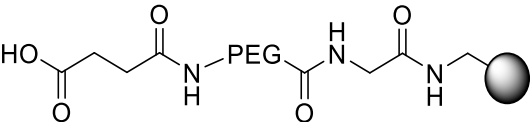
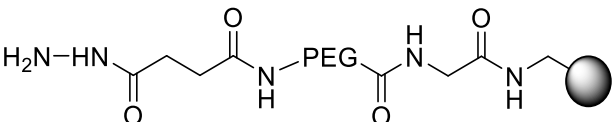
NPs concentration was determined by a spectrophotometric method as described previously. Briefly, measurement of turbidity OD at 600 nm of polystyrene NP suspensions was performed, based on nephelometric principals. Light going through NP suspensions is scattered via reflection, refraction and diffraction phenomena and the intensity of the scattered light, which are proportional to number of NPs in suspension, is recorded by standard spectrophotometers. In this way, calibrate standard curves were obtained for amino-methyl cross-linked polystyrene NPs of 385 nm by NP known concentrations. Calibration curves fitted linear regression models by which the number of NPs per μL corresponding to one unit of OD600 for each size could be determined. Thus, these curves using initial batches of NP suspensions allowed estimation of the number of NPs in final batches, which underwent multiple handling procedures, by OD600 measurement of 1 μL .

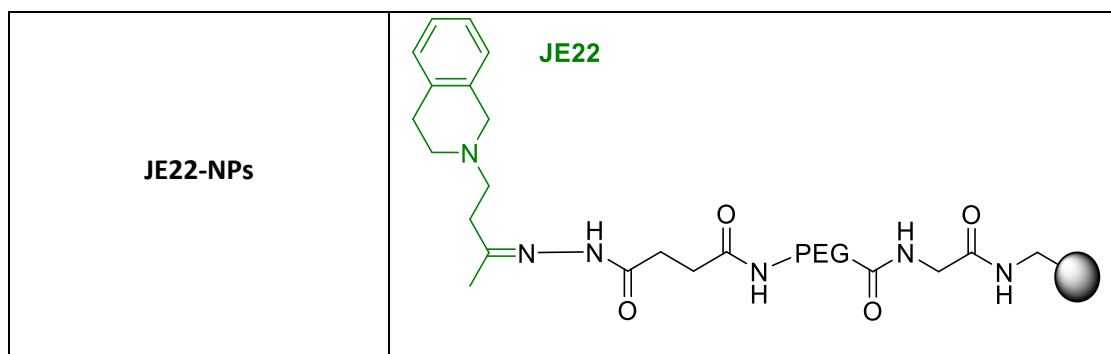
4.4.2.8. Preparation of therapeutic polymeric nanoparticles JE22-NPs

The synthesis of the polymeric nanoparticles **JE22-NPs** is displayed in Scheme 12. Aminomethyl NPs (**Naked-NPs**, **52**) (1 mL, 3% SC, 64 $\mu\text{mol/g}$, 1 μmol , 1 eq.) were synthesized as previously reported (see 4.4.2.5. section for synthetic details). Then, **52** were conditioned in DMF (1 mL × 3 times). N- α -

Fmoc-glycine (Fmoc-Gly-OH) (50 eq.) was mixed in DMF (1 mL) with oxyme (50 eq.) and *N,N'*-diisopropylcarbodiimide (DIC) (50 eq.) for 10 min at 25 °C. Then, this solution was added to **52** and stirred for 2 h at 60 °C at 1,400 rpm on the Thermomixer. Subsequently, the NPs were washed by centrifugation (13,400 rpm, 3-10 min) with DMF, MeOH, and water to obtain Fmoc-Gly-NPs (100% yield, 0.064 mmol g⁻¹ of amino groups). Then, Fmoc deprotection with 20% piperidine/DMF (3 × 20 min) was carried out. Separately, Fmoc-4,7,10-trioxa-1,13-tridecanediamine succinamic acid (Fmoc-PEG-COOH) spacer (50 eq.) was dissolved in DMF (1 mL), then oxyme (50 eq.) and DIC (50 eq.) were added and mixed for 10 min at 25 °C, and this last solution was mixed to NPs for 2 h at 60 °C. Subsequently, Fmoc deprotection was carried out to give **PEGylated-NPs (53)**. Next, a solution of succinic anhydride (50 eq.) and DIPEA (50 eq.) in DMF (1 mL) was added to NPs, sonicated, and mixed for 2 h at 60 °C. Next, **COOH-NPs (54)** were activated with oxyme (50 eq.) and DIC (50 eq.) for 4 h at 25 °C. NPs were centrifuged, and a solution of 55% v/v hydrazine hydrate (75 eq.) in DMF (1 mL) was added, and NPs were left stirring at 25 °C for 15 h. Subsequently, **hydrazine-NPs (55)** were washed and conditioned in MeOH. Finally, **JE22** (10 eq.) was dissolved in MeOH (1 mL) and added to NPs with a drop of TFA, and the resulting mixture was stirred at 25 °C for 15 h on the Thermomixer at 1,400 rpm. **JE22-NPs** were afforded by centrifugation and subsequently washed with DMF (3 × 1 mL), MeOH (3 × 1 mL), and sterile ultrapure H₂O (3 × 1 mL) (Scheme 12 and Table 15).

Table 15. Code, name and structure of synthesized NPs.

Code	Name	Structure
52	Naked-NPs	
53	PEGylated-NPs	
54	COOH-NPs	
55	Hydrazine-NPs	

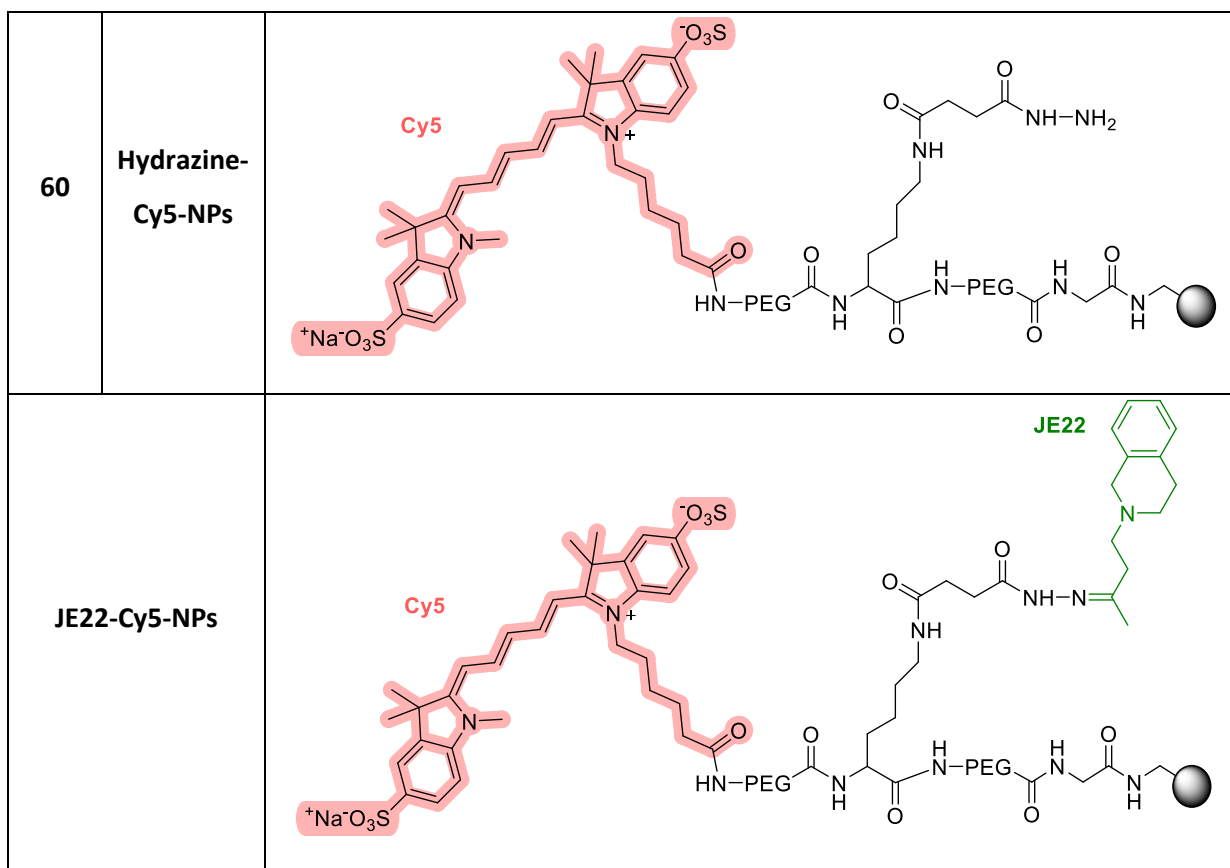


4.4.2.9. Preparation of therapeutic and fluorescent nanoparticles JE22-Cy5-NPs

For the preparation of these NPs, the bifunctionalization of the previously described **53** was performed. Firstly, N- α -Fmoc-N- ϵ -1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohex-1-ylidene)ethyl-L-lysine (Fmoc-Lys(Dde)-OH) (50 eq.) was mixed in DMF (1 mL) with oxyme (50 eq.) and DIC (50 eq.) for 10 min at 25 °C. Then, the solution mixture was added to NPs **53** and stirred on the Thermomixer at 1,400 rpm for 2 h at 60 °C to give **Fmoc-Dde-NPs (56)**. Next, a Fmoc deprotection and a second PEGylation-deprotection step were carried out to obtain the **NH₂-Dde-NPs (57)** and the fluorescent-label of NPs was performed in the next step. NPs **57** were centrifugated, washed (3 x 1 mL) and resuspended in anhydrous DMF (1 mL). Sulfo-Cy5-NHS ester (1 eq.) was dissolved in anhydrous DMF (1 mL) and DIPEA (1 eq.) and subsequently mixed with the NPs on the Thermomixer at 1,400 rpm for 15 h at 25 °C in the dark. **Cy5-Dde-NPs (58)** were centrifugated, washed and afforded. Then, Dde group deprotection was achieved by treatment with 2% hydrazine/DMF (3 x 7 min), and **COOH-Cy5-NPs (59)** and **Hydrazine-Cy5-NPs (60)** were obtained following the previous described synthetic steps. **JE22** was conjugated to NPs using the previous methodology to furnish target **JE22-Cy5-NPs**. Finally, NPs were obtained by centrifugation and subsequently washed several times with DMF (3 x 1 mL), MeOH (3 x 1 mL) and sterile ultrapure H₂O (3 x 1 mL) (Scheme 13 and Table 16).

Table 16. Code, name and structure of synthesized NPs.

Code	Name	Structure
53	PEGylated-NPs	
56	Fmoc-Dde-NPs	
57	NH2-Dde-NPs	
58	Cy5-Dde-NPs	
59	COOH-Cy5-NPs	



4.4.2.10. Characterization of JE22-NPs and JE22-Cy5-NPs

Particle size distribution and mean size were measured using DLS with biological grade water in a disposable cuvette. Zeta potential values were determined on a Zetasizer Nano ZS ZEN 3500 using a transparent cuvette. NPs morphology and shape were analyzed by TEM using a LIBRA 120 PLUS TEM and analyzed with Xei data acquisition software.

4.4.2.11. Stability study of JE22-NPs

For the stability study, 10 μL of NPs were incubated for 24 h in ultrapure water (Milli-Q grade, H_2O mq), DMEM, NaCl 10 mM, NaCl 154 mM, and PBS at pH = 7 at 4 $^\circ\text{C}$ and 37 $^\circ\text{C}$. Then, NPs were centrifuged and prepared in biological grade water, and subsequently, the particle mean size and size distribution were determined by DLS and zeta potential analysis.

4.4.2.12. Determination of conjugation efficiency (CE) of JE22 for JE22-NPs and JE22-Cy5-NPs

Calculation of JE22 CE (%) and loading capacity (LC) was carried out by measurement of the concentration of free JE22 in the supernatant obtained after the centrifugation of NPs by UV spectroscopy at 254 nm. Previously, an absorbance study of JE22 at different concentrations and a

calibration curve with lineal ratio between **JE22** concentration and the OD of the compound was performed. Subsequently, **JE22** LC and CE were calculated based on formulas as follows:

$$LC = \frac{[JE22 \text{ conjugated on nanoparticle surface}]}{\text{Number of NPs}} \times N_A$$

where N_A is Avogadro's number.

$$CE (\%) = \frac{[JE22 \text{ conjugated on nanoparticle surface}]}{\text{Loading of free amine groups on nanoparticle surface}} \times 100$$

4.4.2.13. Determination of CE of Cy5 for JE22-Cy5-NPs

A calibration standard curve with lineal ratio between Cy5 concentration and the OD of Cy5 was performed by spectrophotometry. By measuring the concentration of free fluorophore in the supernatant obtained after centrifuging NPs using UV spectroscopy at 650 nm, the CE and LC of Cy5 were calculated. The calculations were conducted according to the formulas previously described in section 4.4.2.12.

4.4.2.14. Evaluation of drug release profile of JE22-NPs

To determine the efficiency of the hydrolysis of the hydrazone bond of the **JE22-NPs**, samples at acidic and neutral pH were prepared. First, 200 μL (8.81×10^8 NPs/ μL) of NPs were incubated in a PBS solution at pH = 5 and pH = 7 for 120 h in an incubator at 37 °C. Then, the supernatants were collected by centrifuging each sample at $t = 1.5, 3, 6, 24, 48, 72, 96,$ and 120 h, and they were analyzed through HPLC (Agilent 1200 series HPLC system) with a C18 column from Waters CORTECS™ (2.1 mm \times 100 mm, 1.6 μm). The detection of photo diode array (PDA) $e\lambda$ for **JE22** was established at 252 nm. The mobile phase of H₂O (0.1% HCOOH): CH₃CN was supplied at a flow rate of 0.4 mL/min: 0% B, T8: 95% B, T8.1: 0% B, analysis time 10 min. Using standard samples, a calibration curve of **JE22** was prepared. The maximum identification was confirmed by the t_R of **JE22** at 1.55 min. Cumulative release of **JE22** was performed using the following equation:

$$\text{Cumulative JE22 Release (\%)} = \frac{D_t}{D_T} \times 100$$

where D_T is the total concentration of **JE22**-loaded onto the **JE22-NPs**, and D_t is the concentration of **JE22** released from **JE22-NPs** at a given time t .²²⁶

4.4.2.15. Fluorescence determination of JE22-Cy5-NPs by flow cytometry

Conjugation of fluorophore Cy5 to the NPs was checked by flow cytometry using FACSCanto II and Flowjo® 10 software for analysis. The red fluorescence emission of the NPs was detected in the APC channel (660/20 nm).

4.4.2.16. Fluorescence determination of JE22-Cy5-NPs by confocal laser microscopy

The fluorescence emission of the Cy5-labelled NPs was determined by confocal microscopy using a ZEISS LSM 710 confocal laser scanning microscope. ZEN 2012 Blue Edition Image and ImageJ software® (version 1.49b) were used for the analysis. Fluorescence emission was detected in the APC channel.

4.4.3. Biology

4.4.3.1. Study of pH effect on MDA-MB-231 cell viability

MDA-MB-231 cells were seeded in a 96-well plate format (1,000 cells/well) and incubated for 24 h. Each well was then replaced with DMEM media at pH = 5 and incubated for 1.5, 3 and 6 h. Media was replaced with pH = 7.4 DMEM media and cell viability tested at day 5 using PrestoBlue™ cell viability reagent. Cells incubated with normal DMEM media were used as control. Each condition was performed in triplicates.

4.4.3.2. Confocal microscopy analysis

Glass coverslips were coated with poly-L-lysine (10×10^4 cells/well), and then MDA-MB-231 cells were seeded onto them in 24-well plate format. Following incubation time (24 h), cells were stained using an anti-CD44-FITC antibody diluted in MACS® bovine serum albumin (BSA) Stock Solution (1 μ L/400 μ L). Plates were incubated for 10 min on ice in the dark. Then, cells were washed with DMEM media and treated with a new solution of culture media containing **JE22-Cy5-NPs** (1,000 NPs/cell). After 30 min of incubation at 37 °C, the medium was aspirated, and the cells were washed twice with 1 \times PBS and fixed in 4% paraformaldehyde for 10 min at rt. After washing with 1 \times PBS, fixed cells were mounted with DAPI-containing mounting medium (ProLong Gold). A ZEISS LSM 710 confocal laser microscope was used to collect the images using a DIC Plan-Apochromat 63 \times oil immersion objective with 1.40 numerical apertures and the ZEN 2010 software. Images were subsequently analyzed using the Zen 2012 Blue Edition Image and ImageJ® software (version 1.49b).

4.4.3.3. Wound healing assay

MDA-MB-231 cells were seeded in a 12-well plate format at 25×10^4 cells/well and incubated until 90% confluence. Then, cells were gently scratched using a pipette tip, washed with PBS to remove cell debris, and treated with **JE22-NPs** at 20,000 NPs/cell (36 nM) and **JE22** ($EC_{50} = 8 \mu\text{M}$). Untreated cells (DMSO, 0.1% v/v) and cells treated with **Naked-NPs (52)** at 20,000 NPs were used as controls. Images were acquired at time zero and after 24 h of incubation using an Olympus CKX53 microscope (4x objective magnification). Wound areas were measured using ImageJ® software.

4.4.4. Expression and purification of *HsCD44*-HABD

The DNA sequence encoding the human CD44 (*HsCD44*; aa A20 - T175) was codon optimized and synthesized by GenScript (USA) for expression in HEK293F cells. The DNA, containing at the 5' end a recognition sequence for KpnI, and at the 3' end a stop codon and a recognition sequence for XhoI, was cloned into a modified pHLSec containing, after the secretion signal sequence, a 12xHis tag, a superfolder GFP and a TEV cleavage site, rendering the vector pHLSec-12Hist-GFP-TEV-*HsCD44*. The cloning of the construct into the modified pHLSec was performed by GenScript.

pHLSec-12Hist-GFP-TEV-*HsCD44* (20-175) was transfected into HEK293F cell line as described below. For DNA amplification, all plasmids were transformed in *E. coli* DH5 α cells and extracted with PureLink™ Expi Endotoxin-Free Giga Plasmid Purification Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

Cells were grown in suspension in a humidified 37 °C and 8% CO₂ incubator with rotation at 125 rpm. Transfection was performed at a cell density of 2.5×10^6 cell/mL in fresh media F17 serum-free media (Gibco) with 2% Glutamax and 0.1% Kolliphor® P 188. For each 150 mL of culture, 450 μg of the plasmid ($1\mu\text{g}/\mu\text{L}$) was mixed with 135 μL of sterilized 1.5 M NaCl. This mixture was added to each 150 mL cell culture flask and incubated for 5 min in the incubator. After that, 1.35 mg of polyethylenimine "Max" (1 mg/mL) was mixed with 135 μL sterilized 1.5 M NaCl and subsequently the mix was added to the cell culture flask. Cells were diluted 1:1 with pre-warmed media supplemented with valproic acid 24 h post-transfection to a final concentration of 2.2 mM. Then, cells were harvested 6 days post-transfection by spinning down at 300 x g for 5 min, after which the supernatants were collected and centrifuged at 4,000 x g for 15 min.

Supernatant was dialyzed against buffer A (25 mM Tris pH 7.5, 300 mM NaCl) and loaded into a His-Trap Column (GE Healthcare). Protein was eluted with an imidazol gradient in buffer A from 10 mM up to 500 mM. Buffer exchange to 25 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl (buffer B) was carried out using a HiPrep 26/10 Desalting Column (GE Healthcare). TEV protease was then added in a ratio 1:50

(TEV:protein) to the fusion construct in order to cleavage the His-GFP. After 20 h of reaction at 18 °C, the cleavage was satisfactorily verified through sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). TEV protease and GFP were removed from the solution using a His-TrapColumn (GE Healthcare), obtaining an isolated *HsCD44*. The isolated *HsCD44* was then loaded in HiLoad 26/60 Superdex 75 Column (GE Healthcare) in order to eliminate any aggregates, previously equilibrated with buffer B. Quantification of protein was carried out by absorbance at 280 nm using his theoretical extinction coefficient ($\epsilon_{280\text{ nm}}\text{HsCD44} = 11,920\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

4.4.5. STD NMR spectroscopy studies

The study was carried out at 600 MHz NMR, the buffer used was tris-d11 25 mM NaCl 150 mM in D₂O, CD44-HABD concentration was 50 μM and **JE22** concentration was 2 mM. To obtain the epitope, the experiments were carried out at 5 °C, irradiating at 1.06 ppm (on-resonance) and 40 ppm (off-resonance) and using the following saturation times: 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4 and 5 seconds.

4.4.6. DMR studies

4.4.6.1. Drugs and reagents

LMW-HA (50 kDa) was purchased from HAWorks LLC. HMW-HA (875 kDa) and etoposide were purchased from Sigma-Aldrich. Derivative **JE22** was synthesized. Concentrated solutions for compounds (100 mM) were made in DMSO and kept at -20 °C until use. Stock solutions for HAs (10 mg/mL) were made in assay buffer and kept at -20 °C until use. The medium and reagents for cell culture were purchased from Euroclone. *N*-(2-Hydroxyethyl)piperazine-*N'*-ethanesulfonic acid (HEPES) and BSA fraction V were from Sigma-Aldrich.

4.4.6.2. Cells

MDA-MB-231 cells were maintained in DMEM High Glucose supplemented with 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin and 2 mmol/L glutamine. Cells were cultured at 37 °C in 5% CO₂ humidified air.

4.4.6.3. DMR assay

For DMR measurements, the label-free EnSight Multimode Plate Reader through the Corning® Epic® Technology was used. Cells were seeded 20,000 cells/well in a volume of 30 μL onto no-coated, poly-D-lysina coated and fibronectin-coated 384-well DMR microplates and cultured for 20 h to obtain confluent monolayers. On the day of the experiment, cells were manually washed twice and

maintained in the assay buffer (Hanks balanced salt solution with 20 mM HEPES, 0.01% BSA fraction V and 0.1% DMSO) for 90 min before the test. Serial dilutions were made in the assay buffer.

Agonism protocol: a 5-minute baseline was first established, followed by adding compounds manually in a volume of 10 μ L and recording compounds-triggered DMR signal for 60 min. In agonism experiment LMW-HA was tested from the concentration of 2,500 μ g/mL, 1:2 serial dilutions, while CD44 ligands were tested from the concentration of 1 mM, 1:3 serial dilutions.

Antagonism protocol: antagonists were added manually 25 min before reading the 5-minute baseline. After baseline establishment, LMW-HA was injected and DMR signal was recorded for 60 min. Antagonist properties of ligands were measured by assessing the CRC to LMW-HA (from 2,500 μ g/ml, 1:2 serial dilutions) in the absence and in the presence of a fixed concentration of compound (100 μ M). Responses were described as pm shifts over time (sec) following subtraction of values from vehicle-treated wells. Maximum pm modification (peak measured at 60 min time point) was used to generate CRCs after baseline normalization. All the experiments were carried out at 37 °C.

4.4.6.4. Data analysis

All data are expressed as the mean \pm SEM of at least three experiments performed in duplicate. CRCs were fitted to the classical four-parameter logistic nonlinear regression model. Curve fitting was performed using GraphPad Prism software.

5. Conclusiones

1. Se ha desarrollado una metodología sintética que permite obtener derivados de *N*-aril (serie A), 3-(indacen-4-ilcarbamoil)-2-arilsulfonil (serie B) y *N*-alquil (serie C) THIQ.
2. Las técnicas empleadas de espectroscopía de RMN de ^1H y ^{13}C y espectrometría de masas han permitido identificar inequívocamente los 52 compuestos sintetizados en esta memoria.
3. Ocho derivados de THIQ (**JE2e**, **JE5**, **JE6**, **JE8**, **JE11a**, **JE18**, **JE21** y **JE22**) han presentado actividades antiproliferativas frente a la línea tumoral CD44+ MDA-MB-231 inferiores a 10 μM siendo el compuesto **JE5** el más activo con un valor de EC_{50} en el rango submicromolar.
4. La inducción de apoptosis no es el mecanismo por el que los compuestos **JE2e**, **JE5**, **JE6** y **JE22** ejercen su efecto antiproliferativo en la línea tumoral MDA-MB-231.
5. El compuesto **JE5** altera la integridad celular de forma dosis dependiente en un modelo tridimensional de esferoides MDA-MB-231.
6. Los estudios computacionales han demostrado que **JE2e**, **JE5**, **JE6** y **JE22** se unen al CD44-HABD ocupando el bolsillo de unión de la THIQ y alcanzando la zona de unión al HA.
7. Los compuestos **JE2e**, **JE5**, **JE6** y **JE22** impiden la unión de HA marcado fluorescentemente a CD44 en un ensayo de competitividad corroborando los resultados obtenidos mediante MD.
8. Los ensayos de STD NMR han demostrado que el compuesto **JE22** se une al CD44-HABD fundamentalmente a través de los metilenos vecinales a la amina de la THIQ.
9. Los estudios preliminares de DMR muestran que **JE22** disminuye la señal producida por el LMW-HA en la línea tumoral MDA-MB-231.
10. Se ha desarrollado y caracterizado un nanosistema para la conjugación del compuesto **JE22** a NPs de poliestireno mediante la formación de un enlace hidrazona sensible al pH.
11. Este nanosistema permite liberar de forma eficiente y selectiva del compuesto **JE22** en el microambiente tumoral favoreciendo su acción sobre el receptor CD44 en la línea tumoral MDA-MB-231.

5. Conclusions

1. A synthetic methodology has been developed to obtain *N*-aryl (A series), 3-(indacen-4-ylcarbamoyl)-2-arylsulfonyl (B series) and *N*-alkyl (C series) THIQ derivatives.
2. ¹H and ¹³C NMR spectroscopy and mass spectrometry techniques have unequivocally allowed the identification of the 52 compounds synthesized in this work.
3. Eight THIQ derivatives (**JE2e**, **JE5**, **JE6**, **JE8**, **JE11a**, **JE18**, **JE21** and **JE22**) have shown antiproliferative activities against the CD44+ MDA-MB-231 tumor cell line below 10 μM, being compound **JE5** the most active with an EC₅₀ value in the submicromolar range.
4. Induction of apoptosis is not the mechanism by which compounds **JE2e**, **JE5**, **JE6** and **JE22** exert their antiproliferative effect on the MDA-MB-231 tumor cell line.
5. Compound **JE5** alters cell integrity in a dose-dependent manner in a three-dimensional model of MDA-MB-231 spheroids.
6. Computational studies have shown that **JE2e**, **JE5**, **JE6** and **JE22** bind to CD44-HABD occupying the THIQ binding pocket and reaching the HA binding site.
7. Compounds **JE2e**, **JE5**, **JE6** and **JE22** hinder the binding of fluorescently labelled HA to CD44 in a competitive assay corroborating the results obtained by MD.
8. STD NMR assays have shown that compound **JE22** binds to CD44-HABD mainly through the vicinal methylenes to the THIQ amine.
9. Preliminary DMR studies show that **JE22** decreases the signal produced by LMW-HA in the MDA-MB-231 tumor cell line.
10. A nanosystem for the conjugation of compound **JE22** to polystyrene NPs via the formation of a pH-sensitive hydrazone bond has been developed and characterized.
11. This nanosystem allows efficient and selective release of the compound **JE22** in the tumor microenvironment, enhancing its action on the CD44 receptor in the MDA-MB-231 tumor cell line.

6. Bibliography

- (1) World Health Organization. Cancer. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed 2022-11-04).
- (2) Sung, H.; Ferlay, J.; Siegel, R. L.; Laversanne, M.; Soerjomataram, I.; Jemal, A.; Bray, F. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA. Cancer J. Clin.* **2021**, *71* (3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
- (3) International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory. <https://gco.iarc.fr/> (accessed 2022-11-04).
- (4) Henley, S. J.; Ward, E. M.; Scott, S.; Ma, J.; Anderson, R. N.; Firth, A. U.; Thomas, C. C.; Islami, F.; Weir, H. K.; Lewis, D. R.; Sherman, R. L.; Wu, M.; Benard, V. B.; Richardson, L. C.; Jemal, A.; Cronin, K.; Kohler, B. A. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, Part I: National Cancer Statistics. *Cancer* **2020**, *126* (10), 2225–2249. <https://doi.org/10.1002/cncr.32802>.
- (5) Las cifras del cáncer en España 2022. Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). Published online 2022. <https://seom.org/> (accessed 2022-11-04).
- (6) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The next Generation. *Cell* **2011**, *144* (5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- (7) Cooper, G.; Hausman, R. *La Célula*, 6th ed.; Marbán: Madrid, 2013.
- (8) Hanahan, D.; Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **2000**, *100* (1), 57–70. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81683-9).
- (9) Marusyk, A.; Polyak, K. Tumor Heterogeneity: Causes and Consequences. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* **2010**, *1805* (1), 105–117. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.11.002>.
- (10) Marieb, E. N.; Keller, S. M. *Essentials of Human Anatomy & Physiology*, Twelfth edition.; Pearson: NY, NY, 2018.
- (11) Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov.* **2022**, *12* (1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>.

- (12) Vaupel, P.; Schmidberger, H.; Mayer, A. The Warburg Effect: Essential Part of Metabolic Reprogramming and Central Contributor to Cancer Progression. *Int. J. Radiat. Biol.* **2019**, *95* (7), 912–919. <https://doi.org/10.1080/09553002.2019.1589653>.
- (13) Atashzar, M. R.; Baharlou, R.; Karami, J.; Abdollahi, H.; Rezaei, R.; Pourramezan, F.; Zoljalali Moghaddam, S. H. Cancer Stem Cells: A Review from Origin to Therapeutic Implications. *J. Cell. Physiol.* **2020**, *235* (2), 790–803. <https://doi.org/10.1002/jcp.29044>.
- (14) Forouzanfar, M. H.; Alexander, L.; Anderson, H. R.; Bachman, V. F.; Zunt, J. R.; Murray, C. J.; et al. Global, Regional, and National Comparative Risk Assessment of 79 Behavioural, Environmental and Occupational, and Metabolic Risks or Clusters of Risks in 188 Countries, 1990–2013: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet* **2015**, *386* (10010), 2287–2323. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00128-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00128-2).
- (15) Cai, Z.; Liu, Q. Understanding the Global Cancer Statistics 2018: Implications for Cancer Control. *Sci. China Life Sci.* **2021**, *64* (6), 1017–1020. <https://doi.org/10.1007/s11427-019-9816-1>.
- (16) Curtius, K.; Wright, N. A.; Graham, T. A. An Evolutionary Perspective on Field Cancerization. *Nat. Rev. Cancer* **2018**, *18* (1), 19–32. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.102>.
- (17) Laconi, E.; Doratiotto, S.; Vineis, P. The Microenvironments of Multistage Carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* **2008**, *18* (5), 322–329. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.03.019>.
- (18) Arvelo, F.; Sojo, F.; Cotte, C. Tumour Progression and Metastasis. *ecancermedicalscience* **2016**, *10*, 617. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2016.617>.
- (19) Weinberg, R. A. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. *CA. Cancer J. Clin.* **1994**, *44* (3), 160–170. <https://doi.org/10.3322/canjclin.44.3.160>.
- (20) Lee, E. Y. H. P.; Muller, W. J. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, *2* (10), a003236. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003236>.
- (21) Bashyam, M. D.; Animireddy, S.; Bala, P.; Naz, A.; George, S. A. The Yin and Yang of Cancer Genes. *Gene* **2019**, *704*, 121–133. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.04.025>.
- (22) Arruebo, M.; Vilaboa, N.; Sáez-Gutierrez, B.; Lambea, J.; Tres, A.; Valladares, M.; González-Fernández, Á. Assessment of the Evolution of Cancer Treatment Therapies. *Cancers* **2011**, *3* (3), 3279–3330. <https://doi.org/10.3390/cancers3033279>.
- (23) Miller, K. D.; Siegel, R. L.; Lin, C. C.; Mariotto, A. B.; Kramer, J. L.; Rowland, J. H.; Stein, K. D.; Alteri, R.; Jemal, A. Cancer Treatment and Survivorship Statistics, 2016. *CA. Cancer J. Clin.* **2016**, *66* (4), 271–289. <https://doi.org/10.3322/caac.21349>.

- (24) Chakraborty, S.; Rahman, T. The Difficulties in Cancer Treatment. *ecancermedicalscience* **2012**, *6*, ed16. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2012.ed16>.
- (25) Winkler, J.; Abisoye-Ogunniyan, A.; Metcalf, K. J.; Werb, Z. Concepts of Extracellular Matrix Remodelling in Tumour Progression and Metastasis. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 5120. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18794-x>.
- (26) Fallacara, A.; Baldini, E.; Manfredini, S.; Vertuani, S. Hyaluronic Acid in the Third Millennium. *Polymers* **2018**, *10* (7), 701. <https://doi.org/10.3390/polym10070701>.
- (27) Gaffney, J.; Matou-Nasri, S.; Grau-Olivares, M.; Slevin, M. Therapeutic Applications of Hyaluronan. *Mol. Biosyst.* **2010**, *6* (3), 437–443. <https://doi.org/10.1039/B910552M>.
- (28) Kobayashi, T.; Chanmee, T.; Itano, N. Hyaluronan: Metabolism and Function. *Biomolecules* **2020**, *10* (11), 1525. <https://doi.org/10.3390/biom10111525>.
- (29) Noble, P. W. Hyaluronan and Its Catabolic Products in Tissue Injury and Repair. *Matrix Biol.* **2002**, *21* (1), 25–29. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(01\)00184-6](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(01)00184-6).
- (30) Jiang, D.; Liang, J.; Noble, P. W. Hyaluronan as an Immune Regulator in Human Diseases. *Physiol. Rev.* **2011**, *91* (1), 221–264. <https://doi.org/10.1152/physrev.00052.2009>.
- (31) Fraser, J. R. E.; Laurent, T. C.; Laurent, U. B. G. Hyaluronan: Its Nature, Distribution, Functions and Turnover. *J. Intern. Med.* **1997**, *242* (1), 27–33. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.1997.00170.x>.
- (32) Scott, J. E.; Heatley, F. Hyaluronan Forms Specific Stable Tertiary Structures in Aqueous Solution: A ¹³C NMR Study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96* (9), 4850–4855. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.9.4850>.
- (33) Mikelsaar, R.-H.; Scott, J. E. Molecular Modelling of Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan, Compared with Electron Microscopy and NMR Data. Possible Sheets and Tubular Structures in Aqueous Solution. *Glycoconj. J.* **1994**, *11* (2), 65–71. <https://doi.org/10.1007/BF00731145>.
- (34) Scott, J. E.; Cummings, C.; Brass, A.; Chen, Y. Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solution, Investigated by Rotary Shadowing-Electron Microscopy and Computer Simulation. Hyaluronan Is a Very Efficient Network-Forming Polymer. *Biochem. J.* **1991**, *274* (Pt 3), 699–705.
- (35) Cowman, M. K.; Matsuoka, S. Experimental Approaches to Hyaluronan Structure. *Carbohydr. Res.* **2005**, *340* (5), 791–809. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2005.01.022>.

- (36) Karousou, E.; Misra, S.; Ghatak, S.; Dobra, K.; Götte, M.; Vigetti, D.; Passi, A.; Karamanos, N. K.; Skandalis, S. S. Roles and Targeting of the HAS/Hyaluronan/CD44 Molecular System in Cancer. *Matrix Biol.* **2017**, *59*, 3–22. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2016.10.001>.
- (37) Goncharova, V.; Serobyán, N.; Iizuka, S.; Schraufstatter, I.; Ridder, A. de; Povaliy, T.; Wacker, V.; Itano, N.; Kimata, K.; Orlovskaja, I. A.; Yamaguchi, Y.; Khaldoyanidi, S. Hyaluronan Expressed by the Hematopoietic Microenvironment Is Required for Bone Marrow Hematopoiesis *. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287* (30), 25419–25433. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.376699>.
- (38) Toole, B. P. Hyaluronan in Morphogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2001**, *12* (2), 79–87. <https://doi.org/10.1006/scdb.2000.0244>.
- (39) Garantziotis, S.; Savani, R. C. Hyaluronan Biology: A Complex Balancing Act of Structure, Function, Location and Context. *Matrix Biol.* **2019**, *78–79*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2019.02.002>.
- (40) Witschen, P. M.; Chaffee, T. S.; Brady, N. J.; Huggins, D. N.; Knutson, T. P.; LaRue, R. S.; Munro, S. A.; Tiegs, L.; McCarthy, J. B.; Nelson, A. C.; Schwertfeger, K. L. Tumor Cell Associated Hyaluronan-CD44 Signaling Promotes Pro-Tumor Inflammation in Breast Cancer. *Cancers* **2020**, *12* (5), E1325. <https://doi.org/10.3390/cancers12051325>.
- (41) Toole, B. P. Hyaluronan-CD44 Interactions in Cancer: Paradoxes and Possibilities. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15* (24), 7462–7468. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0479>.
- (42) Hascall, V. C.; Laurent, T. C. *Hyaluronan: Structure and Physical Properties*. Glycoforum. <https://www.glycoforum.gr.jp/article/01A2.html> (accessed 2022-11-12).
- (43) Stern, R. Hyaluronan Catabolism: A New Metabolic Pathway. *Eur. J. Cell Biol.* **2004**, *83* (7), 317–325. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00392>.
- (44) Papakonstantinou, E.; Roth, M.; Karakiulakis, G. Hyaluronic Acid: A Key Molecule in Skin Aging. *Dermatoendocrinol.* **2012**, *4* (3), 253–258. <https://doi.org/10.4161/derm.21923>.
- (45) Weigel, P. H. Hyaluronan Synthase: The Mechanism of Initiation at the Reducing End and a Pendulum Model for Polysaccharide Translocation to the Cell Exterior. *Int. J. Cell Biol.* **2015**, *2015*, e367579. <https://doi.org/10.1155/2015/367579>.
- (46) Stoolmiller, A. C.; Dorfman, A. The Biosynthesis of Hyaluronic Acid by Streptococcus. *J. Biol. Chem.* **1969**, *244* (2), 236–246. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)94424-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)94424-8).
- (47) Weigel, P. H. *Bacterial Hyaluronan Synthases -Update-*. Glycoforum. <https://www.glycoforum.gr.jp/article/08A4.html> (accessed 2022-11-12).

- (48) Yang, J.; Cheng, F.; Yu, H.; Wang, J.; Guo, Z.; Stephanopoulos, G. Key Role of the Carboxyl Terminus of Hyaluronan Synthase in Processive Synthesis and Size Control of Hyaluronic Acid Polymers. *Biomacromolecules* **2017**, *18* (4), 1064–1073. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01239>.
- (49) Stern, R.; Asari, A. A.; Sugahara, K. N. Hyaluronan Fragments: An Information-Rich System. *Eur. J. Cell Biol.* **2006**, *85* (8), 699–715. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2006.05.009>.
- (50) Liang, J.; Jiang, D.; Noble, P. W. Hyaluronan as a Therapeutic Target in Human Diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *97*, 186–203. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.10.017>.
- (51) Caon, I.; Bartolini, B.; Parnigoni, A.; Caravà, E.; Moretto, P.; Viola, M.; Karousou, E.; Vigetti, D.; Passi, A. Revisiting the Hallmarks of Cancer: The Role of Hyaluronan. *Semin. Cancer Biol.* **2020**, *62*, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.07.007>.
- (52) Okuda, H.; Kobayashi, A.; Xia, B.; Watabe, M.; Pai, S. K.; Hirota, S.; Xing, F.; Liu, W.; Pandey, P. R.; Fukuda, K.; Modur, V.; Ghosh, A.; Wilber, A.; Watabe, K. Hyaluronan Synthase HAS2 Promotes Tumor Progression in Bone by Stimulating the Interaction of Breast Cancer Stem-Like Cells with Macrophages and Stromal Cells. *Cancer Res.* **2012**, *72* (2), 537–547. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1678>.
- (53) Golshani, R.; Lopez, L.; Estrella, V.; Kramer, M.; Iida, N.; Lokeshwar, V. B. Hyaluronic Acid Synthase-1 Expression Regulates Bladder Cancer Growth, Invasion, and Angiogenesis through CD44. *Cancer Res.* **2008**, *68* (2), 483–491. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2140>.
- (54) Teng, B. P.; Heffler, M. D.; Lai, E. C.; Zhao, Y.-L.; LeVeau, C. M.; Golubovskaya, V. M.; BullardDunn, K. M. Inhibition of Hyaluronan Synthase-3 Decreases Subcutaneous Colon Cancer Growth by Increasing Apoptosis. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2011**, *11* (7), 620–628. <https://doi.org/10.2174/187152011796817655>.
- (55) Lai, E.; Singh, R.; Teng, B.; Zhao, Y.; Sharratt, E.; Howell, G.; Rajput, A.; Bullard Dunn, K. Inhibition of Hyaluronan Synthase-3 Decreases Subcutaneous Colon Cancer Growth in Mice. *Dis. Colon Rectum* **2010**, *53* (4), 475–482. <https://doi.org/10.1007/DCR.0b013e3181c87084>.
- (56) Nagy, N.; Kuipers, H. F.; Frymoyer, A. R.; Ishak, H. D.; Bollyky, J. B.; Wight, T. N.; Bollyky, P. L. 4-Methylumbelliferone Treatment and Hyaluronan Inhibition as a Therapeutic Strategy in Inflammation, Autoimmunity, and Cancer. *Front. Immunol.* **2015**, *6*, 123. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00123>.

- (57) Stern, R. Association between Cancer and “Acid Mucopolysaccharides”: An Old Concept Comes of Age, Finally. *Semin. Cancer Biol.* **2008**, *18* (4), 238–243. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.03.014>.
- (58) Chanmee, T.; Ontong, P.; Itano, N. Hyaluronan: A Modulator of the Tumor Microenvironment. *Cancer Lett.* **2016**, *375* (1), 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.02.031>.
- (59) Dicker, K. T.; Gurski, L. A.; Pradhan-Bhatt, S.; Witt, R. L.; Farach-Carson, M. C.; Jia, X. Hyaluronan: A Simple Polysaccharide with Diverse Biological Functions. *Acta Biomater.* **2014**, *10* (4), 1558–1570. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.019>.
- (60) Harada, H.; Takahashi, M. CD44-Dependent Intracellular and Extracellular Catabolism of Hyaluronic Acid by Hyaluronidase-1 and -2 *. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (8), 5597–5607. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608358200>.
- (61) Schmaus, A.; Bauer, J.; Sleeman, J. P. Sugars in the Microenvironment: The Sticky Problem of HA Turnover in Tumors. *Cancer Metastasis Rev.* **2014**, *33* (4), 1059–1079. <https://doi.org/10.1007/s10555-014-9532-2>.
- (62) Shuster, S.; Frost, G. I.; Csoka, A. B.; Formby, B.; Stern, R. Hyaluronidase Reduces Human Breast Cancer Xenografts in SCID Mice. *Int. J. Cancer* **2002**, *102* (2), 192–197. <https://doi.org/10.1002/ijc.10668>.
- (63) Stern, R. Hyaluronidases in Cancer Biology. *Semin. Cancer Biol.* **2008**, *18* (4), 275–280. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.03.017>.
- (64) Lokeshwar, V. B.; Selzer, M. G. Hyaluronidase: Both a Tumor Promoter and Suppressor. *Semin. Cancer Biol.* **2008**, *18* (4), 281–287. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.03.008>.
- (65) Udabage, L.; Brownlee, G. R.; Waltham, M.; Blick, T.; Walker, E. C.; Heldin, P.; Nilsson, S. K.; Thompson, E. W.; Brown, T. J. Antisense-Mediated Suppression of Hyaluronan Synthase 2 Inhibits the Tumorigenesis and Progression of Breast Cancer. *Cancer Res.* **2005**, *65* (14), 6139–6150. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1622>.
- (66) Liu, M.; Tolg, C.; Turley, E. Dissecting the Dual Nature of Hyaluronan in the Tumor Microenvironment. *Front. Immunol.* **2019**, *10*, 947. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00947>.
- (67) Toole, B. P. Hyaluronan: From Extracellular Glue to Pericellular Cue. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4* (7), 528–539. <https://doi.org/10.1038/nrc1391>.

- (68) Slevin, M.; Kumar, S.; Gaffney, J. Angiogenic Oligosaccharides of Hyaluronan Induce Multiple Signaling Pathways Affecting Vascular Endothelial Cell Mitogenic and Wound Healing Responses *. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (43), 41046–41059. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109443200>.
- (69) Matou-Nasri, S.; Gaffney, J.; Kumar, S.; Slevin, M. Oligosaccharides of Hyaluronan Induce Angiogenesis through Distinct CD44 and RHAMM-Mediated Signalling Pathways Involving Cdc2 and γ -Adducin. *Int. J. Oncol.* **2009**, *35* (4), 761–773. https://doi.org/10.3892/ijo_00000389.
- (70) Sugahara, K. N.; Murai, T.; Nishinakamura, H.; Kawashima, H.; Saya, H.; Miyasaka, M. Hyaluronan Oligosaccharides Induce CD44 Cleavage and Promote Cell Migration in CD44-Expressing Tumor Cells*. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (34), 32259–32265. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300347200>.
- (71) Bouga, H.; Tsouros, I.; Bounias, D.; Kyriakopoulou, D.; Stavropoulos, M. S.; Papageorgakopoulou, N.; Theocharis, D. A.; Vynios, D. H. Involvement of Hyaluronidases in Colorectal Cancer. *BMC Cancer* **2010**, *10*, 499. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-499>.
- (72) Choi, B.-H.; Ryoo, I.; Sim, K. H.; Ahn, H.-J.; Lee, Y. J.; Kwak, M.-K. High Levels of Hyaluronic Acid Synthase-2 Mediate NRF2-Driven Chemoresistance in Breast Cancer Cells. *Biomol. Ther.* **2022**, *30* (4), 368–379. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2022.074>.
- (73) Vizoso, F. J.; Casar, J. M. del; Corte, M. D.; García, I.; Corte, M. G.; Alvarez, A.; García-Muñiz, J. L. Significance of Cytosolic Hyaluronan Levels in Gastric Cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.* **2004**, *30* (3), 318–324. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2003.11.007>.
- (74) Picaud, L.; Thibault, B.; Mery, E.; Ouali, M.; Martinez, A.; Delord, J.-P.; Couderc, B.; Ferron, G. Evaluation of the Effects of Hyaluronic Acid-Carboxymethyl Cellulose Barrier on Ovarian Tumor Progression. *J. Ovarian Res.* **2014**, *7*, 40. <https://doi.org/10.1186/1757-2215-7-40>.
- (75) Tammi, R. H.; Kultti, A.; Kosma, V.-M.; Pirinen, R.; Auvinen, P.; Tammi, M. I. Hyaluronan in Human Tumors: Pathobiological and Prognostic Messages from Cell-Associated and Stromal Hyaluronan. *Semin. Cancer Biol.* **2008**, *18* (4), 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2008.03.005>.
- (76) Day, A. J.; Prestwich, G. D. Hyaluronan-Binding Proteins: Tying Up the Giant *. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (7), 4585–4588. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100036200>.
- (77) Scheibner, K. A.; Lutz, M. A.; Boodoo, S.; Fenton, M. J.; Powell, J. D.; Horton, M. R. Hyaluronan Fragments Act as an Endogenous Danger Signal by Engaging TLR21. *J. Immunol.* **2006**, *177* (2), 1272–1281. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.2.1272>.

- (78) Campo, G. M.; Avenoso, A.; Campo, S.; D'Ascola, A.; Nastasi, G.; Calatroni, A. Small Hyaluronan Oligosaccharides Induce Inflammation by Engaging Both Toll-like-4 and CD44 Receptors in Human Chondrocytes. *Biochem. Pharmacol.* **2010**, *80* (4), 480–490. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.04.024>.
- (79) Jackson, D. G. Immunological Functions of Hyaluronan and Its Receptors in the Lymphatics. *Immunol. Rev.* **2009**, *230* (1), 216–231. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00803.x>.
- (80) Mahoney, D. J.; Blundell, C. D.; Day, A. J. Mapping the Hyaluronan-Binding Site on the Link Module from Human Tumor Necrosis Factor-Stimulated Gene-6 by Site-Directed Mutagenesis *. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (25), 22764–22771. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100666200>.
- (81) Baranova, N. S.; Nilebäck, E.; Haller, F. M.; Briggs, D. C.; Svedhem, S.; Day, A. J.; Richter, R. P. The Inflammation-Associated Protein TSG-6 Cross-Links Hyaluronan via Hyaluronan-Induced TSG-6 Oligomers. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286* (29), 25675–25686. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.247395>.
- (82) Yang, B.; Yang, B. L.; Savani, R. C.; Turley, E. A. Identification of a Common Hyaluronan Binding Motif in the Hyaluronan Binding Proteins RHAMM, CD44 and Link Protein. *EMBO J.* **1994**, *13* (2), 286–296. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1994.tb06261.x>.
- (83) Zöller, M. CD44: Can a Cancer-Initiating Cell Profit from an Abundantly Expressed Molecule? *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11* (4), 254–267. <https://doi.org/10.1038/nrc3023>.
- (84) Lesley, J.; Hyman, R. CD44 Structure and Function. *Front. Biosci.-Landmark* **1998**, *3* (4), 616–630. <https://doi.org/10.2741/A306>.
- (85) Misra, S.; Heldin, P.; Hascall, V. C.; Karamanos, N. K.; Skandalis, S. S.; Markwald, R. R.; Ghatak, S. Hyaluronan–CD44 Interactions as Potential Targets for Cancer Therapy. *FEBS J.* **2011**, *278* (9), 1429–1443. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08071.x>.
- (86) Chen, C.; Zhao, S.; Karnad, A.; Freeman, J. W. The Biology and Role of CD44 in Cancer Progression: Therapeutic Implications. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* **2018**, *11* (1), 64. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0605-5>.
- (87) Naor, D.; Sionov, R. V.; Ish-Shalom, D. CD44: Structure, Function and Association with the Malignant Process. In *Advances in Cancer Research*; Vande Woude, G. F., Klein, G., Eds.; Academic Press, 1997; Vol. 71, pp 241–319. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(08\)60101-3](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(08)60101-3).
- (88) Chen, L.; Fu, C.; Zhang, Q.; He, C.; Zhang, F.; Wei, Q. The Role of CD44 in Pathological Angiogenesis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **2020**, *34* (10), 13125–13139. <https://doi.org/10.1096/fj.202000380RR>.

- (89) Cortes-Dericks, L.; Schmid, R. A. CD44 and Its Ligand Hyaluronan as Potential Biomarkers in Malignant Pleural Mesothelioma: Evidence and Perspectives. *Respir. Res.* **2017**, *18* (1), 58. <https://doi.org/10.1186/s12931-017-0546-5>.
- (90) Senbanjo, L. T.; Chellaiah, M. A. CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Front. Cell Dev. Biol.* **2017**, *5*. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00018>.
- (91) Gomari, M. M.; Farsimadan, M.; Rostami, N.; mahmoudi, Z.; Fadaie, M.; Farhani, I.; Tarighi, P. CD44 Polymorphisms and Its Variants, as an Inconsistent Marker in Cancer Investigations. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **2021**, *787*, 108374. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2021.108374>.
- (92) Yan, Y.; Zuo, X.; Wei, D. Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. *Stem Cells Transl. Med.* **2015**, *4* (9), 1033–1043. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0048>.
- (93) Ponta, H.; Sherman, L.; Herrlich, P. A. CD44: From Adhesion Molecules to Signalling Regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4* (1), 33–45. <https://doi.org/10.1038/nrm1004>.
- (94) Morath, I.; Hartmann, T. N.; Orian-Rousseau, V. CD44: More than a Mere Stem Cell Marker. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2016**, *81*, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.09.009>.
- (95) Medrano-González, P. A.; Rivera-Ramírez, O.; Montaña, L. F.; Rendón-Huerta, E. P. Proteolytic Processing of CD44 and Its Implications in Cancer. *Stem Cells Int.* **2021**, *2021*, e6667735. <https://doi.org/10.1155/2021/6667735>.
- (96) Cichy, J.; Puré, E. The Liberation of CD44. *J. Cell Biol.* **2003**, *161* (5), 839–843. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302098>.
- (97) Naor, D.; Wallach-Dayán, S. B.; Zahalka, M. A.; Sionov, R. V. Involvement of CD44, a Molecule with a Thousand Faces, in Cancer Dissemination. *Semin. Cancer Biol.* **2008**, *18* (4), 260–267. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2008.03.015>.
- (98) Guo, Q.; Yang, C.; Gao, F. The State of CD44 Activation in Cancer Progression and Therapeutic Targeting. *FEBS J.* **2021**, *n/a* (n/a). <https://doi.org/10.1111/febs.16179>.
- (99) Misra, S.; Hascall, V. C.; Markwald, R. R.; Ghatak, S. Interactions between Hyaluronan and Its Receptors (CD44, RHAMM) Regulate the Activities of Inflammation and Cancer. *Front. Immunol.* **2015**, *6*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00201>.
- (100) Xu, H.; Niu, M.; Yuan, X.; Wu, K.; Liu, A. CD44 as a Tumor Biomarker and Therapeutic Target. *Exp. Hematol. Oncol.* **2020**, *9* (1), 36. <https://doi.org/10.1186/s40164-020-00192-0>.

- (101) Sneath, R. J.; Mangham, D. C. The Normal Structure and Function of CD44 and Its Role in Neoplasia. *Mol. Pathol.* **1998**, *51* (4), 191–200. <https://doi.org/10.1136/mp.51.4.191>.
- (102) Gadhoun, Z.; Delaunay, J.; Maquarre, E.; Durand, L.; Lancereaux, V.; Qi, J.; Robert-Lezenes, J.; Chomienne, C.; Smadja-Joffe, F. The Effect of Anti-CD44 Monoclonal Antibodies on Differentiation and Proliferation of Human Acute Myeloid Leukemia Cells. *Leuk. Lymphoma* **2004**, *45* (8), 1501–1510. <https://doi.org/10.1080/1042819042000206687>.
- (103) Wang, Z.; Zhao, K.; Hackert, T.; Zöller, M. CD44/CD44v6 a Reliable Companion in Cancer-Initiating Cell Maintenance and Tumor Progression. *Front. Cell Dev. Biol.* **2018**, *6*, 97. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00097>.
- (104) Ma, L.; Dong, L.; Chang, P. CD44v6 Engages in Colorectal Cancer Progression. *Cell Death Dis.* **2019**, *10* (1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-1265-7>.
- (105) Saito, S.; Okabe, H.; Watanabe, M.; Ishimoto, T.; Iwatsuki, M.; Baba, Y.; Tanaka, Y.; Kurashige, J.; Miyamoto, Y.; Baba, H. CD44v6 Expression Is Related to Mesenchymal Phenotype and Poor Prognosis in Patients with Colorectal Cancer. *Oncol. Rep.* **2013**, *29* (4), 1570–1578. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2273>.
- (106) Du, L.; Wang, H.; He, L.; Zhang, J.; Ni, B.; Wang, X.; Jin, H.; Cahuzac, N.; Mehrpour, M.; Lu, Y.; Chen, Q. CD44 Is of Functional Importance for Colorectal Cancer Stem Cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2008**, *14* (21), 6751–6760. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1034>.
- (107) Thapa, R.; Wilson, G. D. The Importance of CD44 as a Stem Cell Biomarker and Therapeutic Target in Cancer. *Stem Cells Int.* **2016**, *2016*, 1–15. <https://doi.org/10.1155/2016/2087204>.
- (108) Luo, Z.; Wu, R.-R.; Lv, L.; Li, P.; Zhang, L.-Y.; Hao, Q.-L.; Li, W. Prognostic Value of CD44 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer: A Systematic Review. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2014**, *7* (7), 3632–3646.
- (109) Roosta, Y.; Sanaat, Z.; Nikanfar, A. R.; Dolatkah, R.; Fakhrjou, A. Predictive Value of CD44 for Prognosis in Patients with Breast Cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* **2020**, *21* (9), 2561–2567. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2020.21.9.2561>.
- (110) Wang, Z.; Tang, Y.; Xie, L.; Huang, A.; Xue, C.; Gu, Z.; Wang, K.; Zong, S. The Prognostic and Clinical Value of CD44 in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 309. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00309>.

- (111) Banerji, S.; Day, A. J.; Kahmann, J. D.; Jackson, D. G. Characterization of a Functional Hyaluronan-Binding Domain from the Human CD44 Molecule Expressed in *Escherichia Coli*. *Protein Expr. Purif.* **1998**, *14* (3), 371–381. <https://doi.org/10.1006/prep.1998.0971>.
- (112) Teriete, P.; Banerji, S.; Noble, M.; Blundell, C. D.; Wright, A. J.; Pickford, A. R.; Lowe, E.; Mahoney, D. J.; Tammi, M. I.; Kahmann, J. D.; Campbell, I. D.; Day, A. J.; Jackson, D. G. Structure of the Regulatory Hyaluronan Binding Domain in the Inflammatory Leukocyte Homing Receptor CD44. *Mol. Cell* **2004**, *13* (4), 483–496. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(04\)00080-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(04)00080-2).
- (113) Banerji, S.; Wright, A. J.; Noble, M.; Mahoney, D. J.; Campbell, I. D.; Day, A. J.; Jackson, D. G. Structures of the Cd44-Hyaluronan Complex Provide Insight into a Fundamental Carbohydrate-Protein Interaction. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2007**, *14* (3), 234–239. <https://doi.org/10.1038/nsmb1201>.
- (114) Bajorath, J.; Greenfield, B.; Munro, S. B.; Day, A. J.; Aruffo, A. Identification of CD44 Residues Important for Hyaluronan Binding and Delineation of the Binding Site. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (1), 338–343. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.1.338>.
- (115) Jana, M.; Bandyopadhyay, S. Conformational Flexibility of a Protein–Carbohydrate Complex and the Structure and Ordering of Surrounding Water. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14* (18), 6628–6638. <https://doi.org/10.1039/C2CP24104H>.
- (116) Peach, R.; Hollenbaugh, D.; Stamenkovic, I.; Aruffo, A. Identification of Hyaluronic Acid Binding Sites in the Extracellular Domain of CD44. *J. Cell Biol.* **1993**, *122* (1), 257–264. <https://doi.org/10.1083/jcb.122.1.257>.
- (117) Ogino, S.; Nishida, N.; Umemoto, R.; Suzuki, M.; Takeda, M.; Terasawa, H.; Kitayama, J.; Matsumoto, M.; Hayasaka, H.; Miyasaka, M.; Shimada, I. Two-State Conformations in the Hyaluronan-Binding Domain Regulate CD44 Adhesiveness under Flow Condition. *Struct. Lond. Engl.* **2010**, *18* (5), 649–656. <https://doi.org/10.1016/j.str.2010.02.010>.
- (118) Takeda, M.; Terasawa, H.; Sakakura, M.; Yamaguchi, Y.; Kajiwara, M.; Kawashima, H.; Miyasaka, M.; Shimada, I. Hyaluronan Recognition Mode of CD44 Revealed by Cross-Saturation and Chemical Shift Perturbation Experiments. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (44), 43550–43555. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308199200>.
- (119) Takeda, M.; Ogino, S.; Umemoto, R.; Sakakura, M.; Kajiwara, M.; Sugahara, K. N.; Hayasaka, H.; Miyasaka, M.; Terasawa, H.; Shimada, I. Ligand-Induced Structural Changes of the CD44 Hyaluronan-Binding Domain Revealed by NMR*. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281* (52), 40089–40095. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608425200>.

- (120) Chanmee, T.; Ontong, P.; Kimata, K.; Itano, N. Key Roles of Hyaluronan and Its CD44 Receptor in the Stemness and Survival of Cancer Stem Cells. *Front. Oncol.* **2015**, *5*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00180>.
- (121) Murai, T. Lipid Raft-Mediated Regulation of Hyaluronan–CD44 Interactions in Inflammation and Cancer. *Front. Immunol.* **2015**, *6*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00420>.
- (122) Spinelli, F. M.; Vitale, D. L.; Demarchi, G.; Cristina, C.; Alaniz, L. The Immunological Effect of Hyaluronan in Tumor Angiogenesis. *Clin. Transl. Immunol.* **2015**, *4* (12), e52. <https://doi.org/10.1038/cti.2015.35>.
- (123) Freeman, S. A.; Vega, A.; Riedl, M.; Collins, R. F.; Ostrowski, P. P.; Woods, E. C.; Bertozzi, C. R.; Tammi, M. I.; Lidke, D. S.; Johnson, P.; Mayor, S.; Jaqaman, K.; Grinstein, S. Transmembrane Pickets Connect Cyto- and Pericellular Skeletons Forming Barriers to Receptor Engagement. *Cell* **2018**, *172* (1), 305–317.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.023>.
- (124) Szataneck, R.; Baj-Krzyworzeka, M. CD44 and Tumor-Derived Extracellular Vesicles (TEVs). Possible Gateway to Cancer Metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (3), 1463. <https://doi.org/10.3390/ijms22031463>.
- (125) Miletti-González, K. E.; Chen, S.; Muthukumaran, N.; Saglimbeni, G. N.; Wu, X.; Yang, J.; Apolito, K.; Shih, W. J.; Hait, W. N.; Rodríguez-Rodríguez, L. The CD44 Receptor Interacts with P-Glycoprotein to Promote Cell Migration and Invasion in Cancer. *Cancer Res.* **2005**, *65* (15), 6660–6667. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3478>.
- (126) Misra, S.; Ghatak, S.; Toole, B. P. Regulation of MDR1 Expression and Drug Resistance by a Positive Feedback Loop Involving Hyaluronan, Phosphoinositide 3-Kinase, and ErbB2 *♦. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280* (21), 20310–20315. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500737200>.
- (127) Yaghobi, Z.; Movassaghpour, A.; Talebi, M.; Abdoli Shadbad, M.; Hajiasgharzadeh, K.; Pourvahdani, S.; Baradaran, B. The Role of CD44 in Cancer Chemoresistance: A Concise Review. *Eur. J. Pharmacol.* **2021**, *903*, 174147. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174147>.
- (128) Tremmel, M.; Matzke, A.; Albrecht, I.; Laib, A. M.; Olaku, V.; Ballmer-Hofer, K.; Christofori, G.; Héroult, M.; Augustin, H. G.; Ponta, H.; Orian-Rousseau, V. A CD44v6 Peptide Reveals a Role of CD44 in VEGFR-2 Signaling and Angiogenesis. *Blood* **2009**, *114* (25), 5236–5244. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-04-219204>.
- (129) Chaudhry, G.-S.; Akim, A.; Naveed Zafar, M.; Safdar, N.; Sung, Y. Y.; Muhammad, T. S. T. Understanding Hyaluronan Receptor (CD44) Interaction, HA-CD44 Activated Potential Targets in

Cancer Therapeutics. *Adv. Pharm. Bull.* **2021**, *11* (3), 426–438. <https://doi.org/10.34172/apb.2021.050>.

(130) Shakouri, A.; Parvan, R.; Adljouy, N.; Abdolalizadeh, J. Purification of Hyaluronidase as an Anticancer Agent Inhibiting CD44. *Biomed. Chromatogr.* **2020**, *34* (1), e4709. <https://doi.org/10.1002/bmc.4709>.

(131) Provenzano, P. P.; Cuevas, C.; Chang, A. E.; Goel, V. K.; Von Hoff, D. D.; Hingorani, S. R. Enzymatic Targeting of the Stroma Ablates Physical Barriers to Treatment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* **2012**, *21* (3), 418–429. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.01.007>.

(132) Kudo, D.; Suto, A.; Hakamada, K. The Development of a Novel Therapeutic Strategy to Target Hyaluronan in the Extracellular Matrix of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18* (3), 600. <https://doi.org/10.3390/ijms18030600>.

(133) Lokeshwar, V. B.; Mirza, S.; Jordan, A. Targeting Hyaluronic Acid Family for Cancer Chemoprevention and Therapy. *Adv. Cancer Res.* **2014**, *123*, 35–65. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800092-2.00002-2>.

(134) Kultti, A.; Pasonen-Seppänen, S.; Jauhiainen, M.; Rilla, K. J.; Kärnä, R.; Pyöriä, E.; Tammi, R. H.; Tammi, M. I. 4-Methylumbelliferone Inhibits Hyaluronan Synthesis by Depletion of Cellular UDP-Glucuronic Acid and Downregulation of Hyaluronan Synthase 2 and 3. *Exp. Cell Res.* **2009**, *315* (11), 1914–1923. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.03.002>.

(135) Nagase, H.; Kudo, D.; Suto, A.; Yoshida, E.; Suto, S.; Negishi, M.; Kakizaki, I.; Hakamada, K. 4-Methylumbelliferone Suppresses Hyaluronan Synthesis and Tumor Progression in SCID Mice Intraperitoneally Inoculated With Pancreatic Cancer Cells. *Pancreas* **2017**, *46* (2), 190–197. <https://doi.org/10.1097/MPA.0000000000000741>.

(136) Rosato, A.; Banzato, A.; De Luca, G.; Renier, D.; Bettella, F.; Pagano, C.; Esposito, G.; Zanovello, P.; Bassi, P. HYAD1-P20: A New Paclitaxel-Hyaluronic Acid Hydrosoluble Bioconjugate for Treatment of Superficial Bladder Cancer. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **2006**, *24* (3), 207–215. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2005.08.020>.

(137) Rudrabhatla, S. R.; Mahaffey, C. L.; Mummert, M. E. Tumor Microenvironment Modulates Hyaluronan Expression: The Lactate Effect. *J. Invest. Dermatol.* **2006**, *126* (6), 1378–1387. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700255>.

- (138) Mummert, M. E.; Mohamadzadeh, M.; Mummert, D. I.; Mizumoto, N.; Takashima, A. Development of a Peptide Inhibitor of Hyaluronan-Mediated Leukocyte Trafficking. *J. Exp. Med.* **2000**, *192* (6), 769–780. <https://doi.org/10.1084/jem.192.6.769>.
- (139) Paul, C. P.; Good, P. D.; Winer, I.; Engelke, D. R. Effective Expression of Small Interfering RNA in Human Cells. *Nat. Biotechnol.* **2002**, *20* (5), 505–508. <https://doi.org/10.1038/nbt0502-505>.
- (140) Ganesh, S.; Iyer, A. K.; Morrissey, D. V.; Amiji, M. M. Hyaluronic Acid Based Self-Assembling Nanosystems for CD44 Target Mediated siRNA Delivery to Solid Tumors. *Biomaterials* **2013**, *34* (13), 3489–3502. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.01.077>.
- (141) Kim, S.; Kil, W. H.; Lee, J.; Oh, S.-J.; Han, J.; Jeon, M.; Jung, T.; Lee, S. K.; Bae, S. Y.; Lee, H. C.; Lee, J. H.; Yi, H. W.; Kim, S. W.; Nam, S. J.; Lee, J. E. Zerumbone Suppresses EGF-Induced CD44 Expression through the Inhibition of STAT3 in Breast Cancer Cells. *Oncol. Rep.* **2014**, *32* (6), 2666–2672. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3514>.
- (142) Wang, C.; Wang, Z.; Chen, C.; Fu, X.; Wang, J.; Fei, X.; Yan, X.; Xu, R. A Low MW Inhibitor of CD44 Dimerization for the Treatment of Glioblastoma. *Br. J. Pharmacol.* **2020**, *177* (13), 3009–3023. <https://doi.org/10.1111/bph.15030>.
- (143) Zeidler, A.; Bräuer, R.; Thoss, K.; Bahnsen, J.; Heinrichs, V.; Jablonski-Westrich, D.; Wroblewski, M.; Rebstock, S.; Hamann, A. Therapeutic Effects of Antibodies against Adhesion Molecules in Murine Collagen Type II-Induced Arthritis. *Autoimmunity* **1995**, *21* (4), 245–252. <https://doi.org/10.3109/08916939509001943>.
- (144) Mikecz, K.; Brennan, F. R.; Kim, J. H.; Glant, T. T. Anti-CD44 Treatment Abrogates Tissue Aedema and Leukocyte Infiltration in Murine Arthritis. *Nat. Med.* **1995**, *1* (6), 558–563. <https://doi.org/10.1038/nm0695-558>.
- (145) Kashima, Y.; Takahashi, M.; Shiba, Y.; Itano, N.; Izawa, A.; Koyama, J.; Nakayama, J.; Taniguchi, S.; Kimata, K.; Ikeda, U. Crucial Role of Hyaluronan in Neointimal Formation after Vascular Injury. *PLoS One* **2013**, *8* (3), e58760. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058760>.
- (146) Heider, K.-H.; Sproll, M.; Susani, S.; Patzelt, E.; Beaumier, P.; Ostermann, E.; Ahorn, H.; Adolf, G. R. Characterization of a High-Affinity Monoclonal Antibody Specific for CD44v6 as Candidate for Immunotherapy of Squamous Cell Carcinomas. *Cancer Immunol. Immunother.* **1996**, *43* (4), 245–253. <https://doi.org/10.1007/s002620050329>.
- (147) Rupp, U.; Schoendorf-Holland, E.; Eichbaum, M.; Schuetz, F.; Lauschner, I.; Schmidt, P.; Staab, A.; Hanft, G.; Huober, J.; Sinn, H.-P.; Sohn, C.; Schneeweiss, A. Safety and Pharmacokinetics of

Bivatuzumab Mertansine in Patients with CD44v6-Positive Metastatic Breast Cancer: Final Results of a Phase I Study. *Anticancer. Drugs* **2007**, *18* (4), 477–485. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e32801403f4>.

(148) Riechelmann, H.; Sauter, A.; Golze, W.; Hanft, G.; Schroen, C.; Hoermann, K.; Erhardt, T.; Gronau, S. Phase I Trial with the CD44v6-Targeting Immunoconjugate Bivatuzumab Mertansine in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Oral Oncol.* **2008**, *44* (9), 823–829. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2007.10.009>.

(149) Uchino, M.; Kojima, H.; Wada, K.; Imada, M.; Onoda, F.; Satofuka, H.; Utsugi, T.; Murakami, Y. Nuclear β -Catenin and CD44 Upregulation Characterize Invasive Cell Populations in Non-Aggressive MCF-7 Breast Cancer Cells. *BMC Cancer* **2010**, *10*, 414. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-414>.

(150) Li, L.; Hao, X.; Qin, J.; Tang, W.; He, F.; Smith, A.; Zhang, M.; Simeone, D. M.; Qiao, X. T.; Chen, Z.-N.; Lawrence, T. S.; Xu, L. Antibody Against CD44s Inhibits Pancreatic Tumor Initiation and Postradiation Recurrence in Mice. *Gastroenterology* **2014**, *146* (4), 1108-1118.e12. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.12.035>.

(151) Zhang, S.; Wu, C. C. N.; Fecteau, J.-F.; Cui, B.; Chen, L.; Zhang, L.; Wu, R.; Rassenti, L.; Lao, F.; Weigand, S.; Kipps, T. J. Targeting Chronic Lymphocytic Leukemia Cells with a Humanized Monoclonal Antibody Specific for CD44. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2013**, *110* (15), 6127–6132. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221841110>.

(152) Xu, Y.; Stamenkovic, I.; Yu, Q. CD44 Attenuates Activation of the Hippo Signaling Pathway and Is a Prime Therapeutic Target for Glioblastoma. *Cancer Res.* **2010**, *70* (6), 2455–2464. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2505>.

(153) Slomiany, M. G.; Dai, L.; Bomar, P. A.; Knackstedt, T. J.; Kranc, D. A.; Tolliver, L.; Maria, B. L.; Toole, B. P. Abrogating Drug Resistance in Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors by Disrupting Hyaluronan-CD44 Interactions with Small Hyaluronan Oligosaccharides. *Cancer Res.* **2009**, *69* (12), 4992–4998. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0143>.

(154) Slomiany, M. G.; Dai, L.; Tolliver, L. B.; Grass, G. D.; Zeng, Y.; Toole, B. P. Inhibition of Functional Hyaluronan-CD44 Interactions in CD133-Positive Primary Human Ovarian Carcinoma Cells by Small Hyaluronan Oligosaccharides. *Clin. Cancer Res.* **2009**, *15* (24), 7593–7601. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-2317>.

- (155) Ghatak, S.; Misra, S.; Toole, B. P. Hyaluronan Oligosaccharides Inhibit Anchorage-Independent Growth of Tumor Cells by Suppressing the Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Cell Survival Pathway *. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277 (41), 38013–38020. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202404200>.
- (156) Alaniz, L.; García, M. G.; Gallo-Rodriguez, C.; Agusti, R.; Sterín-Speziale, N.; Hajos, S. E.; Alvarez, E. Hyaluronan Oligosaccharides Induce Cell Death through PI3-K/Akt Pathway Independently of NF-KappaB Transcription Factor. *Glycobiology* **2006**, 16 (5), 359–367. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwj085>.
- (157) Yeh, C.-J.; Zulueta, M. M. L.; Li, Y.-K.; Hung, S.-C. Synthesis of Hyaluronic Acid Oligosaccharides with a GlcNAc–GlcA Repeating Pattern and Their Binding Affinity with CD44. *Org. Biomol. Chem.* **2020**, 18 (28), 5370–5387. <https://doi.org/10.1039/D0OB01048K>.
- (158) Collis, D. W. P.; Yilmaz, G.; Yuan, Y.; Monaco, A.; Ochbaum, G.; Shi, Y.; O'Malley, C.; Uzunova, V.; Napier, R.; Bitton, R.; Becer, C. R.; Azevedo, H. S. Hyaluronan (HA)-Inspired Glycopolymers as Molecular Tools for Studying HA Functions. *RSC Chem. Biol.* **2021**, 2 (2), 568–576. <https://doi.org/10.1039/D0CB00223B>.
- (159) Lu, X.; Huang, X. Design and Syntheses of Hyaluronan Oligosaccharide Conjugates as Inhibitors of CD44-Hyaluronan Binding. *Glycoconj. J.* **2015**, 32 (7), 549–556. <https://doi.org/10.1007/s10719-015-9597-3>.
- (160) Harada, H.; Nakata, T.; Hirota-Takahata, Y.; Tanaka, I.; Nakajima, M.; Takahashi, M. F-16438s, Novel Binding Inhibitors of CD44 and Hyaluronic Acid. I. Establishment of an Assay Method and Biological Activity. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2006**, 59 (12), 770–776. <https://doi.org/10.1038/ja.2006.101>.
- (161) Hirota-Takahata, Y.; Harada, H.; Tanaka, I.; Nakata, T.; Nakajima, M.; Takahashi, M. F-19848 A, a Novel Inhibitor of Hyaluronic Acid Binding to Cellular Receptor CD44. *J. Antibiot. (Tokyo)* **2007**, 60 (10), 633–639. <https://doi.org/10.1038/ja.2007.81>.
- (162) Nguyen, T. T.; Tran, D. P.; Pham Dinh Quoc Huy; Hoang, Z.; Carloni, P.; Van Pham, P.; Nguyen, C.; Li, M. S. Ligand Binding to Anti-Cancer Target CD44 Investigated by Molecular Simulations. *J. Mol. Model.* **2016**, 22 (7), 165. <https://doi.org/10.1007/s00894-016-3029-6>.
- (163) Slevin, M. L. The Clinical Pharmacology of Etoposide. *Cancer* **1991**, 67 (1 Suppl), 319–329. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19910101\)67:1+<319::aid-cncr2820671319>3.0.co;2-d](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19910101)67:1+<319::aid-cncr2820671319>3.0.co;2-d).
- (164) Aguirre-Alvarado, C.; Segura-Cabrera, A.; Velázquez-Quesada, I.; Hernández-Esquível, M. A.; García-Pérez, C. A.; Guerrero-Rodríguez, S. L.; Ruiz-Moreno, A. J.; Rodríguez-Moreno, A.; Pérez-Tapia, S. M.; Velasco-Velázquez, M. A. Virtual Screening-Driven Repositioning of Etoposide as CD44

Antagonist in Breast Cancer Cells. *Oncotarget* **2016**, *7* (17), 23772–23784. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8180>.

(165) Liu, L.-K.; Finzel, B. C. Fragment-Based Identification of an Inducible Binding Site on Cell Surface Receptor CD44 for the Design of Protein–Carbohydrate Interaction Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (6), 2714–2725. <https://doi.org/10.1021/jm5000276>.

(166) Faheem, null; Karan Kumar, B.; Venkata Gowri Chandra Sekhar, K.; Chander, S.; Kunjiappan, S.; Murugesan, S. 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline (THIQ) as Privileged Scaffold for Anticancer de Novo Drug Design. *Expert Opin. Drug Discov.* **2021**, *16* (10), 1119–1147. <https://doi.org/10.1080/17460441.2021.1916464>.

(167) Ruiz-Moreno, A. J.; Reyes-Romero, A.; Dömling, A.; Velasco-Velázquez, M. A. In Silico Design and Selection of New Tetrahydroisoquinoline-Based CD44 Antagonist Candidates. *Molecules* **2021**, *26* (7), 1877. <https://doi.org/10.3390/molecules26071877>.

(168) Pustuła, M.; Czub, M.; Łabuzek, B.; Surmiak, E.; Tomala, M.; Twarda-Clapa, A.; Guzik, K.; Popowicz, G. M.; Holak, T. A. NMR Fragment-Based Screening for Development of the CD44-Binding Small Molecules. *Bioorganic Chem.* **2019**, *82*, 284–289. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.10.043>.

(169) Baggio, C.; Barile, E.; Di Sorbo, G.; Kipps, T. J.; Pellecchia, M. The Cell Surface Receptor CD44: NMR-Based Characterization of Putative Ligands. *ChemMedChem* **2016**, *11* (10), 1097–1106. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600039>.

(170) Chidambaram, M.; Manavalan, R.; Kathiresan, K. Nanotherapeutics to Overcome Conventional Cancer Chemotherapy Limitations. *J. Pharm. Pharm. Sci. Publ. Can. Soc. Pharm. Sci. Soc. Can. Sci. Pharm.* **2011**, *14* (1), 67–77. <https://doi.org/10.18433/j30c7d>.

(171) Senapati, S.; Mahanta, A. K.; Kumar, S.; Maiti, P. Controlled Drug Delivery Vehicles for Cancer Treatment and Their Performance. *Signal Transduct. Target. Ther.* **2018**, *3* (1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41392-017-0004-3>.

(172) Zhang, Y.; Li, M.; Gao, X.; Chen, Y.; Liu, T. Nanotechnology in Cancer Diagnosis: Progress, Challenges and Opportunities. *J. Hematol. Oncol.* **2019**, *12* (1), 137. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0833-3>.

(173) Gonzalez-Valdivieso, J.; Girotti, A.; Schneider, J.; Arias, F. J. Advanced Nanomedicine and Cancer: Challenges and Opportunities in Clinical Translation. *Int. J. Pharm.* **2021**, *599*, 120438. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120438>.

- (174) Garbayo, E.; Pascual-Gil, S.; Rodríguez-Nogales, C.; Saludas, L.; Estella-Hermoso de Mendoza, A.; Blanco-Prieto, M. J. Nanomedicine and Drug Delivery Systems in Cancer and Regenerative Medicine. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* **2020**, *12* (5), e1637. <https://doi.org/10.1002/wnan.1637>.
- (175) Ranganathan, R.; Madanmohan, S.; Kesavan, A.; Baskar, G.; Krishnamoorthy, Y. R.; Santosham, R.; Ponraju, D.; Rayala, S. K.; Venkatraman, G. Nanomedicine: Towards Development of Patient-Friendly Drug-Delivery Systems for Oncological Applications. *Int. J. Nanomedicine* **2012**, *7*, 1043–1060. <https://doi.org/10.2147/IJN.S25182>.
- (176) Ghanbari, H.; de Mel, A.; Seifalian, A. M. Cardiovascular Application of Polyhedral Oligomeric Silsesquioxane Nanomaterials: A Glimpse into Prospective Horizons. *Int. J. Nanomedicine* **2011**, *6*, 775–786. <https://doi.org/10.2147/IJN.S14881>.
- (177) Chen, G.; Roy, I.; Yang, C.; Prasad, P. N. Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-Based Diagnostics and Therapy. *Chem. Rev.* **2016**, *116* (5), 2826–2885. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00148>.
- (178) Ahlawat, J.; Henriquez, G.; Narayan, M. Enhancing the Delivery of Chemotherapeutics: Role of Biodegradable Polymeric Nanoparticles. *Molecules* **2018**, *23* (9), 2157. <https://doi.org/10.3390/molecules23092157>.
- (179) Loos, C.; Syrovets, T.; Musyanovych, A.; Mailänder, V.; Landfester, K.; Nienhaus, G. U.; Simmet, T. Functionalized Polystyrene Nanoparticles as a Platform for Studying Bio–Nano Interactions. *Beilstein J. Nanotechnol.* **2014**, *5* (1), 2403–2412. <https://doi.org/10.3762/bjnano.5.250>.
- (180) Kelkar, S. S.; Reineke, T. M. Theranostics: Combining Imaging and Therapy. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22* (10), 1879–1903. <https://doi.org/10.1021/bc200151q>.
- (181) Wicki, A.; Witzigmann, D.; Balasubramanian, V.; Huwyler, J. Nanomedicine in Cancer Therapy: Challenges, Opportunities, and Clinical Applications. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* **2015**, *200*, 138–157. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.12.030>.
- (182) Jeyamogan, S.; Khan, N. A.; Siddiqui, R. Application and Importance of Theranostics in the Diagnosis and Treatment of Cancer. *Arch. Med. Res.* **2021**, *52* (2), 131–142. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2020.10.016>.
- (183) Cano-Cortes, M. V.; Navarro-Marchal, S. A.; Ruiz-Blas, M. P.; Diaz-Mochon, J. J.; Marchal, J. A.; Sanchez-Martin, R. M. A Versatile Theranostic Nanodevice Based on an Orthogonal Bioconjugation Strategy for Efficient Targeted Treatment and Monitoring of Triple Negative Breast

Cancer. *Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med.* **2020**, *24*, 102120. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.102120>.

(184) Cano-Cortes, M. V.; Altea-Manzano, P.; Laz-Ruiz, J. A.; Unciti-Broceta, J. D.; Lopez-Delgado, F. J.; Espejo-Roman, J. M.; Diaz-Mochon, J. J.; Sanchez-Martin, R. M. An Effective Polymeric Nanocarrier That Allows for Active Targeting and Selective Drug Delivery in Cell Coculture Systems. *Nanoscale* **2021**, *13* (6), 3500–3511. <https://doi.org/10.1039/D0NR07145E>.

(185) Ahmad, A.; Khan, F.; Mishra, R. K.; Khan, R. Precision Cancer Nanotherapy: Evolving Role of Multifunctional Nanoparticles for Cancer Active Targeting. *J. Med. Chem.* **2019**, *62* (23), 10475–10496. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00511>.

(186) Chaturvedi, V. K.; Singh, A.; Singh, V. K.; Singh, M. P. Cancer Nanotechnology: A New Revolution for Cancer Diagnosis and Therapy. *Curr. Drug Metab.* **2019**, *20* (6), 416–429. <https://doi.org/10.2174/1389200219666180918111528>.

(187) Peer, D.; Karp, J. M.; Hong, S.; Farokhzad, O. C.; Margalit, R.; Langer, R. Nanocarriers as an Emerging Platform for Cancer Therapy. *Nat. Nanotechnol.* **2007**, *2* (12), 751–760. <https://doi.org/10.1038/nnano.2007.387>.

(188) Saha, R. N.; Vasanthakumar, S.; Bende, G.; Snehalatha, M. Nanoparticulate Drug Delivery Systems for Cancer Chemotherapy. *Mol. Membr. Biol.* **2010**, *27* (7), 215–231. <https://doi.org/10.3109/09687688.2010.510804>.

(189) Cheng, Z.; Zaki, A. A.; Hui, J. Z.; Muzykantov, V. R.; Tsourkas, A. Multifunctional Nanoparticles: Cost versus Benefit of Adding Targeting and Imaging Capabilities. *Science* **2012**, *338* (6109), 903–910. <https://doi.org/10.1126/science.1226338>.

(190) Thomas, R. G.; Moon, M.; Lee, S.; Jeong, Y. Y. Paclitaxel Loaded Hyaluronic Acid Nanoparticles for Targeted Cancer Therapy: In Vitro and in Vivo Analysis. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *72*, 510–518. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.08.054>.

(191) Wang, H.; Agarwal, P.; Zhao, S.; Xu, R. X.; Yu, J.; Lu, X.; He, X. Hyaluronic Acid-Decorated Dual Responsive Nanoparticles of Pluronic F127, PLGA, and Chitosan for Targeted Co-Delivery of Doxorubicin and Irinotecan to Eliminate Cancer Stem-like Cells. *Biomaterials* **2015**, *72*, 74–89. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.08.048>.

(192) Chiesa, E.; Greco, A.; Riva, F.; Dorati, R.; Conti, B.; Modena, T.; Genta, I. Hyaluronic Acid-Based Nanoparticles for Protein Delivery: Systematic Examination of Microfluidic Production Conditions. *Pharmaceutics* **2021**, *13* (10), 1565. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101565>.

- (193) Liang, X.; Li, X.; Duan, J.; Chen, Y.; Wang, X.; Pang, L.; Kong, D.; Song, B.; Li, C.; Yang, J. Nanoparticles with CD44 Targeting and ROS Triggering Properties as Effective in Vivo Antigen Delivery System. *Mol. Pharm.* **2018**, *15* (2), 508–518. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.7b00890>.
- (194) Gaio, E.; Conte, C.; Esposito, D.; Reddi, E.; Quaglia, F.; Moret, F. CD44 Targeting Mediated by Polymeric Nanoparticles and Combination of Chlorine TPCS2a-PDT and Docetaxel-Chemotherapy for Efficient Killing of Breast Differentiated and Stem Cancer Cells In Vitro. *Cancers* **2020**, *12* (2), 278. <https://doi.org/10.3390/cancers12020278>.
- (195) Shi, J.; Ren, Y.; Ma, J.; Luo, X.; Li, J.; Wu, Y.; Gu, H.; Fu, C.; Cao, Z.; Zhang, J. Novel CD44-Targeting and PH/Redox-Dual-Stimuli-Responsive Core–Shell Nanoparticles Loading Triptolide Combats Breast Cancer Growth and Lung Metastasis. *J. Nanobiotechnology* **2021**, *19* (1), 188. <https://doi.org/10.1186/s12951-021-00934-0>.
- (196) Navarro-Marchal, S. A.; Griñán-Lisón, C.; Entrena, J.-M.; Ruiz-Alcalá, G.; Tristán-Manzano, M.; Martín, F.; Pérez-Victoria, I.; Peula-García, J. M.; Marchal, J. A. Anti-CD44-Conjugated Olive Oil Liquid Nanocapsules for Targeting Pancreatic Cancer Stem Cells. *Biomacromolecules* **2021**, *22* (4), 1374–1388. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c01546>.
- (197) Medeiros, S. F.; Santos, A. M.; Fessi, H.; Elaissari, A. Stimuli-Responsive Magnetic Particles for Biomedical Applications. *Int. J. Pharm.* **2011**, *403* (1), 139–161. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.10.011>.
- (198) Katz, J. S.; Burdick, J. A. Light-Responsive Biomaterials: Development and Applications. *Macromol. Biosci.* **2010**, *10* (4), 339–348. <https://doi.org/10.1002/mabi.200900297>.
- (199) Wells, C. M.; Harris, M.; Choi, L.; Murali, V. P.; Guerra, F. D.; Jennings, J. A. Stimuli-Responsive Drug Release from Smart Polymers. *J. Funct. Biomater.* **2019**, *10* (3), 34. <https://doi.org/10.3390/jfb10030034>.
- (200) Dong, H.; Pang, L.; Cong, H.; Shen, Y.; Yu, B. Application and Design of Esterase-Responsive Nanoparticles for Cancer Therapy. *Drug Deliv.* **2019**, *26* (1), 416–432. <https://doi.org/10.1080/10717544.2019.1588424>.
- (201) Zhou, W.; Jia, Y.; Liu, Y.; Chen, Y.; Zhao, P. Tumor Microenvironment-Based Stimuli-Responsive Nanoparticles for Controlled Release of Drugs in Cancer Therapy. *Pharmaceutics* **2022**, *14* (11), 2346. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14112346>.

- (202) Wang, Y.; Xie, H.; Ying, K.; Xie, B.; Chen, X.; Yang, B.; Jin, J.; Wan, J.; Li, T.; Han, W.; Fang, S.; Wang, H. Tuning the Efficacy of Esterase-Activatable Prodrug Nanoparticles for the Treatment of Colorectal Malignancies. *Biomaterials* **2021**, *270*, 120705. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2021.120705>.
- (203) Fleige, E.; Quadir, M. A.; Haag, R. Stimuli-Responsive Polymeric Nanocarriers for the Controlled Transport of Active Compounds: Concepts and Applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2012**, *64* (9), 866–884. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.01.020>.
- (204) Schmaljohann, D. Thermo- and PH-Responsive Polymers in Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2006**, *58* (15), 1655–1670. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.020>.
- (205) Wang, S.; Wang, H.; Liu, Z.; Wang, L.; Wang, X.; Su, L.; Chang, J. Smart PH- and Reduction-Dual-Responsive Folate-PEG-Coated Polymeric Lipid Vesicles for Tumor-Triggered Targeted Drug Delivery. *Nanoscale* **2014**, *6* (13), 7635–7642. <https://doi.org/10.1039/c4nr00843j>.
- (206) ALSawaftah, N. M.; Awad, N. S.; Pitt, W. G.; Hussein, G. A. PH-Responsive Nanocarriers in Cancer Therapy. *Polymers* **2022**, *14* (5), 936. <https://doi.org/10.3390/polym14050936>.
- (207) Zhao, Y.; Luo, Z.; Li, M.; Qu, Q.; Ma, X.; Yu, S.-H.; Zhao, Y. A Preloaded Amorphous Calcium Carbonate/Doxorubicin@silica Nanoreactor for PH-Responsive Delivery of an Anticancer Drug. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2015**, *54* (3), 919–922. <https://doi.org/10.1002/anie.201408510>.
- (208) Ke, C.-J.; Chiang, W.-L.; Liao, Z.-X.; Chen, H.-L.; Lai, P.-S.; Sun, J.-S.; Sung, H.-W. Real-Time Visualization of PH-Responsive PLGA Hollow Particles Containing a Gas-Generating Agent Targeted for Acidic Organelles for Overcoming Multi-Drug Resistance. *Biomaterials* **2013**, *34* (1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.09.023>.
- (209) Ulbrich, K.; Etrych, T.; Chytil, P.; Jelínková, M.; Ríhová, B. Antibody-Targeted Polymer-Doxorubicin Conjugates with PH-Controlled Activation. *J. Drug Target.* **2004**, *12* (8), 477–489. <https://doi.org/10.1080/10611860400011869>.
- (210) Lee, C. C.; Gillies, E. R.; Fox, M. E.; Guillaudeu, S. J.; Fréchet, J. M. J.; Dy, E. E.; Szoka, F. C. A Single Dose of Doxorubicin-Functionalized Bow-Tie Dendrimer Cures Mice Bearing C-26 Colon Carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103* (45), 16649–16654. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607705103>.
- (211) Sun, T.; Zhang, Y. S.; Pang, B.; Hyun, D. C.; Yang, M.; Xia, Y. Engineered Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Therapy. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2014**, *53* (46), 12320–12364. <https://doi.org/10.1002/anie.201403036>.

- (212) Sun, T.-M.; Wang, Y.-C.; Wang, F.; Du, J.-Z.; Mao, C.-Q.; Sun, C.-Y.; Tang, R.-Z.; Liu, Y.; Zhu, J.; Zhu, Y.-H.; Yang, X.-Z.; Wang, J. Cancer Stem Cell Therapy Using Doxorubicin Conjugated to Gold Nanoparticles via Hydrazone Bonds. *Biomaterials* **2014**, *35* (2), 836–845. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.10.011>.
- (213) Cui, T.; Liang, J.-J.; Chen, H.; Geng, D.-D.; Jiao, L.; Yang, J.-Y.; Qian, H.; Zhang, C.; Ding, Y. Performance of Doxorubicin-Conjugated Gold Nanoparticles: Regulation of Drug Location. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9* (10), 8569–8580. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b16669>.
- (214) Tseng, C. M.; Lu, Y. Y.; El-Aasser, M. S.; Vanderhoff, J. W. Uniform Polymer Particles by Dispersion Polymerization in Alcohol. *J. Polym. Sci. Part Polym. Chem.* **1986**, *24* (11), 2995–3007. <https://doi.org/10.1002/pola.1986.080241126>.
- (215) Delair, T.; Marguet, V.; Pichot, C.; Mandrand, B. Synthesis and Characterization of Cationic Amino Functionalized Polystyrene Latexes. *Colloid Polym. Sci.* **1994**, *272* (8), 962–970. <https://doi.org/10.1007/BF00658894>.
- (216) Unciti-Broceta, A.; Johansson, E. M. V.; Yusop, R. M.; Sánchez-Martín, R. M.; Bradley, M. Synthesis of Polystyrene Microspheres and Functionalization with Pd0 Nanoparticles to Perform Bioorthogonal Organometallic Chemistry in Living Cells. *Nat. Protoc.* **2012**, *7* (6), 1207–1218. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.052>.
- (217) Sanchez-Martin, R. M.; Muzerelle, M.; Chitkul, N.; How, S. E.; Mittoo, S.; Bradley, M. Bead-Based Cellular Analysis, Sorting and Multiplexing. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **2005**, *6* (8), 1341–1345. <https://doi.org/10.1002/cbic.200500059>.
- (218) Unciti-Broceta, J. D.; Cano-Cortés, V.; Altea-Manzano, P.; Pernagallo, S.; Díaz-Mochón, J. J.; Sánchez-Martín, R. M. Number of Nanoparticles per Cell through a Spectrophotometric Method - A Key Parameter to Assess Nanoparticle-Based Cellular Assays. *Sci. Rep.* **2015**, *5* (1), 10091. <https://doi.org/10.1038/srep10091>.
- (219) El-Faham, A.; Al Marhoon, Z.; Abdel-Megeed, A.; Albericio, F. OxymaPure/DIC: An Efficient Reagent for the Synthesis of a Novel Series of 4-[2-(2-Acetylamino)phenyl]-2-Oxo-Acetylamino] Benzoyl Amino Acid Ester Derivatives. *Molecules* **2013**, *18* (12), 14747–14759. <https://doi.org/10.3390/molecules181214747>.
- (220) Aryal, S.; Hu, C.-M. J.; Zhang, L. Polymer-Cisplatin Conjugate Nanoparticles for Acid-Responsive Drug Delivery. *ACS Nano* **2010**, *4* (1), 251–258. <https://doi.org/10.1021/nn9014032>.

- (221) Ji, S.; Zhu, Z.; Hoye, T. R.; Macosko, C. W. Maleimide Functionalized Poly(ϵ -Caprolactone)-Block-Poly(Ethylene Glycol) (PCL-PEG-MAL): Synthesis, Nanoparticle Formation, and Thiol Conjugation. *Macromol. Chem. Phys.* **2009**, *210* (10), 823–831. <https://doi.org/10.1002/macp.200900025>.
- (222) Fields, G. B.; Noble, R. L. Solid Phase Peptide Synthesis Utilizing 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Acids. *Int. J. Pept. Protein Res.* **1990**, *35* (3), 161–214. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.1990.tb00939.x>.
- (223) Sarin, V. K.; Kent, S. B. H.; Tam, J. P.; Merrifield, R. B. Quantitative Monitoring of Solid-Phase Peptide Synthesis by the Ninhydrin Reaction. *Anal. Biochem.* **1981**, *117* (1), 147–157. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90704-1](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90704-1).
- (224) Díaz-Mochón, J. J.; Bialy, L.; Bradley, M. Full Orthogonality between Dde and Fmoc: The Direct Synthesis of PNA--Peptide Conjugates. *Org. Lett.* **2004**, *6* (7), 1127–1129. <https://doi.org/10.1021/ol049905y>.
- (225) Sánchez-Martín, R. M.; Alexander, L.; Bradley, M. Multifunctionalized Biocompatible Microspheres for Sensing. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2008**, *1130*, 207–217. <https://doi.org/10.1196/annals.1430.004>.
- (226) Cano-Cortes, M. V.; Laz-Ruiz, J. A.; Diaz-Mochon, J. J.; Sanchez-Martin, R. M. Characterization and Therapeutic Effect of a PH Stimuli Responsive Polymeric Nanoformulation for Controlled Drug Release. *Polymers* **2020**, *12* (6), 1265. <https://doi.org/10.3390/polym12061265>.
- (227) Valero, T.; Delgado-González, A.; Unciti-Broceta, J. D.; Cano-Cortés, V.; Pérez-López, A. M.; Unciti-Broceta, A.; Sánchez Martín, R. M. Drug “Clicking” on Cell-Penetrating Fluorescent Nanoparticles for In Cellulo Chemical Proteomics. *Bioconjug. Chem.* **2018**, *29* (9), 3154–3160. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.8b00481>.
- (228) Borger, J. G.; Cardenas-Maestre, J. M.; Zamoyska, R.; Sanchez-Martin, R. M. Novel Strategy for Microsphere-Mediated DNA Transfection. *Bioconjug. Chem.* **2011**, *22* (10), 1904–1908. <https://doi.org/10.1021/bc200289n>.
- (229) Alexander, L. M.; Sánchez-Martín, R. M.; Bradley, M. Knocking (Anti)-Sense into Cells: The Microsphere Approach to Gene Silencing. *Bioconjug. Chem.* **2009**, *20* (3), 422–426. <https://doi.org/10.1021/bc800529r>.

- (230) Sanchez-Martin, R. M.; Alexander, L.; Muzerelle, M.; Cardenas-Maestre, J. M.; Tsakiridis, A.; Brickman, J. M.; Bradley, M. Microsphere-Mediated Protein Delivery into Cells. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **2009**, *10* (9), 1453–1456. <https://doi.org/10.1002/cbic.200900136>.
- (231) Stetefeld, J.; McKenna, S. A.; Patel, T. R. Dynamic Light Scattering: A Practical Guide and Applications in Biomedical Sciences. *Biophys. Rev.* **2016**, *8* (4), 409–427. <https://doi.org/10.1007/s12551-016-0218-6>.
- (232) Hackley, V. A.; Clogston, J. D. Measuring the Hydrodynamic Size of Nanoparticles in Aqueous Media Using Batch-Mode Dynamic Light Scattering. In *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*; McNeil, S. E., Ed.; Methods in Molecular Biology; Humana Press: Totowa, NJ, 2011; pp 35–52. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_4.
- (233) Lee, S.; Rao, S. P.; Moon, M. H.; Giddings, J. C. Determination of Mean Diameter and Particle Size Distribution of Acrylate Latex Using Flow Field-Flow Fractionation, Photon Correlation Spectroscopy, and Electron Microscopy. *Anal. Chem.* **1996**, *68* (9), 1545–1549. <https://doi.org/10.1021/ac9511814>.
- (234) Mourdikoudis, S.; M. Pallares, R.; K. Thanh, N. T. Characterization Techniques for Nanoparticles: Comparison and Complementarity upon Studying Nanoparticle Properties. *Nanoscale* **2018**, *10* (27), 12871–12934. <https://doi.org/10.1039/C8NR02278J>.
- (235) Delgado, A. V.; González-Caballero, F.; Hunter, R. J.; Koopal, L. K.; Lyklema, J.; International Union of Pure and Applied Chemistry, Physical and Biophysical Chemistry Division IUPAC Technical Report. Measurement and Interpretation of Electrokinetic Phenomena. *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *309* (2), 194–224. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2006.12.075>.
- (236) Forte, M.; Iachetta, G.; Tussellino, M.; Carotenuto, R.; Prisco, M.; De Falco, M.; Laforgia, V.; Valiante, S. Polystyrene Nanoparticles Internalization in Human Gastric Adenocarcinoma Cells. *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA* **2016**, *31*, 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.11.006>.
- (237) Varela, J. A.; Bexiga, M. G.; Åberg, C.; Simpson, J. C.; Dawson, K. A. Quantifying Size-Dependent Interactions between Fluorescently Labeled Polystyrene Nanoparticles and Mammalian Cells. *J. Nanobiotechnology* **2012**, *10* (1), 39. <https://doi.org/10.1186/1477-3155-10-39>.
- (238) Altea-Manzano, P.; Unciti-Broceta, J. D.; Cano-Cortes, V.; Ruiz-Blas, M. P.; Valero-Griñan, T.; Diaz-Mochon, J. J.; Sanchez-Martin, R. Tracking Cell Proliferation Using a Nanotechnology-Based Approach. *Nanomed.* **2017**, *12* (13), 1591–1605. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0118>.

- (239) Robles-Remacho, A.; Luque-González, M. A.; González-Casín, R. A.; Cano-Cortés, M. V.; Lopez-Delgado, F. J.; Guardia-Montegudo, J. J.; Antonio Fara, M.; Sánchez-Martín, R. M.; Díaz-Mochón, J. J. Development of a Nanotechnology-Based Approach for Capturing and Detecting Nucleic Acids by Using Flow Cytometry. *Talanta* **2021**, *226*, 122092. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122092>.
- (240) Gennet, N.; Alexander, L. M.; Sánchez-Martín, R. M.; Behrendt, J. M.; Sutherland, A. J.; Brickman, J. M.; Bradley, M.; Li, M. Microspheres as a Vehicle for Biomolecule Delivery to Neural Stem Cells. *New Biotechnol.* **2009**, *25* (6), 442–449. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2009.05.006>.
- (241) Tsakiridis, A.; Alexander, L. M.; Gennet, N.; Sanchez-Martin, R. M.; Livigni, A.; Li, M.; Bradley, M.; Brickman, J. M. Microsphere-Based Tracing and Molecular Delivery in Embryonic Stem Cells. *Biomaterials* **2009**, *30* (29), 5853–5861. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.06.024>.
- (242) Bradley, M.; Alexander, L.; Duncan, K.; Chennaoui, M.; Jones, A. C.; Sánchez-Martín, R. M. PH Sensing in Living Cells Using Fluorescent Microspheres. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (1), 313–317. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2007.10.075>.
- (243) Sánchez-Martín, R. M.; Cuttle, M.; Mittoo, S.; Bradley, M. Microsphere-Based Real-Time Calcium Sensing. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **2006**, *45* (33), 5472–5474. <https://doi.org/10.1002/anie.200601242>.
- (244) Cárdenas-Maestre, J. M.; Pérez-López, A. M.; Bradley, M.; Sánchez-Martín, R. M. Microsphere-Based Intracellular Sensing of Caspase-3/7 in Apoptotic Living Cells. *Macromol. Biosci.* **2014**, *14* (7), 923–928. <https://doi.org/10.1002/mabi.201300525>.
- (245) Cardenas-Maestre, J. M.; Sanchez-Martin, R. M. Efficient Solid Phase Strategy for Preparation of Modified Xanthene Dyes for Biolabelling. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9* (6), 1720–1722. <https://doi.org/10.1039/c0ob00875c>.
- (246) Yusop, R. M.; Unciti-Broceta, A.; Johansson, E. M. V.; Sánchez-Martín, R. M.; Bradley, M. Palladium-Mediated Intracellular Chemistry. *Nat. Chem.* **2011**, *3* (3), 239–243. <https://doi.org/10.1038/nchem.981>.
- (247) Kölmel, D. K.; Kool, E. T. Oximes and Hydrazones in Bioconjugation: Mechanism and Catalysis. *Chem. Rev.* **2017**, *117* (15), 10358–10376. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00090>.
- (248) Harling, J. D.; Orlek, B. S.; Thompson, M. Substituted Benzamide Derivatives and Their Use as Anticonvulsants. WO1997048683A1, December 24, 1997.

- (249) Jones, K. M.; Karier, P.; Klussmann, M. C1-Substituted N-Alkyl Tetrahydroisoquinoline Derivatives through V-Catalyzed Oxidative Coupling. *ChemCatChem* **2012**, *4* (1), 51–54. <https://doi.org/10.1002/cctc.201100324>.
- (250) Yan, C.; Liu, Y.; Wang, Q. Mild and Highly Efficient Metal-Free Oxidative α -Cyanation of N-Acyl/Sulfonyl Tetrahydroisoquinolines. *RSC Adv.* **2014**, *4* (104), 60075–60078. <https://doi.org/10.1039/C4RA12922A>.
- (251) Lüthy, M.; Darmency, V.; Renaud, P. Modified B-Alkylcatecholboranes as Radical Precursors. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, *2011* (3), 547–552. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201001120>.
- (252) Olsson, E.; Honeth, G.; Bendahl, P.-O.; Saal, L. H.; Gruvberger-Saal, S.; Ringnér, M.; Vallon-Christersson, J.; Jönsson, G.; Holm, K.; Lövgren, K.; Fernö, M.; Grabau, D.; Borg, Å.; Hegardt, C. CD44 Isoforms Are Heterogeneously Expressed in Breast Cancer and Correlate with Tumor Subtypes and Cancer Stem Cell Markers. *BMC Cancer* **2011**, *11* (1), 418. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-418>.
- (253) Sheridan, C.; Kishimoto, H.; Fuchs, R. K.; Mehrotra, S.; Bhat-Nakshatri, P.; Turner, C. H.; Goulet, R.; Badve, S.; Nakshatri, H. CD44+/CD24-Breast Cancer Cells Exhibit Enhanced Invasive Properties: An Early Step Necessary for Metastasis. *Breast Cancer Res.* **2006**, *8* (5), R59. <https://doi.org/10.1186/bcr1610>.
- (254) Zakaria, N.; Yusoff, N. M.; Zakaria, Z.; Lim, M. N.; Baharuddin, P. J. N.; Fakiruddin, K. S.; Yahaya, B. Human Non-Small Cell Lung Cancer Expresses Putative Cancer Stem Cell Markers and Exhibits the Transcriptomic Profile of Multipotent Cells. *BMC Cancer* **2015**, *15*, 84. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1086-3>.
- (255) Azimioara, M.; Cow, C.; Epple, R.; Jiang, S.; Lelais, G.; Mutnick, D.; Wu, B. Compounds and Compositions as Modulators of Gpr119 Activity. WO2009105717A1, August 27, 2009.
- (256) Bhattacharya, D. S.; Svehkarev, D.; Soucek, J. J.; Hill, T. K.; Taylor, M. A.; Natarajan, A.; Mohs, A. M. Impact of Structurally Modifying Hyaluronic Acid on CD44 Interaction. *J. Mater. Chem. B* **2017**, *5* (41), 8183–8192. <https://doi.org/10.1039/C7TB01895A>.
- (257) Tan, K. P.; Singh, K.; Hazra, A.; Madhusudhan, M. S. Peptide Bond Planarity Constrains Hydrogen Bond Geometry and Influences Secondary Structure Conformations. *Curr. Res. Struct. Biol.* **2021**, *3*, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.crstbi.2020.11.002>.

- (258) Białkowska, K.; Komorowski, P.; Bryszewska, M.; Miłowska, K. Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures—Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (17), 6225. <https://doi.org/10.3390/ijms21176225>.
- (259) Huang, C.-F.; Chen, L.; Li, Y.-C.; Wu, L.; Yu, G.-T.; Zhang, W.-F.; Sun, Z.-J. NLRP3 Inflammasome Activation Promotes Inflammation-Induced Carcinogenesis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2017**, *36* (1), 116. <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0589-y>.
- (260) Savka, R. D.; Plenio, H. A Hexahydro-s-Indacene Based NHC Ligand for Olefin Metathesis Catalysts. *J. Organomet. Chem.* **2012**, *710*, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2012.03.015>.
- (261) Franchi, L.; Ghosh, S.; Glick, G.; Katz, J.; Oipari, A.; Roush, W.; Seidel, H.; Shen, D.-M.; Venkatraman, S.; Winkler, D. Compounds and Compositions for Treating Conditions Associated with Nlrp Activity. WO2020102576A1, May 22, 2020.
- (262) Watterson, S. H.; Guo, J.; Spergel, S. H.; Langevine, C. M.; Moquin, R. V.; Shen, D. R.; Yarde, M.; Cvijic, M. E.; Banas, D.; Liu, R.; Suchard, S. J.; Gillooly, K.; Taylor, T.; Rex-Rabe, S.; Shuster, D. J.; McIntyre, K. W.; Cornelius, G.; D'Arienzo, C.; Marino, A.; Balimane, P.; Warrack, B.; Salter-Cid, L.; McKinnon, M.; Barrish, J. C.; Carter, P. H.; Pitts, W. J.; Xie, J.; Dyckman, A. J. Potent and Selective Agonists of Sphingosine 1-Phosphate 1 (S1P1): Discovery and SAR of a Novel Isoxazole Based Series. *J. Med. Chem.* **2016**, *59* (6), 2820–2840. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.6b00089>.
- (263) Winans, K. A.; Bertozzi, C. R. An Inhibitor of the Human UDP-GlcNAc 4-Epimerase Identified from a Uridine-Based Library: A Strategy to Inhibit O-Linked Glycosylation. *Chem. Biol.* **2002**, *9* (1), 113–129. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(02\)00093-5](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(02)00093-5).
- (264) M. Heravi, M.; Ghavidel, M.; Mohammadkhani, L. Beyond a Solvent: Triple Roles of Dimethylformamide in Organic Chemistry. *RSC Adv.* **2018**, *8* (49), 27832–27862. <https://doi.org/10.1039/C8RA04985H>.
- (265) Sun, Y.-T.; Wang, G.-F.; Yang, Y.-Q.; Jin, F.; Wang, Y.; Xie, X.-Y.; Mach, R. H.; Huang, Y.-S. Synthesis and Pharmacological Evaluation of 6,7-Dimethoxy-1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline Derivatives as Sigma-2 Receptor Ligands. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *147*, 227–237. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.016>.
- (266) Suk, J. S.; Xu, Q.; Kim, N.; Hanes, J.; Ensign, L. M. PEGylation as a Strategy for Improving Nanoparticle-Based Drug and Gene Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *99*, 28–51. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.09.012>.

- (267) Manchun, S.; Dass, C. R.; Sriamornsak, P. Targeted Therapy for Cancer Using PH-Responsive Nanocarrier Systems. *Life Sci.* **2012**, *90* (11), 381–387. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2012.01.008>.
- (268) Pietrovito, L.; Cano-Cortés, V.; Gamberi, T.; Magherini, F.; Bianchi, L.; Bini, L.; Sánchez-Martín, R. M.; Fasano, M.; Modesti, A. Cellular Response to Empty and Palladium-Conjugated Amino-Polystyrene Nanospheres Uptake: A Proteomic Study. *PROTEOMICS* **2015**, *15* (1), 34–43. <https://doi.org/10.1002/pmic.201300423>.
- (269) Kaiser, E.; Colescott, R. L.; Bossinger, C. D.; Cook, P. I. Color Test for Detection of Free Terminal Amino Groups in the Solid-Phase Synthesis of Peptides. *Anal. Biochem.* **1970**, *34* (2), 595–598. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(70\)90146-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(70)90146-6).
- (270) Michl, J.; Park, K. C.; Swietach, P. Evidence-Based Guidelines for Controlling PH in Mammalian Live-Cell Culture Systems. *Commun. Biol.* **2019**, *2* (1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0393-7>.
- (271) Ali, H.; Al-Yatama, M. K.; Abu-Farha, M.; Behbehani, K.; Madhoun, A. A. Multi-Lineage Differentiation of Human Umbilical Cord Wharton's Jelly Mesenchymal Stromal Cells Mediates Changes in the Expression Profile of Stemness Markers. *PLOS ONE* **2015**, *10* (4), e0122465. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122465>.
- (272) Ponta, H.; Sherman, L.; Herrlich, P. A. CD44: From Adhesion Molecules to Signalling Regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4* (1), 33–45. <https://doi.org/10.1038/nrm1004>.
- (273) Tsujimoto, Y.; Shimizu, S. Role of the Mitochondrial Membrane Permeability Transition in Cell Death. *Apoptosis* **2007**, *12* (5), 835–840. <https://doi.org/10.1007/s10495-006-0525-7>.
- (274) Zhong, Z.-F.; Tan, W.; Tian, K.; Yu, H.; Qiang, W.-A.; Wang, Y.-T. Combined Effects of Furanodiene and Doxorubicin on the Migration and Invasion of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells in Vitro. *Oncol. Rep.* **2017**, *37* (4), 2016–2024. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5435>.
- (275) Khan, K. H. Gene Expression in Mammalian Cells and Its Applications. *Adv. Pharm. Bull.* **2013**, *3* (2), 257–263. <https://doi.org/10.5681/apb.2013.042>.
- (276) Mayer, M.; Meyer, B. Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38* (12), 1784–1788. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19990614\)38:12<1784::AID-ANIE1784>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19990614)38:12<1784::AID-ANIE1784>3.0.CO;2-Q).
- (277) Angulo, J.; Nieto, P. M. STD-NMR: Application to Transient Interactions between Biomolecules—a Quantitative Approach. *Eur. Biophys. J.* **2011**, *40* (12), 1357–1369. <https://doi.org/10.1007/s00249-011-0749-5>.

- (278) Mayer, M.; Meyer, B. Group Epitope Mapping by Saturation Transfer Difference NMR To Identify Segments of a Ligand in Direct Contact with a Protein Receptor. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123* (25), 6108–6117. <https://doi.org/10.1021/ja0100120>.
- (279) Walpole, S.; Monaco, S.; Nepravishta, R.; Angulo, J. Chapter Twelve - STD NMR as a Technique for Ligand Screening and Structural Studies. In *Methods in Enzymology*; Wand, A. J., Ed.; Biological NMR Part B; Academic Press, 2019; Vol. 615, pp 423–451. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2018.08.018>.
- (280) Jayalakshmi, V.; Krishna, N. R. Complete Relaxation and Conformational Exchange Matrix (CORCEMA) Analysis of Intermolecular Saturation Transfer Effects in Reversibly Forming Ligand–Receptor Complexes. *J. Magn. Reson.* **2002**, *155* (1), 106–118. <https://doi.org/10.1006/jmre.2001.2499>.
- (281) Schröder, R.; Schmidt, J.; Blättermann, S.; Peters, L.; Janssen, N.; Grundmann, M.; Seemann, W.; Kaufel, D.; Merten, N.; Drewke, C.; Gomeza, J.; Milligan, G.; Mohr, K.; Kostenis, E. Applying Label-Free Dynamic Mass Redistribution Technology to Frame Signaling of G Protein-Coupled Receptors Noninvasively in Living Cells. *Nat. Protoc.* **2011**, *6* (11), 1748–1760. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.386>.
- (282) Schröder, R.; Janssen, N.; Schmidt, J.; Kebig, A.; Merten, N.; Hennen, S.; Müller, A.; Blättermann, S.; Mohr-Andrä, M.; Zahn, S.; Wenzel, J.; Smith, N. J.; Gomeza, J.; Drewke, C.; Milligan, G.; Mohr, K.; Kostenis, E. Deconvolution of Complex G Protein-Coupled Receptor Signaling in Live Cells Using Dynamic Mass Redistribution Measurements. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28* (9), 943–949. <https://doi.org/10.1038/nbt.1671>.
- (283) Pacifico, S.; Albanese, V.; Illuminati, D.; Fantinati, A.; Marzola, E.; Ferrari, F.; Neto, J. A.; Sturaro, C.; Ruzza, C.; Calò, G.; Preti, D.; Guerrini, R. Tetrabranched Hetero-Conjugated Peptides as Bifunctional Agonists of the NOP and Mu Opioid Receptors. *Bioconjug. Chem.* **2019**, *30* (9), 2444–2451. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.9b00519>.
- (284) Ruzza, C.; Ferrari, F.; Guerrini, R.; Marzola, E.; Preti, D.; Reinscheid, R. K.; Calo, G. Pharmacological Profile of the Neuropeptide S Receptor: Dynamic Mass Redistribution Studies. *Pharmacol. Res. Perspect.* **2018**, *6* (6), e00445. <https://doi.org/10.1002/prp2.445>.
- (285) Pacifico, S.; Albanese, V.; Illuminati, D.; Marzola, E.; Fabbri, M.; Ferrari, F.; Holanda, V. A. D.; Sturaro, C.; Malfacini, D.; Ruzza, C.; Trapella, C.; Preti, D.; Lo Cascio, E.; Arcovito, A.; Della Longa, S.; Marangoni, M.; Fattori, D.; Nassini, R.; Calò, G.; Guerrini, R. Novel Mixed NOP/Opioid Receptor

Peptide Agonists. *J. Med. Chem.* **2021**, *64* (10), 6656–6669. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.0c02062>.

(286) Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. *J. Comput. Chem.* **1998**, *19* (14), 1639–1662. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-987X\(19981115\)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1639::AID-JCC10>3.0.CO;2-B).

(287) Olsson, M. H. M.; Søndergaard, C. R.; Rostkowski, M.; Jensen, J. H. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical PKa Predictions. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7* (2), 525–537. <https://doi.org/10.1021/ct100578z>.

(288) Huey, R.; Morris, G. M.; Olson, A. J.; Goodsell, D. S. A Semiempirical Free Energy Force Field with Charge-Based Desolvation. *J. Comput. Chem.* **2007**, *28* (6), 1145–1152. <https://doi.org/10.1002/jcc.20634>.

(289) Morris, G. M.; Huey, R.; Lindstrom, W.; Sanner, M. F.; Belew, R. K.; Goodsell, D. S.; Olson, A. J. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *J. Comput. Chem.* **2009**, *30* (16), 2785–2791. <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.

(290) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14* (1), 33–38, 27–28. [https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5).

(291) Huang, J.; MacKerell, A. D. CHARMM36 All-Atom Additive Protein Force Field: Validation Based on Comparison to NMR Data. *J. Comput. Chem.* **2013**, *34* (25), 2135–2145. <https://doi.org/10.1002/jcc.23354>.

(292) MacKerell, A. D.; Bashford, D.; Bellott, M.; Dunbrack, R. L.; Evanseck, J. D.; Field, M. J.; Fischer, S.; Gao, J.; Guo, H.; Ha, S.; Joseph-McCarthy, D.; Kuchnir, L.; Kuczera, K.; Lau, F. T. K.; Mattos, C.; Michnick, S.; Ngo, T.; Nguyen, D. T.; Prodhom, B.; Reiher, W. E.; Roux, B.; Schlenkrich, M.; Smith, J. C.; Stote, R.; Straub, J.; Watanabe, M.; Wiórkiewicz-Kuczera, J.; Yin, D.; Karplus, M. All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102* (18), 3586–3616. <https://doi.org/10.1021/jp973084f>.

(293) Jorgensen, W. L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J. D.; Impey, R. W.; Klein, M. L. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J. Chem. Phys.* **1983**, *79* (2), 926–935. <https://doi.org/10.1063/1.445869>.

- (294) Kim, S.; Lee, J.; Jo, S.; Brooks III, C. L.; Lee, H. S.; Im, W. CHARMM-GUI Ligand Reader and Modeler for CHARMM Force Field Generation of Small Molecules. *J. Comput. Chem.* **2017**, *38* (21), 1879–1886. <https://doi.org/10.1002/jcc.24829>.
- (295) Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle Mesh Ewald: An N·log(N) Method for Ewald Sums in Large Systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98* (12), 10089–10092. <https://doi.org/10.1063/1.464397>.
- (296) Verlet, L. Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Phys. Rev.* **1967**, *159* (1), 98–103. <https://doi.org/10.1103/PhysRev.159.98>.
- (297) Koopman, E. A.; Lowe, C. P. Advantages of a Lowe-Andersen Thermostat in Molecular Dynamics Simulations. *J. Chem. Phys.* **2006**, *124* (20), 204103. <https://doi.org/10.1063/1.2198824>.
- (298) Feller, S. E.; Zhang, Y.; Pastor, R. W.; Brooks, B. R. Constant Pressure Molecular Dynamics Simulation: The Langevin Piston Method. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103* (11), 4613–4621. <https://doi.org/10.1063/1.470648>.
- (299) Oss, G.; de Vos, S. D.; Luc, K. N. H.; Harper, J. B.; Nguyen, T. V. Tropylium-Promoted Oxidative Functionalization of Tetrahydroisoquinolines. *J. Org. Chem.* **2018**, *83* (2), 1000–1010. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b02584>.
- (300) Schnatterer, S.; Maier, M.; Petry, F.; Knauf, W.; Seeger, K. Pesticidal Substituted Piperidines. WO2006087162, August 24, 2006.
- (301) Miller, S. P.; Zhong, Y.-L.; Liu, Z.; Simeone, M.; Yasuda, N.; Limanto, J.; Chen, Z.; Lynch, J.; Capodanno, V. Practical and Cost-Effective Manufacturing Route for the Synthesis of a β -Lactamase Inhibitor. *Org. Lett.* **2014**, *16* (1), 174–177. <https://doi.org/10.1021/ol4031606>.
- (302) Antoni, F.; Bause, M.; Scholler, M.; Bauer, S.; Stark, S. A.; Jackson, S. M.; Manolaridis, I.; Locher, K. P.; König, B.; Buschauer, A.; Bernhardt, G. Tariquidar-Related Triazoles as Potent, Selective and Stable Inhibitors of ABCG2 (BCRP). *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *191*, 112133. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112133>.
- (303) Zhou, Y.; Wang, J.; Jiang, Q. Tetrahydroisoquinoline Derivative with Antifungal Activity and Its Preparation Method. CN1412182A, April 23, 2003.
- (304) Dohle, W.; Leese, M. P.; Jourdan, F. L.; Chapman, C. J.; Hamel, E.; Ferrandis, E.; Potter, B. V. L. Optimisation of Tetrahydroisoquinoline-Based Chimeric Microtubule Disruptors. *ChemMedChem* **2014**, *9* (8), 1783–1793. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201402025>.

- (305) Kim, H. P.; Yu, H.; Kim, H.; Kim, S.-H.; Lee, D. DDQ-Promoted Mild and Efficient Metal-Free Oxidative α -Cyanation of N-Acyl/Sulfonyl 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinolines. *Molecules* **2018**, *23* (12), 3223. <https://doi.org/10.3390/molecules23123223>.
- (306) Senboku, H.; Nakahara, K.; Fukuhara, T.; Hara, S. Hg Cathode-Free Electrochemical Detosylation of N,N-Disubstituted p-Toluenesulfonamides: Mild, Efficient, and Selective Removal of N-Tosyl Group. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51* (2), 435–438. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.11.056>.
- (307) Jo, S.; Klauda, J. B.; Im, W. CHARMM-GUI Membrane Builder for Mixed Bilayers and Its Application to Yeast Membranes. *Biophys. J.* **2009**, *96* (3), 41a. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2008.12.109>.
- (308) Lee, J.; Cheng, X.; Swails, J. M.; Yeom, M. S.; Eastman, P. K.; Lemkul, J. A.; Wei, S.; Buckner, J.; Jeong, J. C.; Qi, Y.; Jo, S.; Pande, V. S.; Case, D. A.; Brooks, C. L.; MacKerell, A. D.; Klauda, J. B.; Im, W. CHARMM-GUI Input Generator for NAMD, GROMACS, AMBER, OpenMM, and CHARMM/OpenMM Simulations Using the CHARMM36 Additive Force Field. *J. Chem. Theory Comput.* **2016**, *12* (1), 405–413. <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00935>.
- (309) Wu, E. L.; Cheng, X.; Jo, S.; Rui, H.; Song, K. C.; Dávila-Contreras, E. M.; Qi, Y.; Lee, J.; Monje-Galvan, V.; Venable, R. M.; Klauda, J. B.; Im, W. CHARMM-GUI Membrane Builder toward Realistic Biological Membrane Simulations. *J. Comput. Chem.* **2014**, *35* (27), 1997–2004. <https://doi.org/10.1002/jcc.23702>.
- (310) Huang, J.; MacKerell Jr, A. D. CHARMM36 All-Atom Additive Protein Force Field: Validation Based on Comparison to NMR Data. *J. Comput. Chem.* **2013**, *34* (25), 2135–2145. <https://doi.org/10.1002/jcc.23354>.
- (311) Vanommeslaeghe, K.; Hatcher, E.; Acharya, C.; Kundu, S.; Zhong, S.; Shim, J.; Darian, E.; Guvench, O.; Lopes, P.; Vorobyov, I.; Mackerell Jr., A. D. CHARMM General Force Field: A Force Field for Drug-like Molecules Compatible with the CHARMM All-Atom Additive Biological Force Fields. *J. Comput. Chem.* **2010**, *31* (4), 671–690. <https://doi.org/10.1002/jcc.21367>.
- (312) Essmann, U.; Perera, L.; Berkowitz, M. L.; Darden, T.; Lee, H.; Pedersen, L. G. A Smooth Particle Mesh Ewald Method. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103* (19), 8577–8593. <https://doi.org/10.1063/1.470117>.
- (313) Feller, S. E.; Zhang, Y.; Pastor, R. W.; Brooks, B. R. Constant Pressure Molecular Dynamics Simulation: The Langevin Piston Method. *J. Chem. Phys.* **1995**. <https://doi.org/10.1063/1.470648>.

- (314) Miyamoto, S.; Kollman, P. A. Settle: An Analytical Version of the SHAKE and RATTLE Algorithm for Rigid Water Models. *J. Comput. Chem.* **1992**, *13* (8), 952–962. <https://doi.org/10.1002/jcc.540130805>.
- (315) Tuckerman, M.; Berne, B. J.; Martyna, G. J. Reversible Multiple Time Scale Molecular Dynamics. *J. Chem. Phys.* **1992**, *97* (3), 1990–2001. <https://doi.org/10.1063/1.463137>.
- (316) Phillips, J. C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R. D.; Kalé, L.; Schulten, K. Scalable Molecular Dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26* (16), 1781–1802. <https://doi.org/10.1002/jcc.20289>.
- (317) Phillips, J. C.; Hardy, D. J.; Maia, J. D. C.; Stone, J. E.; Ribeiro, J. V.; Bernardi, R. C.; Buch, R.; Fiorin, G.; Hénin, J.; Jiang, W.; McGreevy, R.; Melo, M. C. R.; Radak, B. K.; Skeel, R. D.; Singharoy, A.; Wang, Y.; Roux, B.; Aksimentiev, A.; Luthey-Schulten, Z.; Kalé, L. V.; Schulten, K.; Chipot, C.; Tajkhorshid, E. Scalable Molecular Dynamics on CPU and GPU Architectures with NAMD. *J. Chem. Phys.* **2020**, *153* (4), 044130. <https://doi.org/10.1063/5.0014475>.
- (318) Nakamura, Y.; Ohta, T.; Oe, Y. A Formal Anti-Markovnikov Hydroamination of Allylic Alcohols via Tandem Oxidation/1,4-Conjugate Addition/1,2-Reduction Using a Ru Catalyst. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (35), 7459–7462. <https://doi.org/10.1039/C5CC01584G>.

Apéndices

Apéndice 1. Derechos, permisos y creación de figuras

- Las siguientes figuras han sido adaptadas o reproducidas sin necesidad de permiso:

La **Figura 1** ha sido adaptada de la ref. 3. La **Figura 18 (B)** ha sido adaptada de la Figura 5 de la ref. 165. La **Figura 19** ha sido adaptada de la Figura 7 de la ref. 165.

- Las siguientes figuras han sido adaptadas o reproducidas bajo permiso:

La **Figura 65** ha sido adaptada de la Figura 1 de la ref. 277 con permiso de Springer Nature bajo la licencia 5487850446102.

La **Figura 67** ha sido reproducida de la Figura 1 de la ref. 281 con permiso de Springer Nature bajo la licencia 5487850934916.

- La **Figura 2, Figura 6, Figura 8, Figura 11, Figura 22, Figura 23, Figura 24, Figura 25 y Figura 27** han sido creadas mediante el uso del programa Biorender.com.

- Todas las estructuras y esquemas químicos han sido creados mediante el uso del programa ChemDraw v20.

- La **Figura 29, Figura 30 (A), (B), Figura 31, Figura 32, Figura 36 (B), Figura 38, Figura 39, Figura 46, Figura 47, Figura 50 (B), Figura 51, Figura 52, Figura 54, Figura 55, Figura 56, Figura 57, Figura 58, Figura 59, Figura 61 (A), Figura 62 (B), Figura 68, Figura 69 y Figura 70** han sido creadas mediante el uso del programa GraphPad v8.

- La **Figura 35, Figura 53 (A), Figura 61 (B) y Figura 63** han sido creadas mediante el uso del programa FlowJo v10.

- La **Figura 28 (A), Figura 33, Figura 34, Figura 41 y Figura 45** han sido creadas mediante el uso del programa PyMol.

- El mapa del plásmido de la **Figura 64 (A)** ha sido creado mediante el uso del programa SnapGene.

- Las estructuras tridimensionales de las siguientes figuras han sido creados mediante el uso del programa BIOVIA Discovery Studio:

La **Figura 9** ha sido creada a partir del PDB ID: 2JCR (**A**) y 1UUH (**B**).

La **Figura 10** ha sido creada a partir del PDB ID: 2JCP (proteína sola) y 2JCR (proteína en complejo con el HA₈).

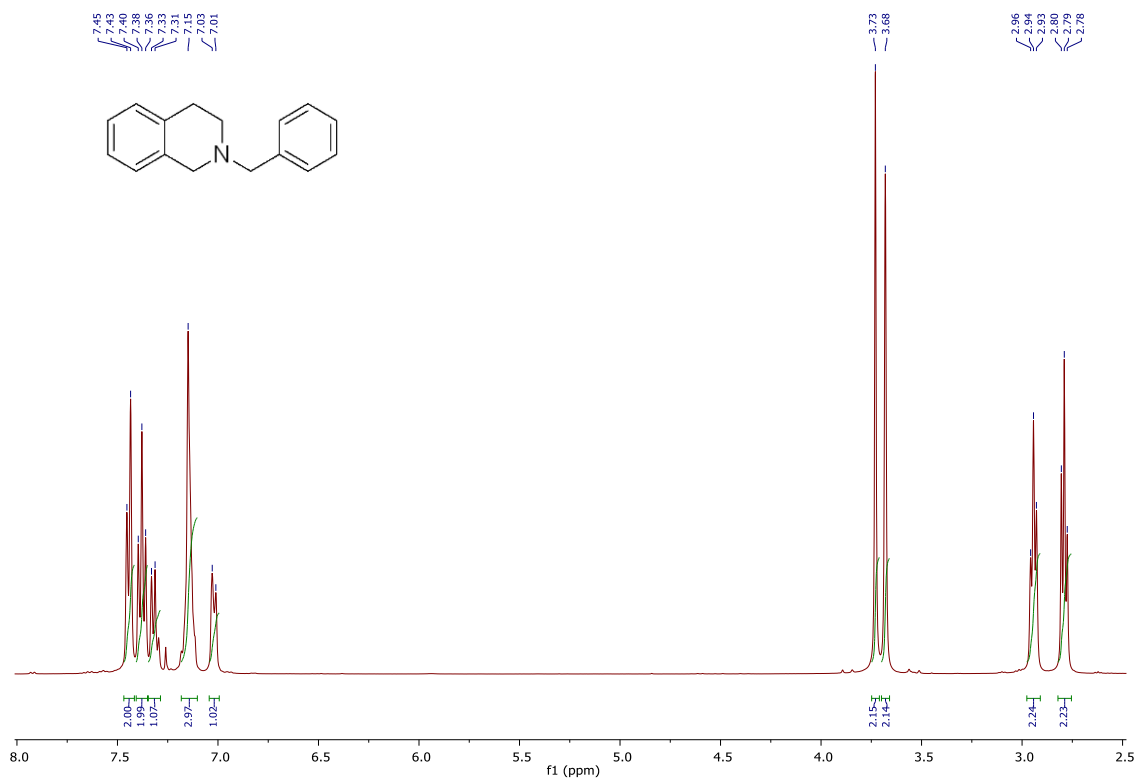
La **Figura 16** ha sido creada a partir del PDB ID: 5BZK y 2JCR.

La **Figura 26 (A)** ha sido creada a partir del PDB ID: 5BZK.

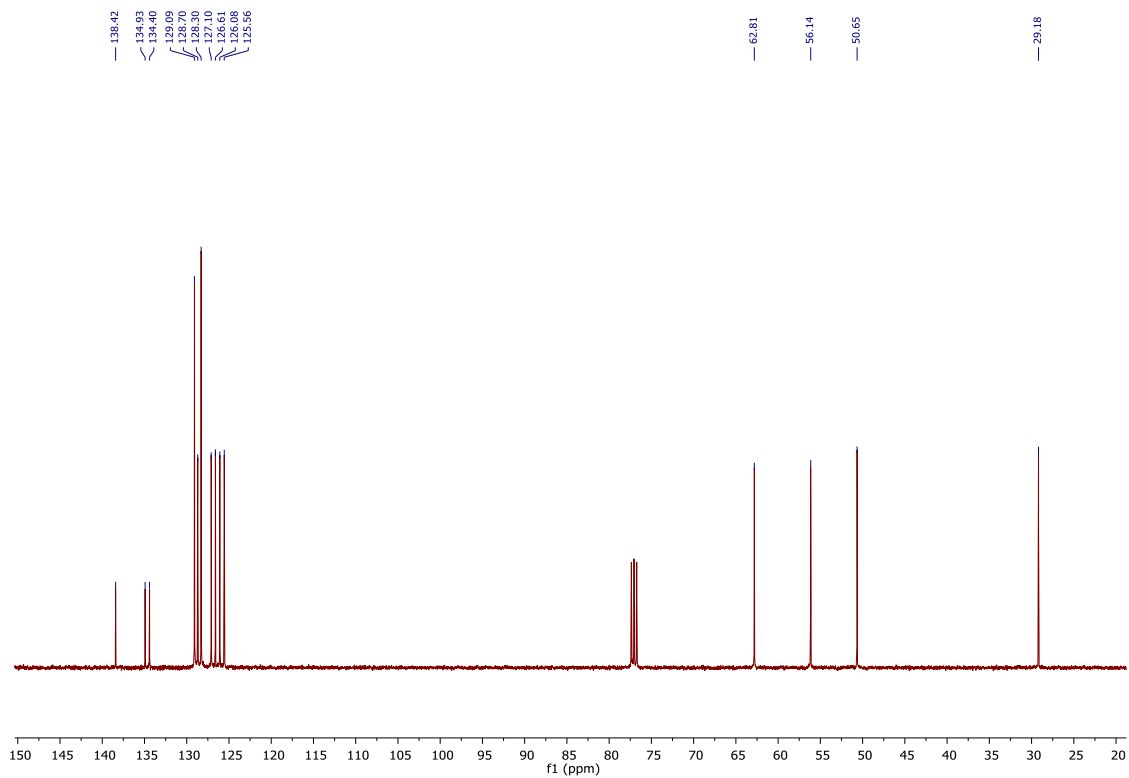
Apéndice 2. Espectros de RMN ^1H y ^{13}C

N-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (JE1a)

^1H NMR

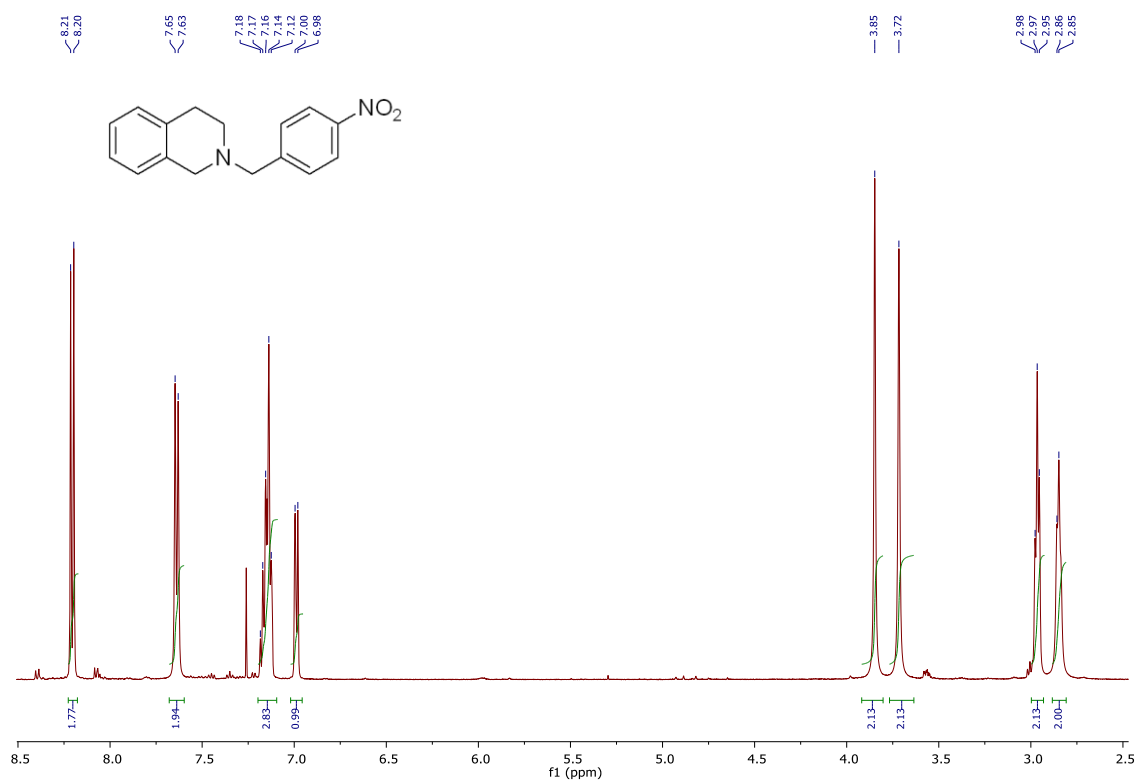


^{13}C NMR

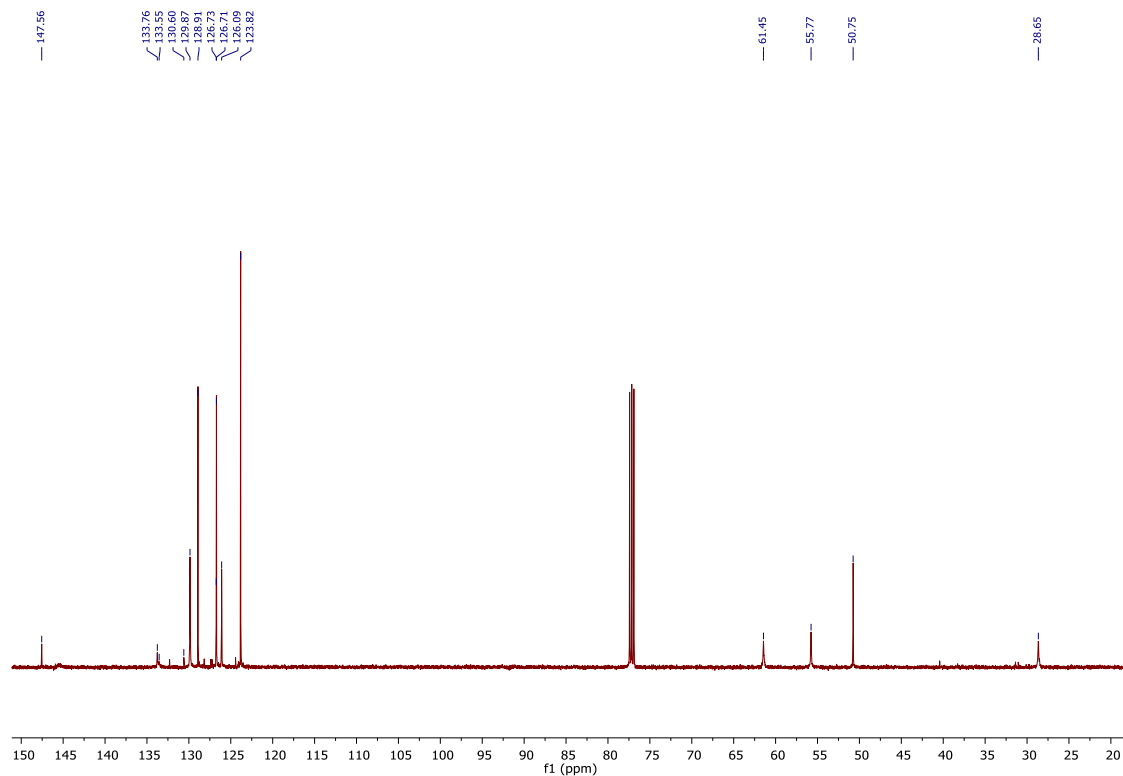


2-(4-nitrobenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (JE1b)

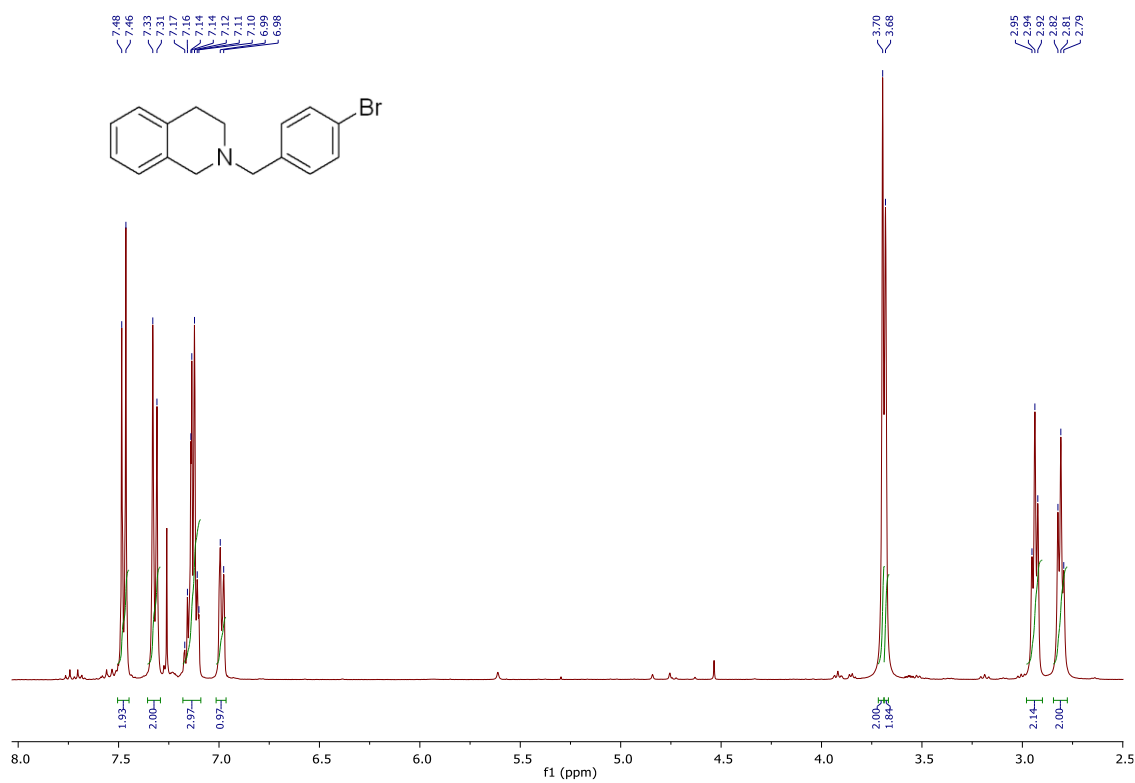
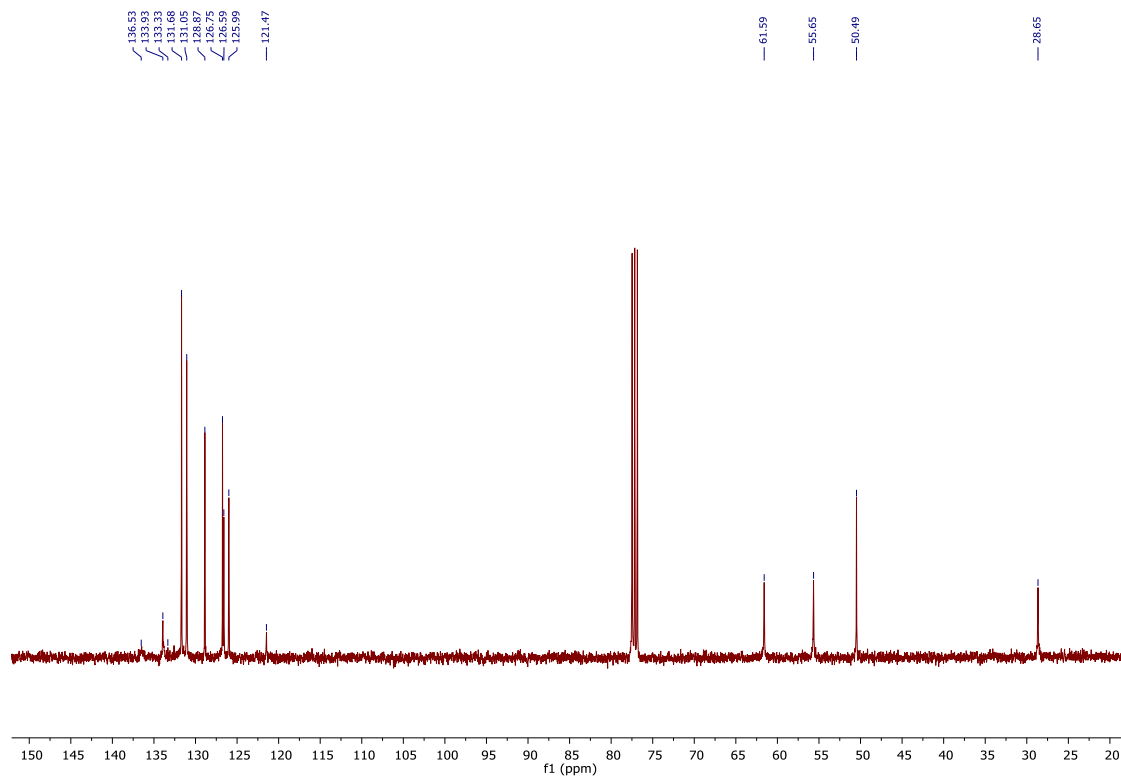
¹H NMR



¹³C NMR

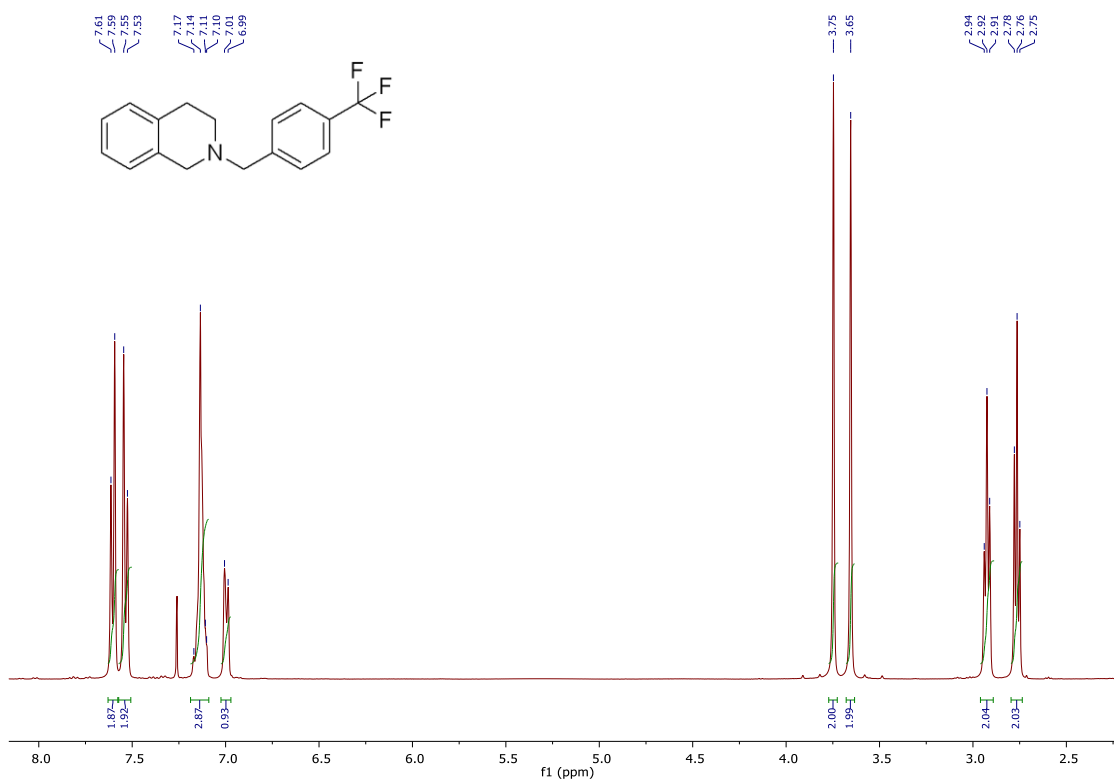


2-(4-bromobenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (JE1c)

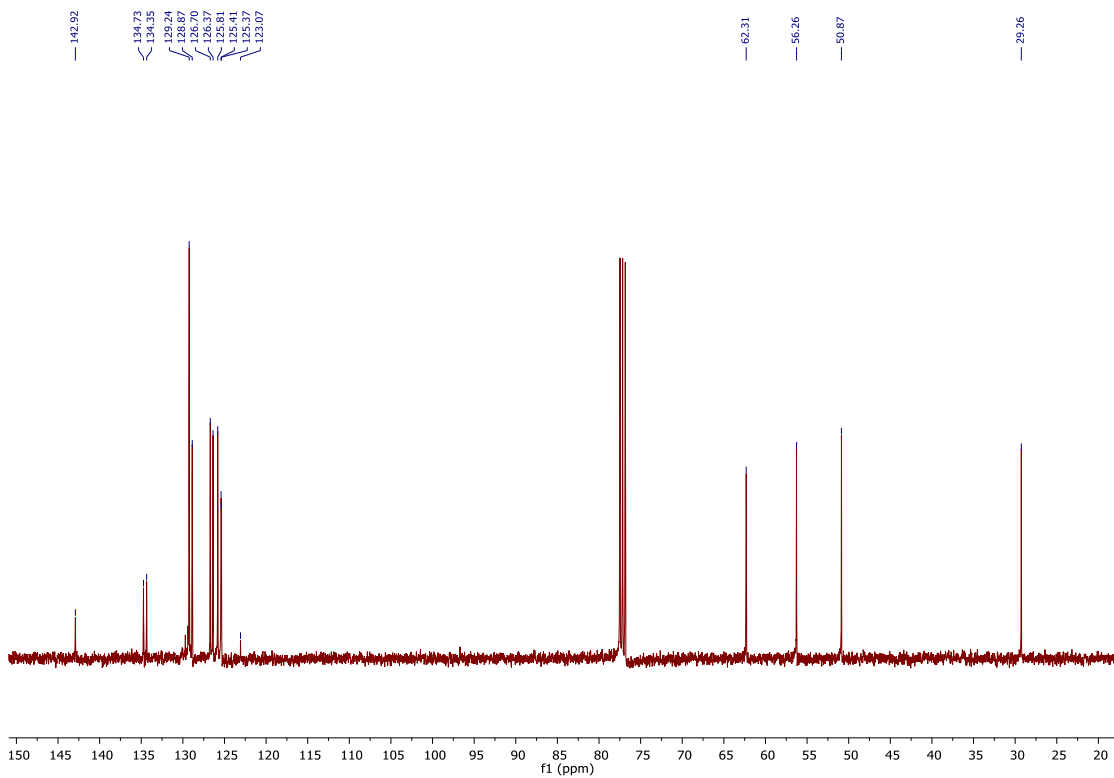
 ^1H NMR ^{13}C NMR

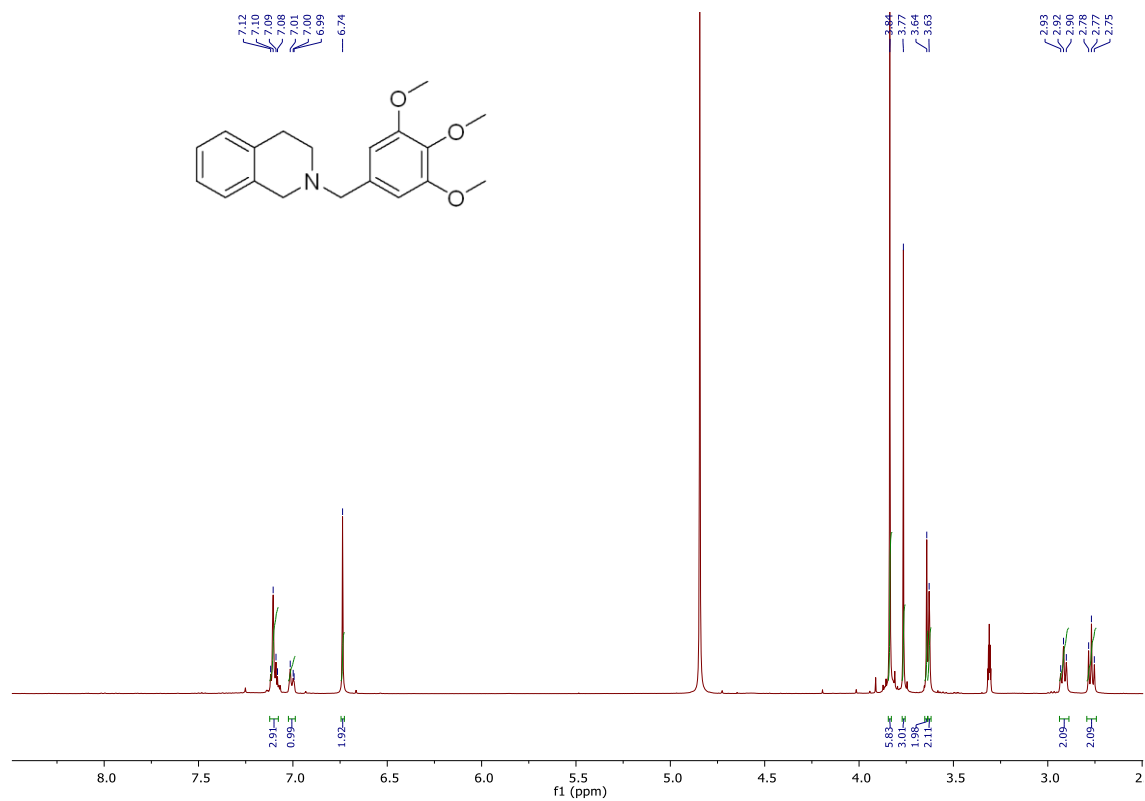
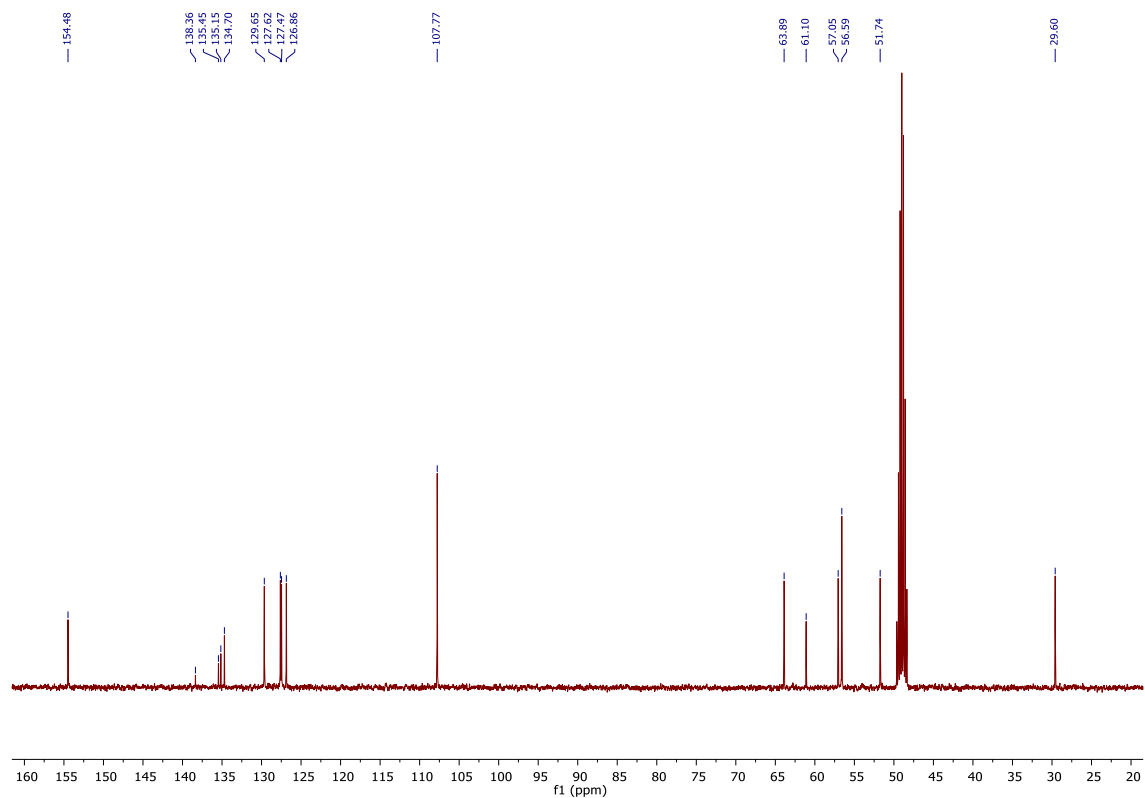
2-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (JE1d)

¹H NMR



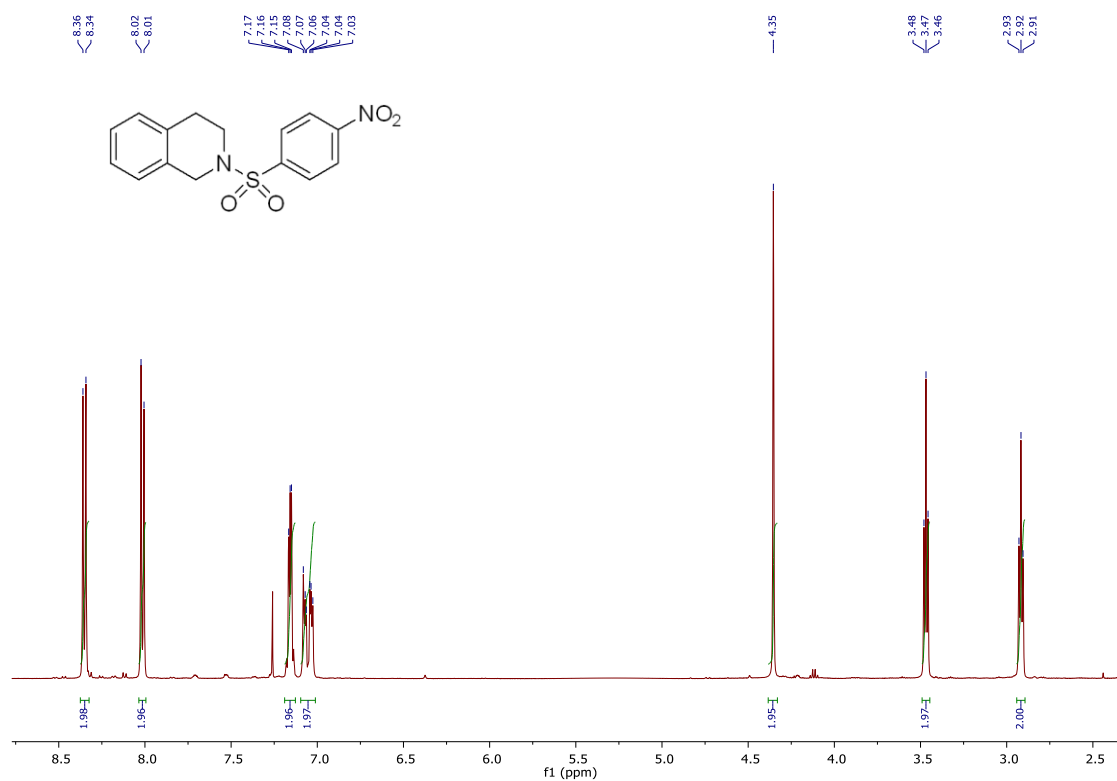
¹³C NMR



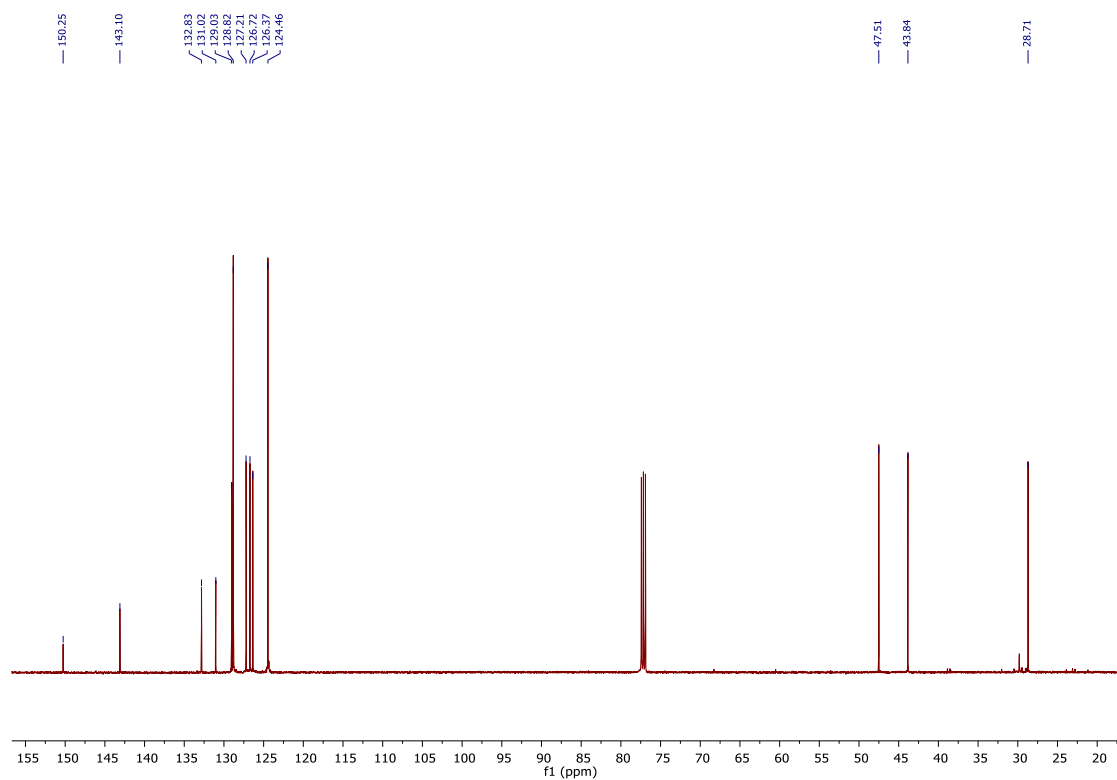
2-(3,4,5-trimethoxybenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (JE1e)**¹H NMR****¹³C NMR**

2-((4-nitrophenyl)sulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (JE1f)

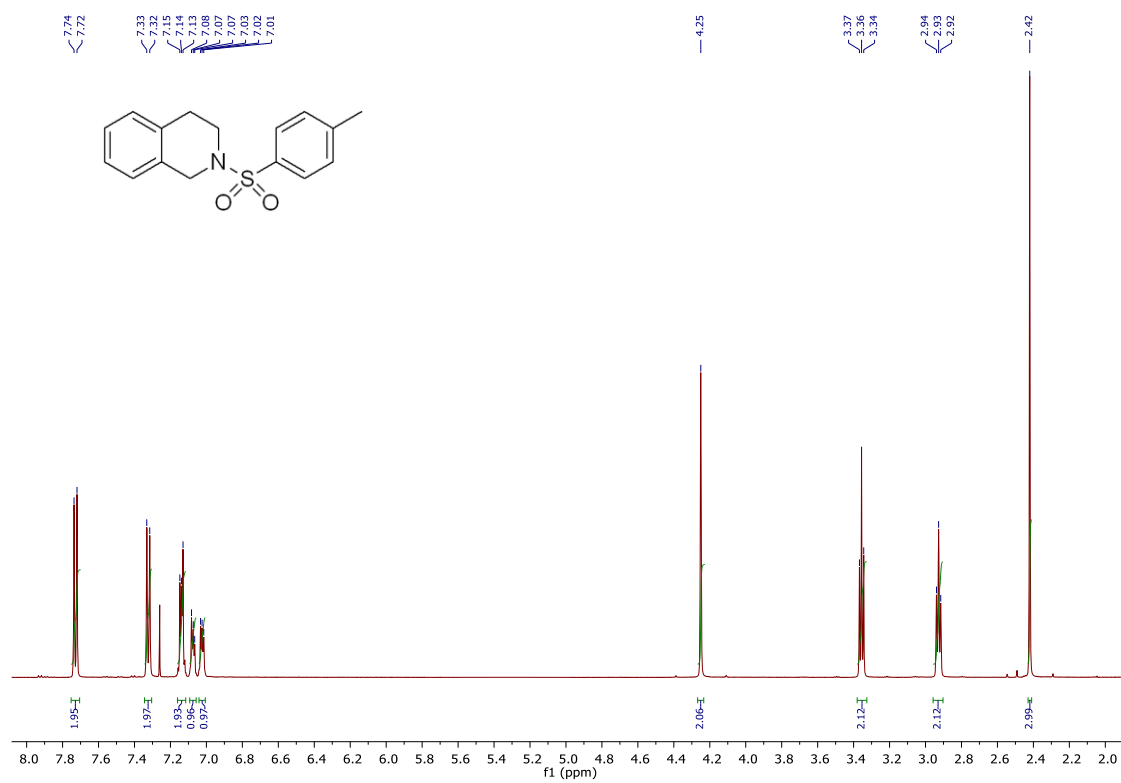
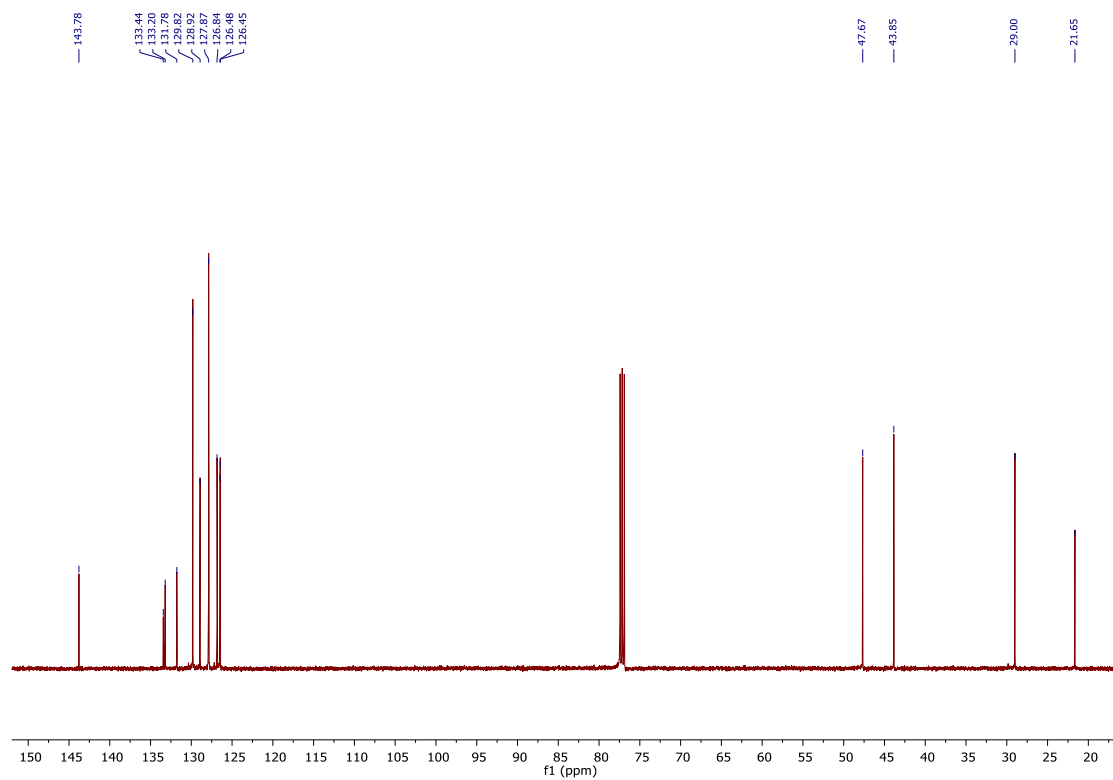
¹H NMR



¹³C NMR

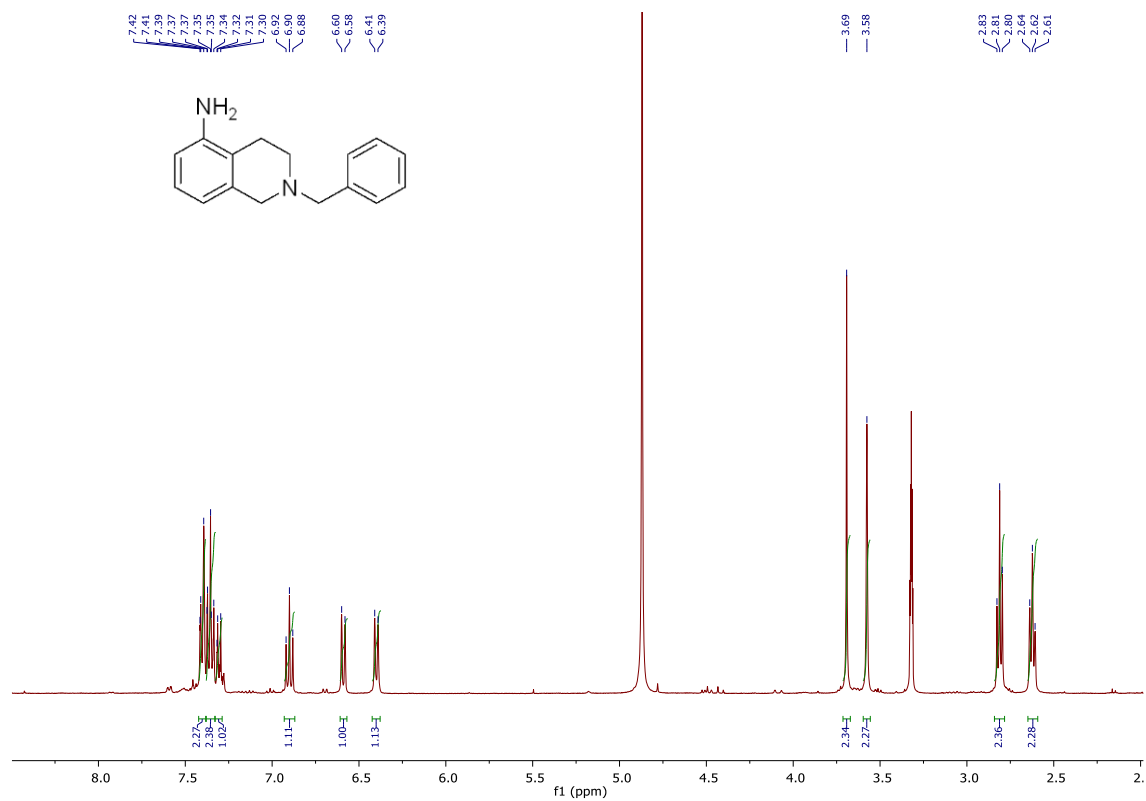


2-tosyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (JE1g)

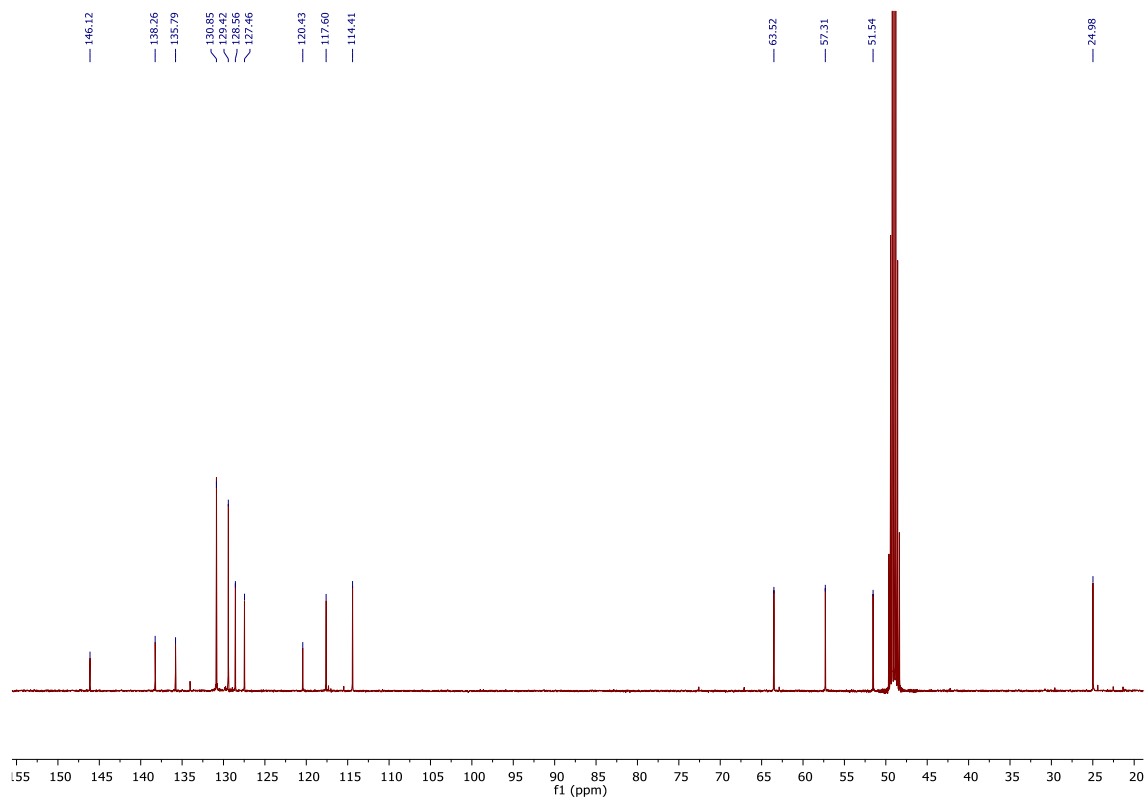
 ^1H NMR ^{13}C NMR

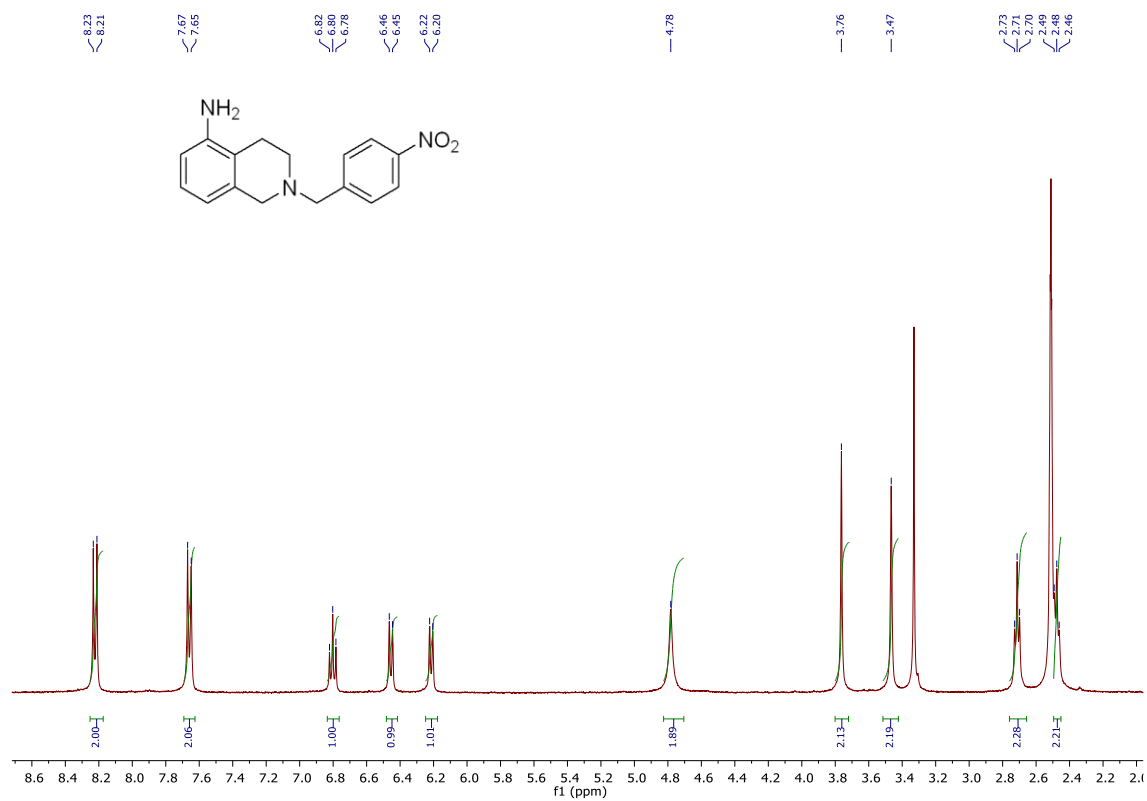
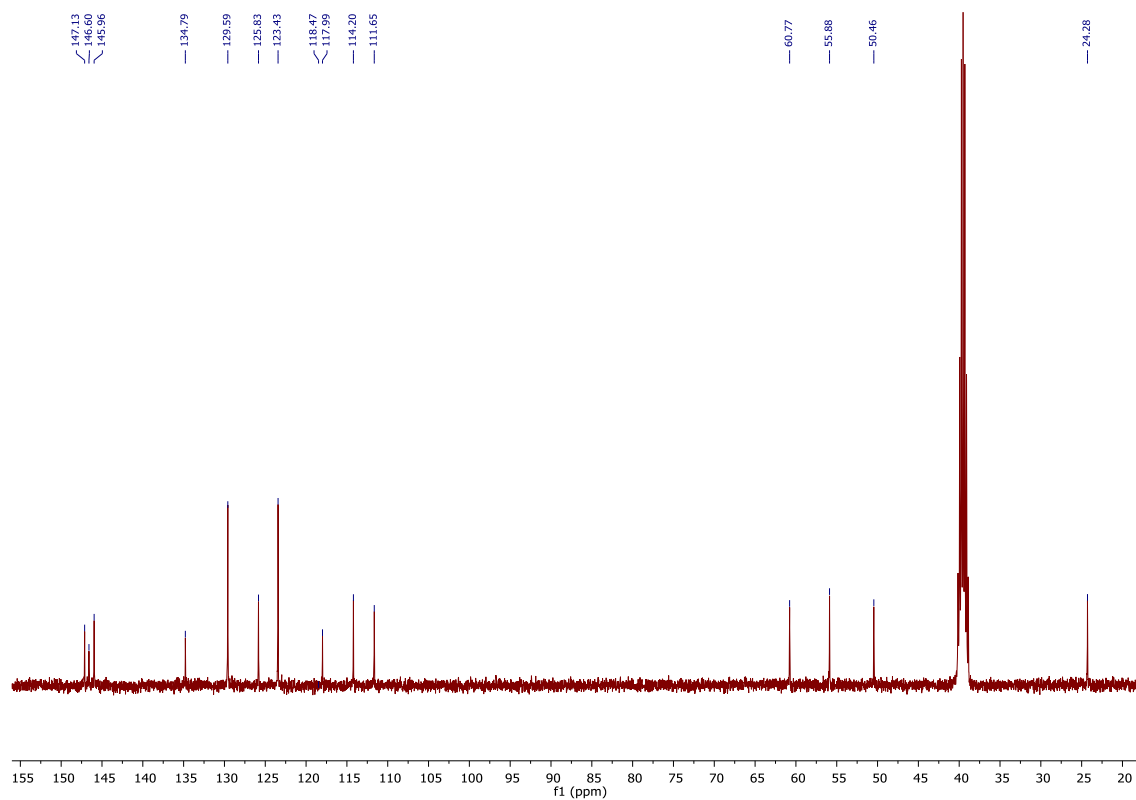
2-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-amine (JE2a)

¹H NMR



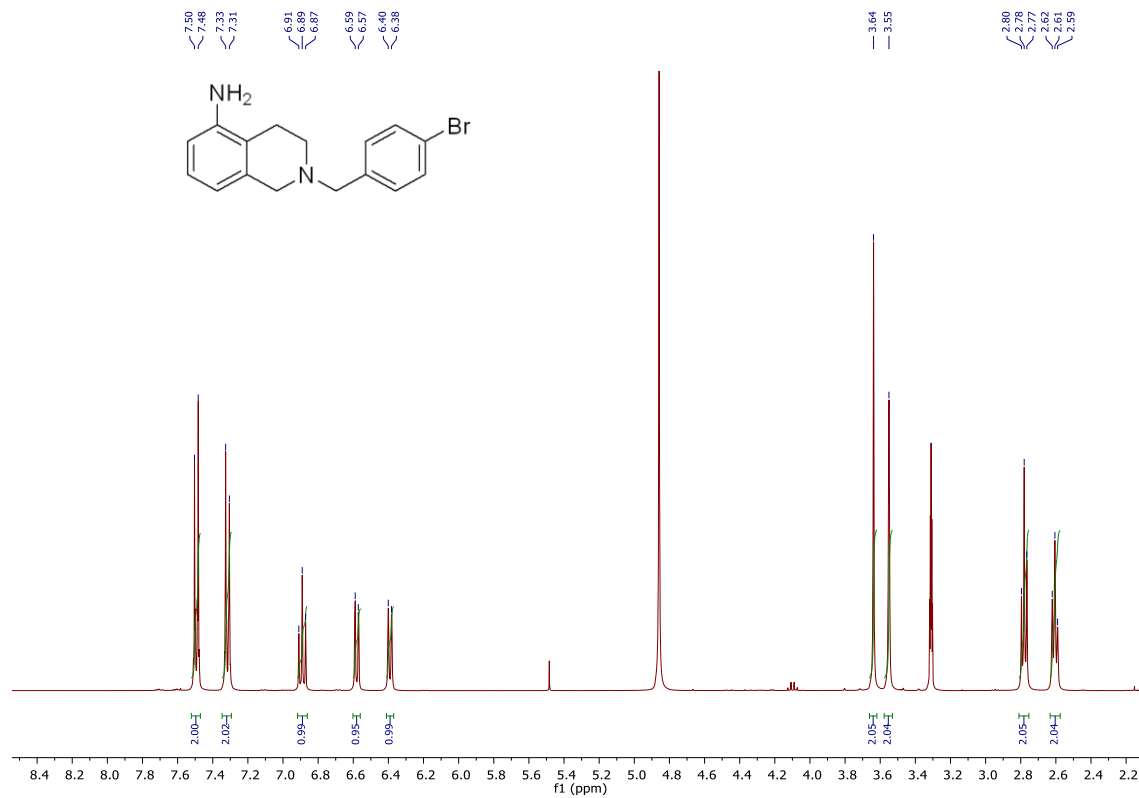
¹³C NMR



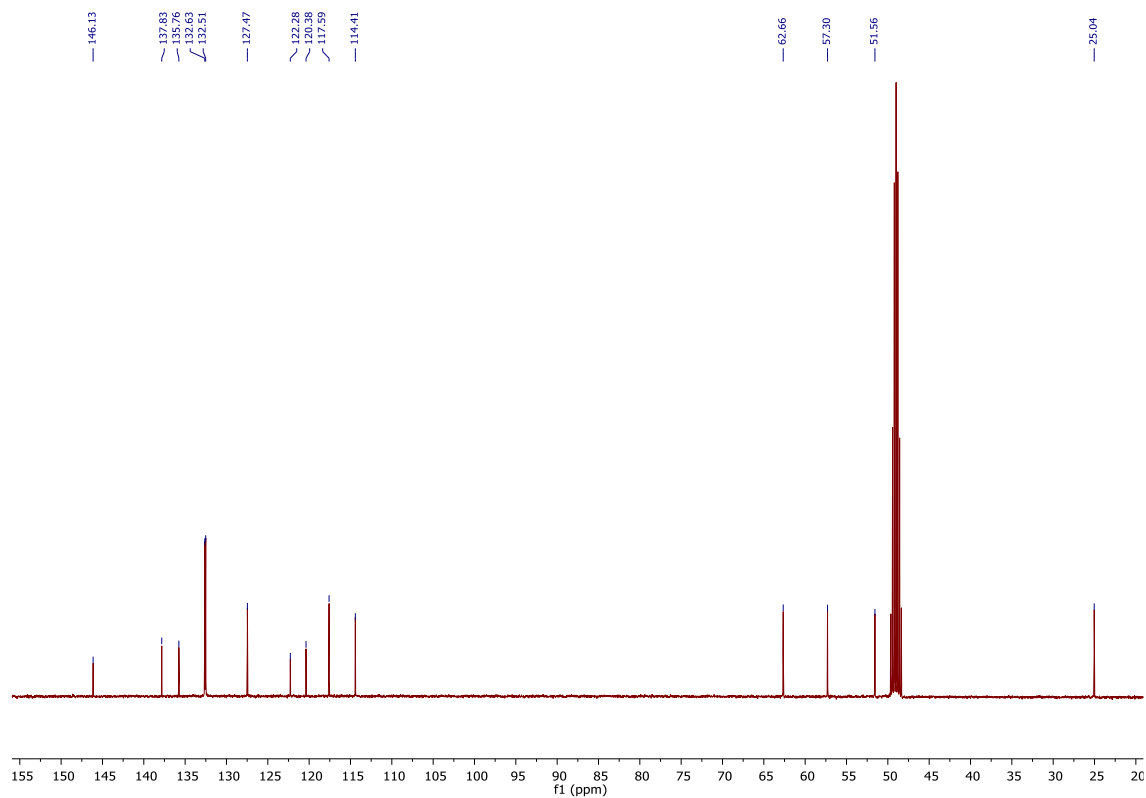
2-(4-nitrobenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-amine (JE2b)**¹H NMR****¹³C NMR**

2-(4-bromobenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-amine (JE2c)

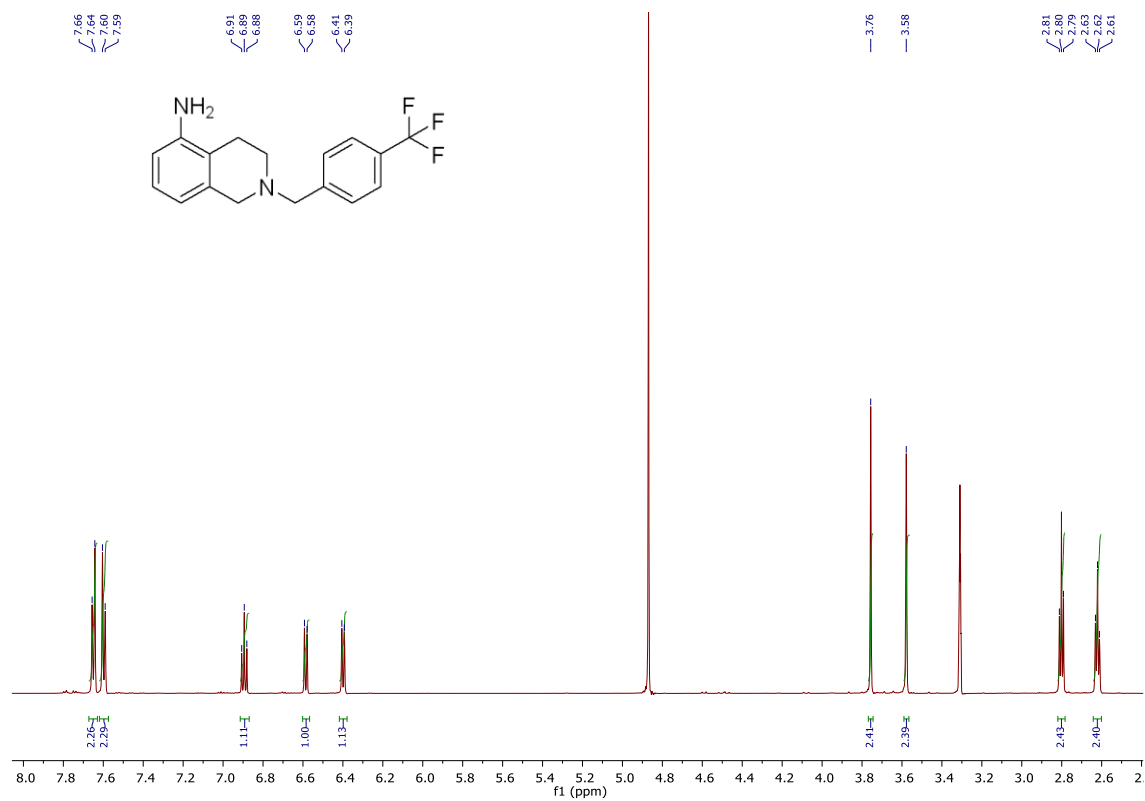
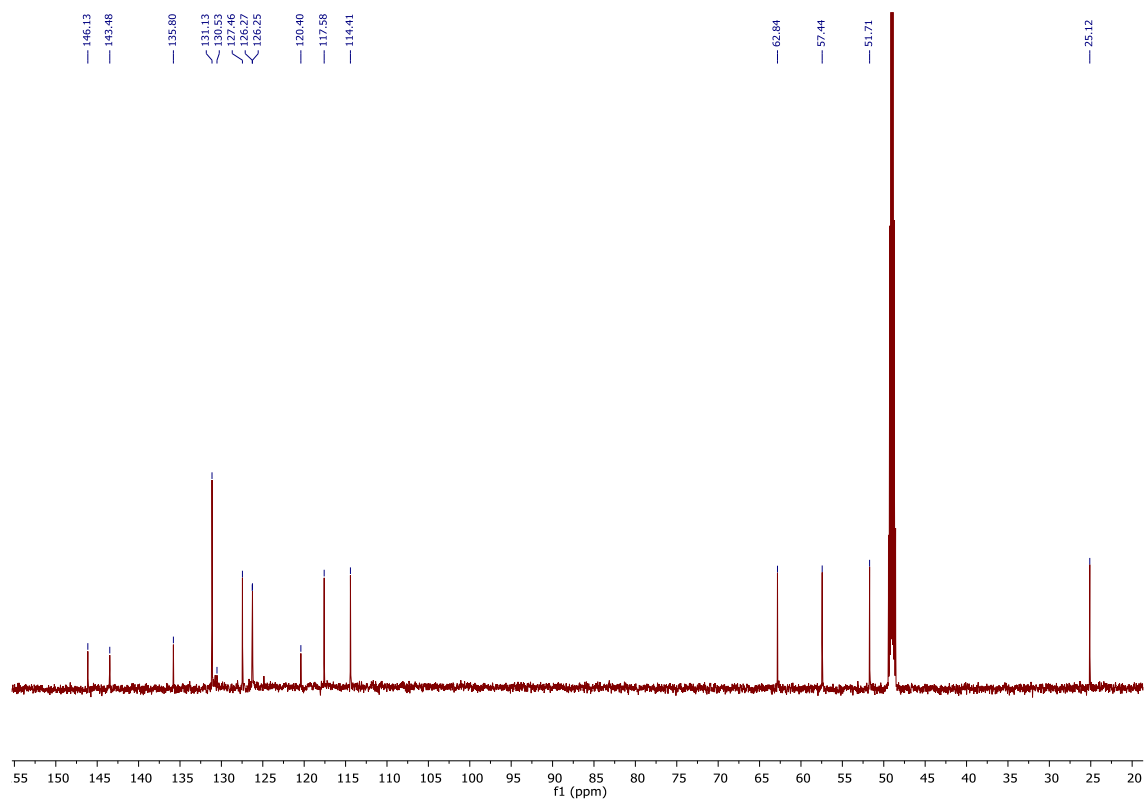
¹H NMR



¹³C NMR

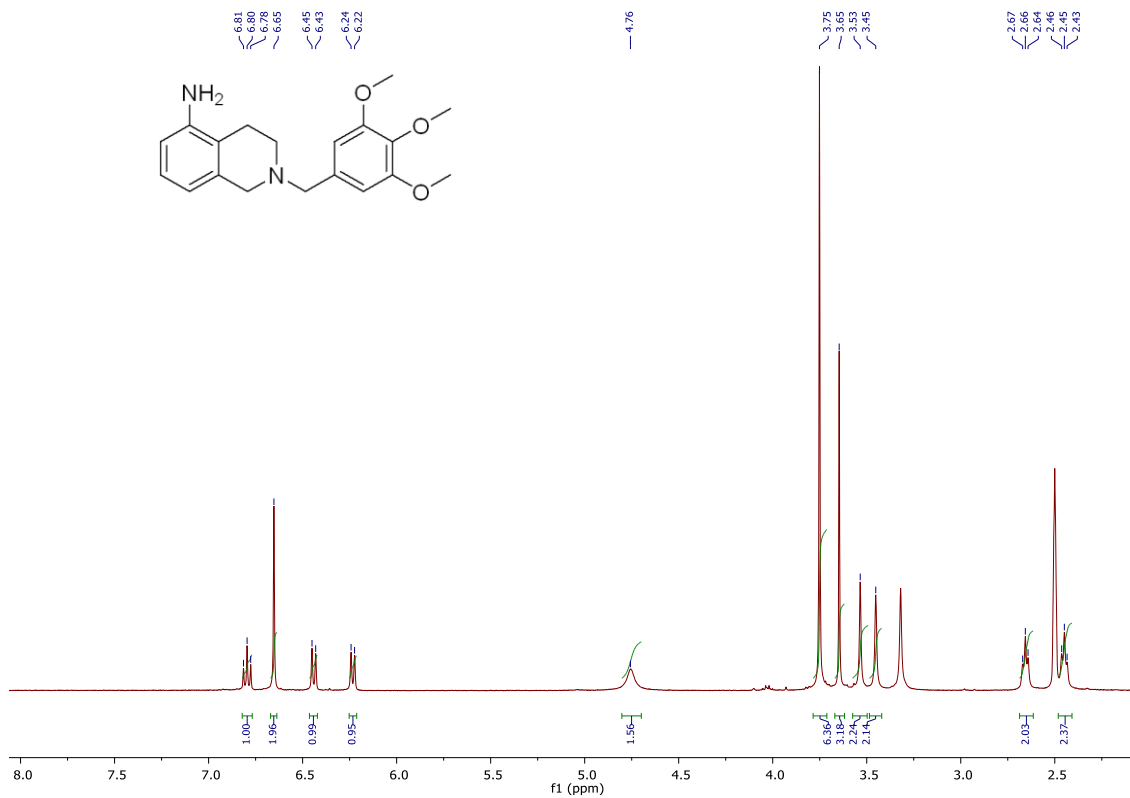


2-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-amine (JE2d)

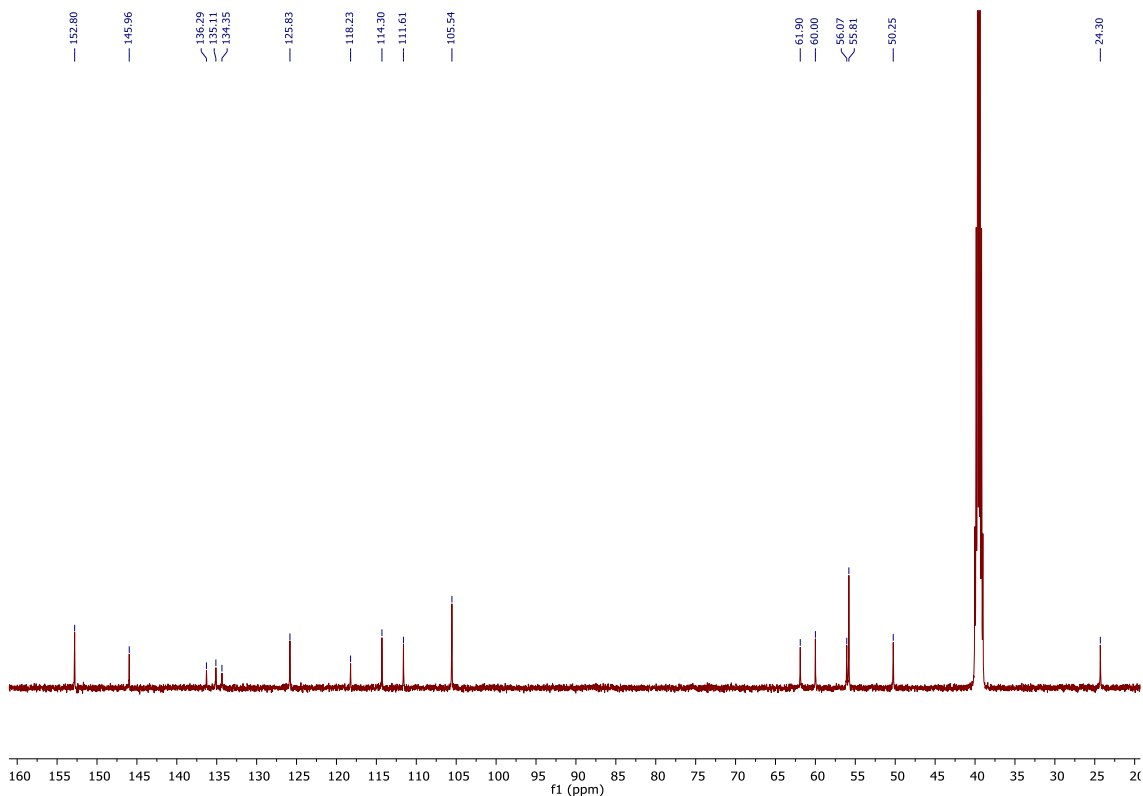
 ^1H NMR ^{13}C NMR

2-(3,4,5-trimethoxybenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-amine (JE2e)

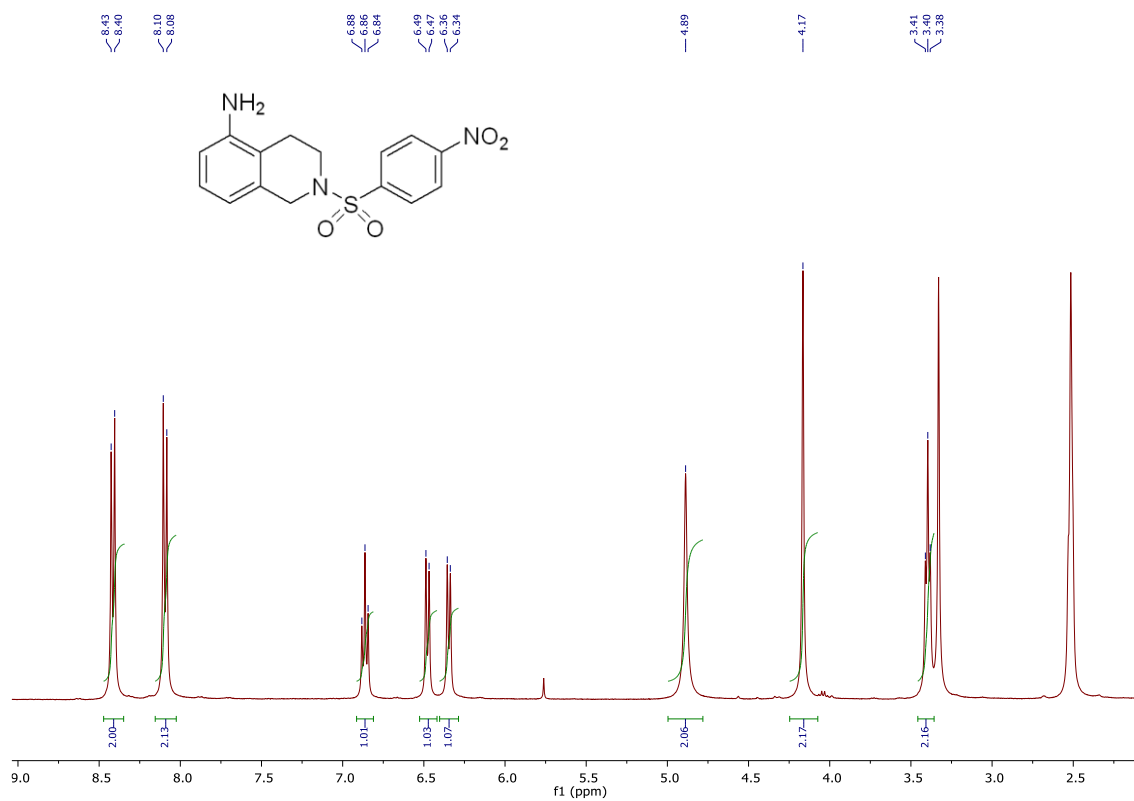
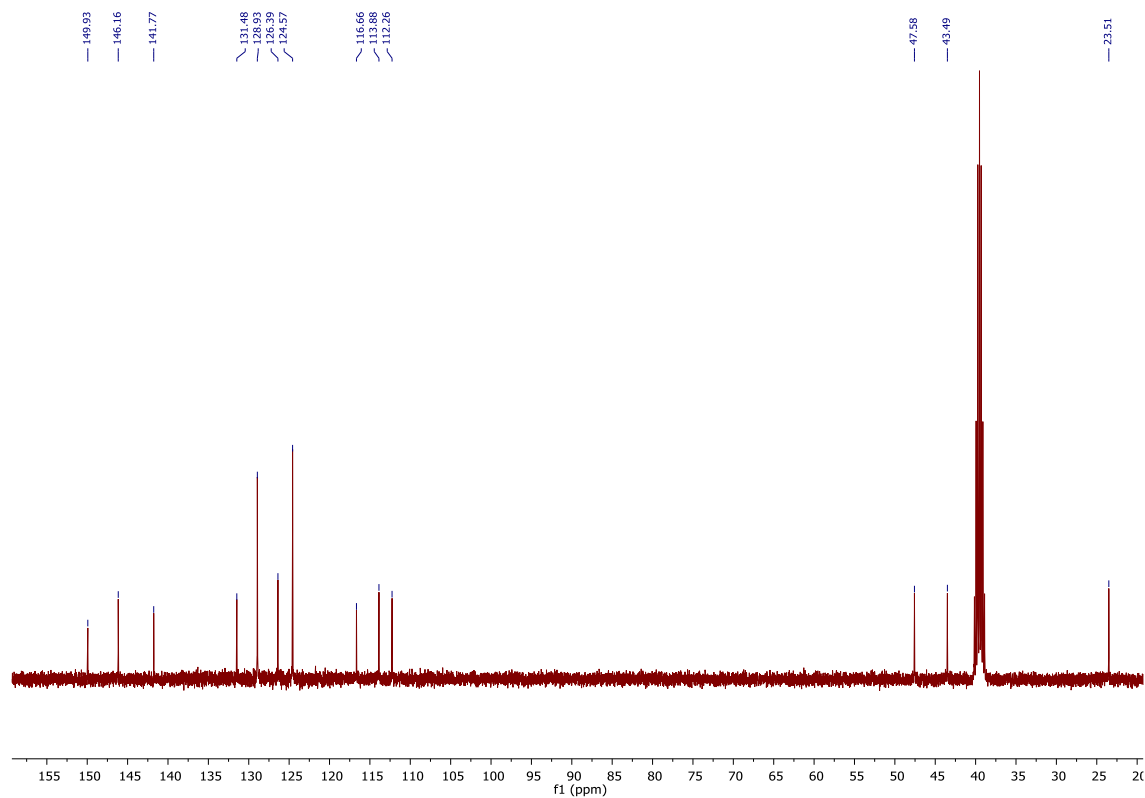
¹H NMR



¹³C NMR

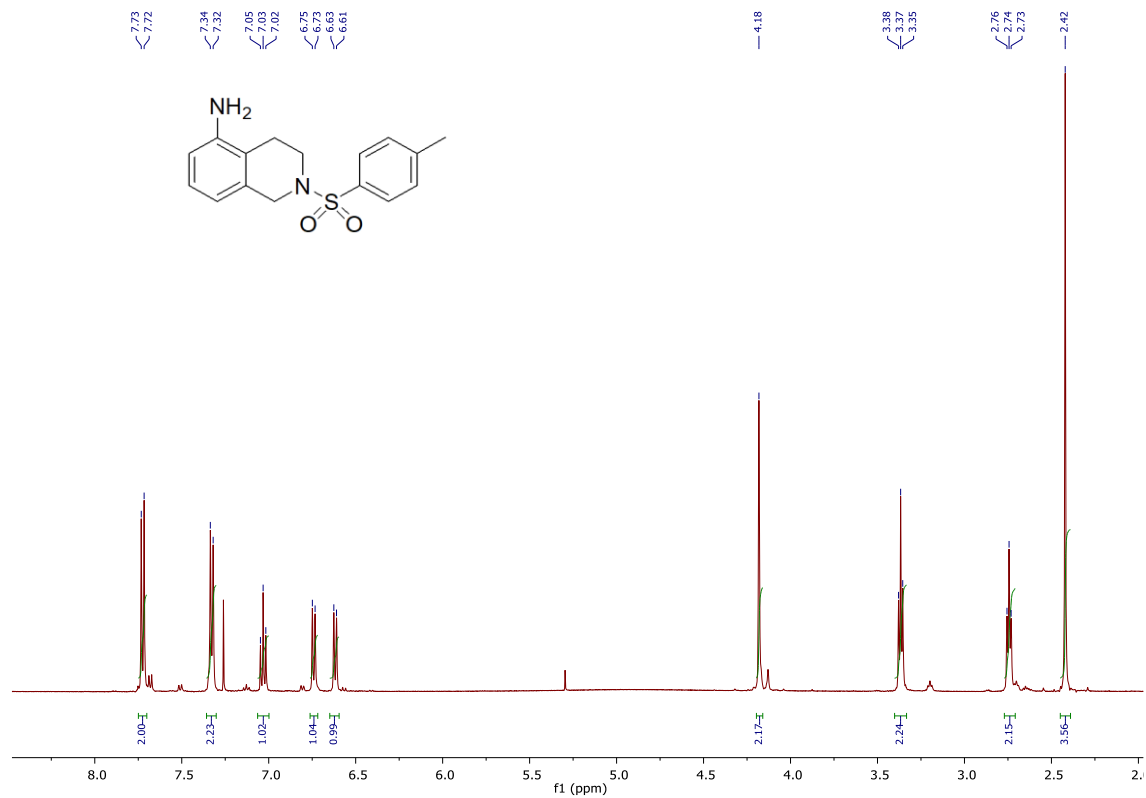


2-((4-nitrophenyl)sulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-amine (JE2f)

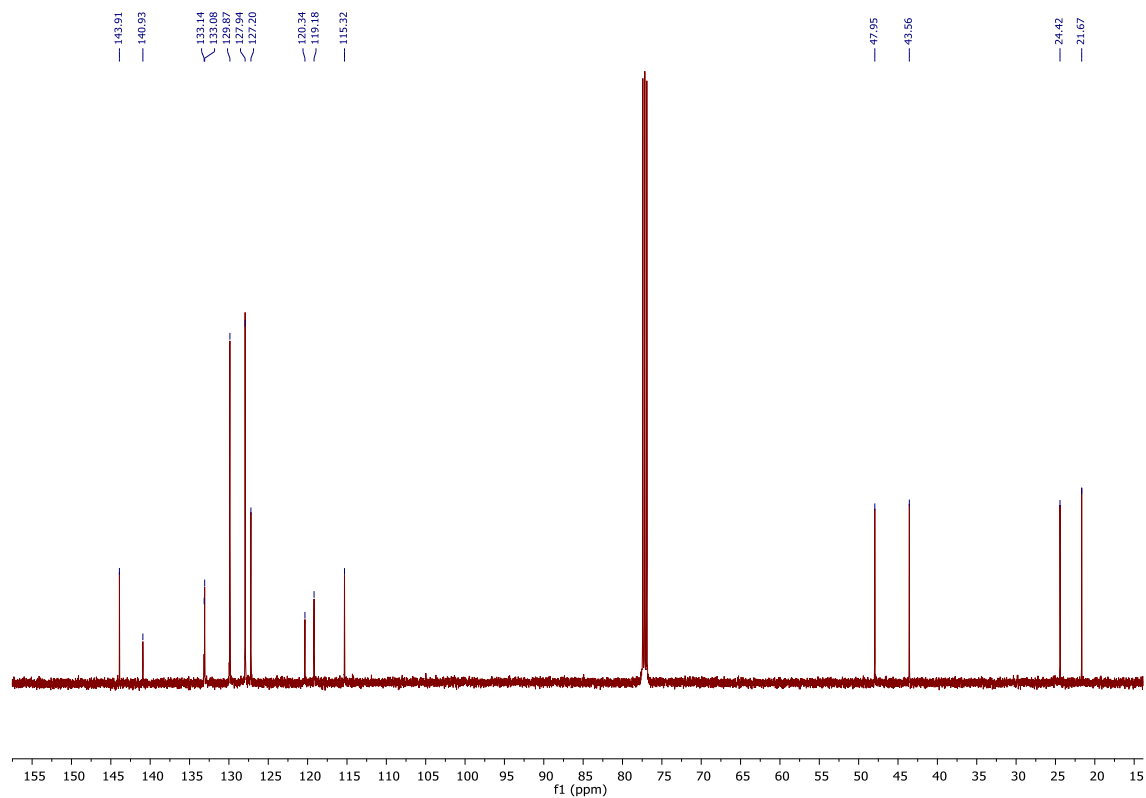
 ^1H NMR ^{13}C NMR

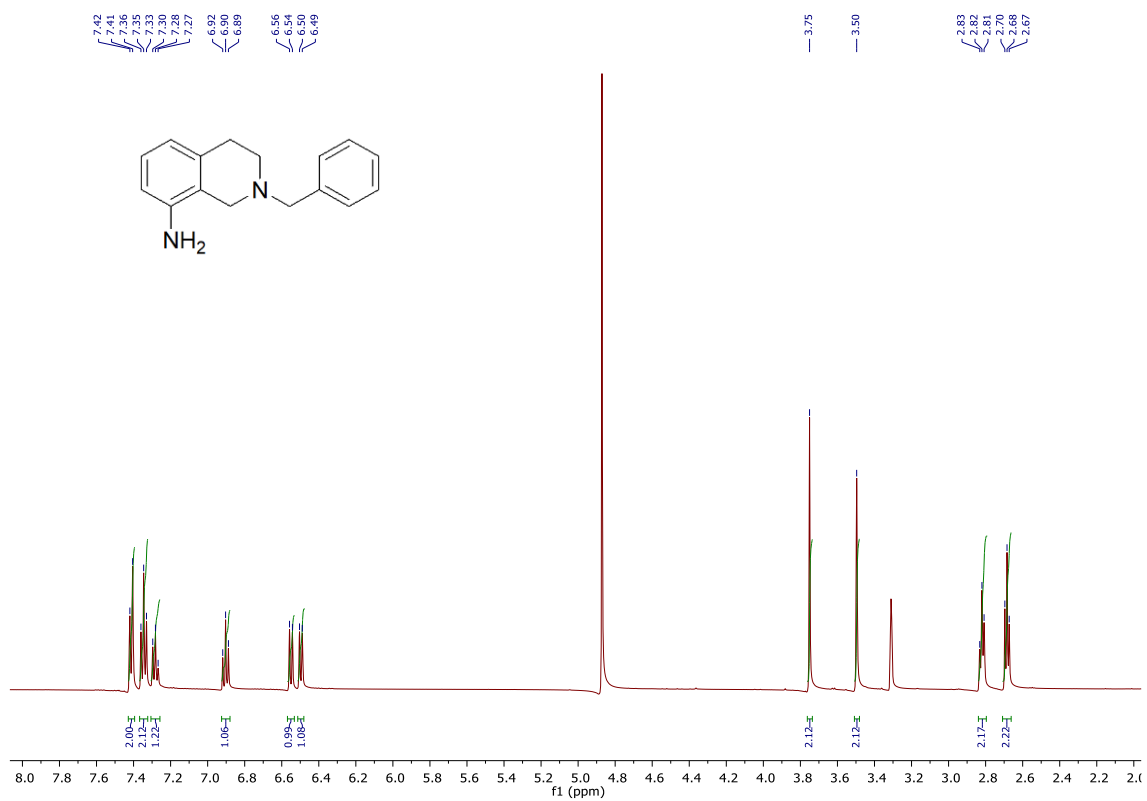
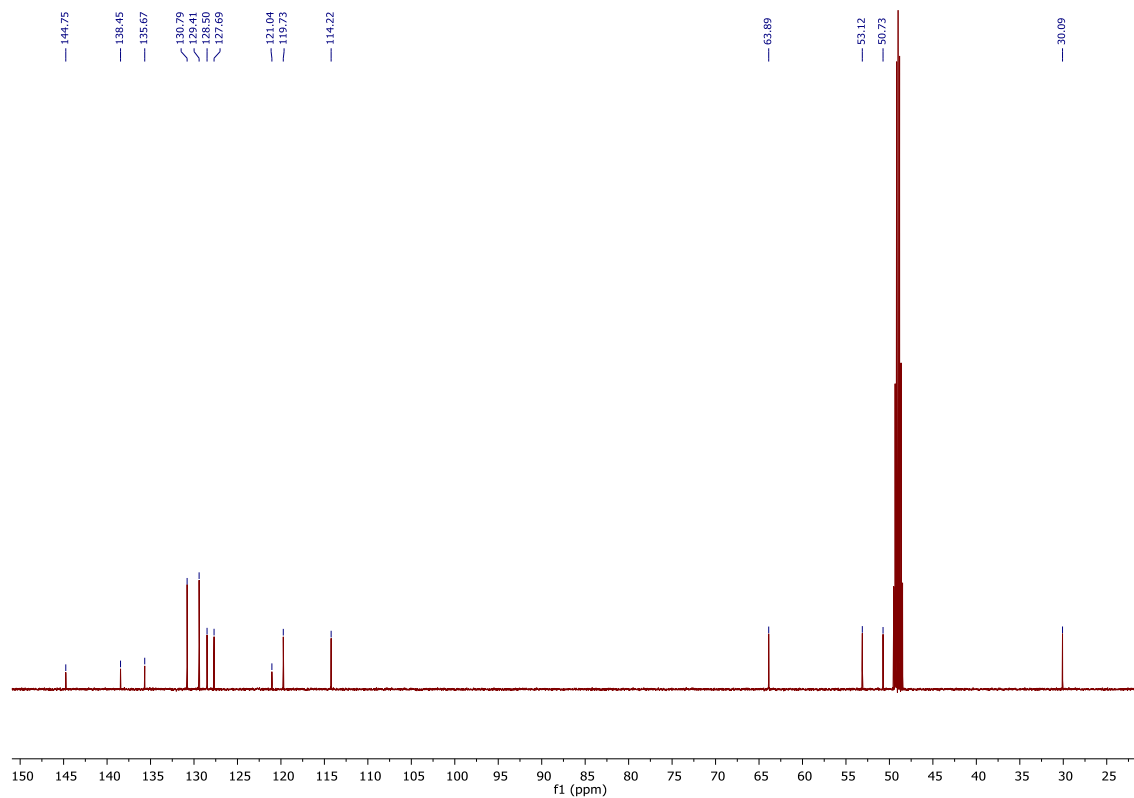
2-tosyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-amine (JE2g)

¹H NMR



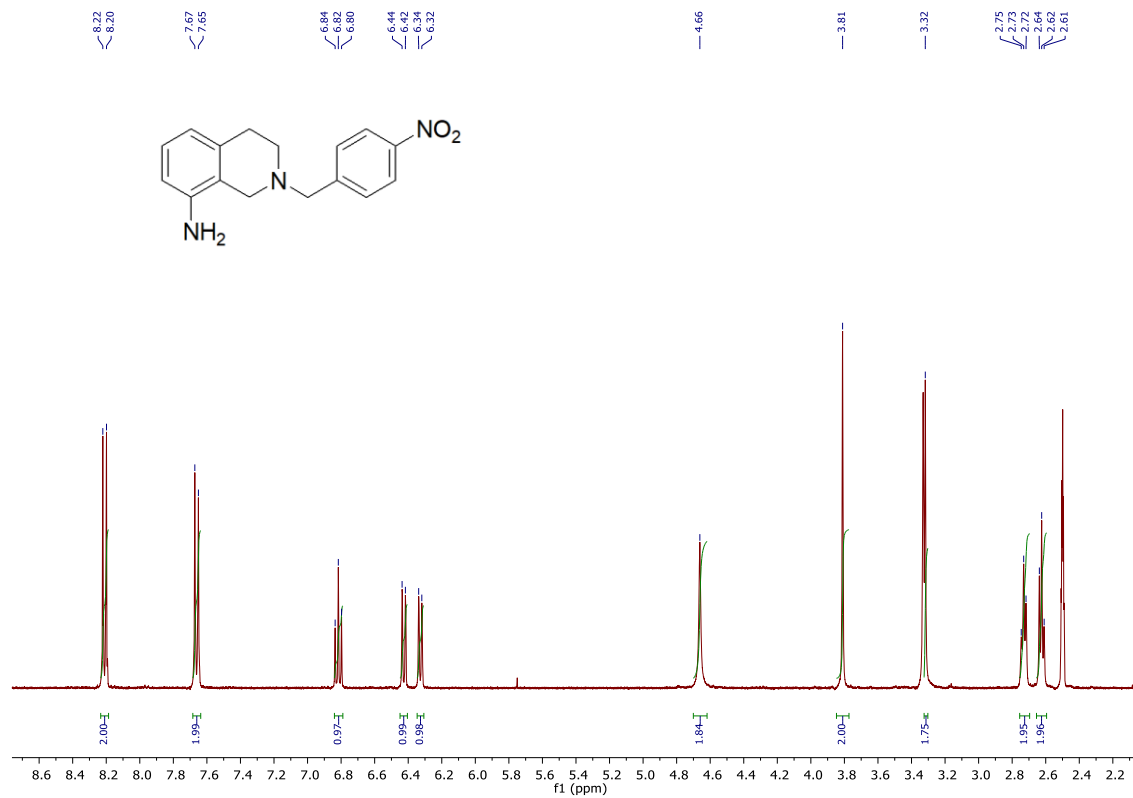
¹³C NMR



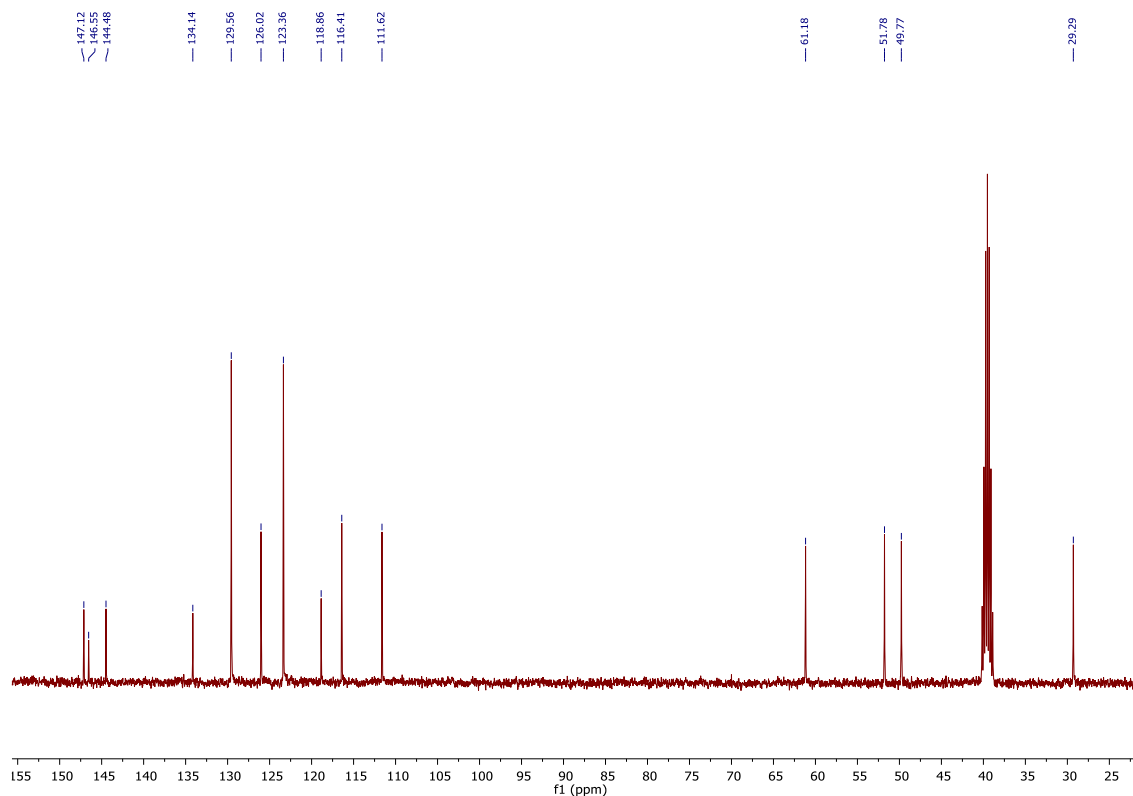
2-benzyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-8-amine (JE3a)**¹H NMR****¹³C NMR**

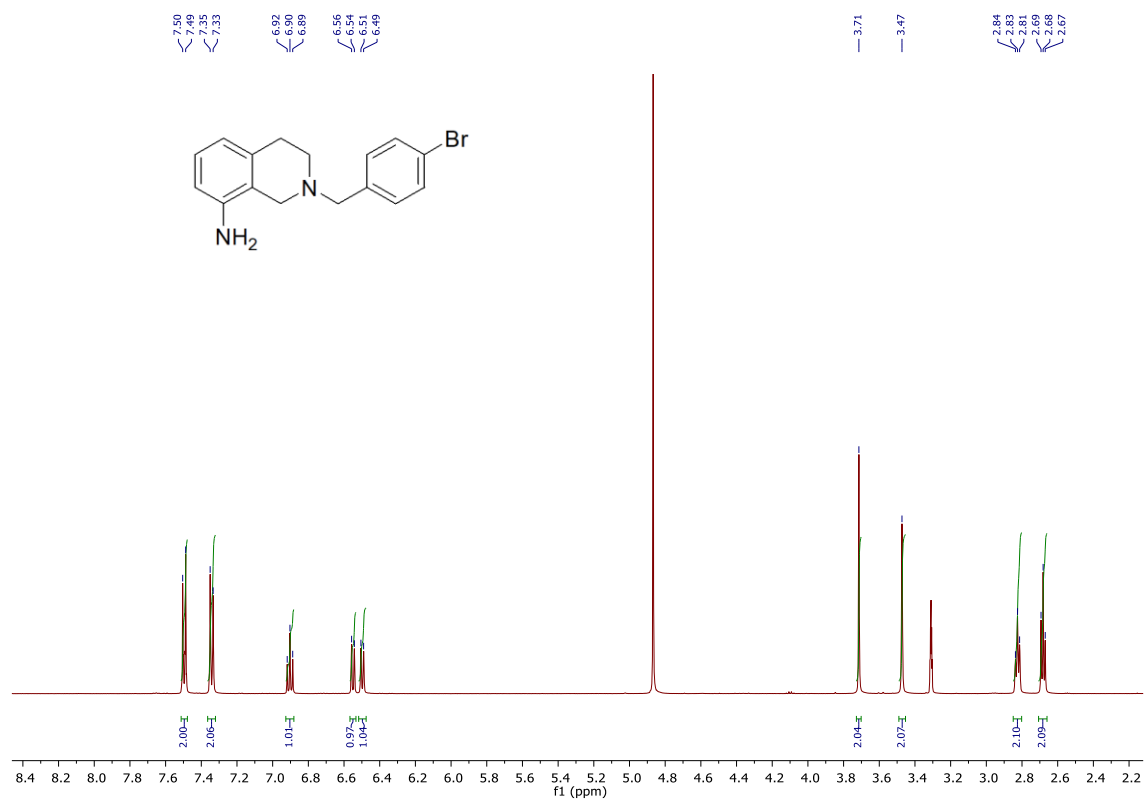
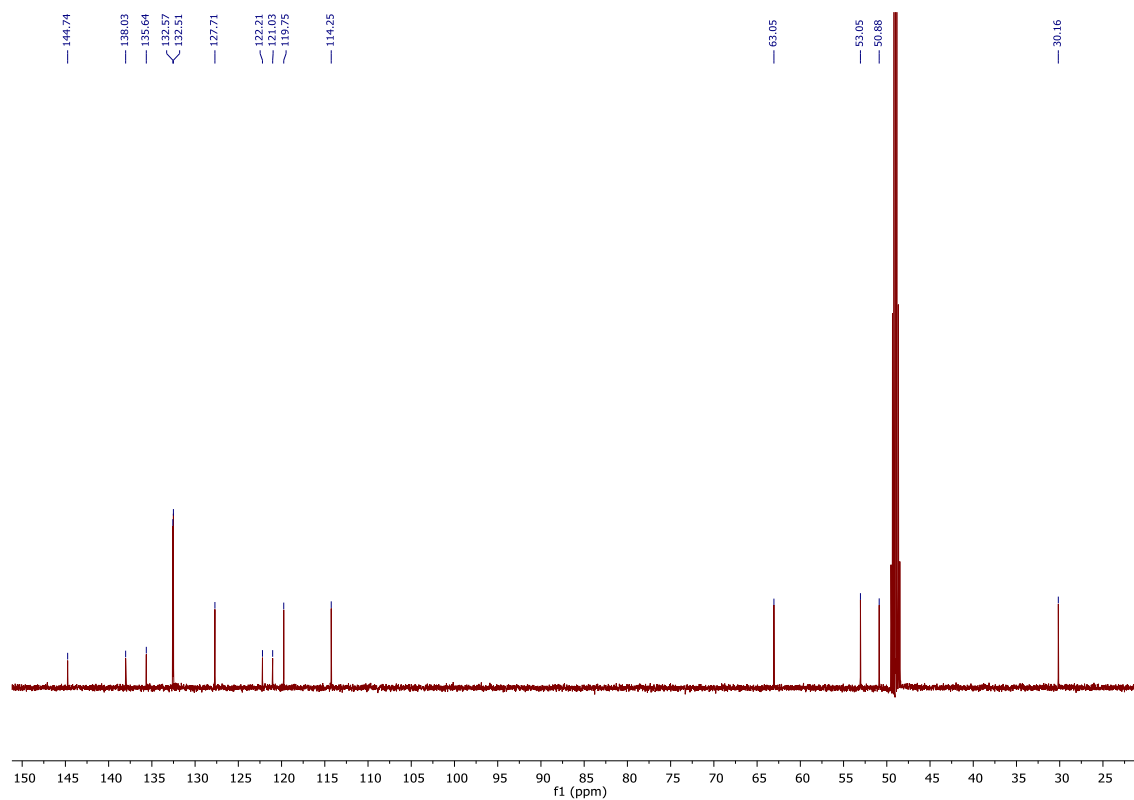
2-(4-nitrobenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-8-amine (JE3b)

¹H NMR



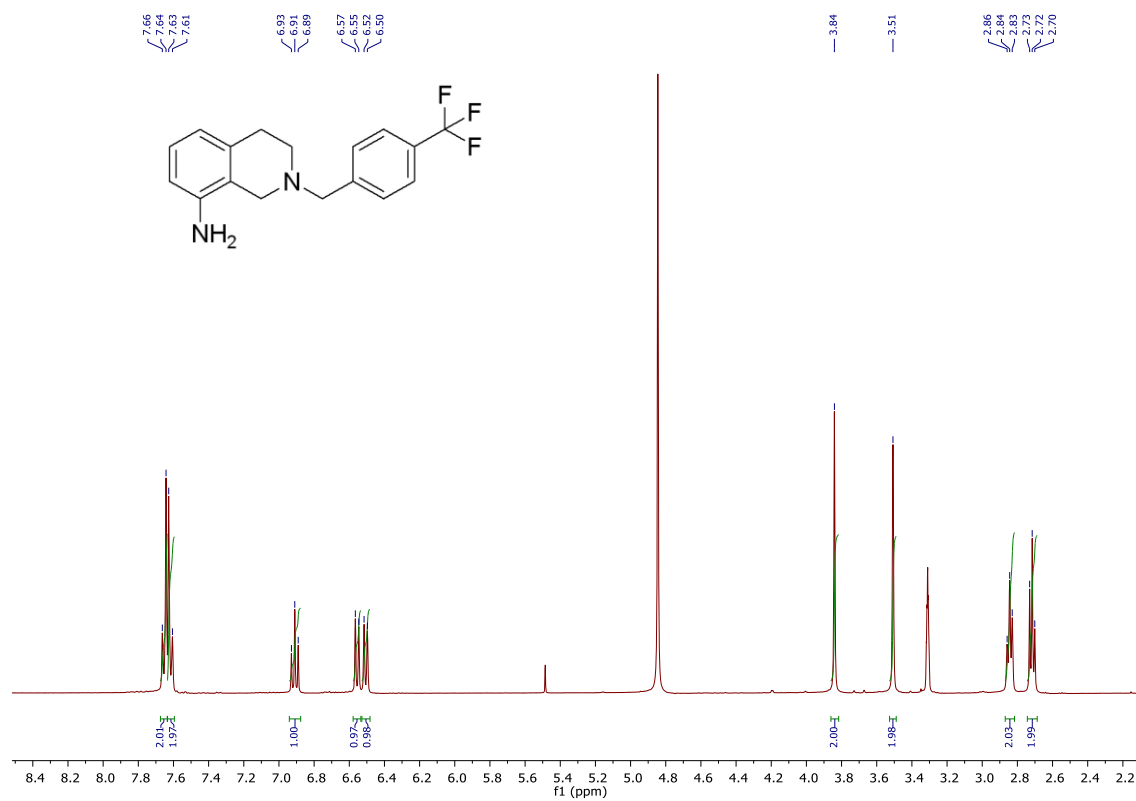
¹³C NMR



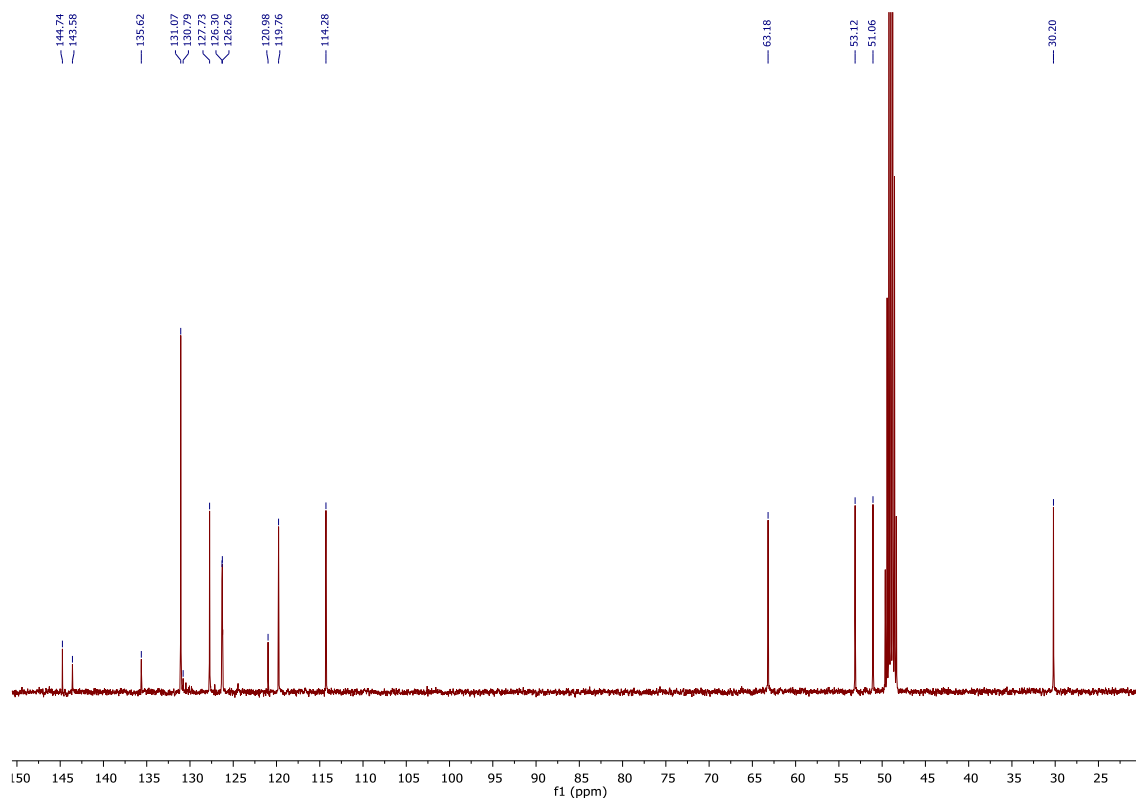
2-(4-bromobenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-8-amine (JE3c)**¹H NMR****¹³C NMR**

2-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-8-amine (JE3d)

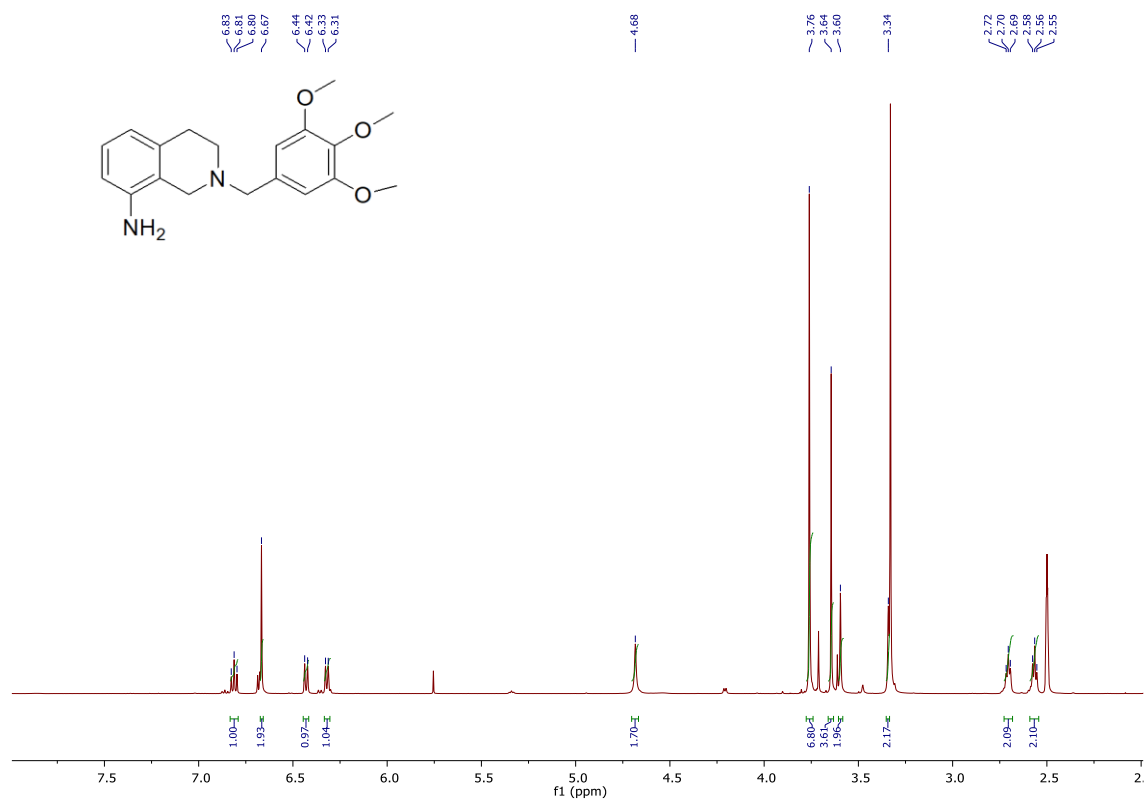
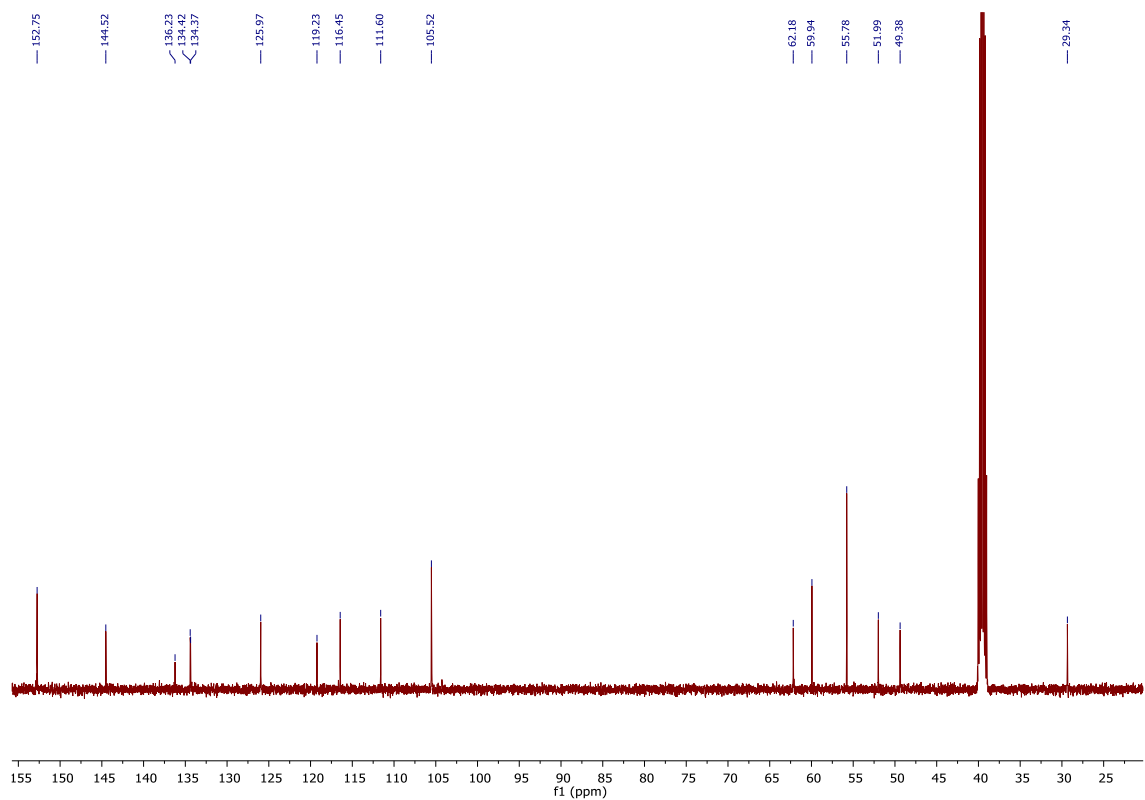
¹H NMR



¹³C NMR

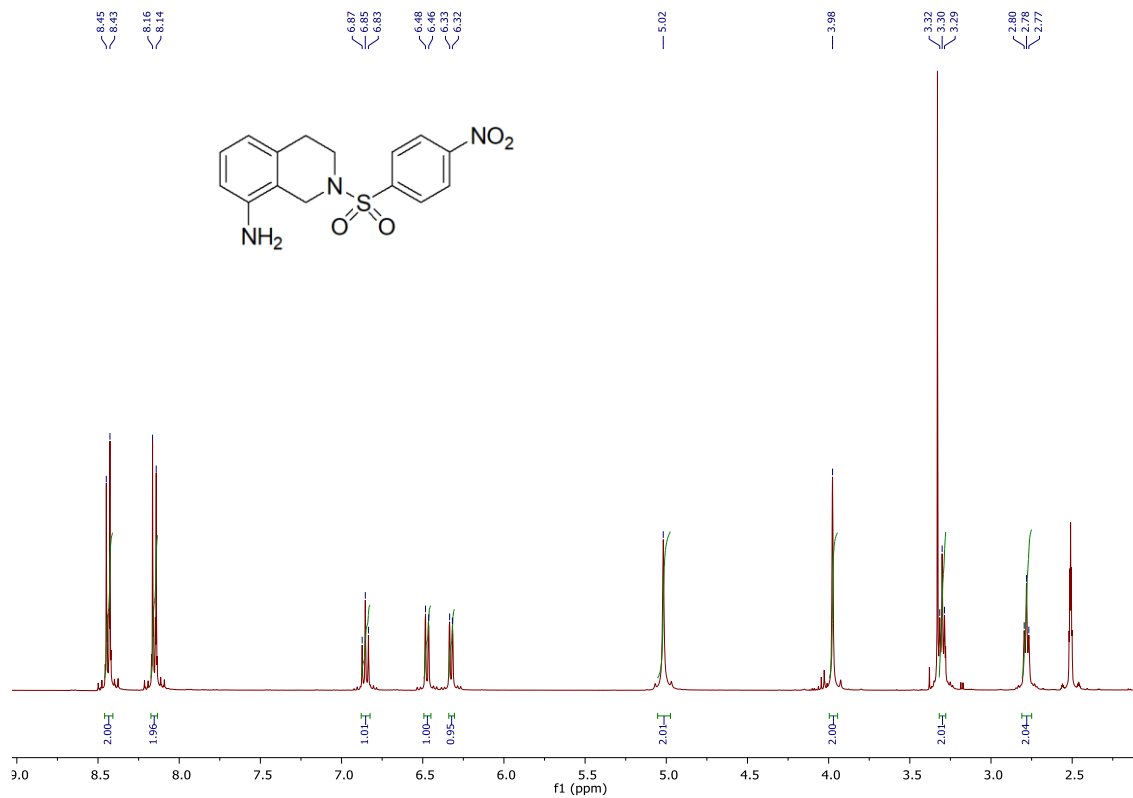


2-(3,4,5-trimethoxybenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-8-amine (JE3e)

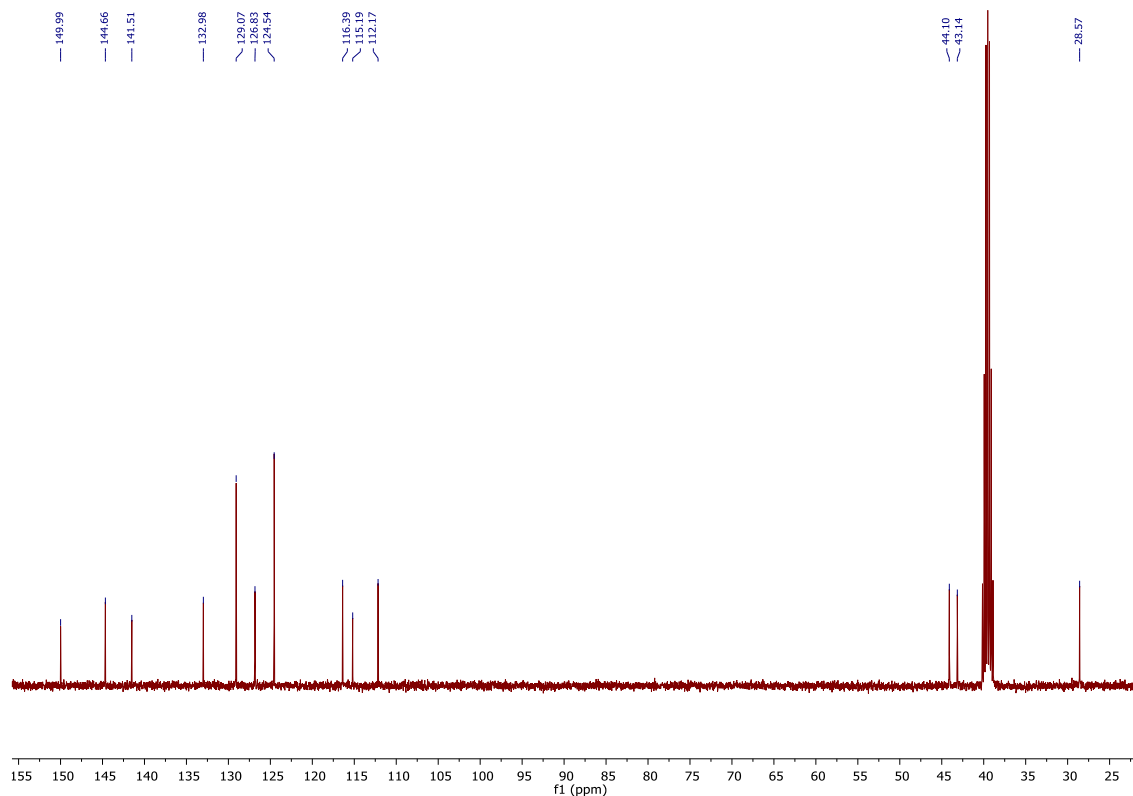
 ^1H NMR ^{13}C NMR

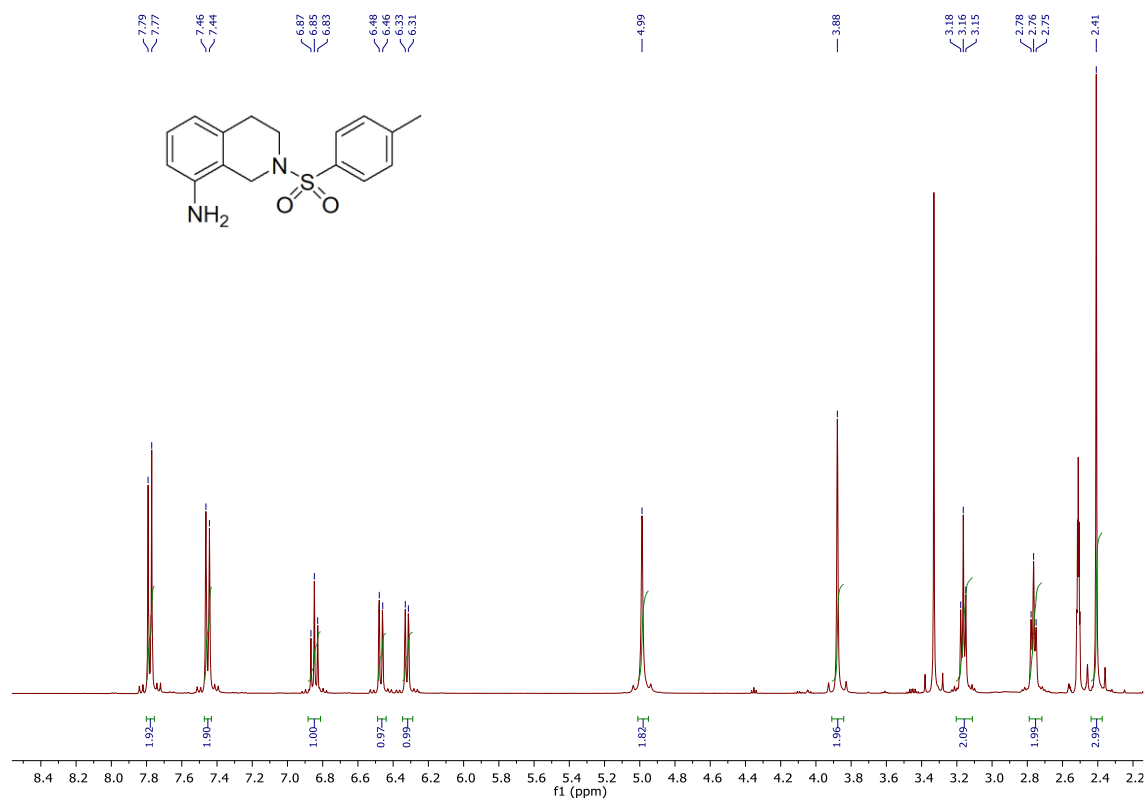
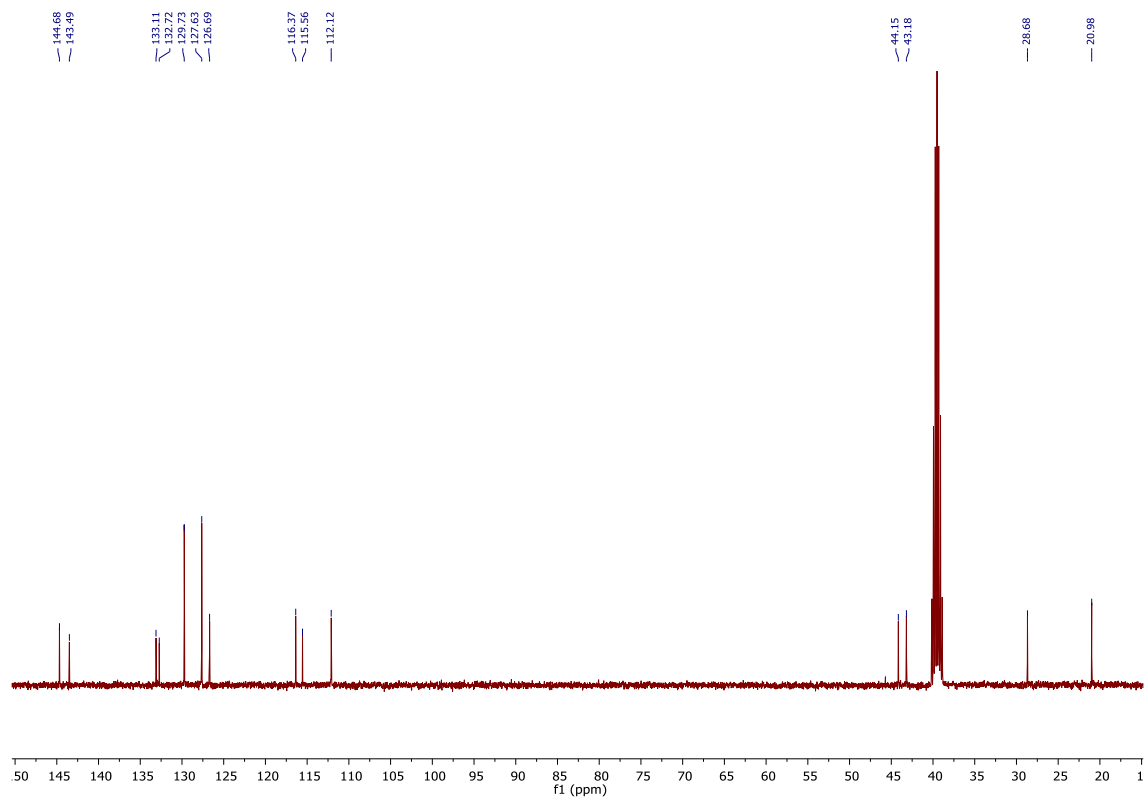
2-((4-nitrophenyl)sulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-8-amine (JE3f)

¹H NMR



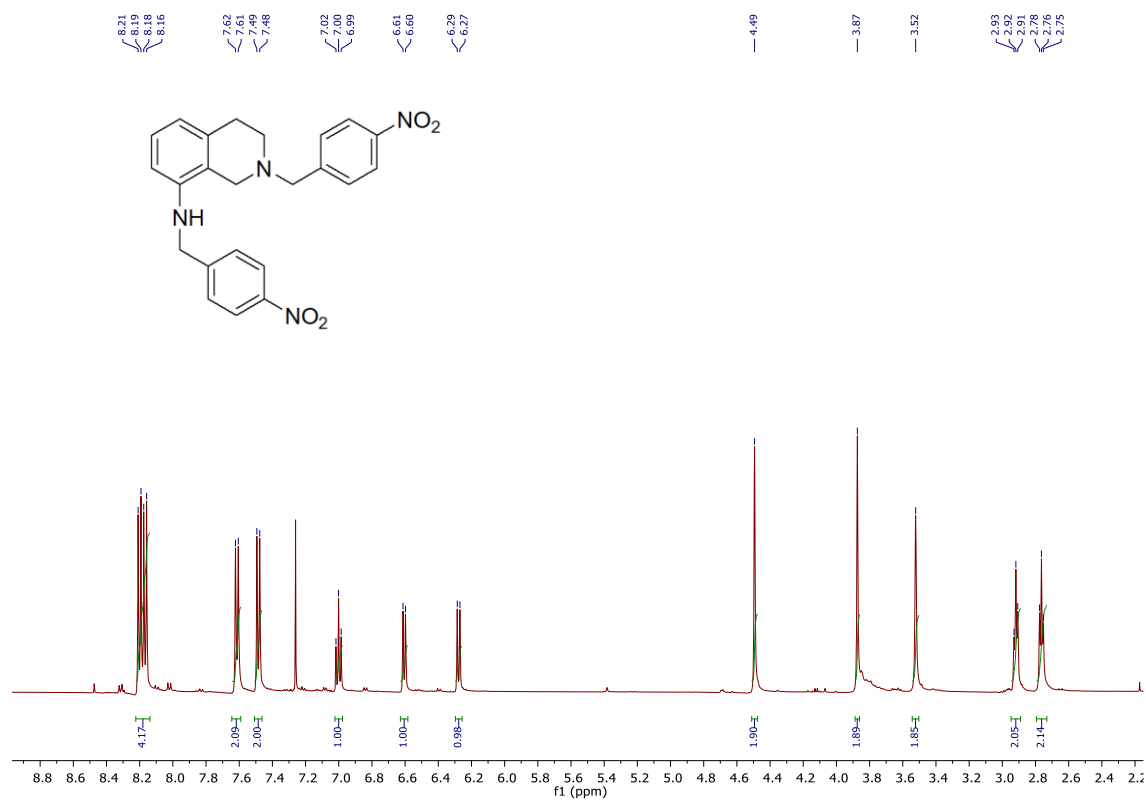
¹³C NMR



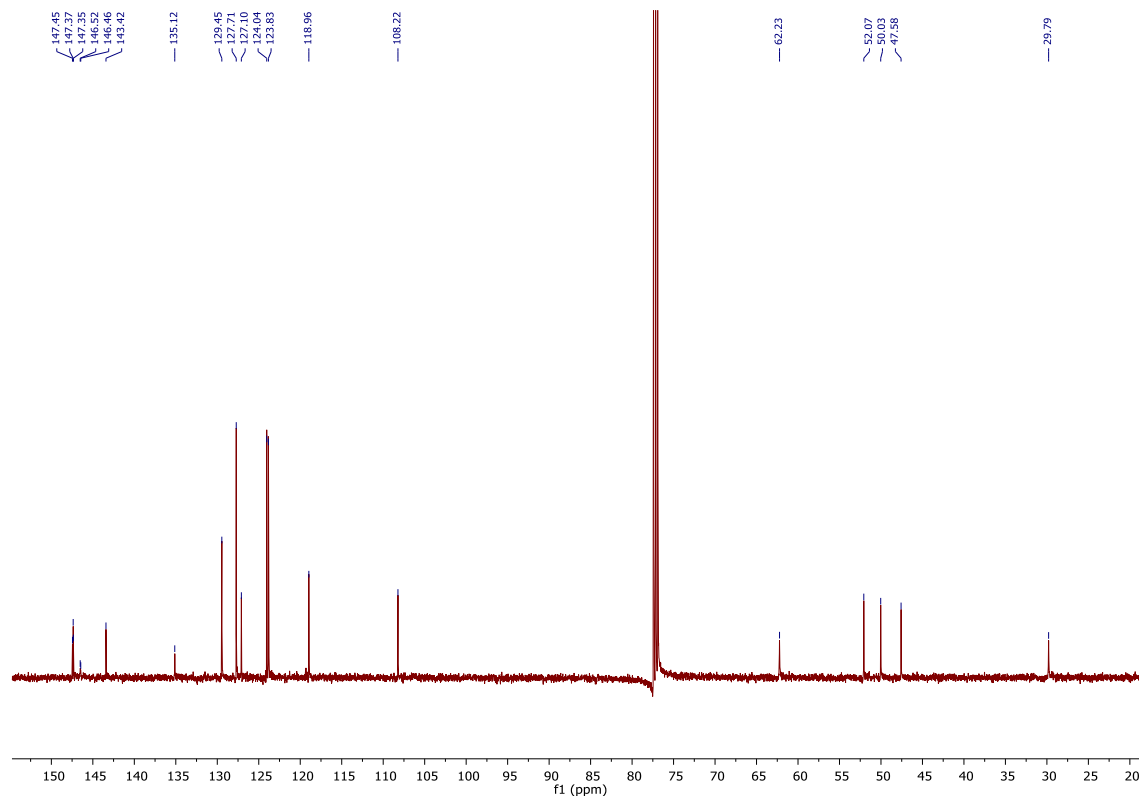
2-tosyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-8-amine (JE3g)**¹H NMR****¹³C NMR**

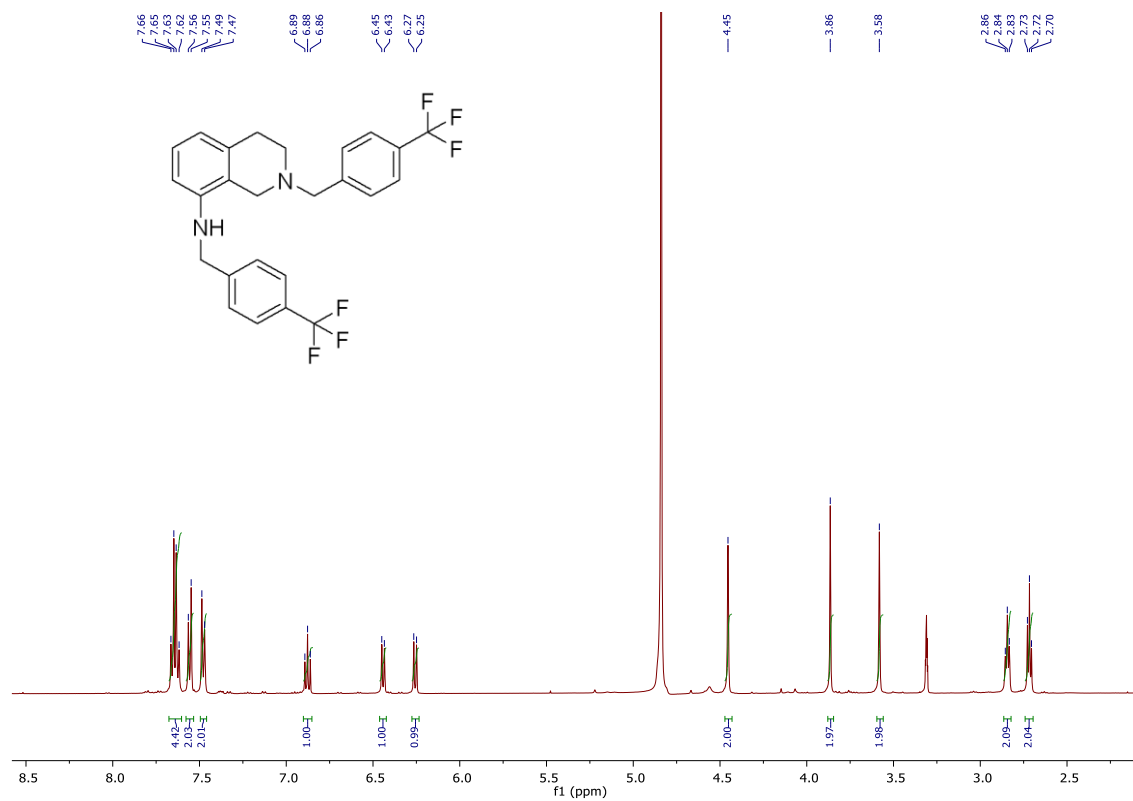
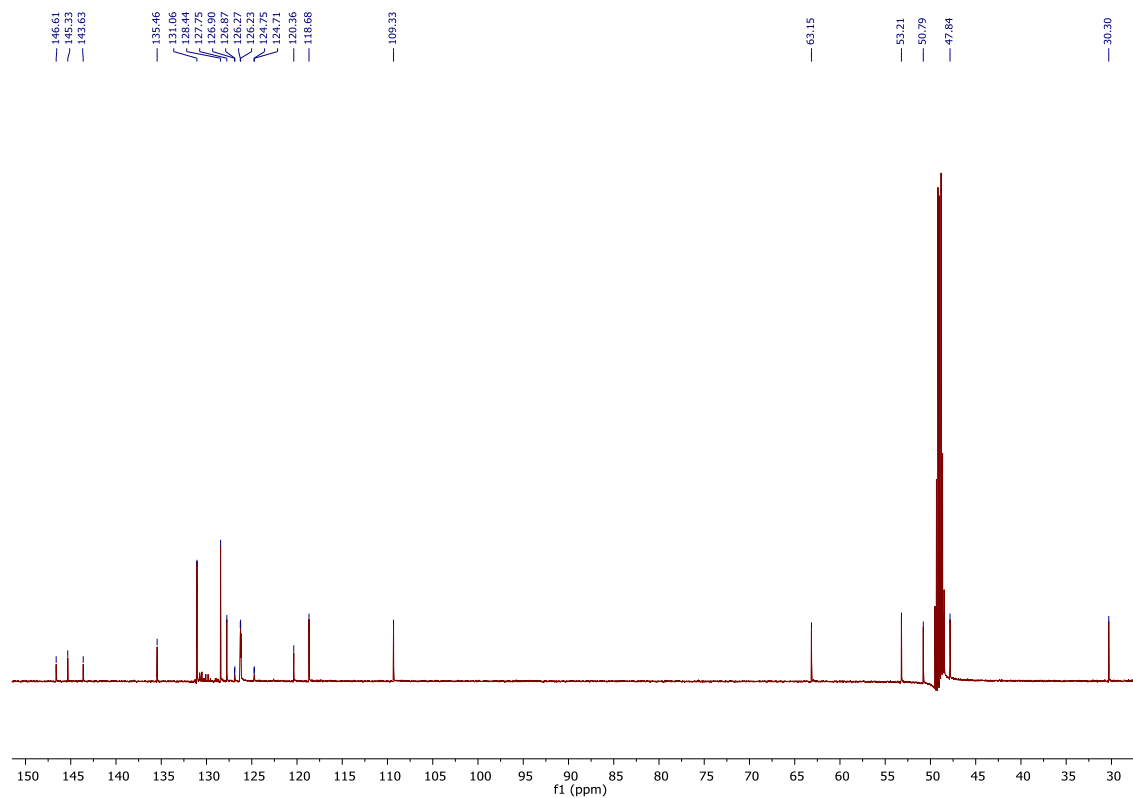
N,2-bis(4-nitrobenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-8-amine (JE3h)

¹H NMR



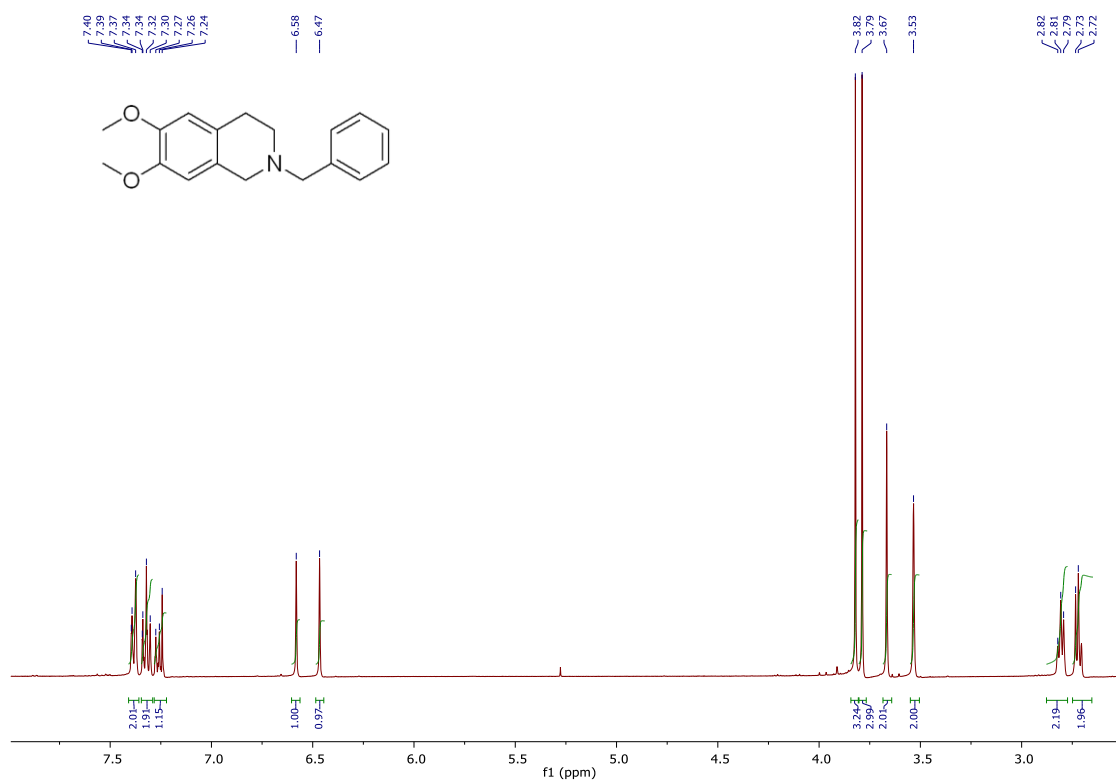
¹³C NMR



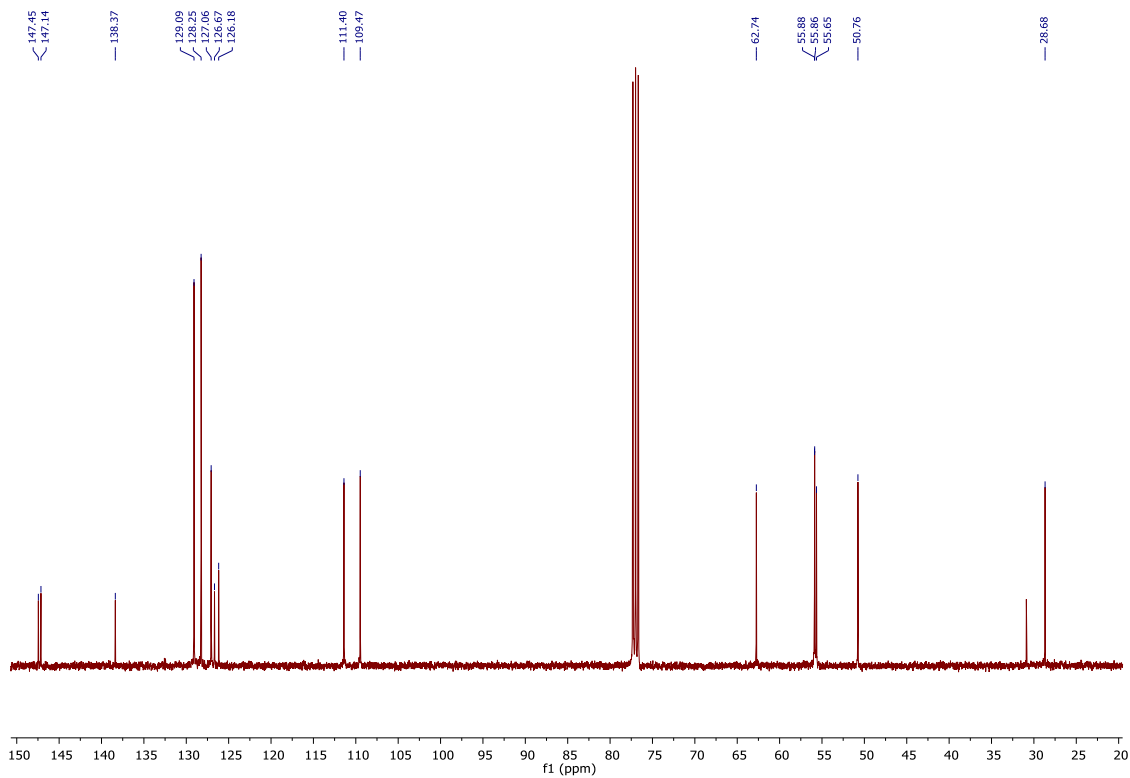
N,2-bis(4-(trifluoromethyl)benzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-8-amine (JE3i)¹H NMR¹³C NMR

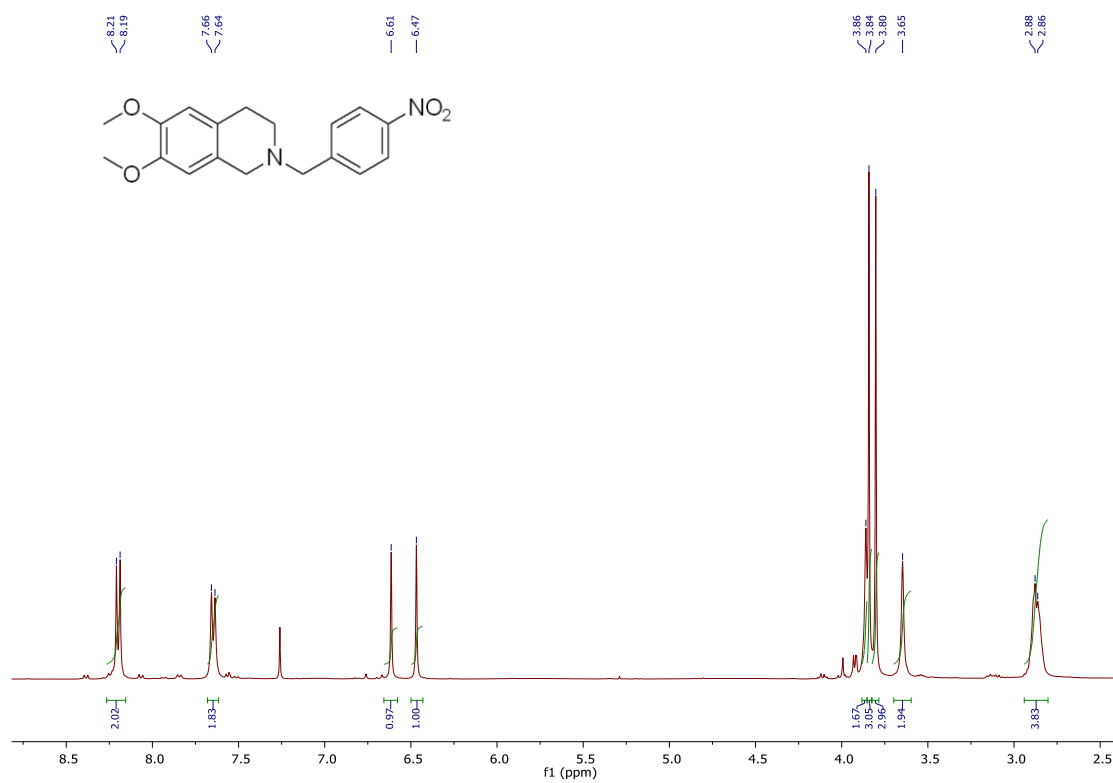
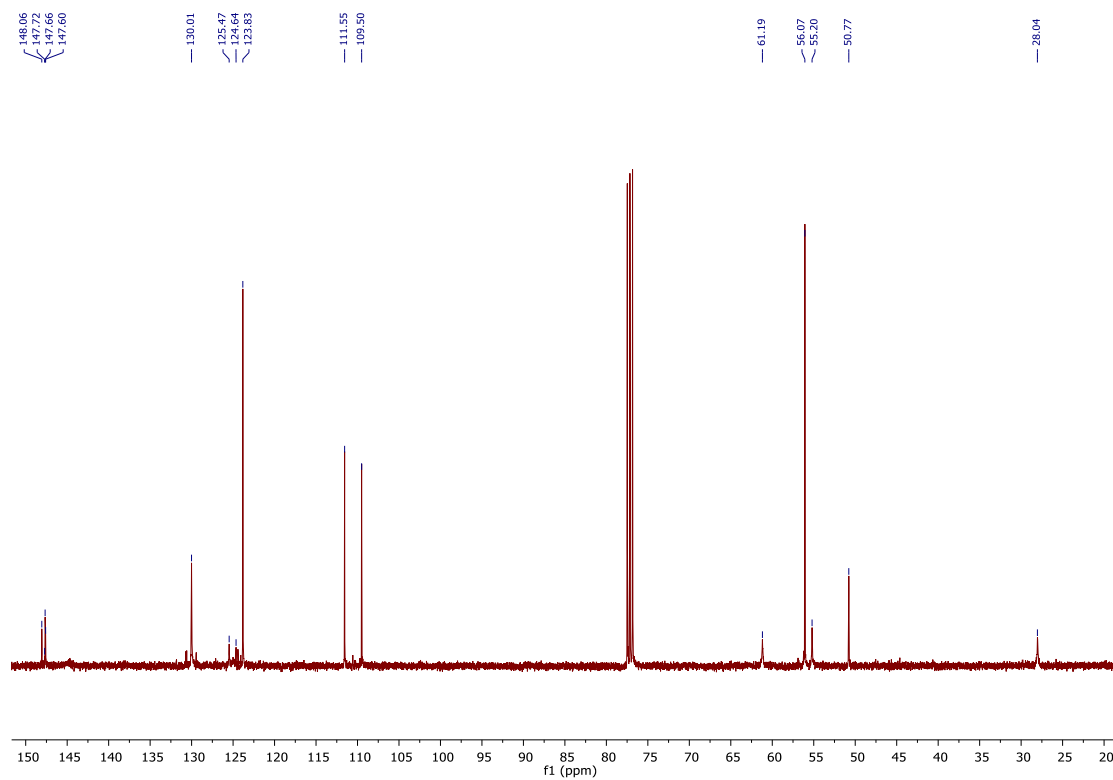
2-benzyl-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (JE4a)

¹H NMR



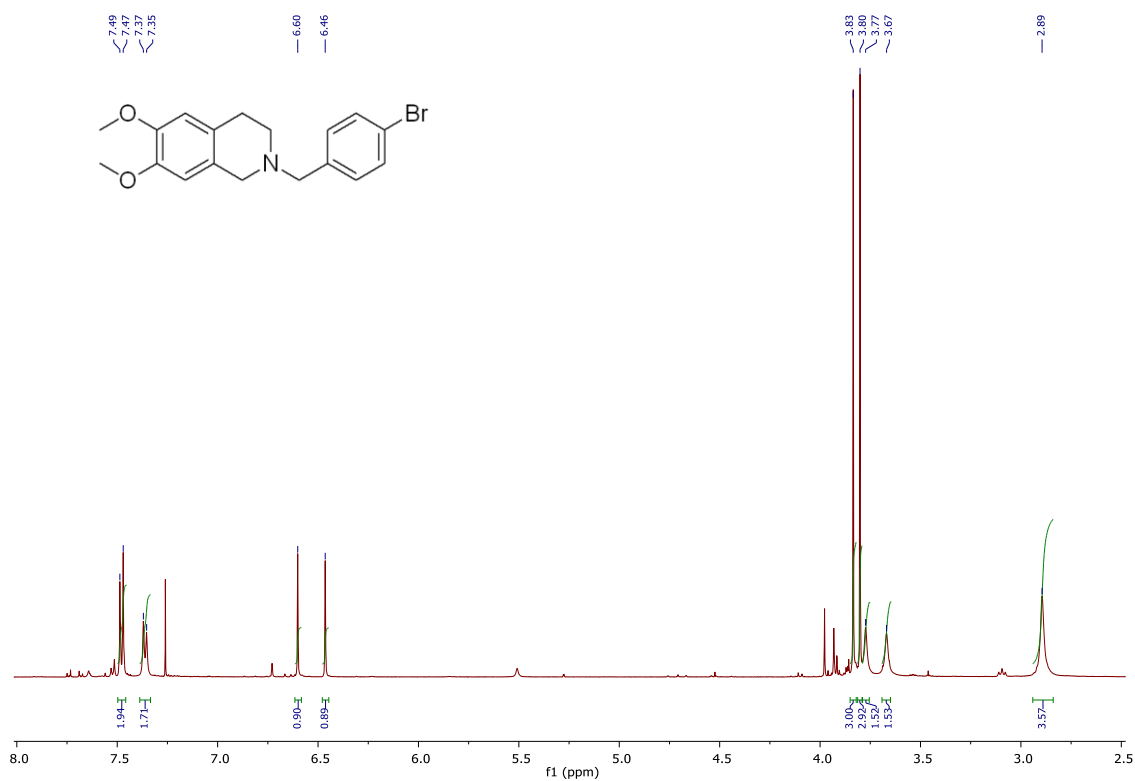
¹³C NMR



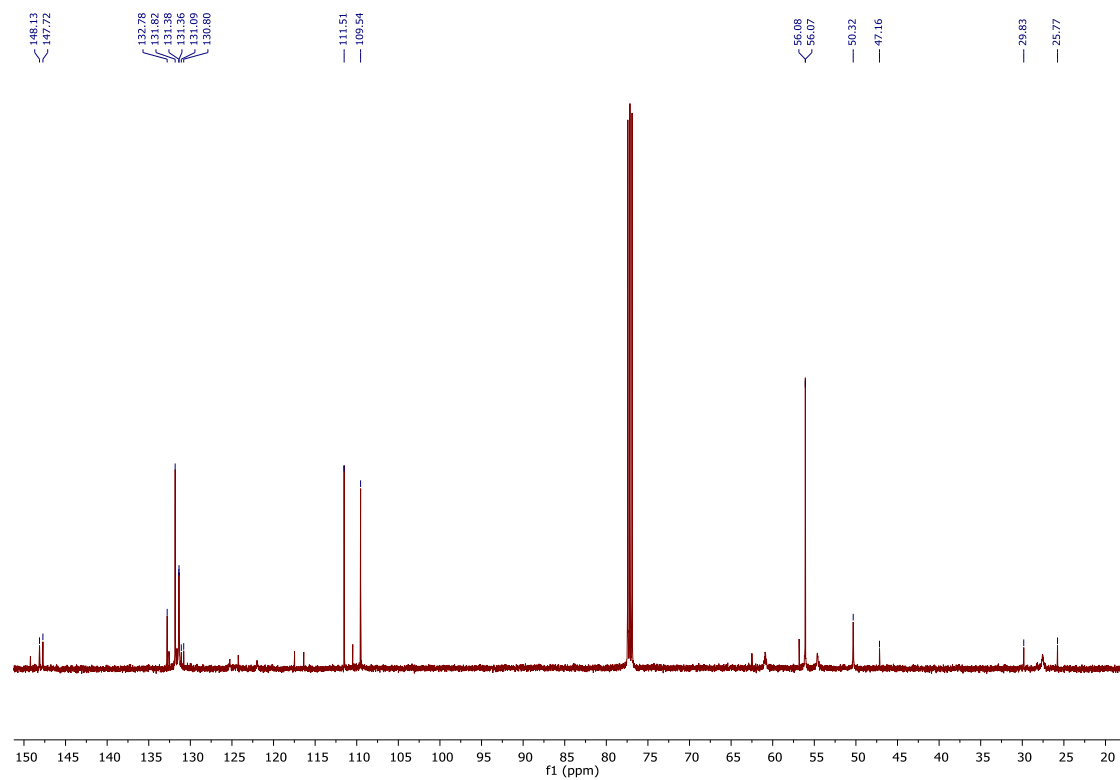
6,7-dimethoxy-2-(4-nitrobenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (JE4b)**¹H NMR****¹³C NMR**

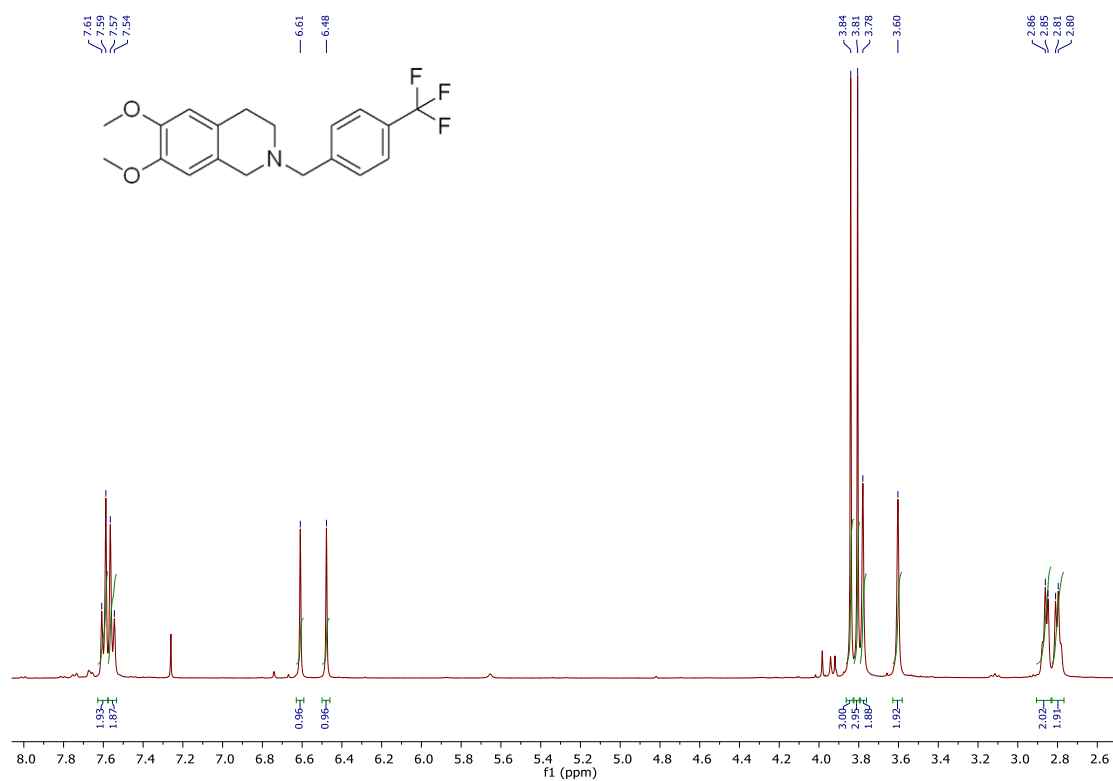
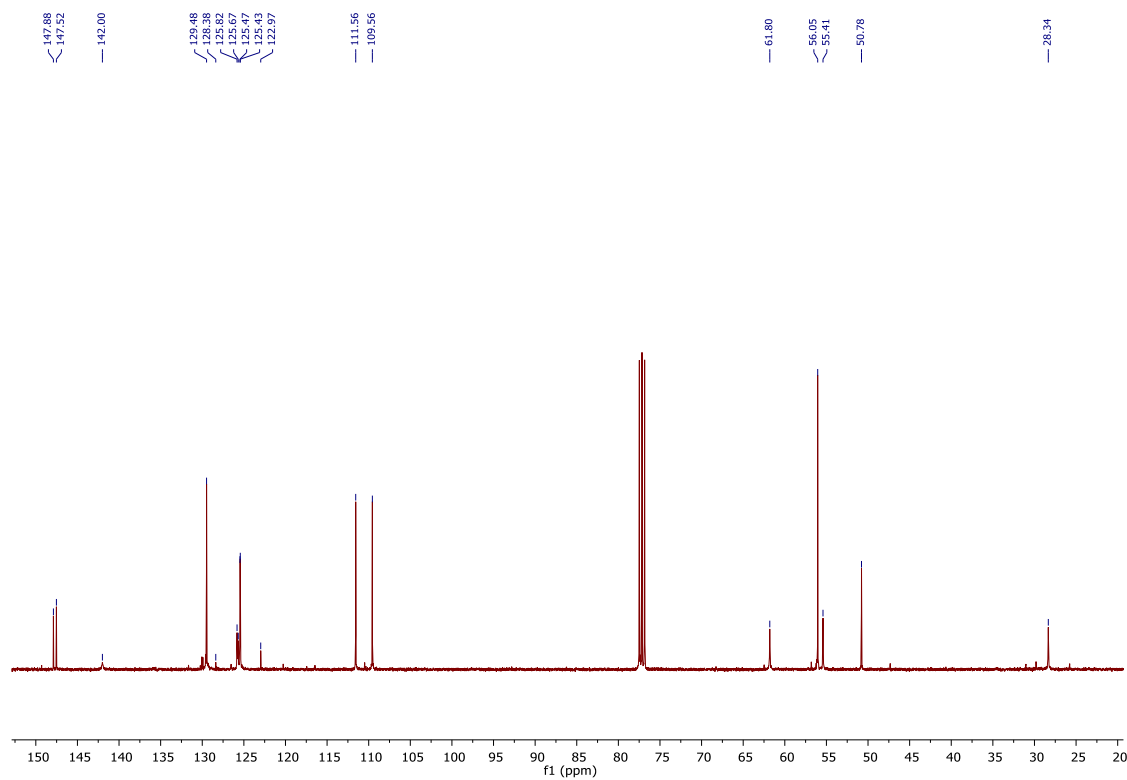
2-(4-bromobenzyl)-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (JE4c)

¹H NMR



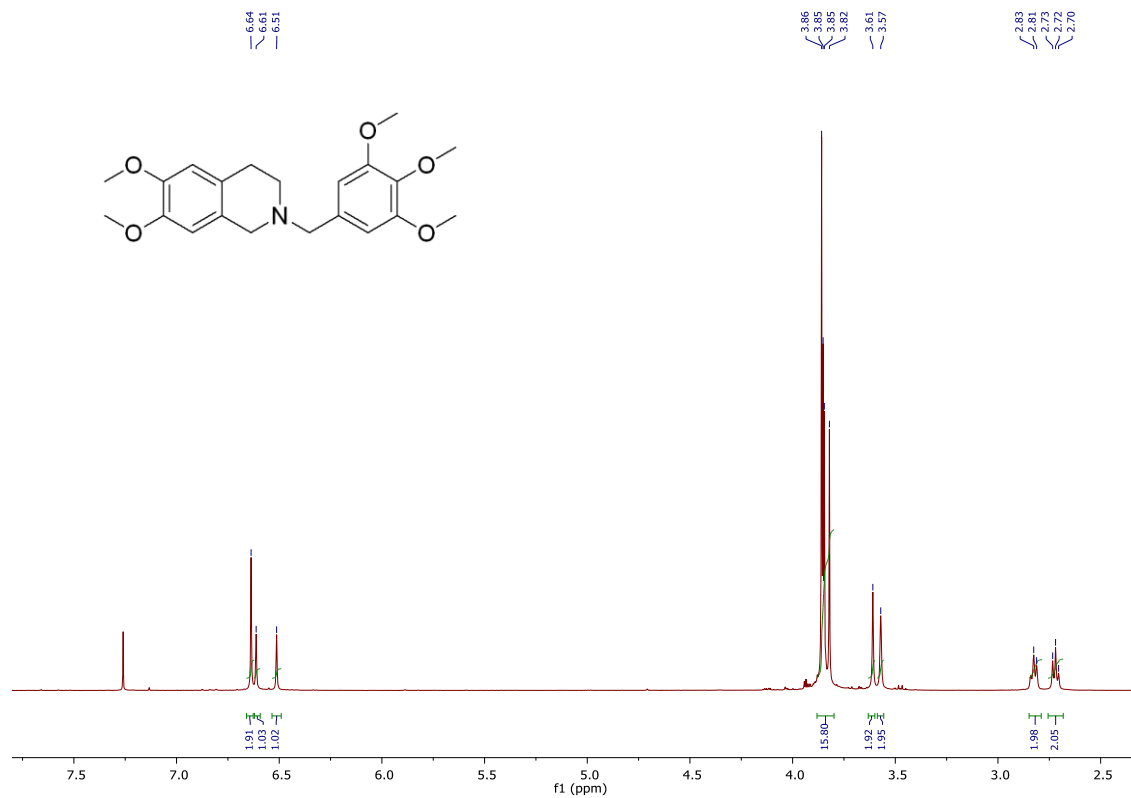
¹³C NMR



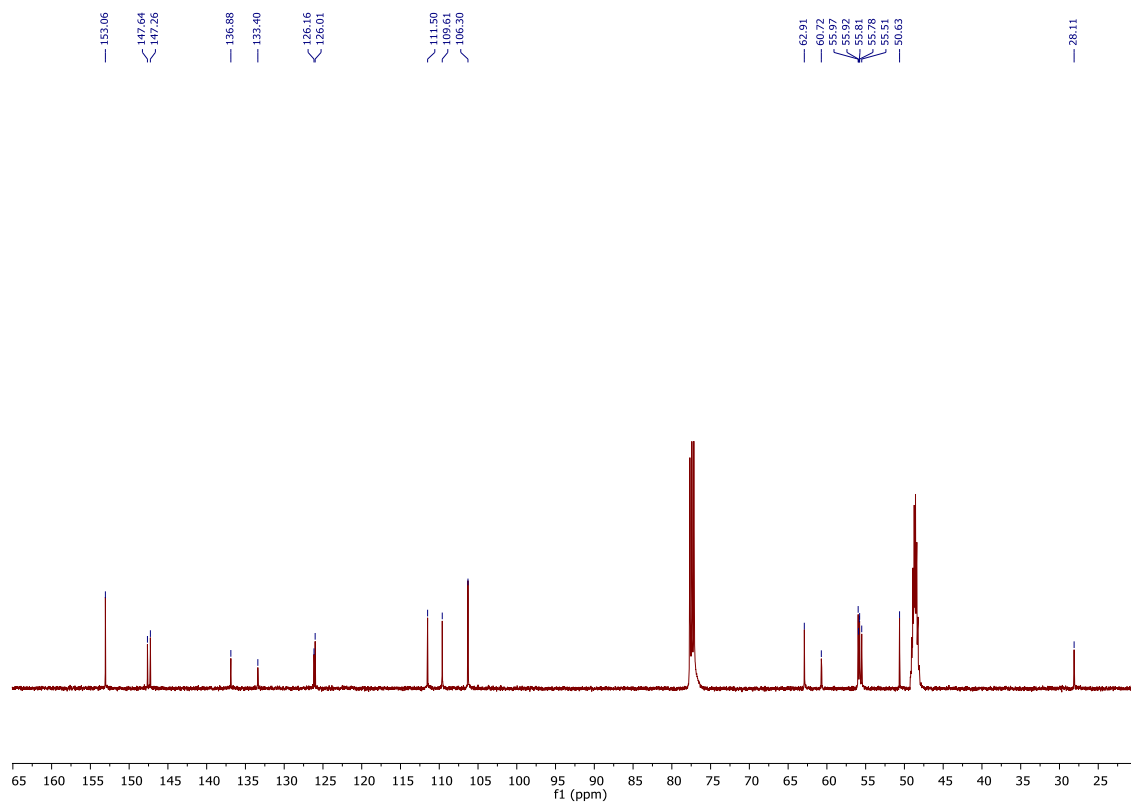
6,7-dimethoxy-2-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (JE4d)**¹H NMR****¹³C NMR**

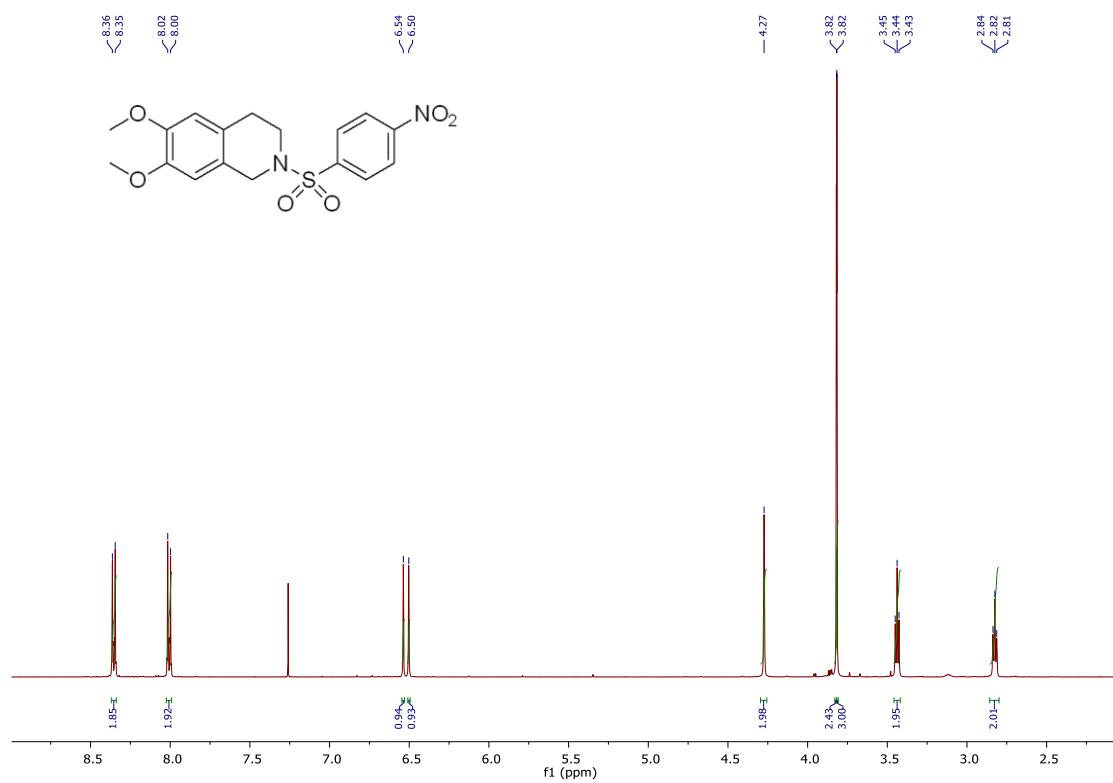
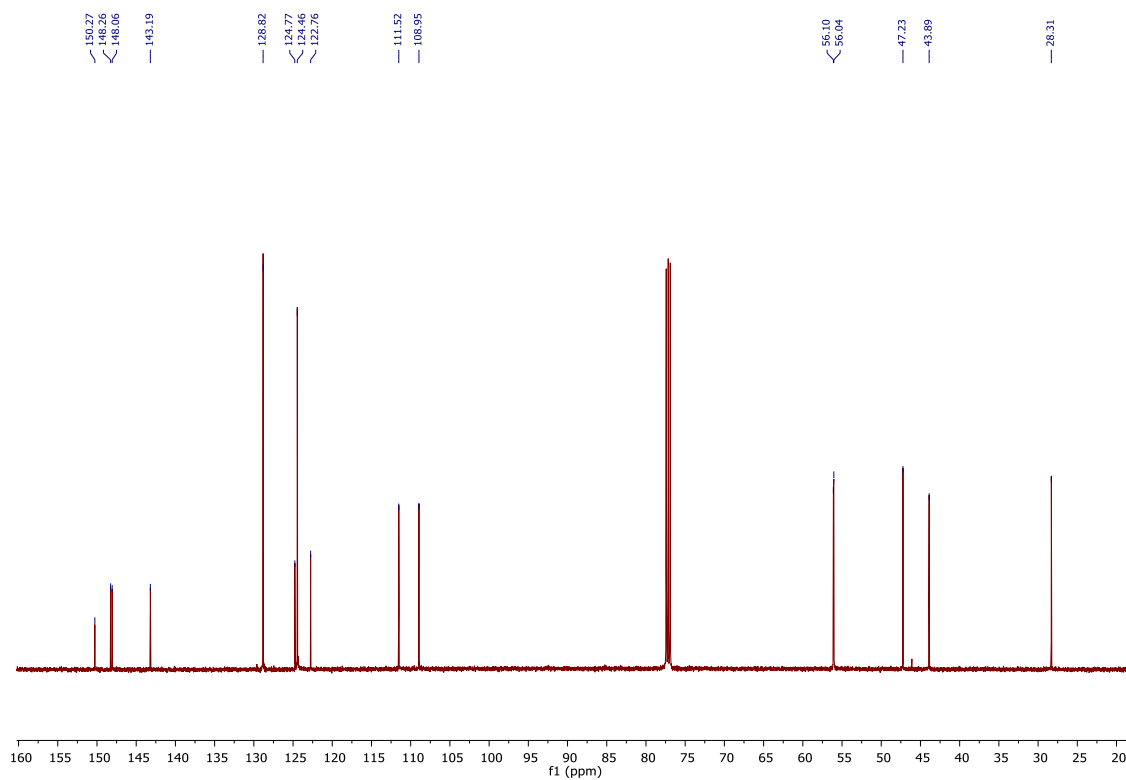
6,7-dimethoxy-2-(3,4,5-trimethoxybenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (JE4e)

¹H NMR



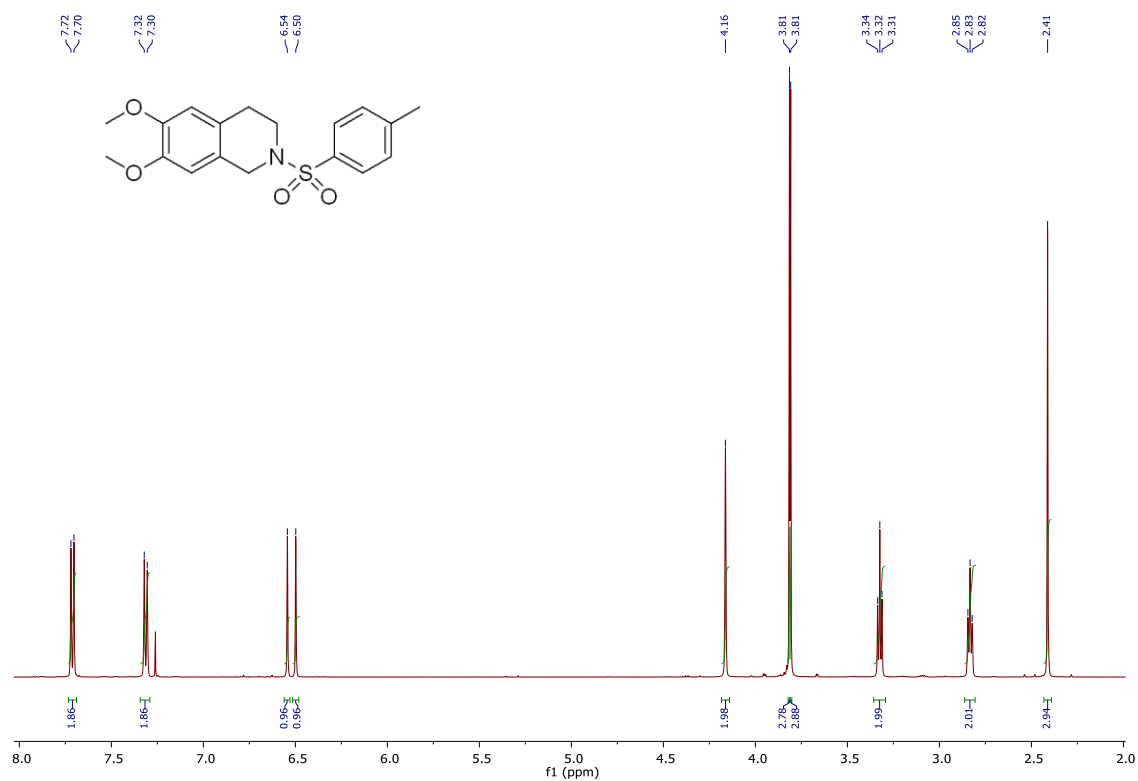
¹³C NMR



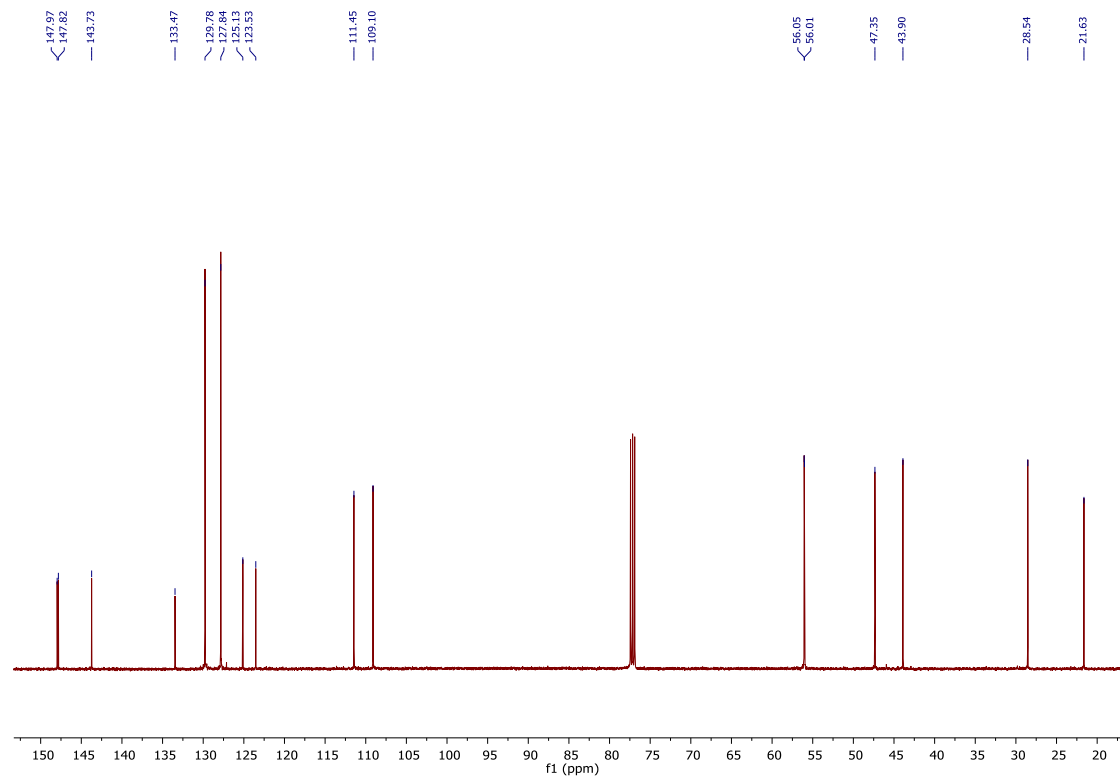
6,7-dimethoxy-2-((4-nitrophenyl)sulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (JE4f)**¹H NMR****¹³C NMR**

6,7-dimethoxy-2-tosyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (JE4g)

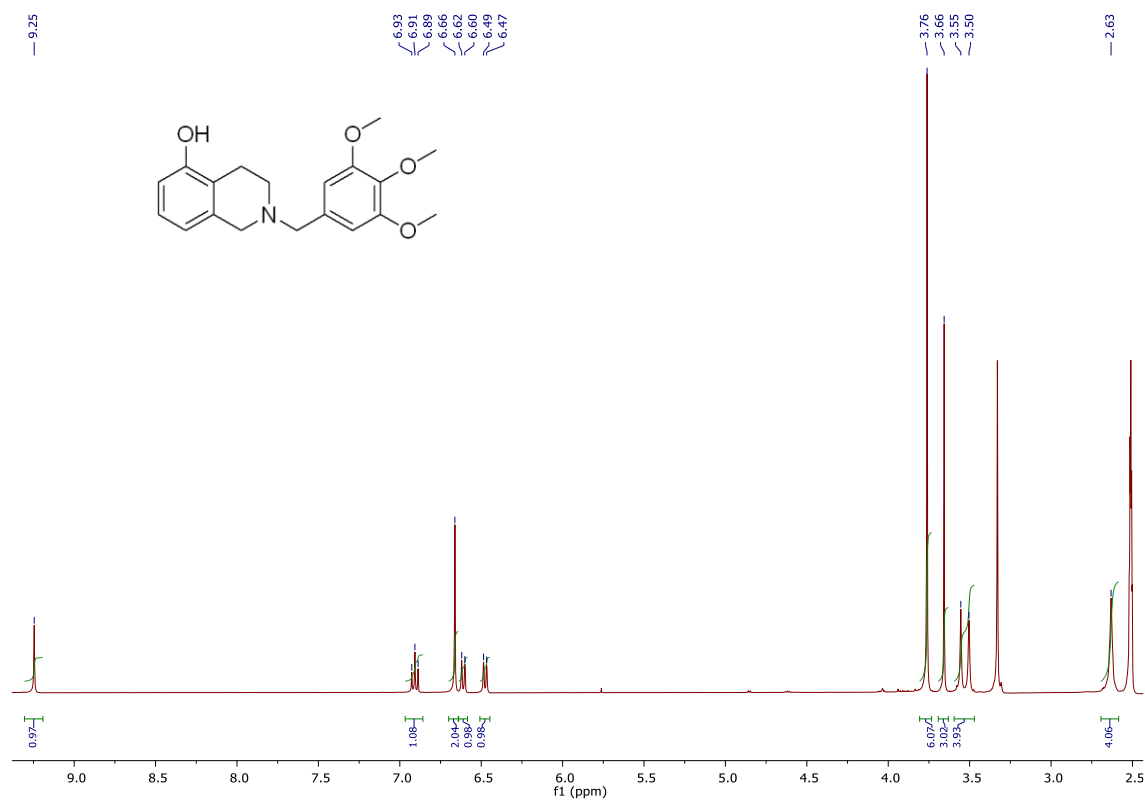
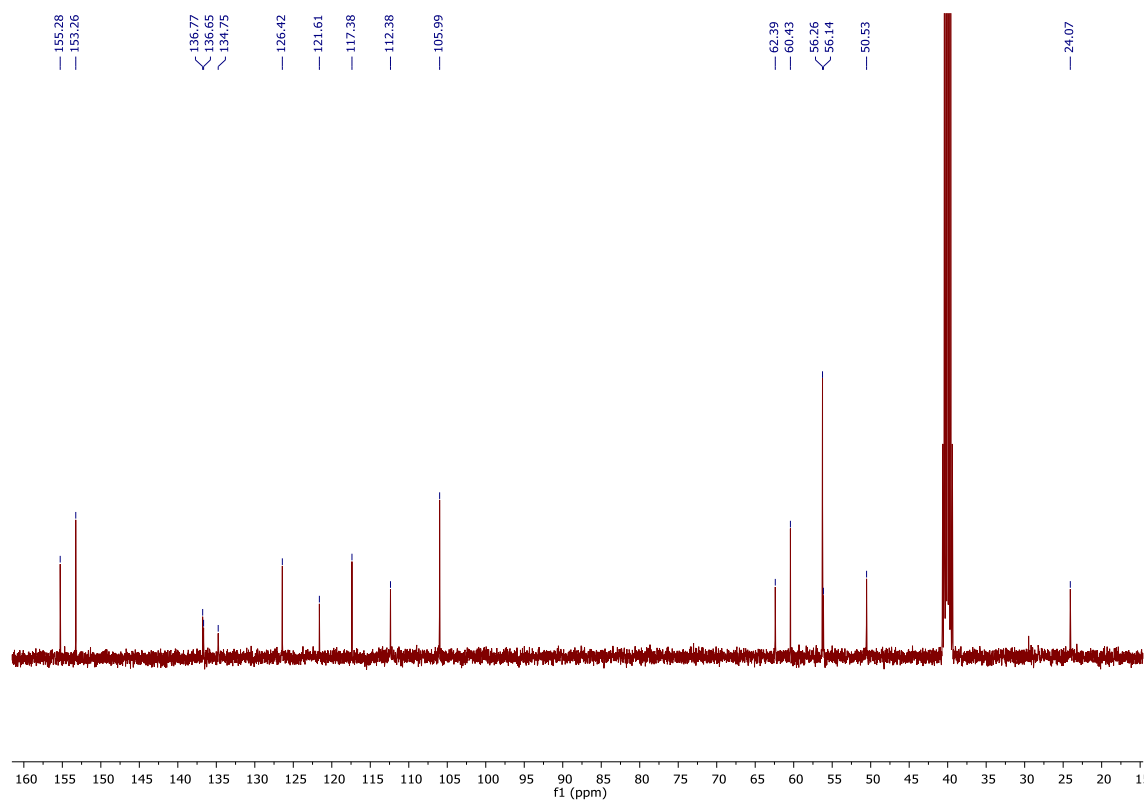
¹H NMR



¹³C NMR

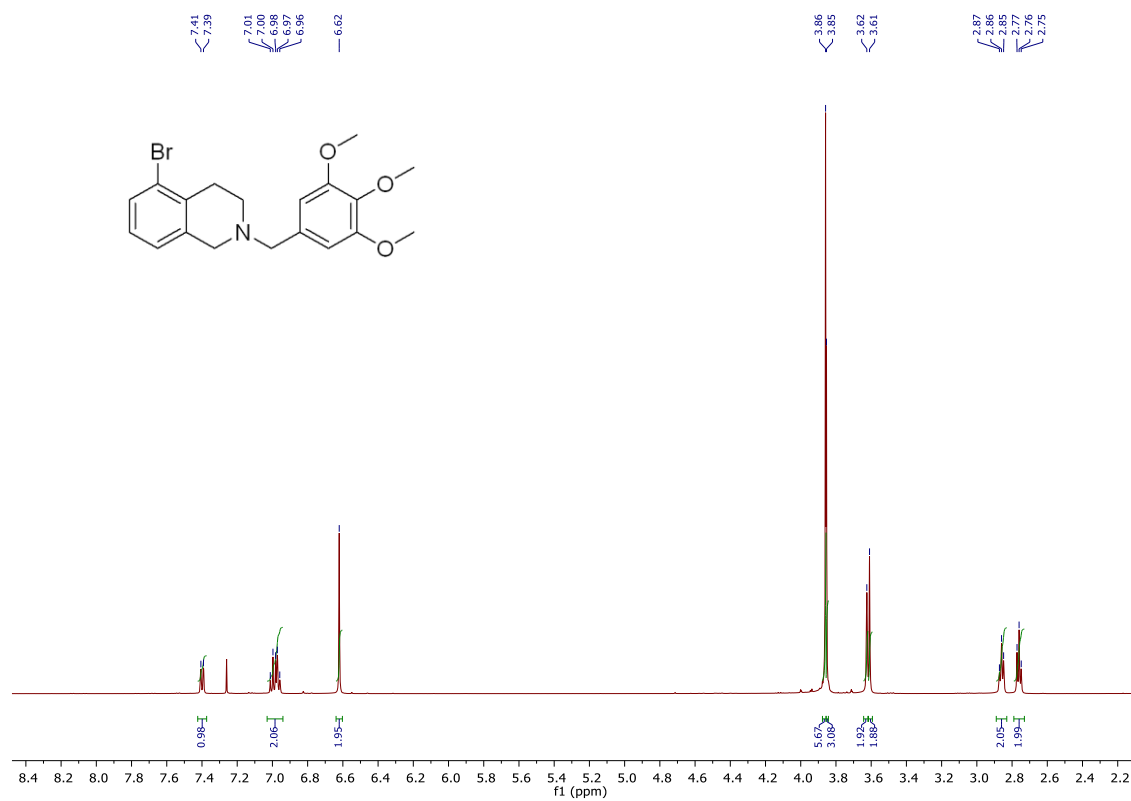


2-(3,4,5-trimethoxybenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-5-ol (JES)

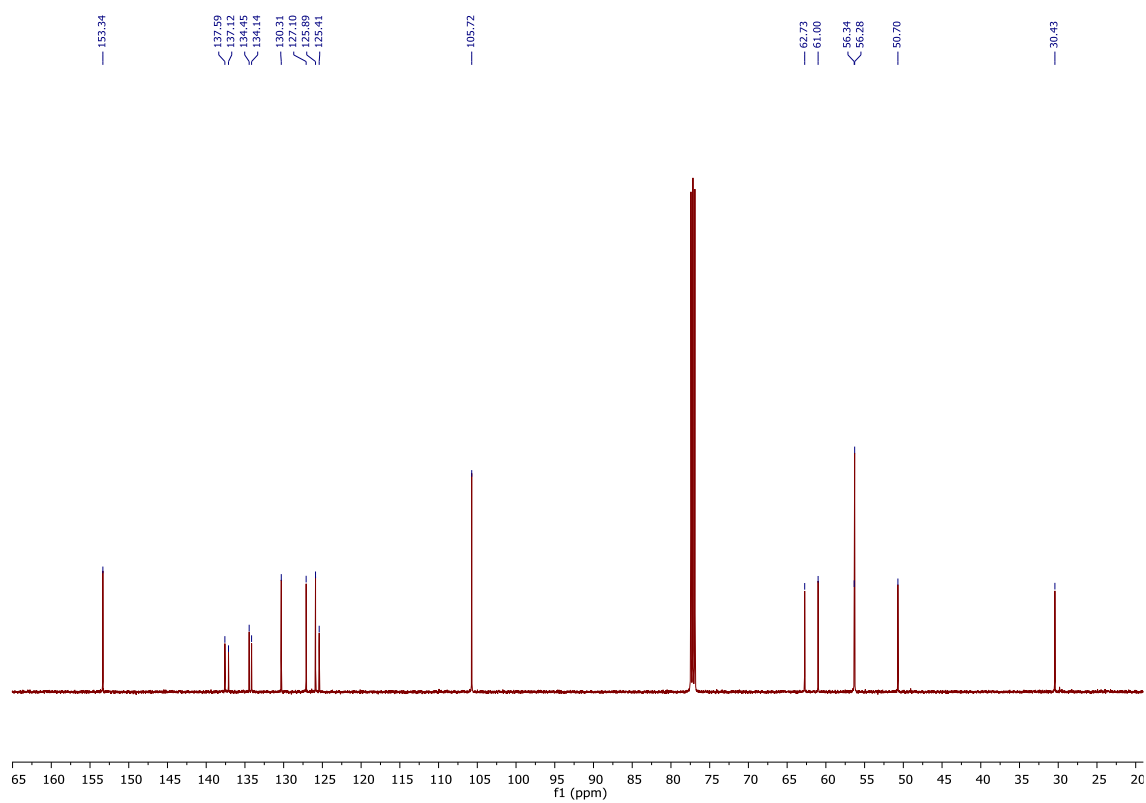
 ^1H NMR ^{13}C NMR

5-bromo-2-(3,4,5-trimethoxybenzyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline (JE6)

¹H NMR

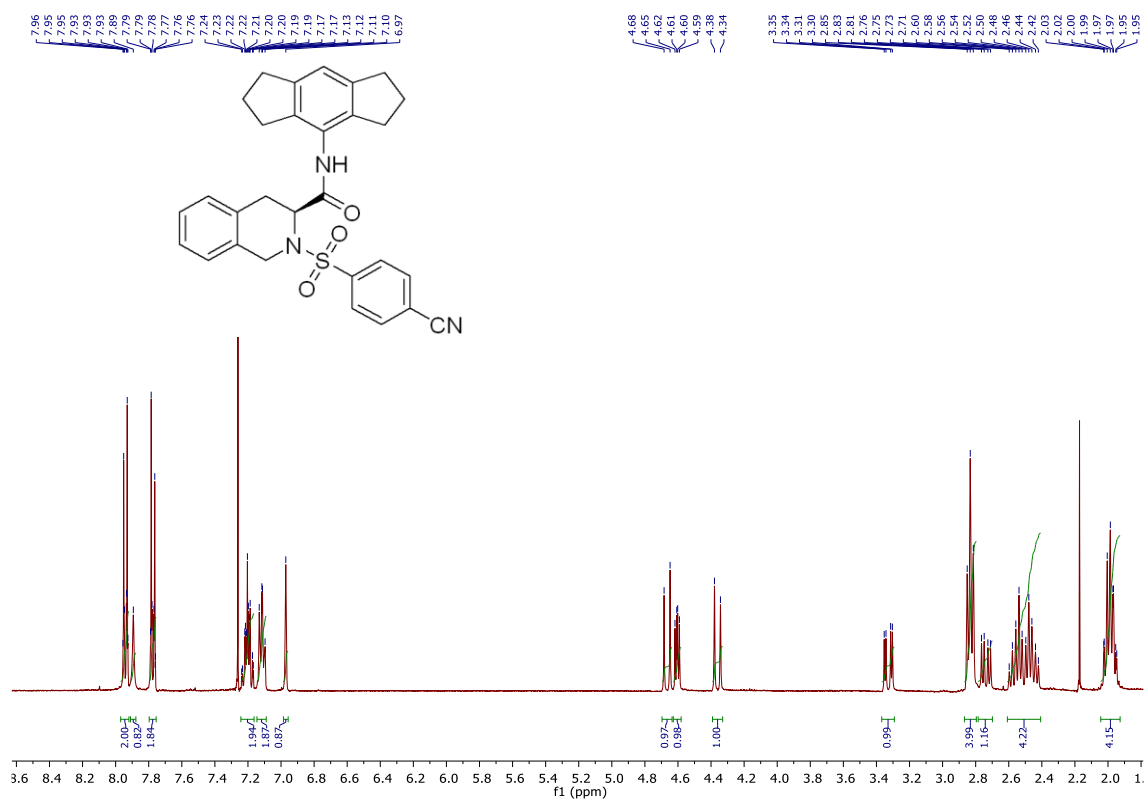


¹³C NMR

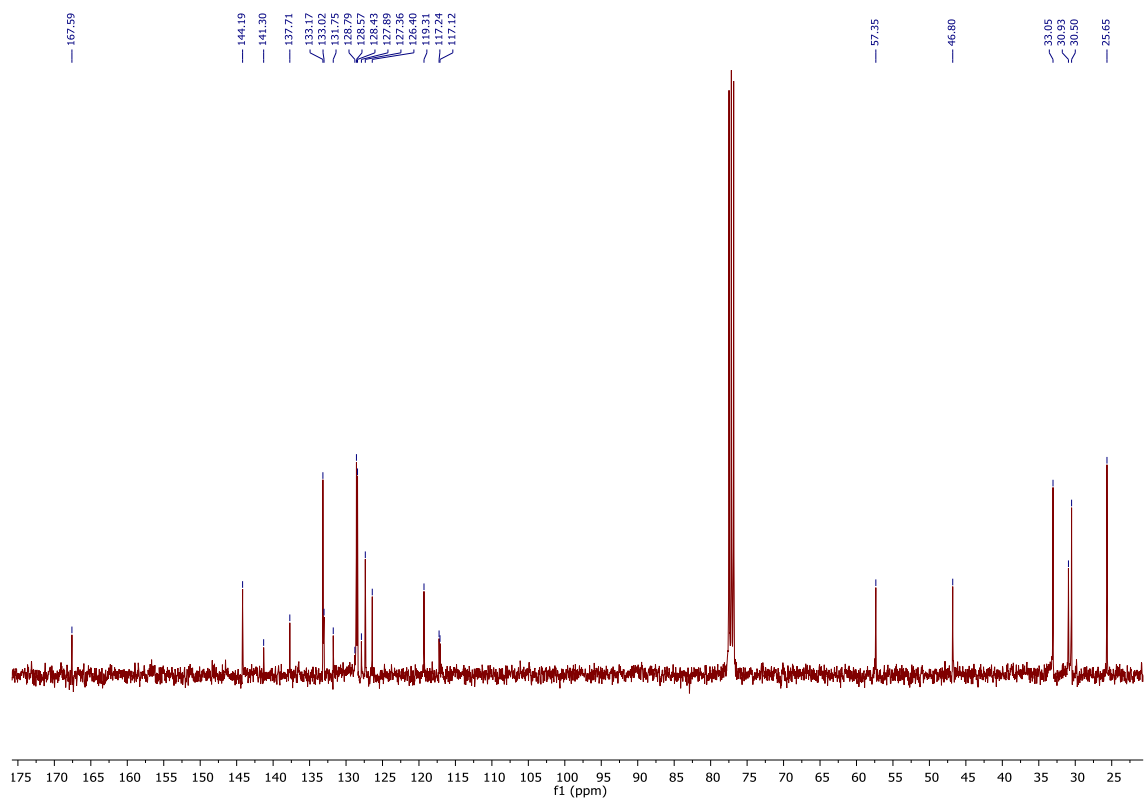


(S)-2-((4-cyanophenyl)sulfonyl)-N-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-s-indacen-4-yl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxamide (JE7)

¹H NMR

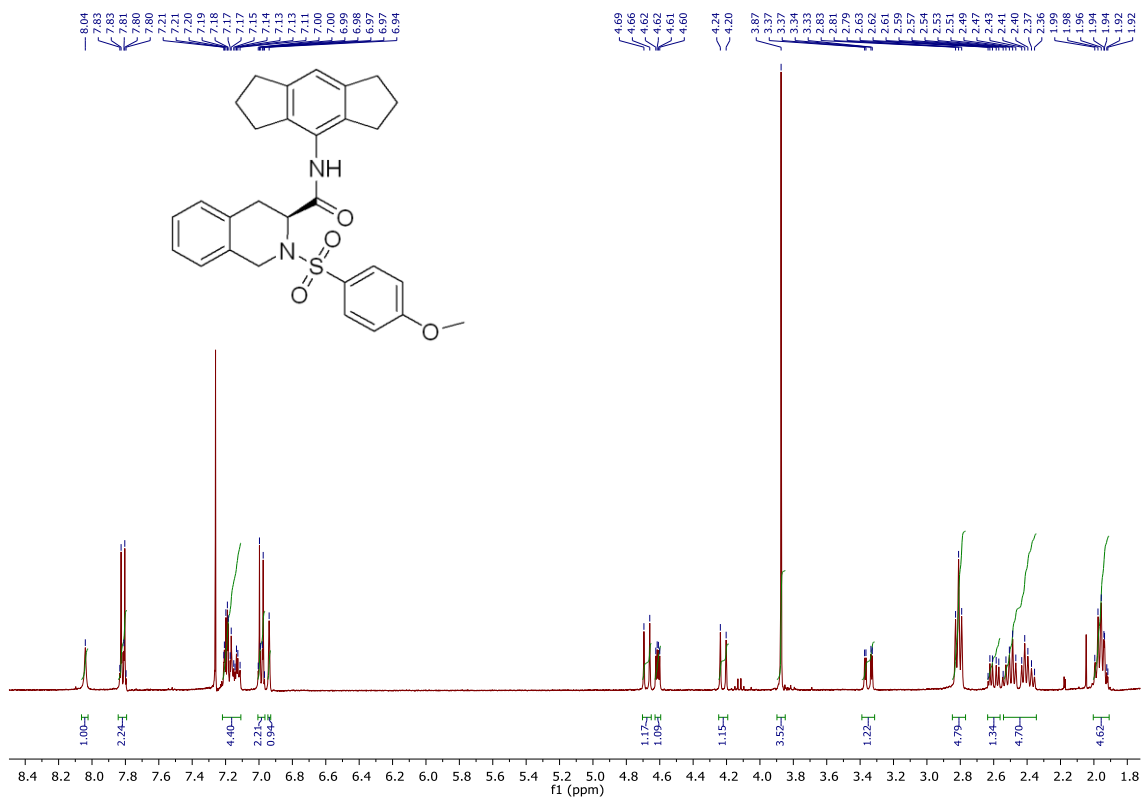


¹³C NMR

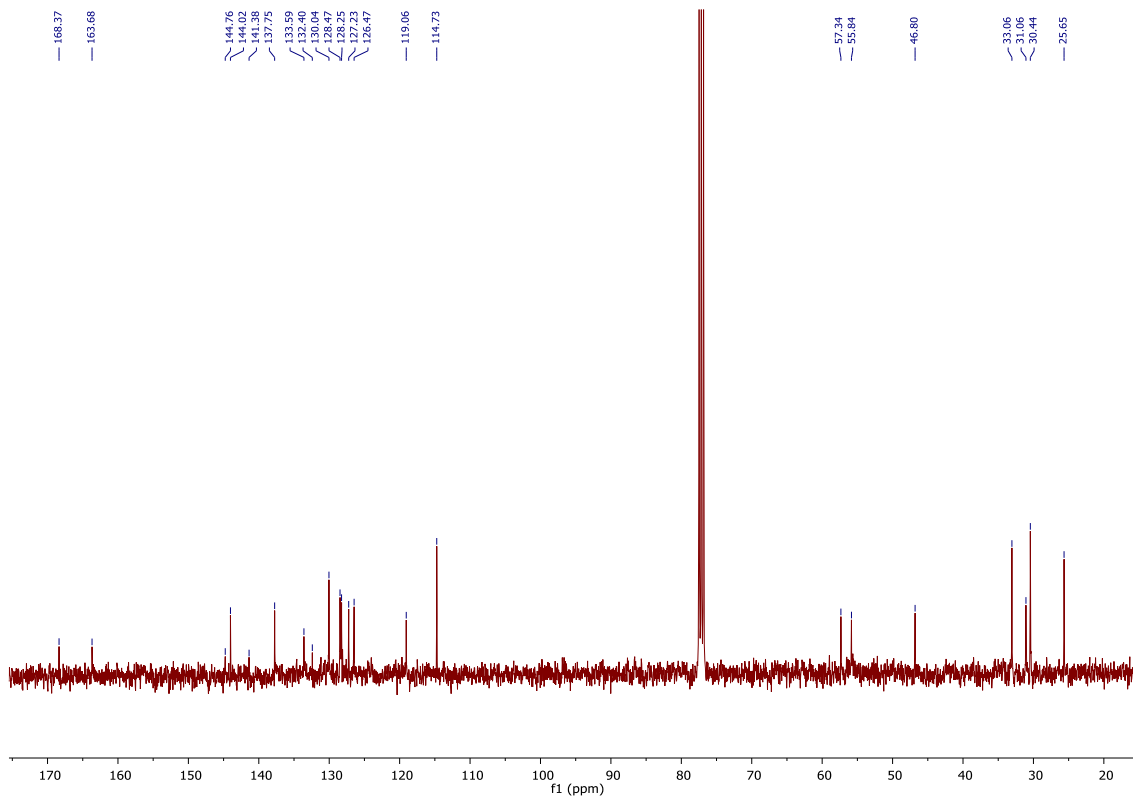


(S)-N-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-s-indacen-4-yl)-2-((4-methoxyphenyl)sulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxamide (**JE8**)

¹H NMR

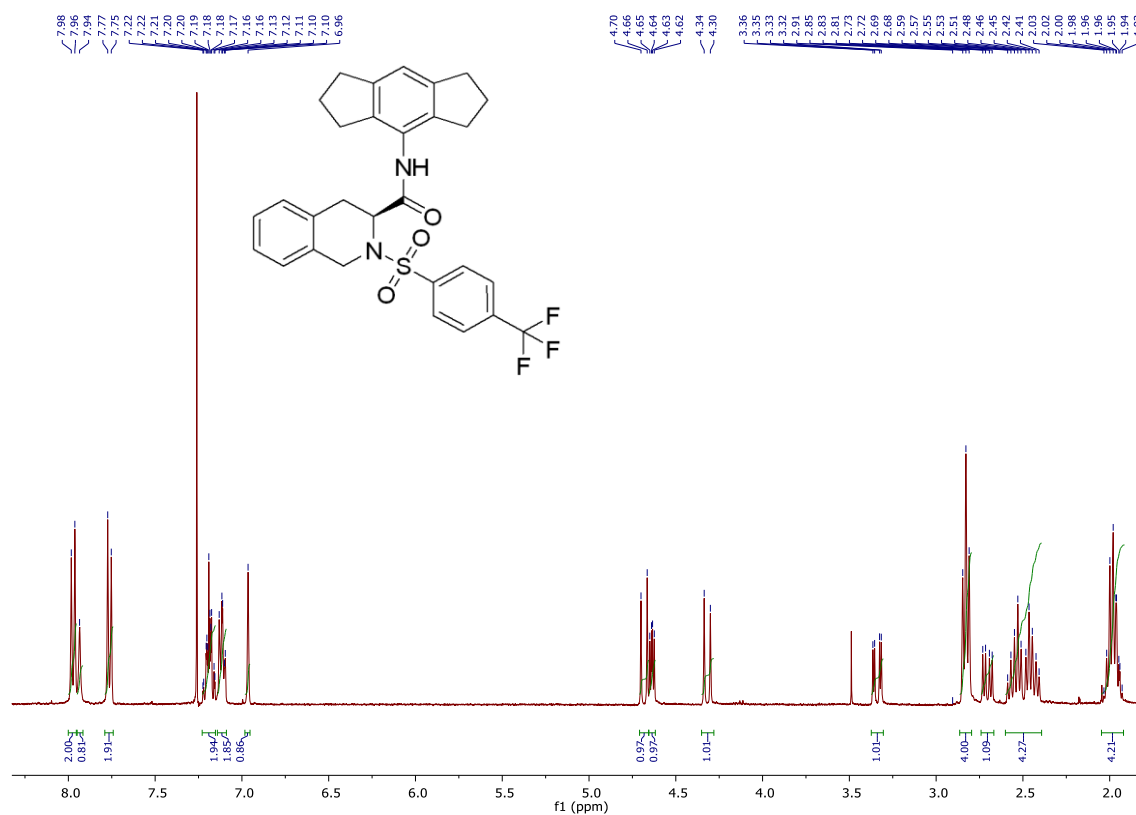


¹³C NMR

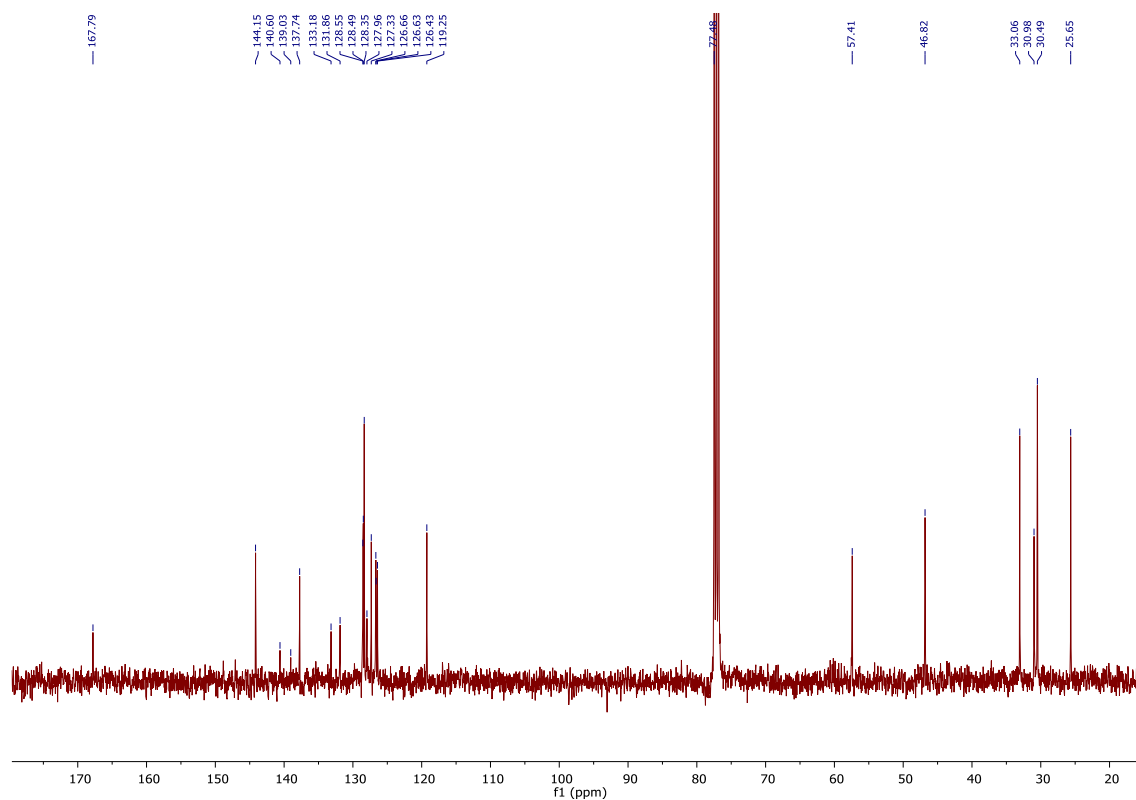


(*S*)-*N*-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-*s*-indacen-4-yl)-2-((4-(trifluoromethyl)phenyl)sulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxamide (JE9)

¹H NMR

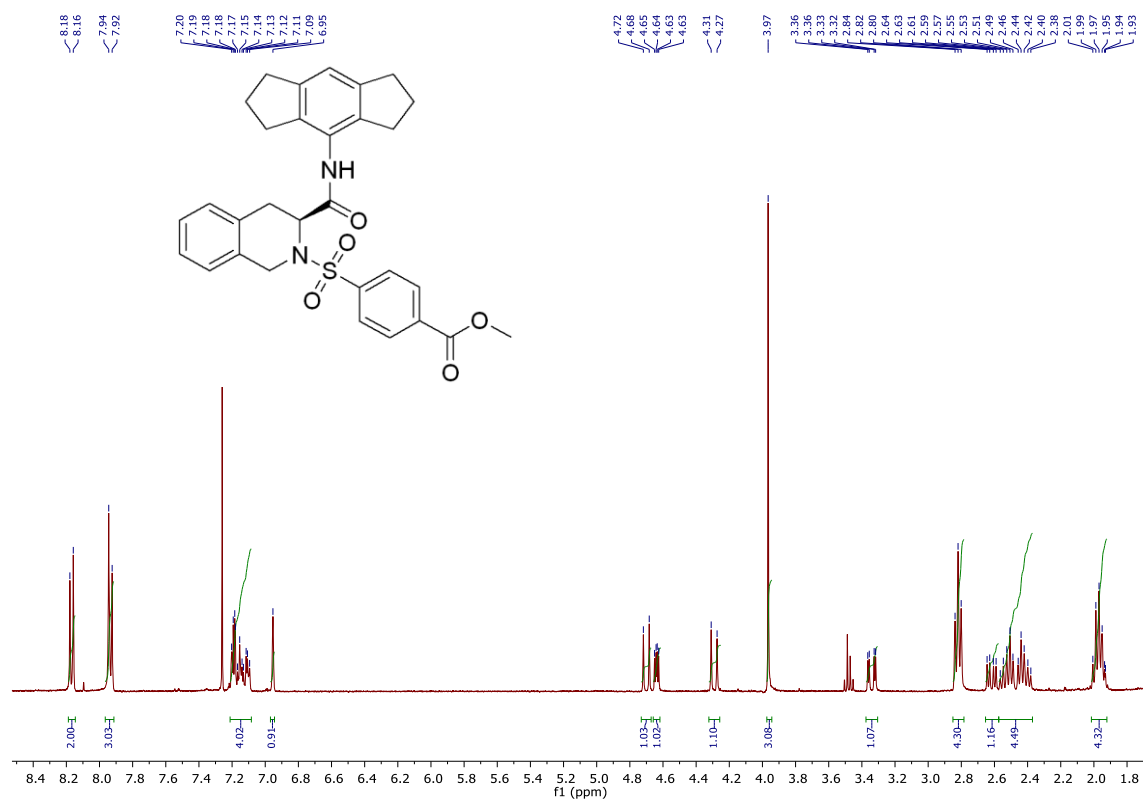


¹³C NMR

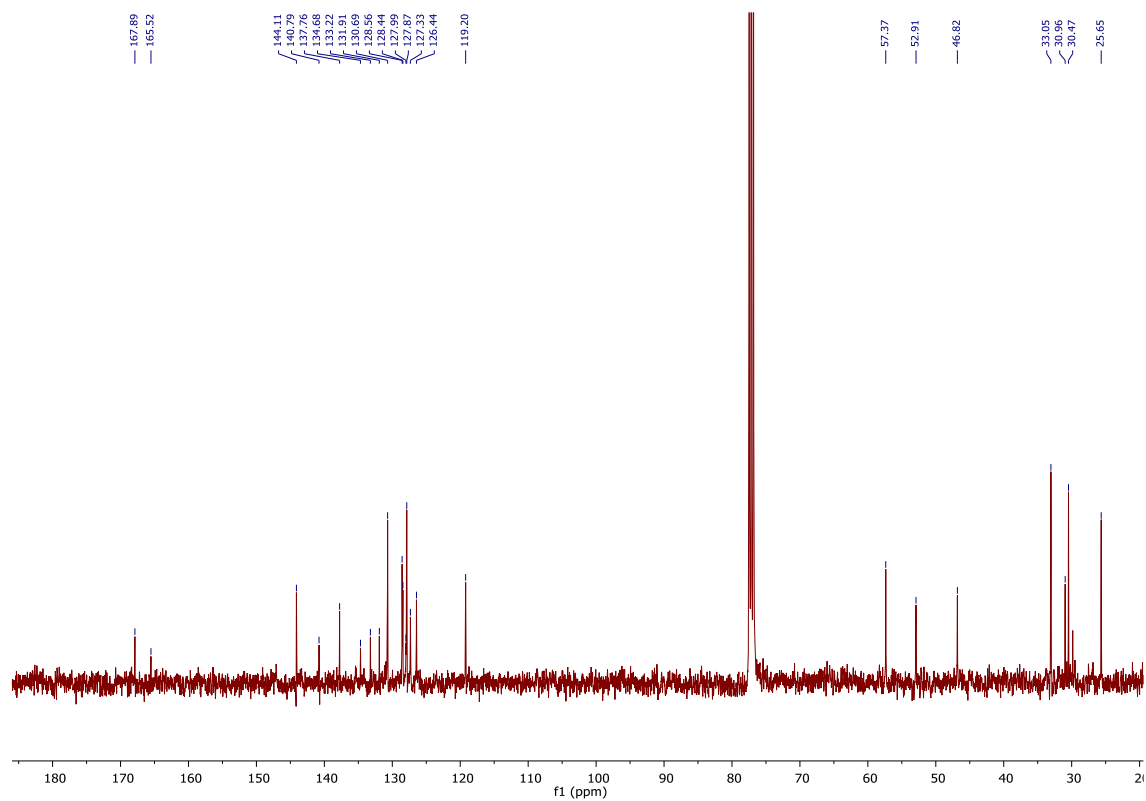


(S)-methyl 4-((3-((1,2,3,5,6,7-hexahydro-*s*-indacen-4-yl)carbamoyl)-3,4-dihydroisoquinolin-2(1*H*)-yl)sulfonyl)benzoate (JE10)

¹H NMR

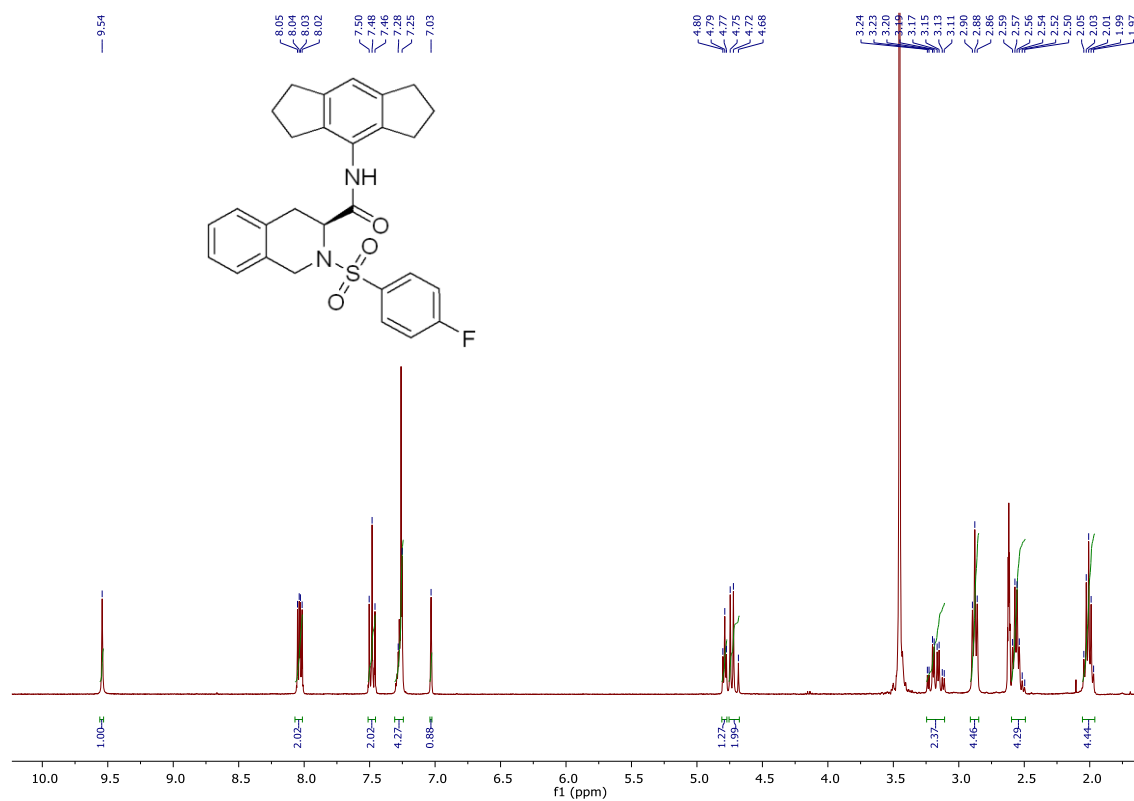


¹³C NMR

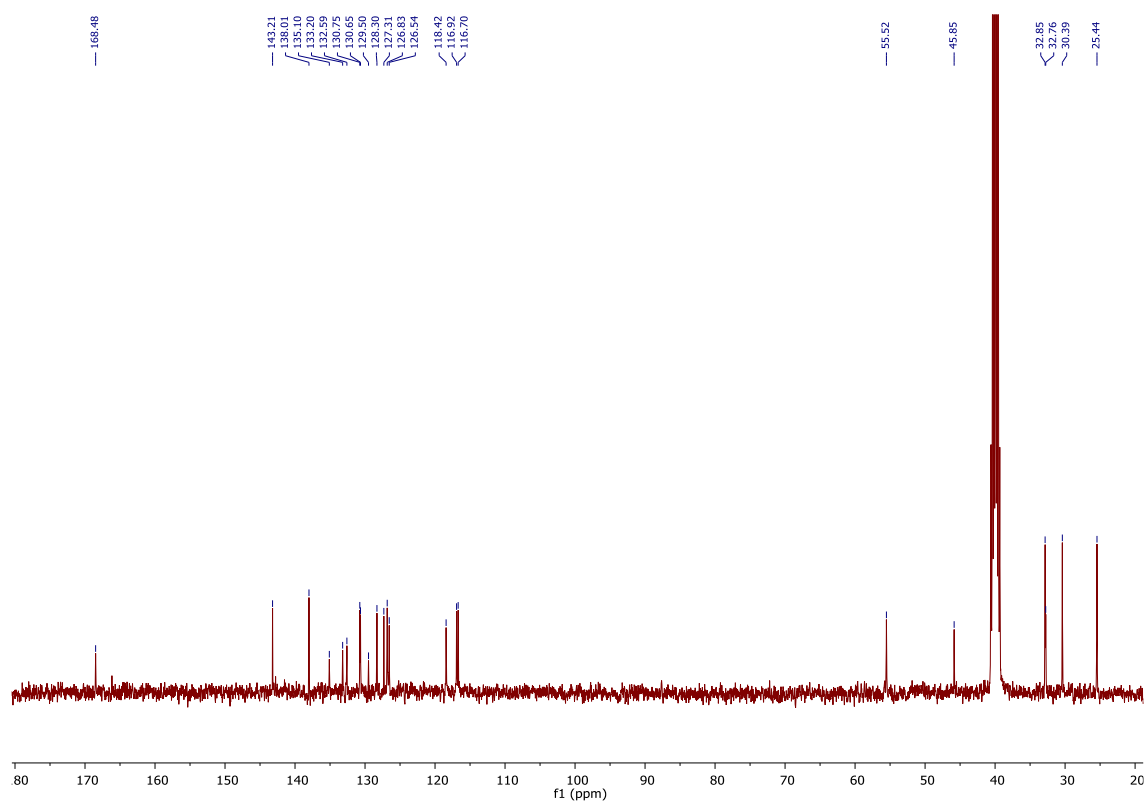


(S)-2-((4-fluorophenyl)sulfonyl)-N-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-s-indacen-4-yl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxamide (JE11a)

¹H NMR

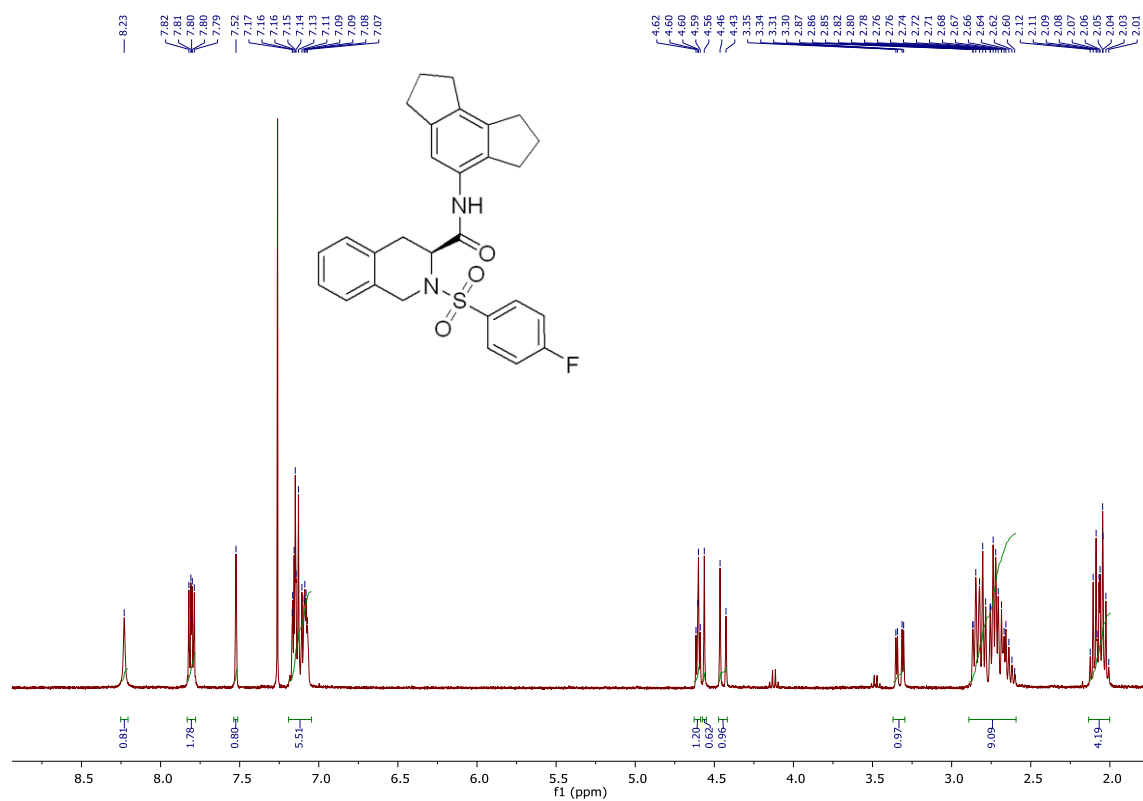


¹³C NMR

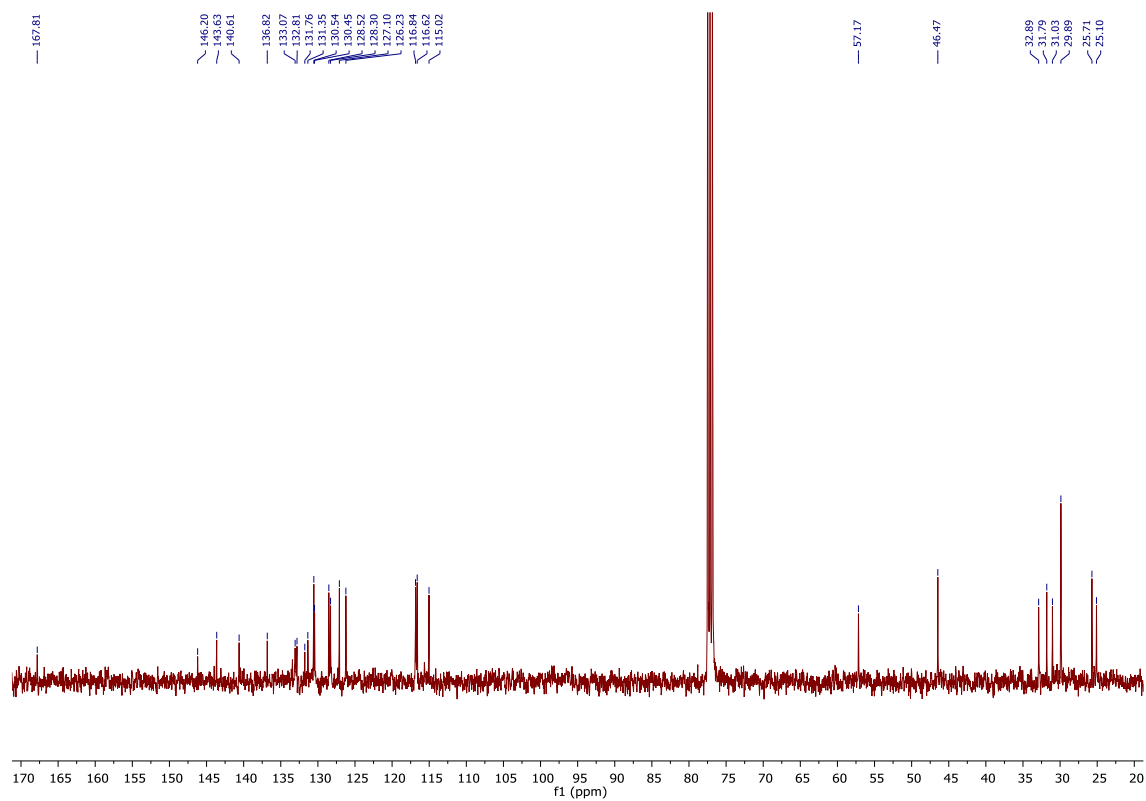


(S)-2-((4-fluorophenyl)sulfonyl)-*N*-(1,2,3,6,7,8-hexahydro-as-indacen-4-yl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxamide (**JE11b**)

¹H NMR

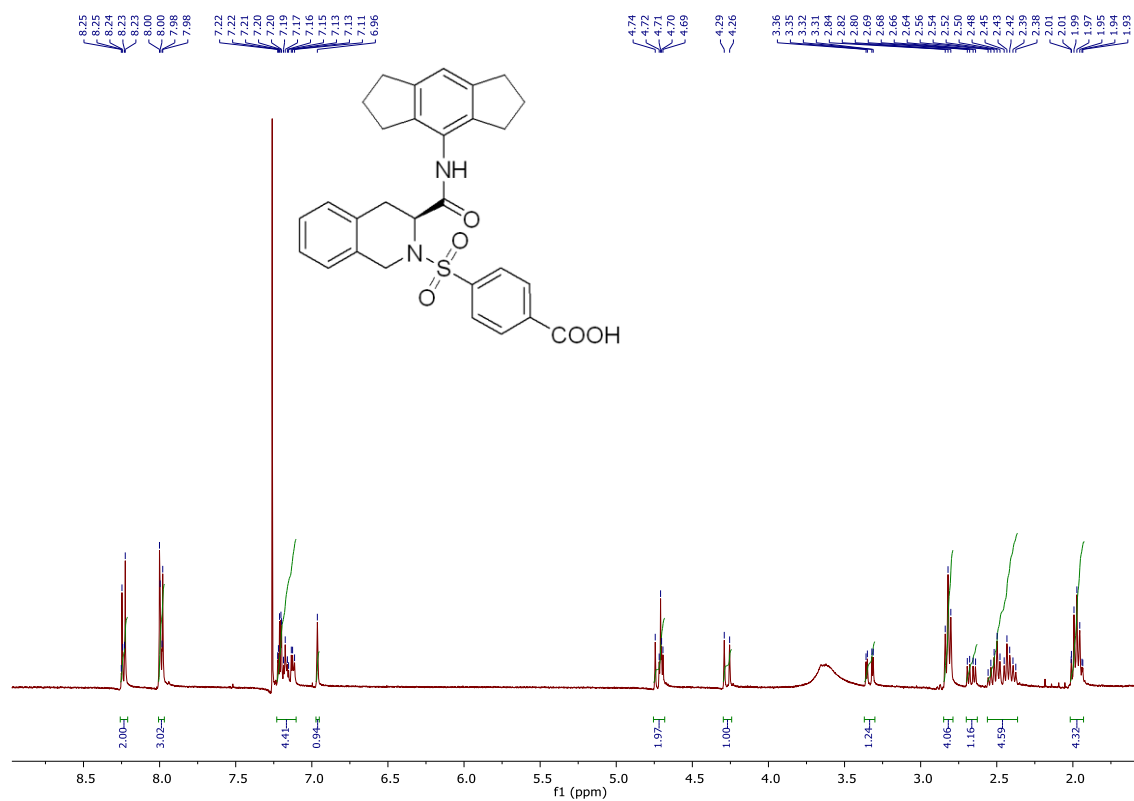


¹³C NMR

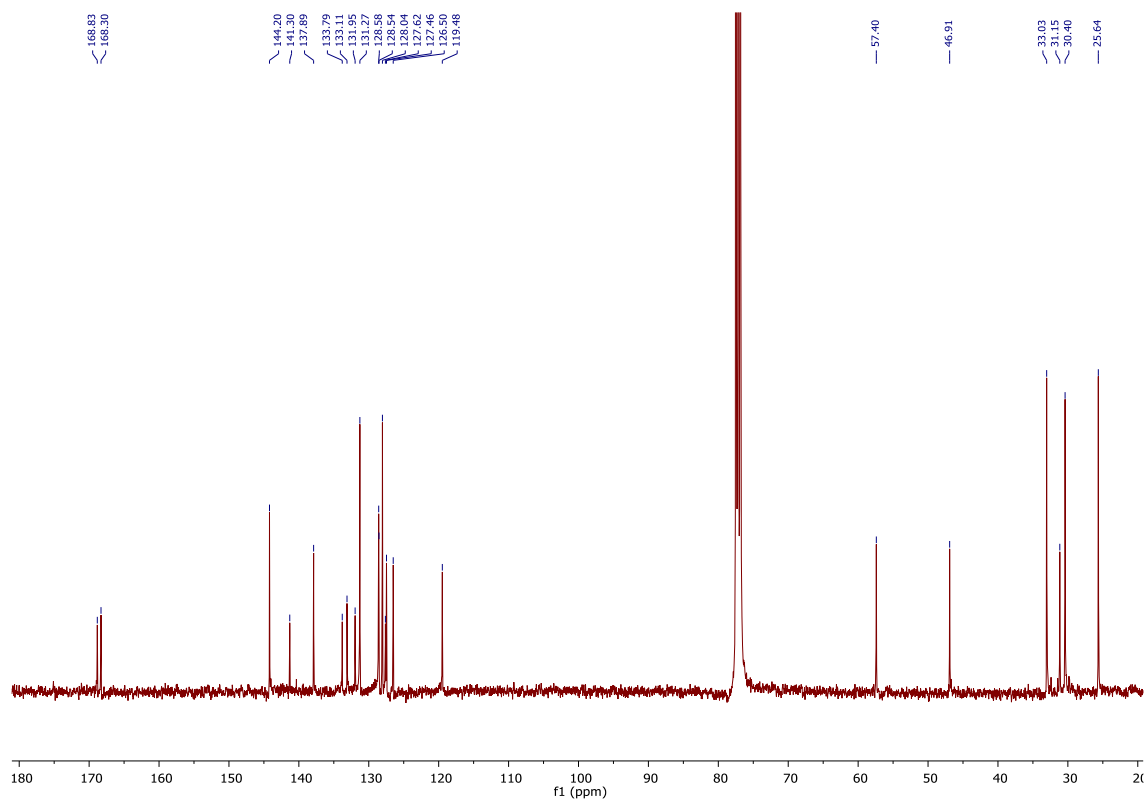


(S)-4-((3-((1,2,3,5,6,7-hexahydro-*s*-indacen-4-yl)carbamoyl)-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)sulfonyl)benzoic acid (**JE12**)

¹H NMR

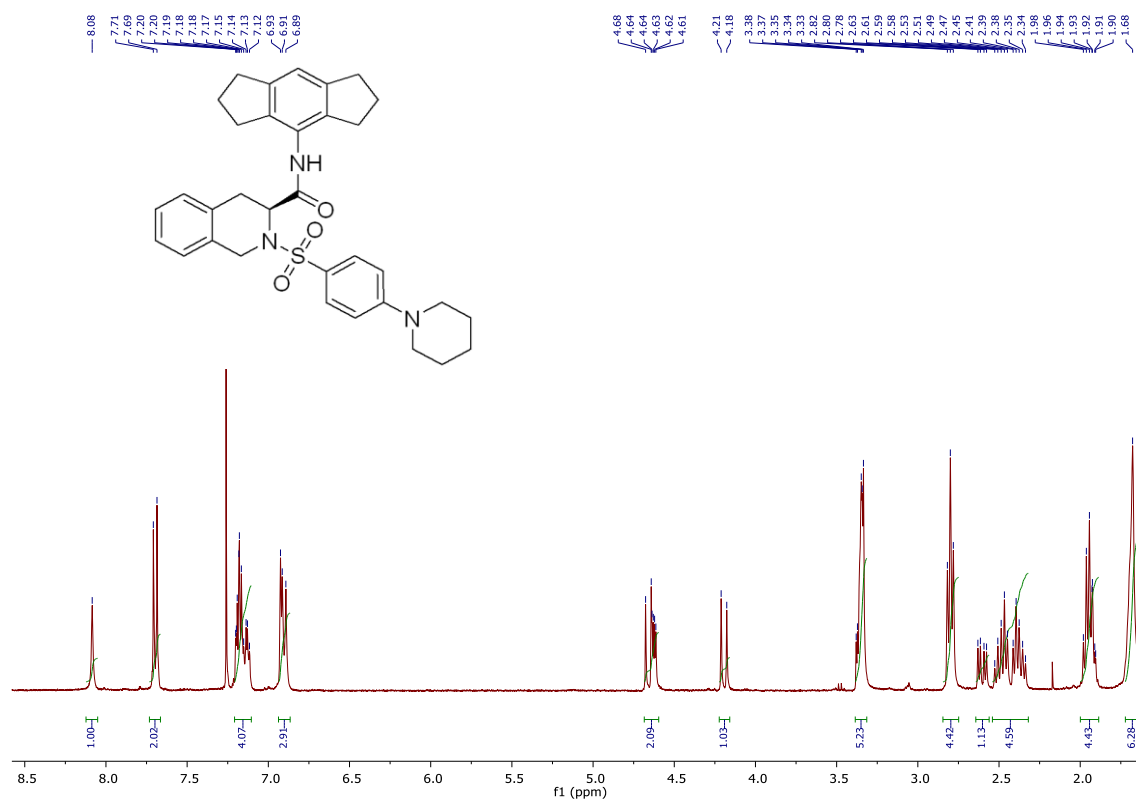


¹³C NMR

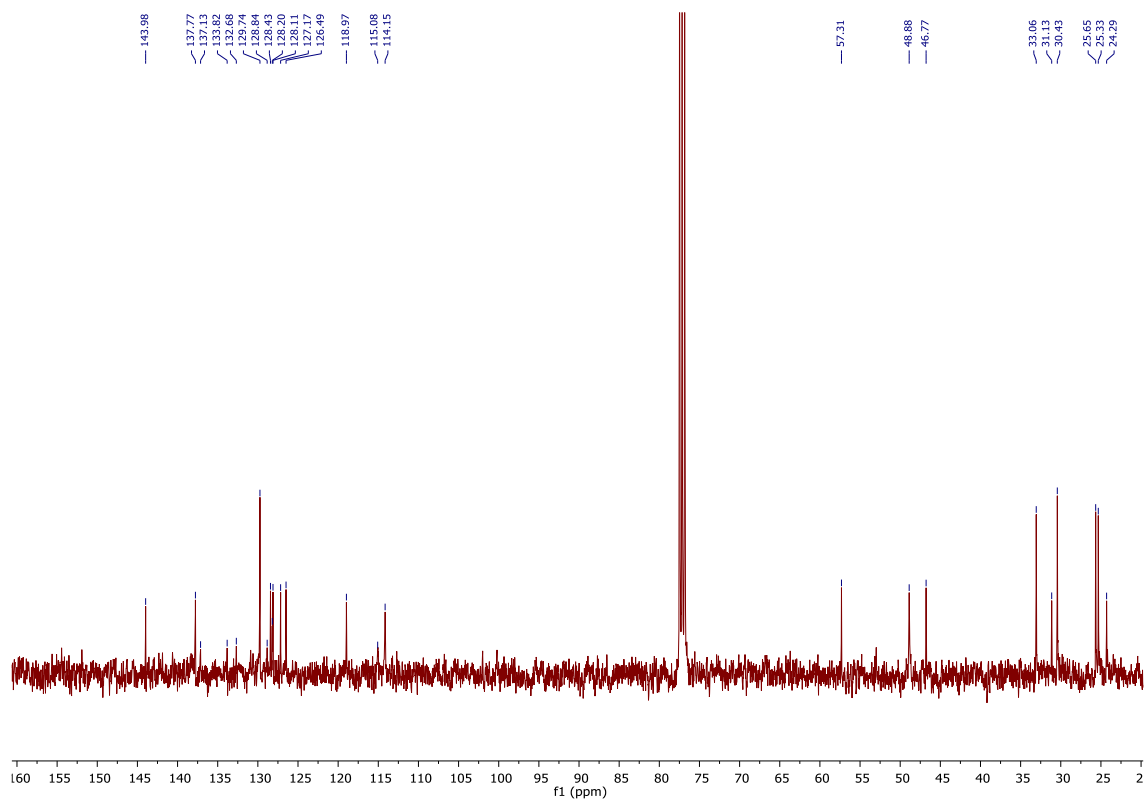


(S)-N-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-s-indacen-4-yl)-2-((4-(piperidin-1-yl)phenyl)sulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxamide (JE14)

¹H NMR

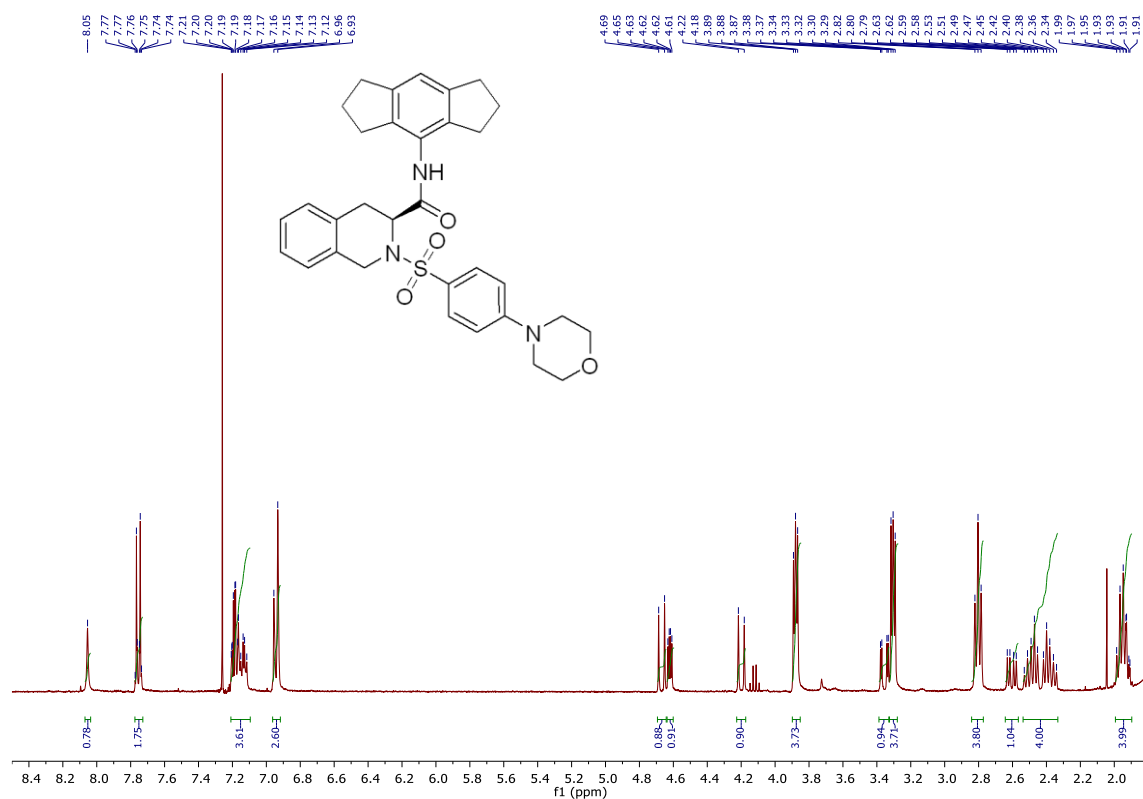


¹³C NMR

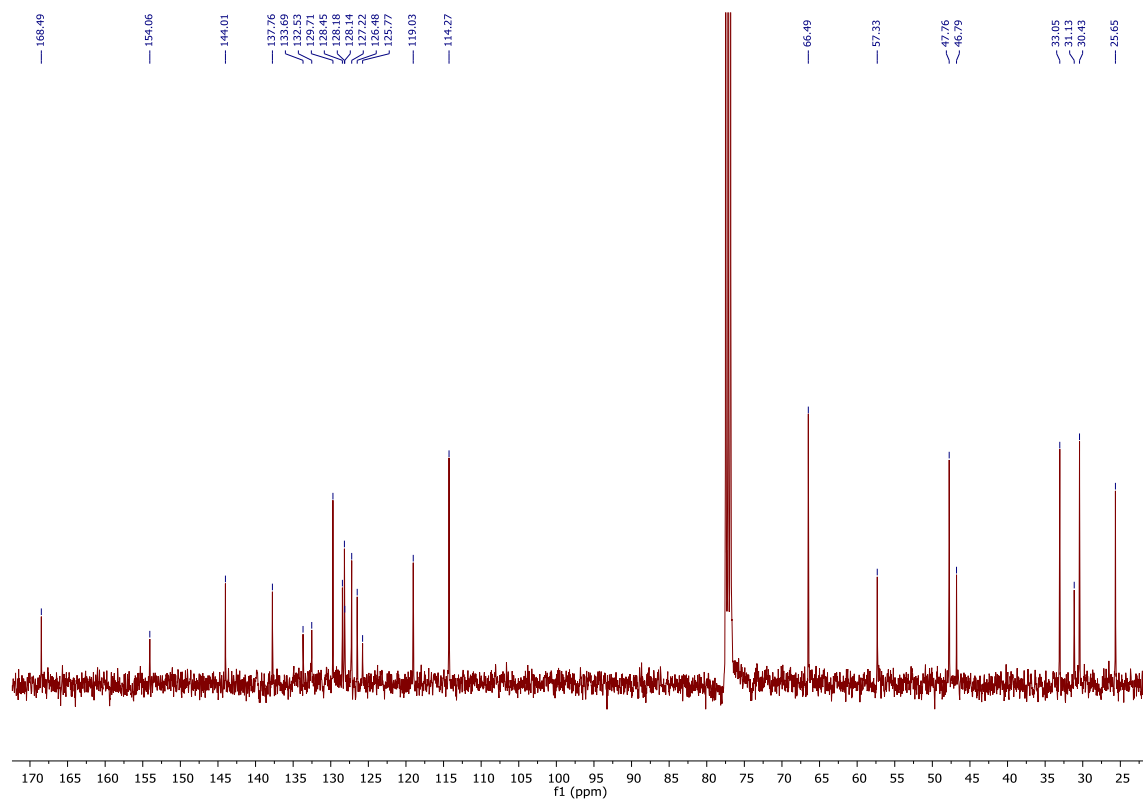


(S)-*N*-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-*s*-indacen-4-yl)-2-((4-morpholinophenyl)sulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxamide (**JE15**)

¹H NMR

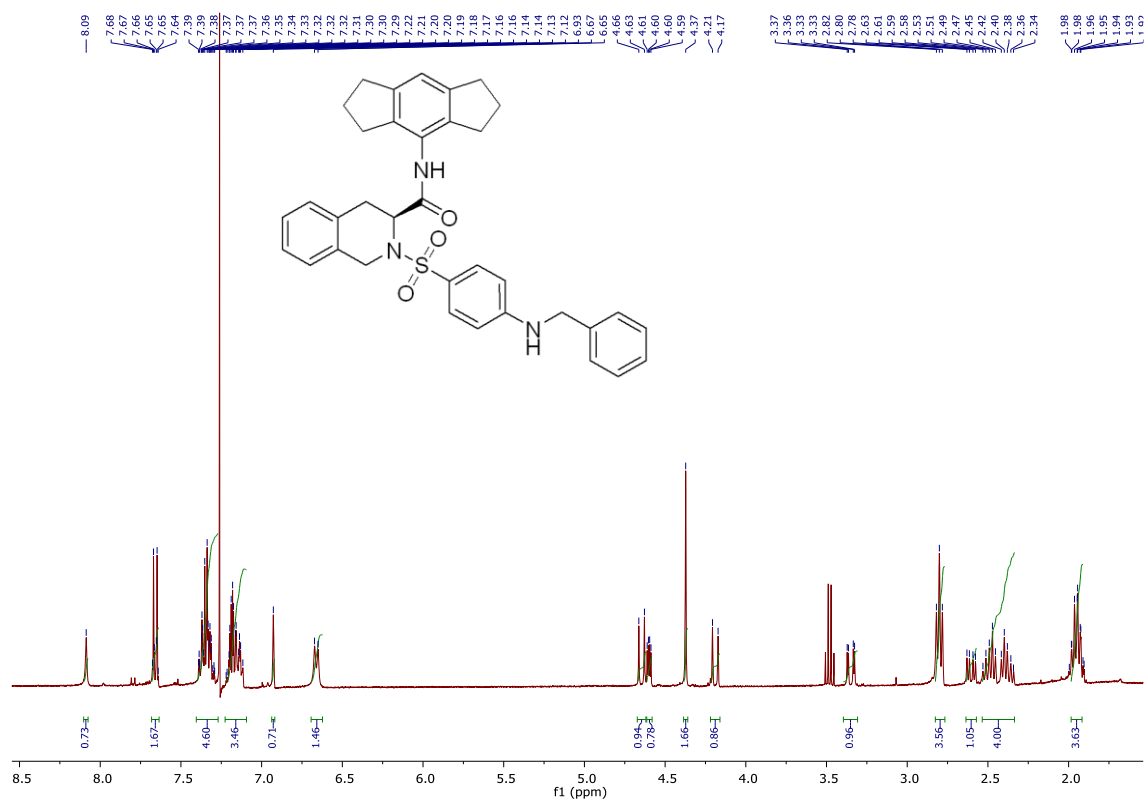


¹³C NMR

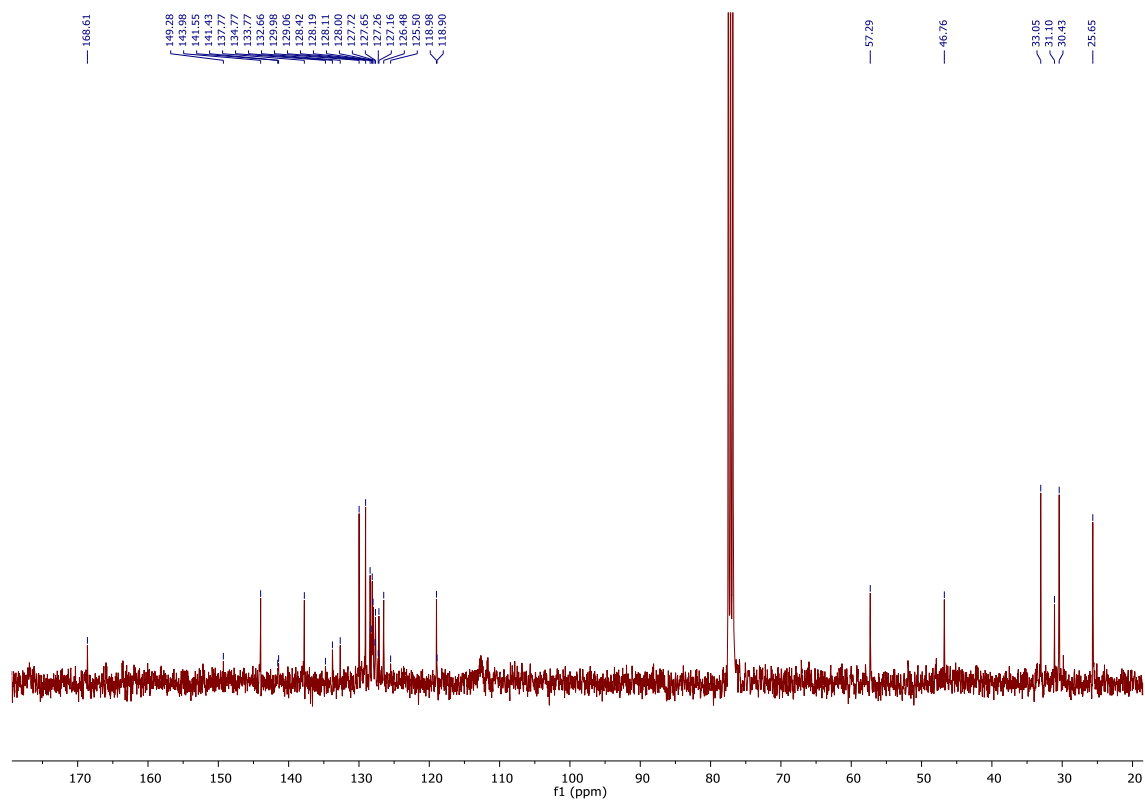


(S)-2-((4-(benzylamino)phenyl)sulfonyl)-N-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-s-indacen-4-yl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxamide (JE16)

¹H NMR

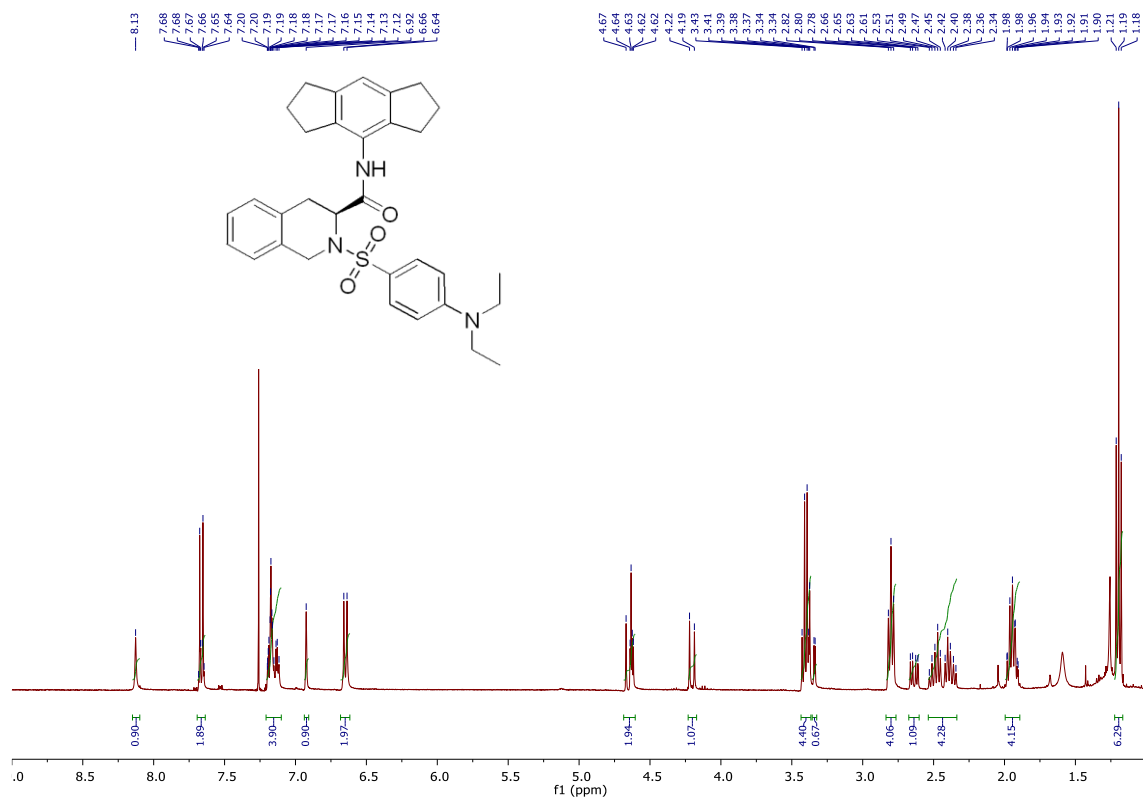


¹³C NMR

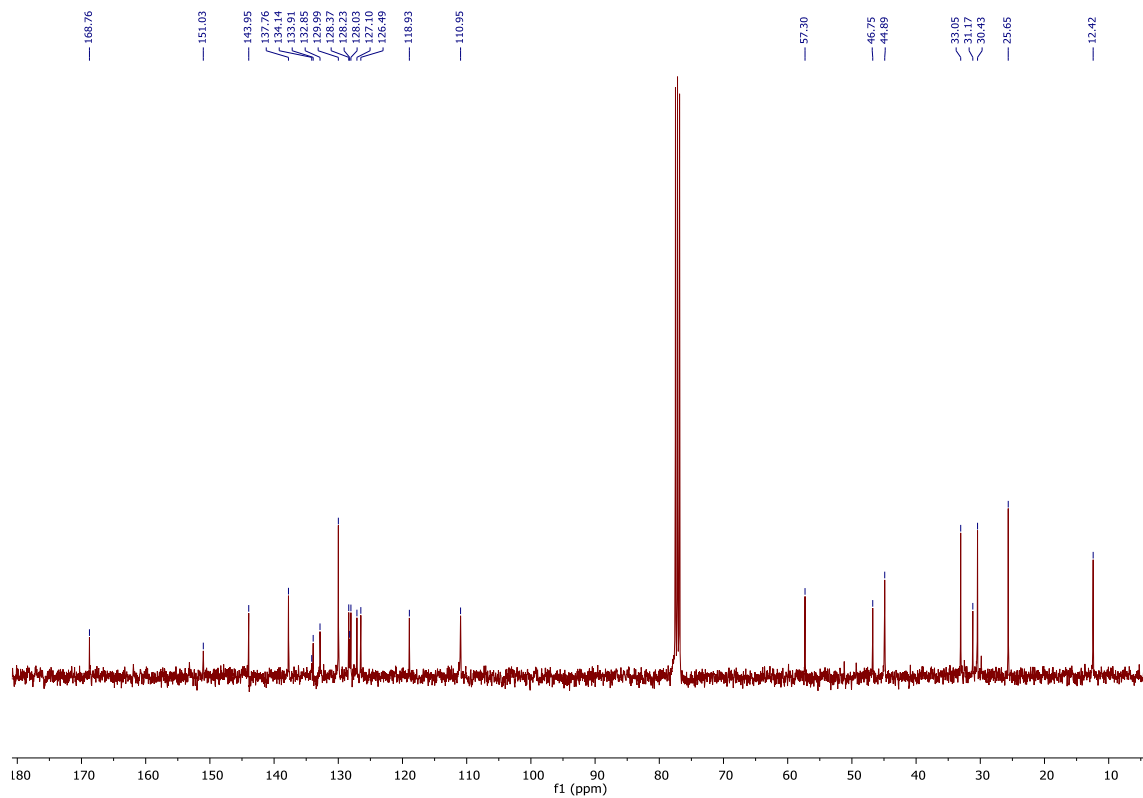


(S)-2-((4-(diethylamino)phenyl)sulfonyl)-*N*-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-*s*-indacen-4-yl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxamide (**JE17**)

¹H NMR

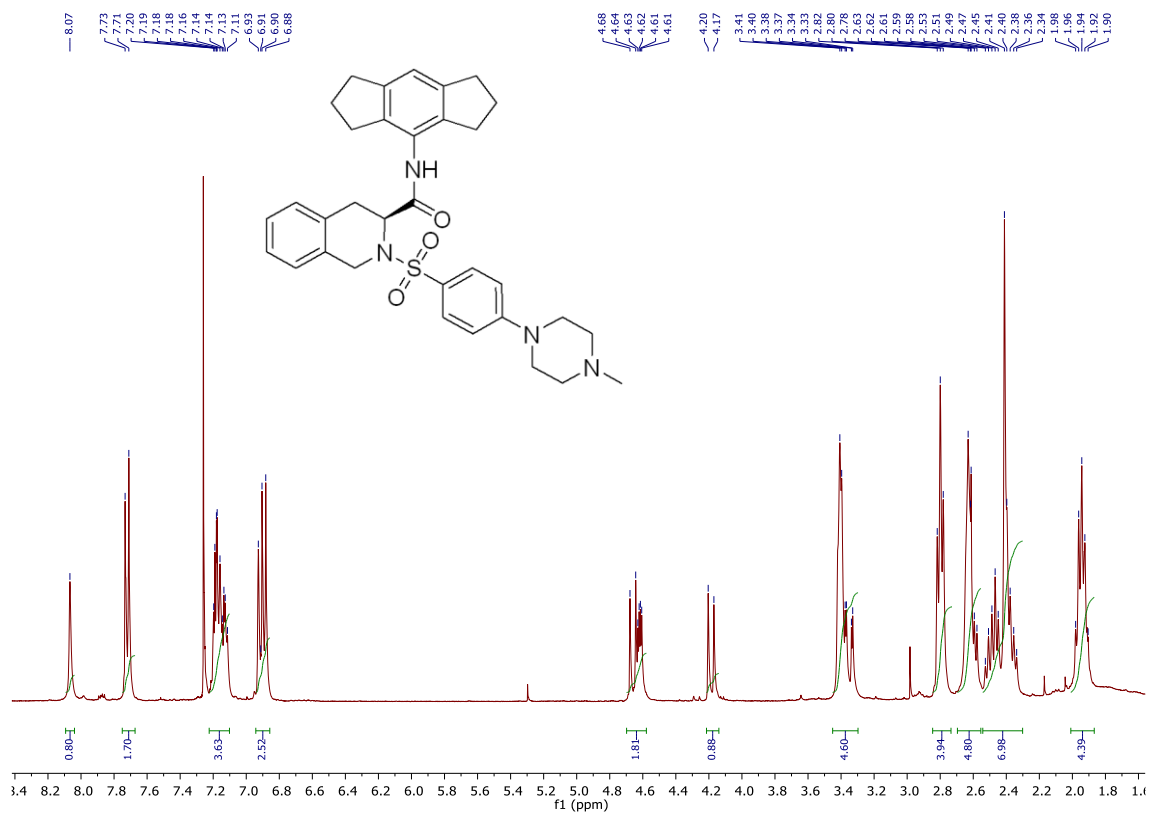


¹³C NMR

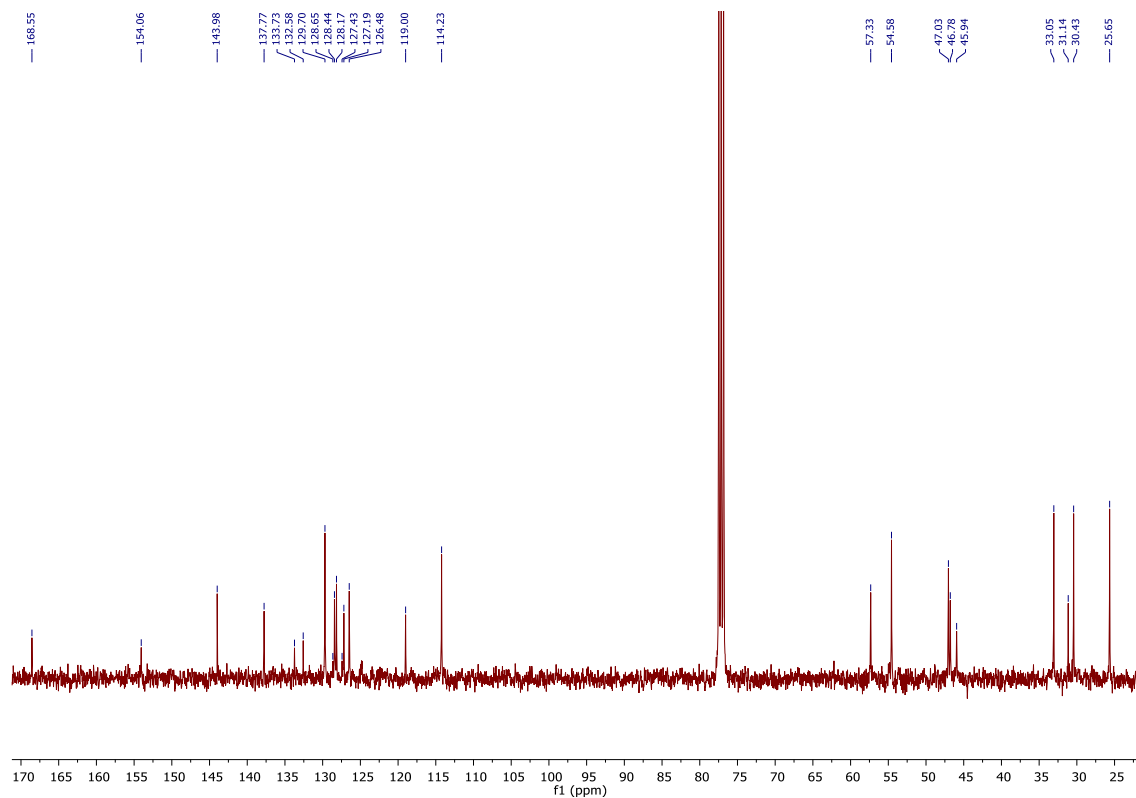


(S)-*N*-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-*s*-indacen-4-yl)-2-((4-(4-methylpiperazin-1-yl)phenyl)sulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxamide (**JE18**)

¹H NMR

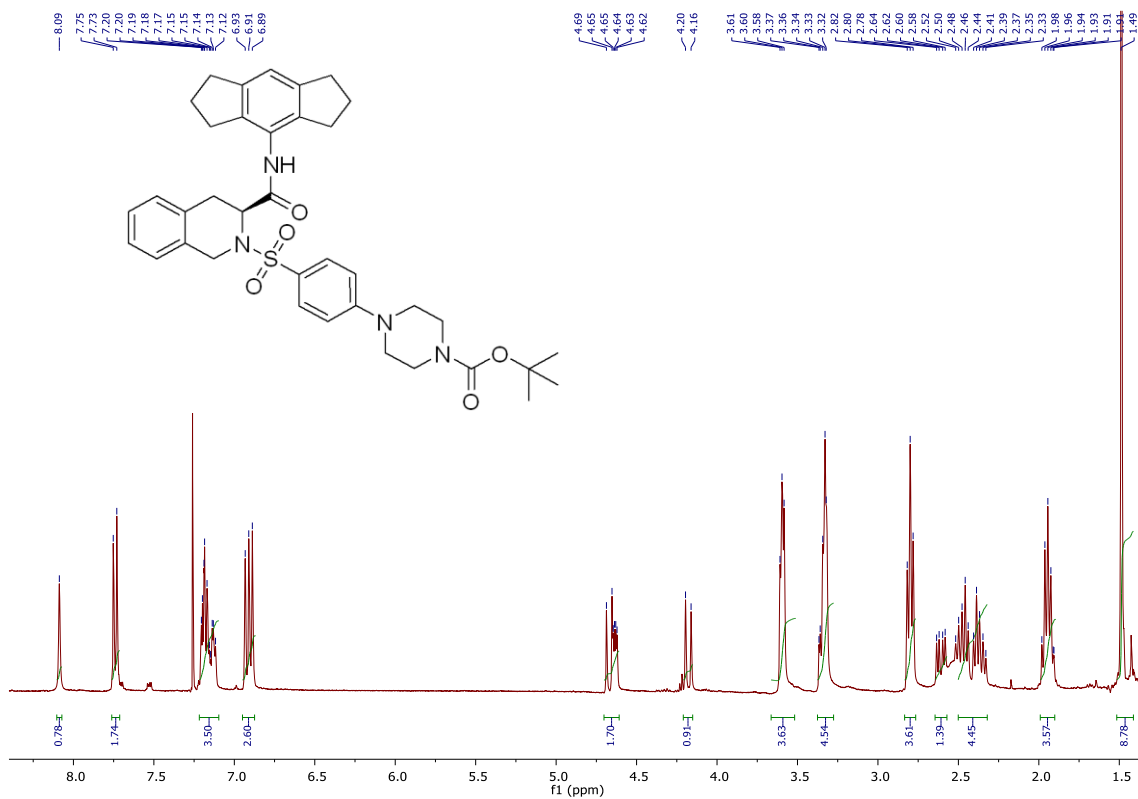


¹³C NMR

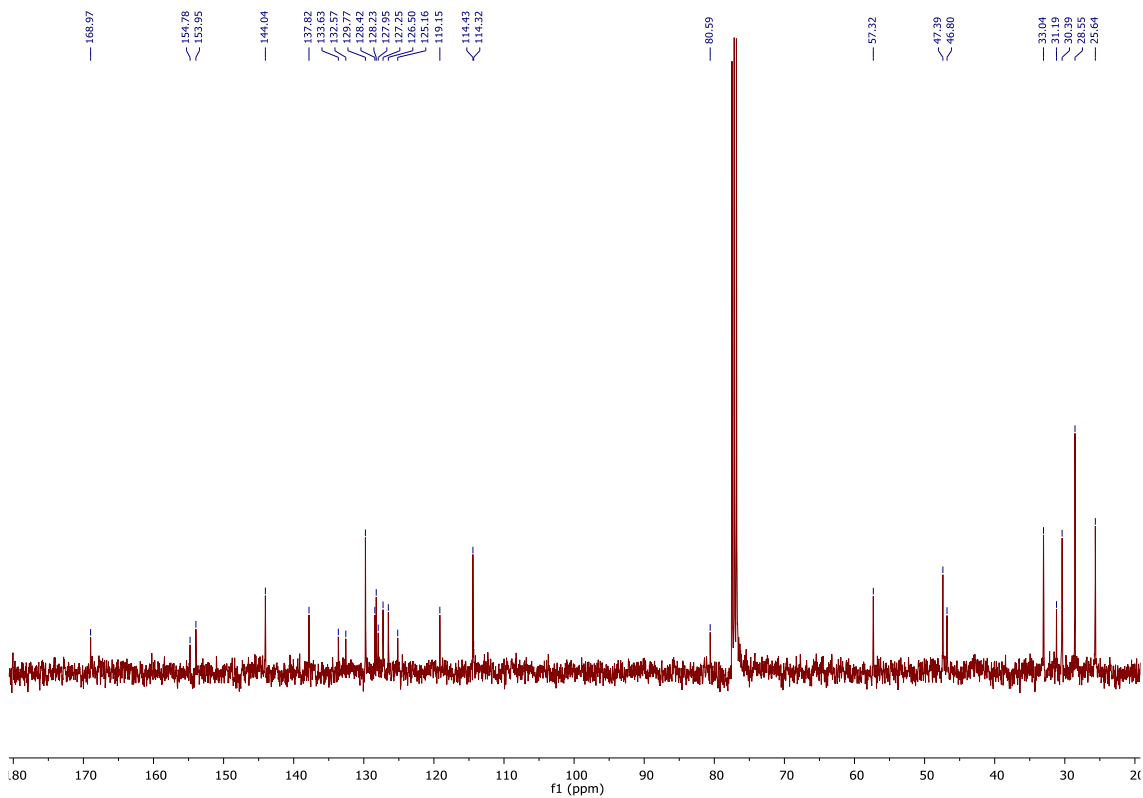


tert-butyl(S)-4-(4-((3-((1,2,3,5,6,7-hexahydro-s-indacen-4-yl)carbamoyl)-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)sulfonyl)phenyl)piperazine-1-carboxylate (JE19)

¹H NMR

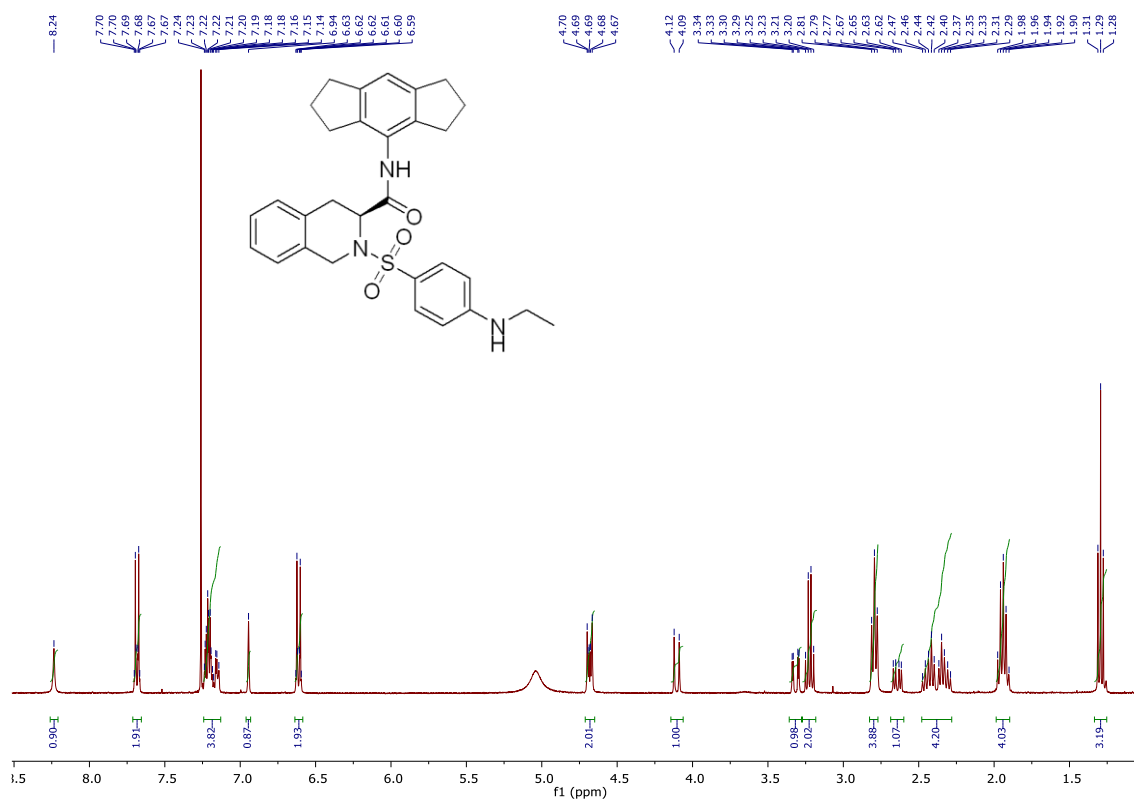


¹³C NMR

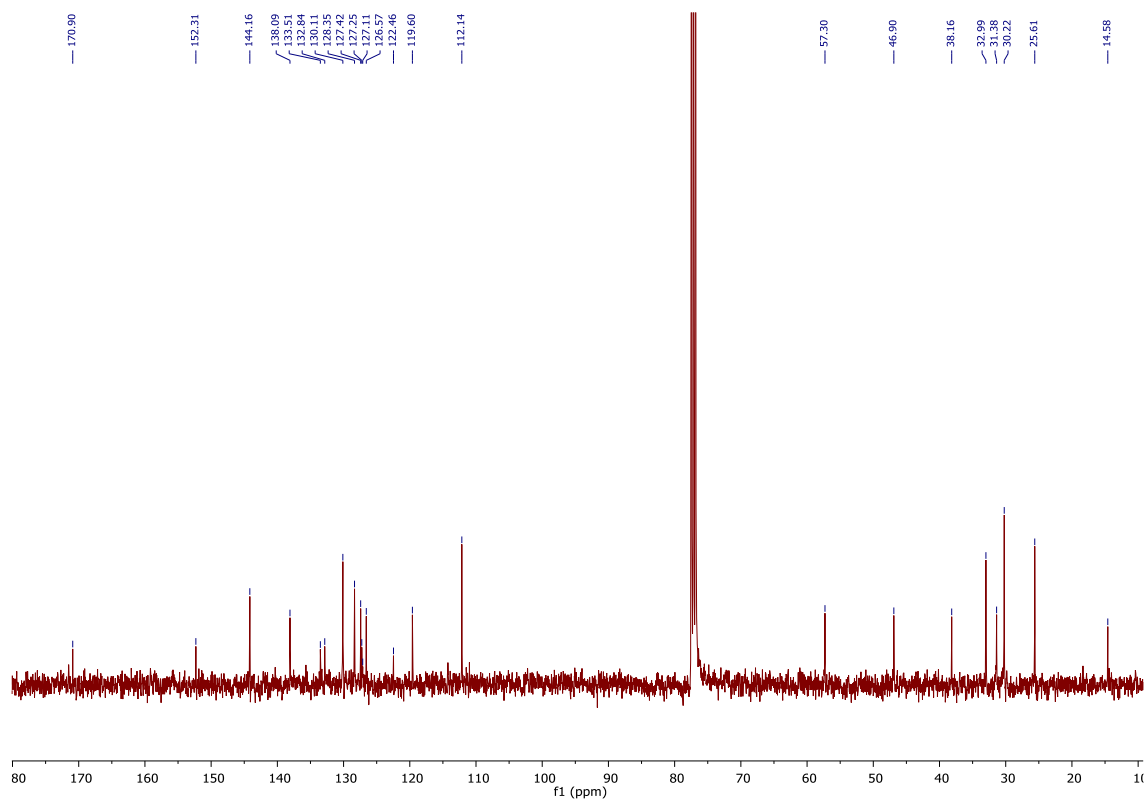


(S)-2-((4-(ethylamino)phenyl)sulfonyl)-*N*-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-*s*-indacen-4-yl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxamide (JE20)

¹H NMR

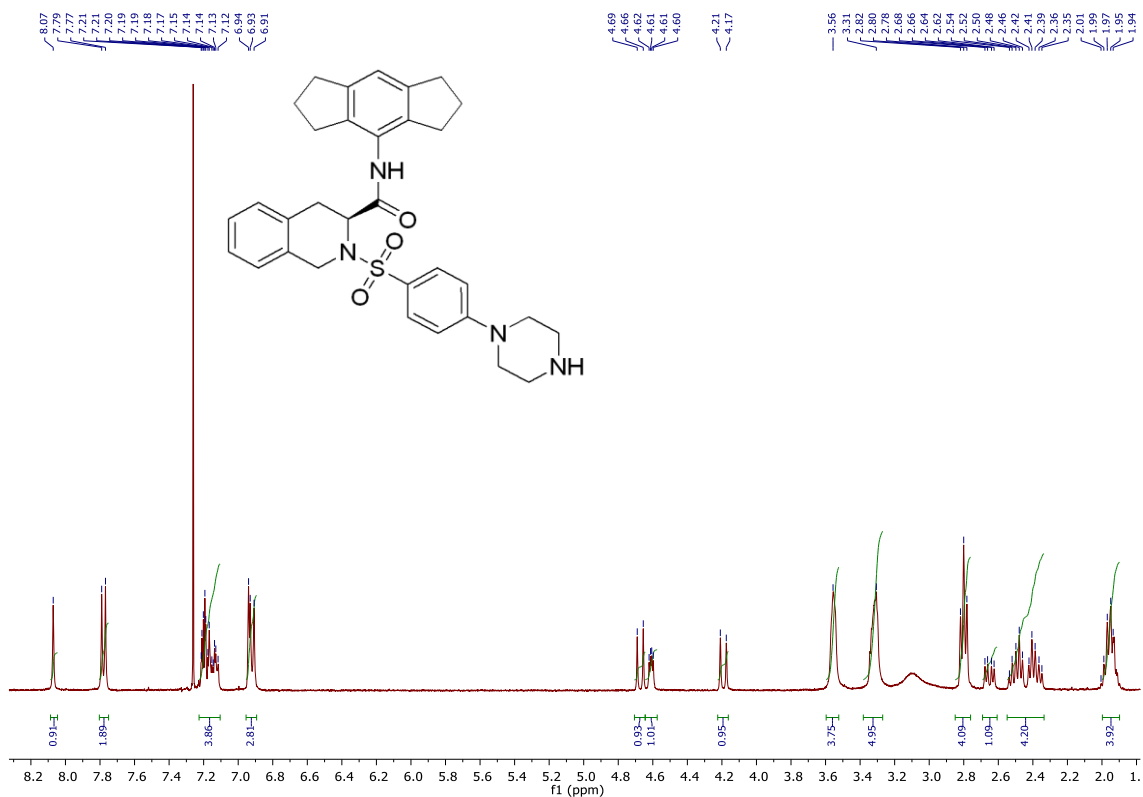


¹³C NMR

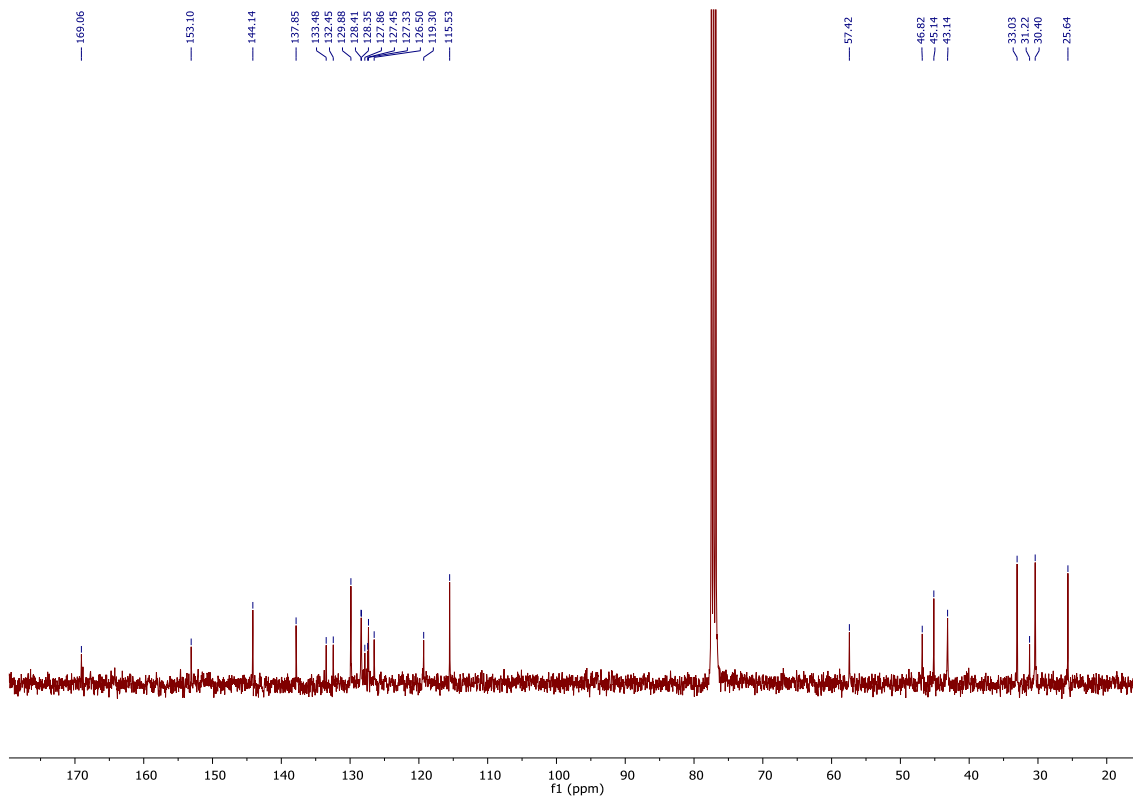


(S)-*N*-(1,2,3,5,6,7-hexahydro-*s*-indacen-4-yl)-2-((4-(piperazin-1-yl)phenyl)sulfonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxamide (**JE21**)

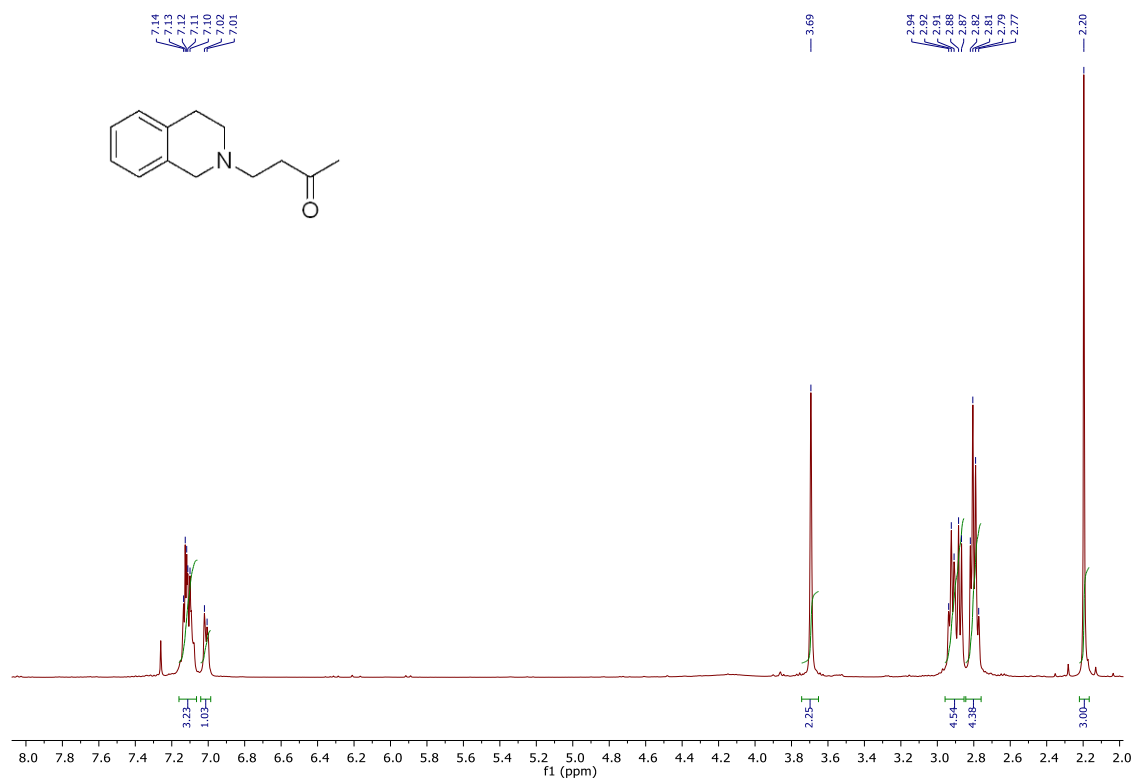
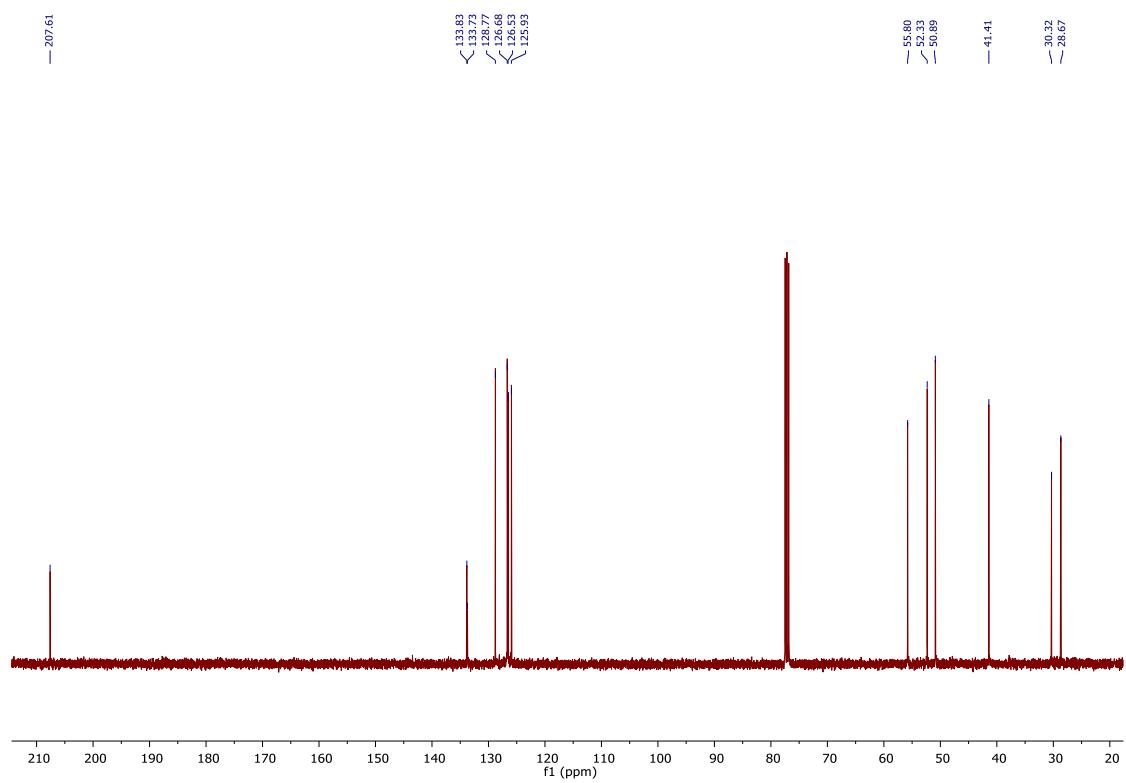
¹H NMR

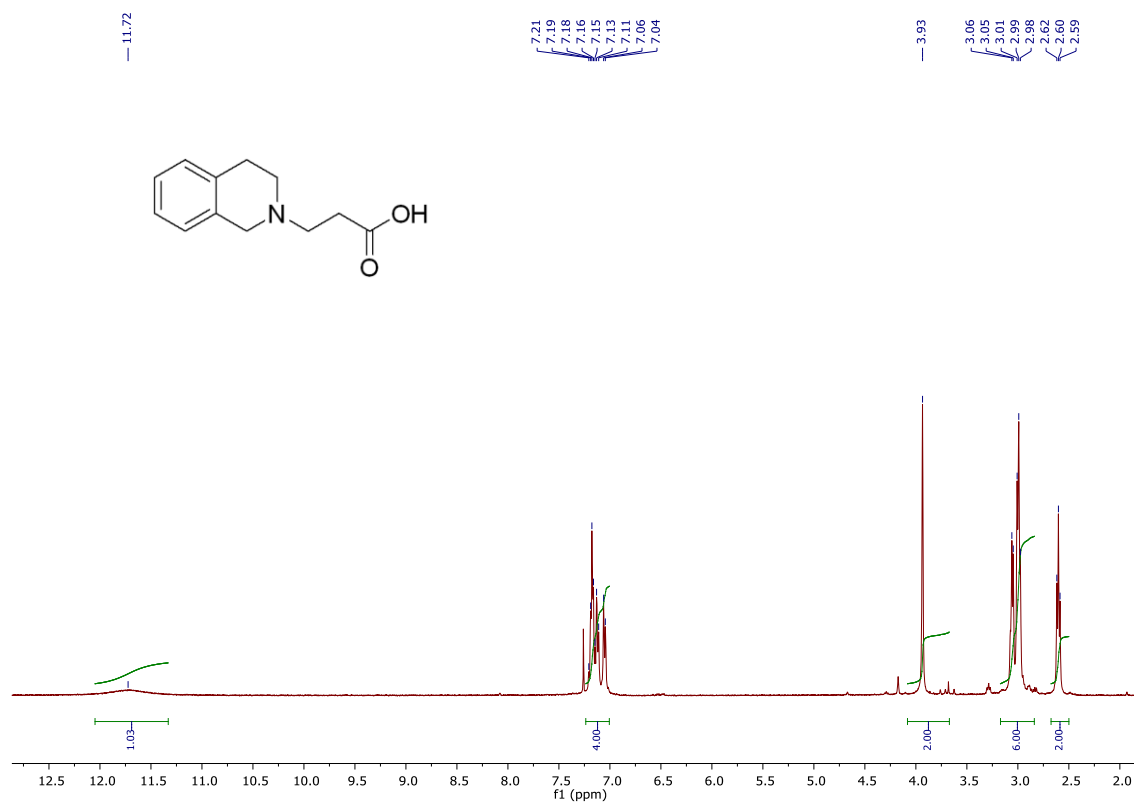
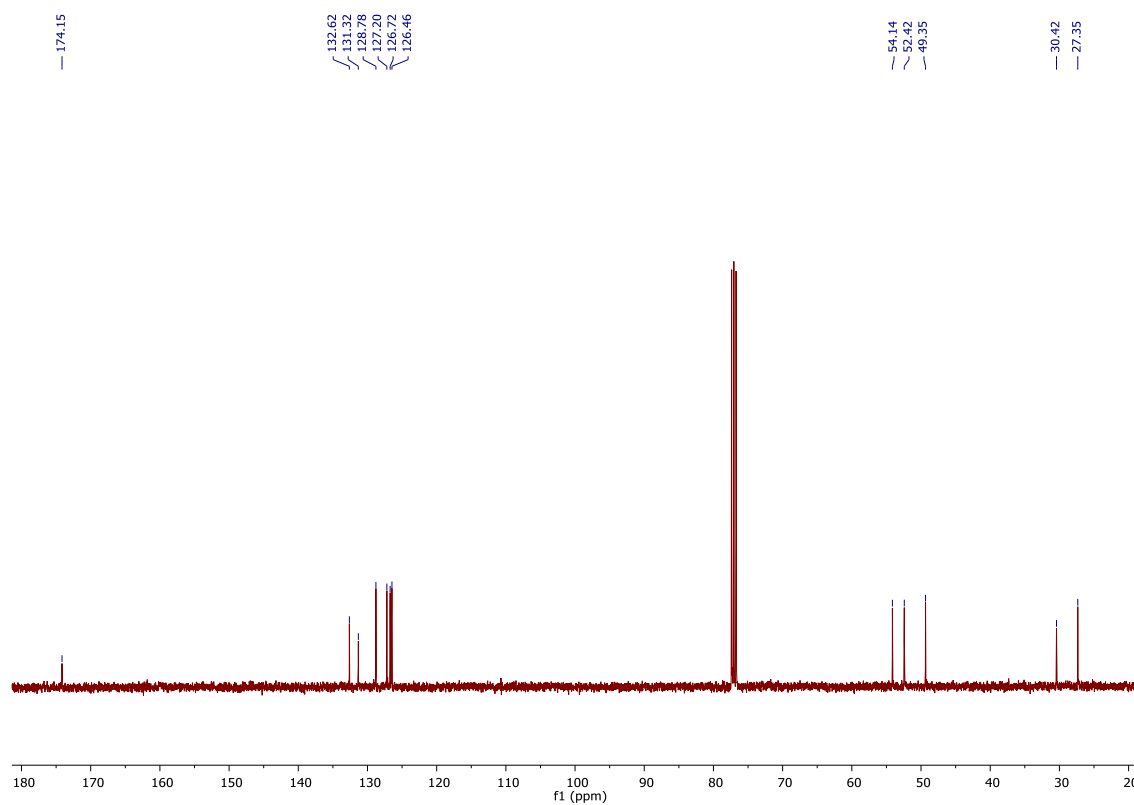


¹³C NMR



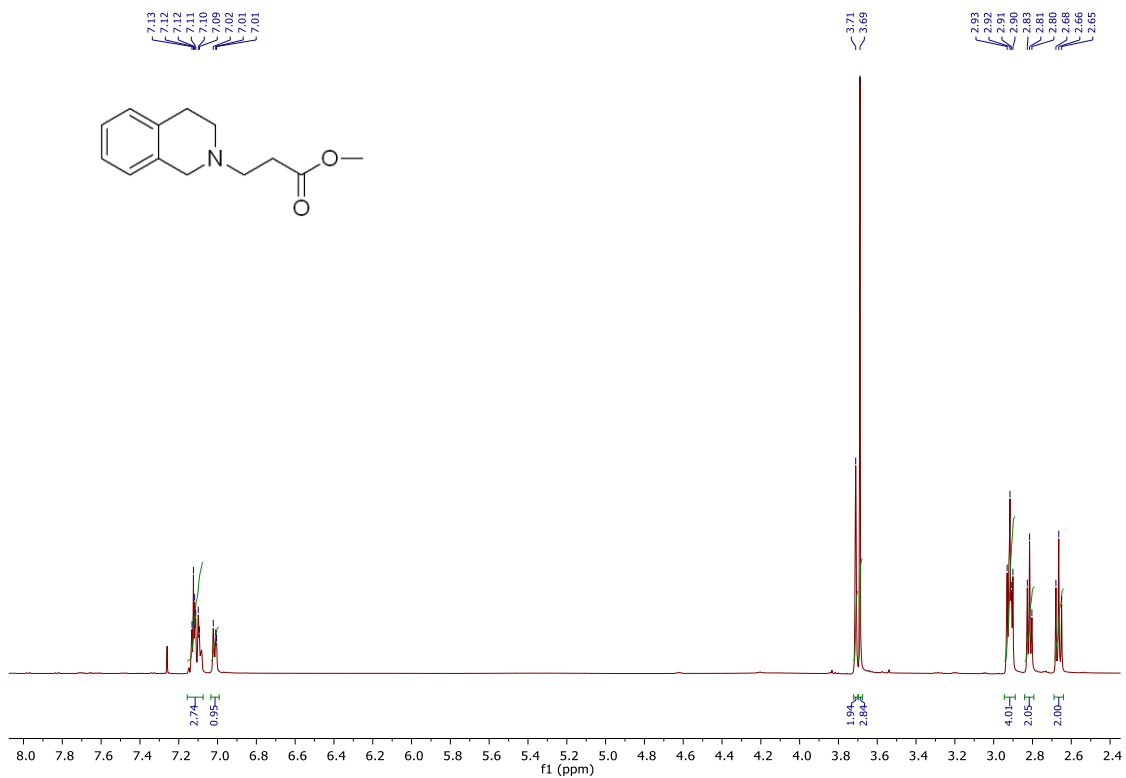
4-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)butan-2-one (JE22)

 ^1H NMR ^{13}C NMR

3-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)propanoic acid (JE24)**¹H NMR****¹³C NMR**

methyl 3-(3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)propanoate (JE25)

¹H NMR



¹³C NMR

