



**UNIVERSITAT
JAUME·I**

**SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA
DE AGENTES MULTIDIANA CON
EFECTO INMUNOMODULADOR,
ANTIANGIOGÉNICO Y
ANTIVASCULAR**

Raquel Gil Edo

Miguel Carda Usó
Eva Falomir Ventura

Junio 2023



**UNIVERSITAT
JAUME I**

Programa de Doctorado en Ciencias
Escuela de Doctorado de la Universitat Jaume I

**SÍNTESIS Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE
AGENTES MULTIDIANA CON EFECTO
INMUNOMODULADOR,
ANTIANGIOGÉNICO Y ANTIVASCULAR**

Memoria presentada por Raquel Gil Edo para optar al grado de doctora por la
Universitat Jaume I

Raquel Gil Edo

Eva Falomir Ventura

Miguel Carda Usó

Castelló de la Plana, junio 2023

FINANCIACIÓN

Agencias financiadoras de la doctoranda:

- Beca predoctoral concedida por la Asociación Española Contra el Cáncer para el proyecto “Síntesis y evaluación biológica de agentes anticáncer multidiana con efecto inmunomodulador, antiangiogénico y antivascular” (ID: PRDCA18002CARD).



- Beca de movilidad para realizar una estancia de investigación concedida por la Fundación Hermanos Balaguer-Gonel.



Agencias financiadoras del proyecto de investigación o de los recursos materiales específicos del grupo de investigación:

- Proyecto financiado por la Universitat Jaume I: programa grupos de investigación en activo en captación de recursos del plan estatal (GACUJI/2022/05).
- Proyecto financiado por la Universitat Jaume I: Descubrimiento de moléculas multidiana anticáncer y estudio de su efecto sobre el microambiente tumoral mediante modelos 3D (UJI-B2021-46).
- Proyecto financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad: Desarrollo de nuevos agentes anticáncer multidiana con potencial efecto disruptivo en el microambiente tumoral (PID2021-1267770B-100).
- Proyecto financiado por la Universitat Jaume I: *In silico*, síntesis y evaluación biológica de agentes anticáncer multidiana con efecto inmunomodulador, antiangiogénico y antivascular (UJI-B2018-38).
- Proyecto financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad: En busca de una nueva generación de agentes anticancerosos multidiana. Desde lo *in silico* hasta lo *in vitro* y desde moléculas pequeñas hasta los nanofármacos (RTI2018-097345-B-I00).

Licencia Creative Commons

Licencia CC Reconocimiento - No comercial -
Compartir igual (BY-NC-SA).



AGRADECIMIENTOS

La presente tesis doctoral ha sido realizada en el grupo de investigación “*Joining Medicine and Chemistry*” del departamento de Química Inorgánica y Orgánica de la Universitat Jaume I bajo la dirección de Miguel Carda Usó y Eva Falomir Ventura. A ellos me gustaría agradecerles la confianza depositada en mi desde el primer momento, así como la acogida que me dieron, ya hace casi diez años, cuando entré en la universidad. Gracias a vosotros me he podido iniciar en la investigación y he descubierto un mundo que me apasiona. Miguel, gracias por compartir con nosotros toda tu sabiduría y experiencia, y gracias por las miles de anécdotas con las que no podíamos parar de reír y nos ayudaban a evadirnos de los problemas que surgían en nuestro trabajo.

Eva, a tí nunca podré agradecerte lo suficiente todo lo que has hecho por mí durante estos años. Eres mi ejemplo a seguir, mi referente, tan pequeñita pero tan grande al mismo tiempo. Tienes un corazón que no te cabe en el pecho y siempre has antepuesto nuestras necesidades a las tuyas propias, siempre dispuesta ayudarnos. Eres como una madre para mí a la que acudo con mis frustraciones de dentro y de fuera del laboratorio, perdona por darte más quebraderos de cabeza pero tus consejos valen oro. Gracias por contagiarnos de tu pasión y compartir con nosotros cada pequeño triunfo.

También estoy enormemente agradecida a Alan Serrels y a su grupo de investigación en Edimburgo, no solo por darme la oportunidad de realizar mi estancia de investigación allí, sin conocerme, sino por una vez allí, haberme acogido como una más sin dudarlo, apoyándose en todo y compartiendo conmigo grandes consejos. A los miembros más jóvenes del grupo, David, Alex y Natasha, gracias por los buenos ratos durante la comida, por las quedadas fuera del laboratorio, tan necesarias, y en definitiva por todo. Hicisteis mi experiencia de lo más enriquecedora tanto a nivel personal como a nivel profesional.

No pueden faltar aquí, los miembros de la junta local de Castellón de la AECC, y todos sus voluntarios, con Salomé y Carlos a la cabeza, siempre tan atentos y demostrándose un gran cariño desde el momento en que me conocieron. Mil gracias, porque gracias a vuestro esfuerzo he podido dedicarme durante estos años a lo que me apasiona y eso no tiene precio. Hacéis una labor muy grande y bonita luchando por conseguir que se tome

conciencia de la importancia de la investigación y, consiguiendo recursos muy necesarios para aquellas personas que han sido diagnosticadas por esta enfermedad que pega tan duro a veces.

Me gustaría extender también mi agradecimiento a los miembros de ambos departamentos de Química de la universidad Jaume I y a los técnicos de servicios centrales que siempre que ha sido necesario, han estado ahí para ayudar.

En estos años, han sido muchos los que no han dudado en ayudarme siempre que lo he necesitado, y es que el mínimo gesto ayuda, por eso, gracias. A Raül y Laura, que me acogieron en el grupo como una más y me demostraron que con fuerza y perseverancia se consiguen las cosas. A Begoña, aun con mil cosas en la cabeza y con unos horarios que harían temblar a cualquiera, siempre encuentra tiempo de parar a saludar, gracias por compartir con nosotros esos momentos de reír por no llorar, no dudes en pedir ayuda siempre que la necesites. Y al resto de becarios que han compartido conmigo esta etapa, aunque muchos ya hayan acabado su andadura y se les pueda llamar doctores. Gracias por las comidas y quedadas de becarios ya marcadas en el calendario, los encuentros inesperados por los pasillos con bromas y algún que otro sustito, todo, lo echaré de menos.

Esta es una etapa muy enriquecedora, sobre todo gracias a las personas que te acompañan en ella, y hay quien ha llegado para quedarse, convirtiéndose en la familia que eliges, mis camaradas incondicionales Alberto, Juanjo, Amelia y Celia. A mis chicos, que por mucho que se quejen, en el fondo nos van a echar de menos. Espero que esta bonita amistad no acabe aquí y aunque no escuchéis nuestros audios interminables sigáis enviando stickers. A mis chicas, gracias por todas esas tardes de tertulia cargadas de consejos sobre mil cosas, por los audios infinitos a 1,5x, por levantarme el ánimo cada día y por compartir mis pasiones. Pero sobre todo a los cuatro, gracias por las risas.

A Inés, otra gran amiga que llegó para quedarse, que aunque nos veamos poco sé que siempre está ahí, tanto en los momentos buenos como en los malos. Contigo han sido muchas las charlas de apoyo mutuo para superar esta etapa, la mía ya llega a su fin y sé que tú me seguirás en breve, confía

que ya lo tienes. Gracias por escucharme siempre y saber darme la dosis de motivación necesaria para seguir.

A mis amigos, con los que siempre es fácil desconectar, gracias chicos por ayudarme a evadirme de la rutina. A mis chicas del baile con las que una se desestresa siguiendo el compás. Y, como no puede ser de otra manera, a mi familia, que son los que siempre están ahí apoyándome pase lo que pase, no sé qué haría sin vosotros.

Pablo, gracias por comprender siempre lo importante que es esto para mí, haber tenido la paciencia suficiente para aguantar mis dilemas constantes e intentar sacarme siempre una sonrisa. Gracias por animarme a seguir ampliando la UJI a base de columnas, por más veces que te explicara a qué llamaba yo columna. Gracias por aguantar mis repentinos cambios de humor y aun así seguir a mi lado.

A mis padres, Tico y Marisol, gracias por apoyar cada una de mis decisiones sin ninguna objeción y darme la valentía que me falta cada vez que me he sentido insegura. No he podido tener mejores referentes para enfrentarme al mundo, nunca habéis dudado de mí, ni siquiera cuándo ni yo misma confiaba, y me habéis enseñado a trabajar duro para conseguir lo que quiero, por eso os debo todo el éxito que he podido tener.

Y a mi hermana, Rebeca, eres el mayor regalo que me podrían haber hecho, no me hubiera podido tocar una hermana mejor. Estoy muy orgullosa de la mujer en la que te has convertido. Gracias por hacerme la vida más fácil, gracias por escucharme y no permitir que entre en bucle, gracias por acompañarme en cada aventura y gracias por tu apoyo incondicional.

A todos vosotros, muchísimas gracias, ya que sin vuestro apoyo esta tesis no habría sido posible.

**“El éxito es la capacidad de ir de
fracaso en fracaso sin perder el
entusiasmo”**

Winston Churchill

ABREVIATURAS y ACRÓNIMOS

ABSA- 4-acetamidobencenosulfonil azida	FGFR- Fibroblast Growth Factor Receptor
AcOEt- Acetato de etilo	FLT3- Fms-like Tyrosine kinase 3
ADN- Ácido Desoxirribonucleico	FOXP3- Transcription Factor Forkhead Box Protein 3
AECC- Asociación Española Contra el Cáncer	HER2- Human Epidermal Growth Factor Receptor-2
AKT- Protein Kinase B	HIF- Hypoxia Inducible Factor
ARN- Ácido Ribonucleico	HRE- Hypoxia Response Elements
ANG- Angiopietin	HSP27- Heat Shock protein 27
APC- Antigen presenting cell	HSP90- Heat Shock Protein 90
BAT3- HLA-B-associated transcript 3	INFβ- Interferon-beta
borano	INFγ- Interferon gamma
BMS- Bristol Myers Squibb	IRF1- Interferon Regulatory factor 1
BRAF- Serine/Threonine-protein Kinase B-Raf	IUPAC- International Union for Pure and Applied Chemistry
BTLA- band T lymphocyte attenuator	JAK- Janus Kinase
c-Kit- Tyrosine-protein kinase Kit	K₂CO₃- Carbonato de potasio
CSC- Cancer Stem Cells	LAG3- Lymphocyte Activation Gene Protein 3
CTL- Cytotoxic T Lymphocytes	LAT- Linker for Activation of T cells
CTLA4- Cytotoxic T-lymphocyte Antigen-4	LCK- Lymphocyte-specific protein tyrosine Kinase
DC- Dendritic Cells	LSEctin- Liver Sinusoidal Endothelial Cell lectin
DMAP- 4-dimetilamoniopiridina	MAPK- Mitogen-Activated Protein Kinase
DMF- Dimetilformamida	MAX- MYC-Associated Protein X
EGF- Epidermal Growth Factor	MDSC- Myeloid-Derived Suppressor Cells
EGFR- Epidermal Growth Factor Receptor	MeCN- Acetonitrilo
ERK- Extracellular-signal Regulated Kinase	MEK- Mitogen-activated protein Kinase Kinase
FAK- Focal Adhesion Kinase	
FDA- Food and Drug Administration	
FGF- Fibroblast Growth Factor	

MHC- Major Histocompatibility Complex

MMP9- Matrix Metallopeptidase 9

MYL9/12- Myosin Light chain 9/12

NF- κ B- Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated Bcells

NK- Natural Killer cells

NOS- Nitric Oxide Synthase

NRP- Neuropilins

OMS- Organización Mundial de la Salud

PD-1- Programmed cell Death-1 protein

PD-L1/2- Programmed cell Death-Ligand 1/2

PDGF- Platelet-Derived Growth Factor

PDGFR- Platelet-Derived Growth Factor Receptor

PI3K- Phosphatidylinositol 3-kinase

PKC- Protein Kinase C

PLGF- Placental Growth Factor

PLC γ - Phospholipase C-gamma

PTEN- Phosphatase and Tensin Homolog

RAF- Rapidly Accelerated Fibrosarcoma

RAS- Rat Sarcoma

RET- Rearranged during Transfection

r.t.- Temperatura ambiente

SMAD- Suppressor of Mothers Against Decapentaplegic

STAT- Signal Transducer and Activator of Transcription

TAA- Tumour associated antigen

TAM- Tumour Associated Macrophages

TCR- T Cell Receptor

TGF β - Tumour Growth Factor beta

TIGIT- T cell Immunoglobulin and Immunoreceptor Tyrosine-based inhibitory motif domain

THF- Tetrahidrofurano

TIM3- T cell Immunoglobulin domain and Mucin domain protein 3

TME- Tumour microenvironment

TNF- Tumour Necrosis Factor

TsCI- Cloruro de 4-toluensulfonilo

TSP-1- Trombospodin-1

VEGF- Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR- Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

VISTA- anti-V-domain Immunoglobulin Suppressor of T cell Activation

ZAP70- Zeta chain of T cell receptor Associated Protein Kinase 70

ABSTRACT

This Doctoral Thesis, entitled "Synthesis and Biological Evaluation of Multitarget Agents with Immunomodulatory, Antiangiogenic and Antivascular Effect", is framed within the field of basic cancer research and its main objective is the search for new molecules with potential anticancer activity.

Solid tumours are no longer understood as isolated masses of mutant cells, these are composed of a dynamic network of tumour and stromal cells and macromolecules that all together form the tumour microenvironment (TME). In the last few years, the role of the immune system in tumour development due to the infiltration of immune cells such as dendritic cells (DCs), NK cells, macrophages and T cells, among others in the TME, has been extensively studied. Thus, due to its involvement as an immune checkpoint, the PD-L1 protein (Programmed Cell Death Ligand-1) has become a very interesting target in the study of new anticancer treatments.

On the other hand, it has been shown that the immune system also leads to the progression of angiogenesis through the overproduction of VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). The interaction of this protein to its receptor VEGFR-2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2), inhibits the activation of T cells through mature DCs, which makes it particularly interesting to find a multitargeted agent capable of inhibiting not only the PD-L1 protein but also the VEGFR-2 receptor. Furthermore, c-Myc is known to play a key role in TME, regulating processes related to tumour progression, such as the overexpression of PD-L1 in the cancer cell membrane. Therefore, inhibition of c-Myc is also of great therapeutic interest.

In this thesis, a family of aryltriazoles with potential dual PD-L1 and c-Myc inhibitory action and a family of diarylureas with potential dual activity against PD-L1 and VEGFR-2 have been designed. And after evaluating the biological activity of both families, the following conclusions can be drawn. In reference to the triazole family, MCF-7 breast cancer cell line showed the greatest sensitivity to the action of this class of compounds, of which three bromo-substituted analogues, containing a dimethoxytrityl group, were the ones that produced the greatest effect on biological targets and therefore resulted in a greater inhibition of tumour progression.

On the other hand, in reference to the family of diarylureas, HT-29 colon adenocarcinoma cell line was the most sensitive to the action of this class of

compounds. This family is divided into two groups according to their linker structure. Of the first group, characterised by an oxamethylene linker, carbamate and *para*-substituted derivatives showed high selectivity index, with carbamate standing out as an antiangiogenic and antivascular agent. From the second group, made up of propyl-linker derivatives, one carbamate and three benzyethylenary ureas are again noteworthy this time for their ability to stop tumour progression by promoting the action of defensive cells by inhibiting the biological targets PD-L1 and VEGFR-2.

RESUMEN

La presente Tesis Doctoral cuyo título es “*Síntesis y Evaluación Biológica de Agentes Multidiana con Efecto Inmunomodulador, Antiangiogénico y Antivascular*”, se encuentra enmarcada en el campo de la investigación básica del cáncer y su principal objetivo es la búsqueda de nuevas moléculas con potencial actividad anticáncer.

Los tumores sólidos ya no se entienden como masas aisladas de células mutantes, sino que están compuestos por una red dinámica de células tumorales y estromales y de macromoléculas que, en conjunto, forman el microambiente tumoral (TME). En los últimos años se ha estudiado ampliamente el papel del sistema inmunitario en la evolución tumoral tras la infiltración en el TME de células inmunitarias tales como células dendríticas (DC), células NK, macrófagos o células T, entre otras. Así, la proteína PD-L1 (Ligando de Muerte celular Programada-1) se ha convertido en una diana muy interesante en el estudio de nuevos tratamientos anticancerígenos por su implicación como punto de control inmunológico.

Por otra parte, se ha demostrado que el sistema inmune también conduce a la progresión de la angiogénesis mediante la sobreproducción de VEGF (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular). La unión de esta proteína a su receptor VEGFR-2 (Receptor del Factor de Crecimiento Endotelial Vascular-2), inhibe la activación de las células T a través de las DC maduras, lo que hace especialmente interesante encontrar un agente multidiana capaz de inhibir, no sólo a la proteína PD-L1, sino también al receptor VEGFR-2. Además, se sabe que c-Myc es una proteína que juega un papel clave en el TME donde regula procesos relacionados con la progresión tumoral, como

la sobreexpresión de PD-L1 en la membrana de las células cancerosas. Por ello, la inhibición de c-Myc también es de gran interés terapéutico.

En esta Tesis se ha diseñado una familia de ariltriazoles con potencial acción inhibidora dual de PD-L1 y c-Myc, y una familia de diarilureas con potencial actividad dual frente a PD-L1 y VEGFR-2. Tras evaluar la actividad biológica de ambas familias se puede concluir lo siguiente. En referencia a la familia de triazoles, la línea celular de cáncer de mama MCF-7, fue la que mostró mayor sensibilidad a la acción de esta clase de compuestos, de los cuales cabe destacar a tres análogos bromo sustituidos, conteniendo un grupo dimetoxitritilo, como los que producían un mayor efecto sobre las dianas biológicas y por tanto daban lugar a una mayor inhibición de la progresión tumoral.

Por otro lado, en referencia a la familia de diarilureas, la línea celular de adenocarcinoma de colon HT-29 fue la más sensible a la acción de esta clase de compuestos. Esta familia, se encuentra dividida en dos grupos según la estructura puente que presentan. Así, del primero de ellos, caracterizados por presentar un puente oxametileno, cabe destacar al carbamato y los derivados *para* sustituidos, que mostraron elevados índices de selectividad, despuntando el carbamato como agente antiangiogénico y antivascular. Del segundo grupo, constituido por los derivados con puente propilo, cabe destacar de nuevo a un carbamato y a tres benzietilenaril ureas por ser capaces de detener la progresión tumoral, promoviendo la acción de las células defensivas mediante la inhibición de las dianas biológicas PD-L1 y VEGFR-2.

RESUM

La present Tesi Doctoral el títol de la qual és, “Síntesi i Avaluació Biològica d'Agents multidiana amb efecte Immunomodulador, Antiangiogènica i Antivascular”, es troba emmarcada en el camp de la investigació bàsica del càncer i el seu principal objectiu és la cerca de noves molècules amb potencial activitat anticancerígena.

Els tumors sòlids ja no s'entenen com a masses aïllades de cèl·lules mutants, sinó que estan compostos per una xarxa dinàmica de cèl·lules tumorals i estromals i de macromolècules que, en conjunt, formen el microambient tumoral (TME). En els últims anys s'ha estudiat àmpliament el

paper del sistema immunitari en la progressió tumoral derivada de la infiltració al TME de cèl·lules immunitàries com ara cèl·lules dendrítiques (DC), cèl·lules NK, macròfags o cèl·lules T, entre altres. Així, la proteïna PD-L1 (Lligand de mort cel·lular Programada-1) s'ha convertit en una diana molt interessant en l'estudi de nous tractaments anticancerígens per la seua implicació com a punt de control immunològic.

D'altra banda, s'ha demostrat que el sistema immune també condueix a la progressió de la angiogènesis mitjançant la sobreproducció de VEGF (Factor de Creixement Endotelial Vascular). La unió d'aquesta proteïna al seu receptor VEGFR-2 (Receptor del Factor de Creixement Endotelial Vascular-2), inhibeix l'activació de les cèl·lules T a través de les DC madures, la qual cosa fa especialment interessant trobar un agent multidiana capaç d'inhibir, no sols a la proteïna PD-L1, sinó també al receptor VEGFR-2. A més, se sap que c-Myc és una proteïna que juga un paper clau en el TME on regula processos relacionats amb la progressió tumoral, com la sobreexpressió de PD-L1 en la membrana de les cèl·lules canceroses. Per això, la inhibició de c-Myc també és de gran interès terapèutic.

En aquesta Tesi s'ha dissenyat una família de ariltriazols amb potencial acció inhibidora dual de PD-L1 i c-Myc, i una família de diarilurees amb potencial activitat dual front a PD-L1 i VEGFR-2. Després d'avaluar l'activitat biològica de ambdues famílies es pot concloure el següent. En referència a la família de triazols, la línia cel·lular de càncer de mama MCF-7, va ser la que va mostrar major sensibilitat a l'acció d'aquesta classe de compostos, dels quals cal destacar a tres anàlegs brom substituïts, contenint un grup dimetoxitritil, com els que produïen un major efecte sobre les dianes biològiques i per tant donaven lloc a una major inhibició de la progressió tumoral.

D'altra banda, en referència a la família de diarilurees, la línia cel·lular d'adenocarcinoma de còlon HT-29 va ser la més sensible a l'acció d'aquesta classe de compostos. Aquesta família, es troba dividida en dos grups segons l'estructura pont que presenten. Així, del primer d'ells, caracteritzats per presentar un pont oxametil, cal destacar el carbamat i els derivats *para* substituïts, que van mostrar elevats índexs de selectivitat, despuntant el carbamat com a agent antiangiogènec i antivascolar. Del segon grup, constituït pels derivats amb pont propil, cal destacar de nou al carbamat corresponent i a tres benzietilenaril urees per ser capaces de detindre la

progressió tumoral, promovent l'acció de les cèl·lules defensives mitjançant la inhibició de les dianes biològiques PD-L1 i VEGFR-2.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Cáncer	1
1.2. Angiogénesis	6
1.2.1. Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF)	9
1.2.2. MYC como regulador endógeno de VEGF/VEGFR-2	13
1.2.3. Agentes antiangiogénicos	15
1.3. Oncoinmunología	19
1.3.1. Ciclo de inmunidad del cáncer	21
1.3.2. TME inmunodeprimido	26
1.3.3. Mecanismo de acción PD-1/PD-L1	31
1.3.4. Reguladores endógenos de PD-L1	33
1.3.5. VEGF/VEGFR-2 como regulador inmune en el TME	35
1.3.6. Agentes Inmunomoduladores	36
1.4. Química Médica	39
2. OBJETIVOS	45
3. DERIVADOS DE TRIAZOL	47
3.1. Diseño de los derivados de triazol	47
3.2. Síntesis de los derivados de triazol	49
4. EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LOS DERIVADOS DE TRIAZOL	55
4.1. Introducción a los estudios biológicos	55
4.1.1. Estudio de viabilidad celular	57
4.1.2. Interacción directa con las dianas biológicas	60
4.1.3. Efecto sobre las dianas biológicas	61
4.2. Evaluación biológica–Familia de Triazoles	70
4.2.1. Ensayo de viabilidad celular	70
4.2.2. Efecto sobre las dianas c-Myc y PD-L1	70
4.2.3. Estudio del efecto sobre las dianas biológicas c-Myc y PD-L1 ...	72
4.2.4. Ensayo de viabilidad celular en co-cultivo	75
4.2.5. Ensayo viabilidad celular en co-cultivo	79
4.2.6. Estudio de citoquinas secretadas en el medio	81
4.3. Evaluación biológica de los derivados–Estancia de Investigación	83
4.3.1. Introducción a los estudios biológicos	83
4.3.2. Viabilidad celular y acción sobre PD-L1	87
4.3.3. Estudio sobre las células T OT-1	89
4.4. Conclusiones	91
5. DERIVADOS DE DIARILUREA	95
5.1. Diseño de los derivados de diarilurea	95
5.2. Síntesis de diarilureas con puente oxametileno	96
5.3. Síntesis de ureas con puente propilo	97

6. EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LOS DERIVADOS DE DIARILUREA	101
6.1. Introducción a los estudios biológicos	101
6.1.1. Estudio de capacidad antiangiogénica	101
6.2. Evaluación biológica de la familia de diarilureas con puente oxametileno	102
6.2.1. Ensayo de viabilidad celular	103
6.2.2. Efecto sobre las dianas PD-L1 y VEGFR-2	104
6.2.3. Efecto sobre la formación de microtúbulos en las células endoteliales	107
6.2.4. Ensayo de viabilidad celular en co-cultivo	109
6.2.5. Evaluación biológica de los derivados–Estancia de Investigación	112
6.3. Evaluación biológica de la familia de diarilureas con puente propilo	118
6.3.1. Ensayo de viabilidad celular	118
6.3.2. Efecto sobre las dianas PD-L1 y VEGFR-2	120
6.3.3. Efecto sobre la formación de microtúbulos en las células endoteliales	122
6.3.4. Ensayo de viabilidad celular en co-cultivo	125
6.4. Conclusiones	130
7. CONCLUSIONES GENERALES	133
8. SUMMARY OF THE THESIS.....	137
8.1. Introduction.....	137
8.1.1. Cancer	137
8.1.2. Angiogenesis.....	137
8.1.3. Oncoimmunology	140
8.1.4. Medicinal Chemistry	146
8.2. Objectives	147
8.3. Triazole-scaffold derivatives	148
8.3.1. Design of Triazole derivatives.....	148
8.3.2. Synthesis	148
8.3.3. Biological evaluation	150
8.3.4. Discussion	155
8.4. Diarylurea derivatives	157
8.4.1. Design of diarylurea derivatives	157
8.4.2. Synthesis	157
8.4.3. Biological Evaluation.....	159
8.4.4. Discussion	169
8.5. General Conclusions.....	171
9. EXPERIMENTAL PROCEDURE	175
9.1. Chemistry Part.....	175
9.1.1. General Techniques	175
9.1.2. Experimental procedure for the synthesis of Triazole derivatives	175
9.1.2.5. Synthesis of the Non-commercially Available Alkynes, T.21-T.26	178
9.1.3. Experimental procedure for the synthesis of BenzylethoxyAryl-Ureas derivatives	188
9.1.4. Experimental procedure for the synthesis of BenzylethyleneAryl-Ureas derivatives	197
9.2. Biological evaluation.....	208

9.2.3.	Target proteins relative quantification by Flow Cytometry	209
9.2.5.	Proteins expression determination by RT-qPCR Assay	209
9.2.6.	Fluorescence Microscopy	210
9.2.7.	Cell viability evaluation in monoculture and in co-cultures by Flow Cytometry.....	210
9.2.8.	Protein Targets relative quantification by Flow Cytometry in co-cultures	211
9.2.10.	Microvessels formation inhibition and destruction assay	212
9.2.11.	Generation of CTLs cells from OT-1 mice	212
9.2.12.	Ex-vivo study of CTLs exhaustion receptors by Flow Cytometry	212
9.2.13.	Effect on proteins implicated in TCR signalling pathway by Immunoblotting.....	213
10.	<i>PRODUCTIONS DERIVED FROM DOCTORAL THESIS ..</i>	215
11.	<i>SELECTED SPECTRA</i>	217

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cáncer

Según los datos recogidos año tras año, el cáncer es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial (véase la Figura 1.1). Sólo en España se estima que en 2023 el número de casos de cáncer diagnosticados alcanzará los 279.260 casos. Este número ha ido en aumento durante las últimas décadas debido a diferentes factores, entre ellos el aumento poblacional y su envejecimiento, la exposición a factores de riesgo, como el alcohol o el tabaquismo y, en algunos tipos de cáncer, el aumento de la detección precoz.¹

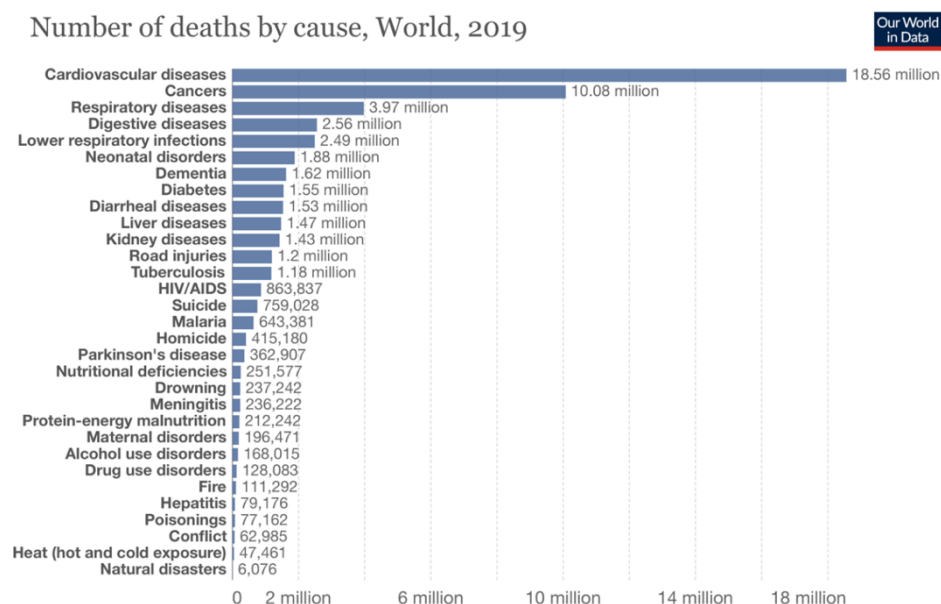


Figura 1.1. Causas de mortalidad a nivel mundial (Año 2019).²

A pesar de lo anteriormente comentado, la supervivencia de los pacientes en España se ha duplicado en los últimos 40 años y se prevé que continúe aumentando lentamente en los próximos años. Esta tendencia se puede achacar a la inversión en investigación impulsada por organizaciones como la **Asociación Española Contra el Cáncer (AECC)**. Esta es una asociación sin ánimo de lucro cuyos principales cometidos se centran en informar y concienciar, mediante charlas y campañas informativas, a la población para que sea consciente de los factores de riesgo asociados al cáncer y que, en consecuencia, asuma la adopción de hábitos de vida saludables. La AECC

¹ Las cifras del cáncer en España 2023; *Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM); 2023*, ISBN: 978-84-09-48173-6.

² Ritchie, H.; Spooner, F.; Roser, M. Causes of death, **2018**, Sitio web: OurWorldInData.org. (Consultado en enero de 2023)

también acompaña, mediante la asistencia y apoyo con voluntarios y psicólogos, a los pacientes oncológicos y a los familiares que lo necesiten. Por otro lado, también hay que señalar que la fundación científica de la AECC se encarga de promover la investigación enfocada en profundizar en las causas y en el comportamiento del cáncer, así como en la aplicación de mejoras en la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de los pacientes oncológicos. La AECC también promueve la difusión a la sociedad en general de estas mejoras, todo ello invirtiendo en proyectos y personal investigador.

Los últimos datos sobre los tipos de cáncer más diagnosticados a nivel mundial corresponden al año 2020. Según se puede ver en la Figura 1.2, los cánceres con mayor incidencia son los de mama, pulmón, colorrectal y próstata. Una incidencia similar se observa también en España pues los tipos de cáncer más diagnosticados en 2023, al igual que en 2022, han sido el de próstata, colorrectal, pulmón y vejiga urinaria para hombres y cáncer de mama y colorrectal para mujeres.¹

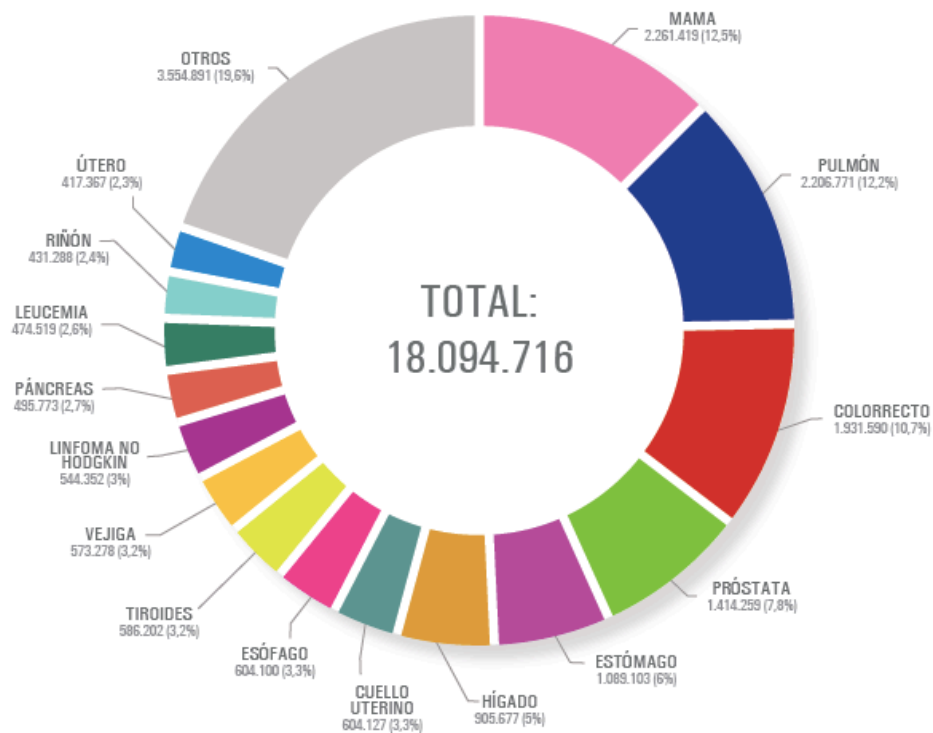


Figura 1.2. Tumores más frecuentes diagnosticados a nivel mundial (Año 2020)³

³ Las cifras del cáncer en España; *Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM)*; **2022**. ISBN: 978-84-09-380929-9.

Según la Organización Mundial de la salud (OMS) el cáncer es el término utilizado para denominar a las enfermedades originadas por el crecimiento descontrolado de células anormales o mutantes que, además, son capaces de invadir órganos o tejidos diferentes de aquellos en los que se originaron.⁴ La mayoría de los tipos de cáncer se caracterizan por formar tumores sólidos, que son masas de tejido sin ninguna función fisiológica. Entre los pocos tipos de cáncer que no forman tumores sólidos encontramos las leucemias, que son enfermedades malignas de la médula ósea caracterizadas por la proliferación excesiva de leucocitos (glóbulos blancos) en la sangre y en la médula ósea.

Existen dos teorías para explicar el origen del cáncer y la formación tumoral. Estas son el modelo de evolución clonal y el modelo de células madre cancerosas (véase la Figura 1.3).⁵

En ambos modelos el proceso comienza con una serie de mutaciones en el ADN de las células. Dichas mutaciones promueven el rápido crecimiento celular y, de forma paralela, alteran los mecanismos de reparación del ADN mutado. El bloqueo en la reparación del ADN origina una creciente población de células mutadas, las cuales contienen una serie de características adquiridas comunes que son transmitidas a las siguientes generaciones.

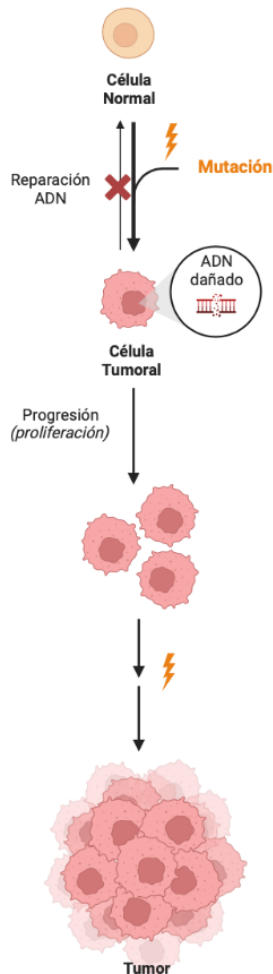
La diferencia entre ambos modelos, por tanto, reside en el tipo de célula que da inicio y continuidad al proceso de carcinogénesis. En el caso del modelo de evolución clonal, todas las células presentes en el tumor contribuyen al mantenimiento del mismo. En este modelo se sigue una evolución darwiniana, ya que son aquellas células que se han vuelto más agresivas, debido a diferentes mutaciones, las que contribuyen a la progresión del tumor, volviéndose, además, más invasivas, lo que favorece el proceso de metástasis y el desarrollo de resistencia a las terapias. Por otro lado, el modelo de células madre cancerosas (CSC) sostiene que son estas células CSC, también conocidas como “Células iniciadoras del tumor”; las encargadas de iniciar y dar continuidad al tumor, aun siendo un grupo minoritario de células dentro de éste. Se cree que las CSC surgen de la transformación mutativa de las células madre normales, ya que ambas presentan ciertas características similares, tales como la auto-renovación, la

⁴ Sitio Web oficial de la Organización Mundial de la Salud: https://www.who.int/es/health-topics/cancer#tab=tab_1 (Consultado en enero 2023)

⁵ Dawood, S.; Austin, L.; Cristofanilli, M. Cancer stem cells: implications for cancer therapy, *Oncology (Williston Park)*. 2014, 28, 1101-1110. PMID: 25510809.

auto-replicación indefinida o la división asimétrica. La gran diferencia entre ellas es que las células madre normales tienen todas sus funciones bajo control mientras que las CSC se dividen y diferencian de forma descontrolada, promoviendo de esta forma el crecimiento del tumor.^{6,7} En este modelo, son las CSC las encargadas de promover la metástasis y desarrollar resistencia a las terapias.

Modelo de Evolución Clonal



Modelo de Células Madre Cancerosas

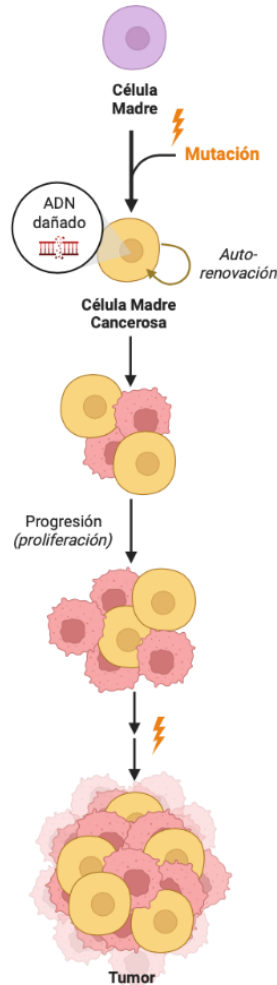


Figura 1.3. Teorías de formación tumoral.⁸

Se han clasificado más de 200 tipos de cánceres diferentes, dependiendo del tejido dónde se ha originado la enfermedad, siendo necesario, según el tipo de cáncer aplicar un tratamiento diferente debido a sus características

⁶ Jiang, W.; Peng, J.; Zhang, Y.; Cho, W.C.S.; Jin, K. The Implications of Cancer Stem Cells for Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, *13*, 16636-16657. Doi: 10.3390/ijms131216636.

⁷ Gabriel, J. A. The biology of cancer (2nd ed.) *John Wiley & Sons*. **2007**, ISBN: 978-0-470-05759-9.

⁸ Creado con BioRender.com

específicas. A pesar de ello, todas las células tumorales presentan una serie de características comunes conocidas como las señas de identidad del cáncer.⁹ Actualmente, se conocen catorce señas de identidad del cáncer (véase la Figura 1.4). Las primeras seis señas de identidad fueron descritas por D. Hanahan y R. A. Weinberg en el año 2000. Estas eran: la señalización proliferativa sostenida, la evasión de los supresores de crecimiento, la resistencia a la muerte celular, la adquisición de inmortalidad replicativa, la inducción de la angiogénesis y la activación de la invasión y la metástasis.¹⁰ Una década más tarde estos dos autores añadieron cuatro nuevas características a las seis iniciales, al demostrarse que los tumores no eran masas de tejido aisladas, sino que eran capaces de interactuar con otros tipos de células creando un microambiente tumoral (TME). Estas cuatro nuevas características eran la desregulación energética celular, la evasión del sistema inmune, la mutación e inestabilidad genómica y la inflamación promovida por el tumor.¹¹ Recientemente, se han añadido a la lista la reprogramación epigenética no-mutativa, el desbloqueo de la plasticidad fenotípica, las células senescentes y la alteración de los microbiomas polimórficos.^{12,13}

El reconocimiento de estas señas de identidad del cáncer permite desarrollar tratamientos específicos dirigidos a aquellos mecanismos que se han visto alterados durante el proceso de formación de las células malignas.

⁹ Pecorino, L. *Molecular Biology of Cancer* (5th ed.) Oxford. **2021**, ISBN:978-0-19-883302-4.

¹⁰ Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer. *Cell*. **2000**, 100, 57-70. Doi: 10.1016/s0092-8674(00)81683-9.

¹¹ Hanahan, D.; Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. **2011**, 144, 646-674. Doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

¹² Segna, S. S.; Grose, R. P. Hallmarks of cancer-the New Testament. *Open Biol*. **2021**, 11, 200358. Doi: 10.1098/rsob.200358.

¹³ Hanahan, D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer discov*. **2022**, 12, 31-46. Doi: 10.1158/2159-8290.

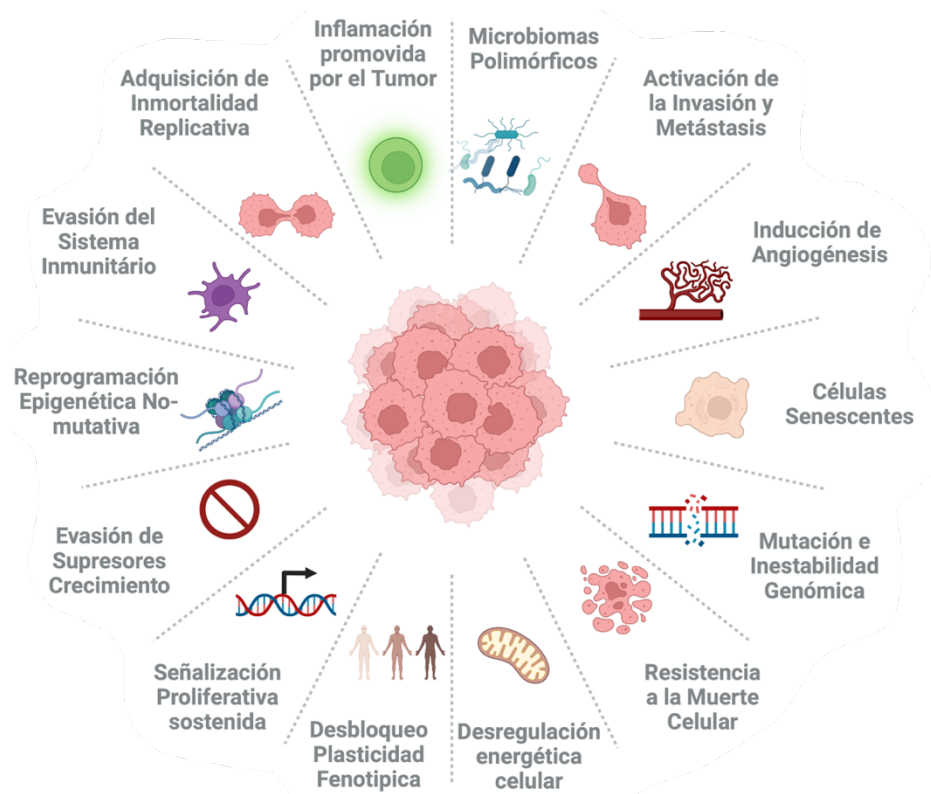


Figura 1.4. Gráfico recopilatorio de las señas de identidad del cáncer.⁸

En los últimos años se está comenzando a estudiar el cáncer a nivel sistémico entendiendo el cáncer como una enfermedad multidimensional con interacciones localizadas a nivel celular, tisular y orgánico. Esto ha dado lugar a seis nuevas señas de identidad del cáncer a nivel sistémico como resultado de la interacción entre el cáncer y el organismo a nivel macroscópico. Estas nuevas señas de identidad son: el sistema canceroso, el cual hace referencia a la relación existente entre el tumor primario la médula ósea y la metástasis lejana, la inflamación global, la inhibición inmunitaria, los cambios metabólicos globales, la predisposición a la trombosis y los cambios neuro-endocrinos.¹⁴

1.2. Angiogénesis

Una de las señas de identidad más estudiadas del cáncer es la angiogénesis tumoral,^{10, 11} proceso mediante el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes. Con la angiogénesis tumoral las células cancerosas obtienen el oxígeno y los nutrientes que necesitan para

¹⁴ Paul, D. The systemic hallmarks of cancer. *J. Cancer Metastasis Treat.* **2020**, 6, 29. Doi: 10.20517/2394-4722.2020.63.

su crecimiento.¹⁵ J. Folkman, considerado el padre de la angiogénesis, postuló, ya en 1971, que este es un mecanismo vital para la carcinogénesis y la progresión del tumor.⁹ La red de vasos sanguíneos resultado de la angiogénesis tumoral muestra una estructura caótica y desorganizada como consecuencia de su rápida formación. Además, las células endoteliales que forman estos nuevos vasos no se encuentran debidamente adheridas, lo que aumenta la permeabilidad y la porosidad de los vasos provocando una pobre entrega de oxígeno y nutrientes al tumor.¹⁶

El proceso de angiogénesis también se encuentra activado durante el crecimiento embrionario, el ciclo menstrual femenino o durante la cicatrización de heridas. Sin embargo, en todos estos casos la angiogénesis se encuentra regulada por un balance entre factores pro y antiangiogénicos que determinan la posición de lo que se conoce como el “interruptor angiogénico” (véase la Figura 1.5).¹⁷ Al contrario que en las células normales, en las tumorales la balanza se decanta hacia los factores proangiogénicos, provocando que el “interruptor angiogénico” se encuentre mayormente activado. Entre los factores que favorecen la angiogénesis, sobreexpresados en el tumor, se encuentran el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la angiopoyetina (ANG)¹⁸ y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), mientras que la trombospondina-1 (TSP-1), la angiostatina y el interferón- β (INF- β), que son algunos de los factores que inhiben la angiogénesis, se encuentran usualmente bloqueados en las células tumorales.¹⁰

¹⁵ Lugano, R.; Ramachandran, M.; Dimberg, A. Tumor angiogenesis: causes, consequences, challenges and opportunities. *Cell Mol. Life. Sci.* **2020**, *77*, 1745-1770. Doi: 10.1007/s00018-019-03351-7.

¹⁶ Carmeliet, P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*. **2005**, *69*, 4-10. Doi: 10.1159/000088478.

¹⁷ Fouad, Y. A.; Aanei, C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am. J. Cancer Res.* **2017**, *7*, 1016-1036. ISSN:2156-6976/ajcr0053932.

¹⁸ Fajiani, E.; Christofori, G. Angiopoietins in angiogenesis. *Cancer Lett.* **2013**, *328*, 18-26. Doi: 10.1016/j.canlet.2012.08.018.

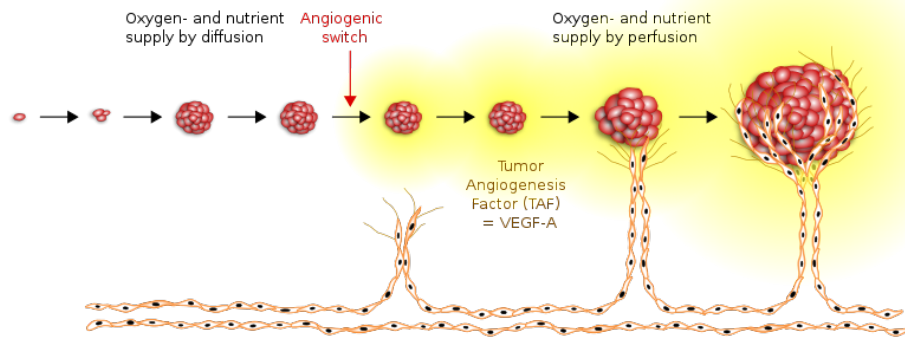


Figura 1.5. “El interruptor angiogénico”.¹⁹

A medida que el tumor va creciendo las células tumorales se van distanciando de los vasos sanguíneos preexistentes, alejándose por tanto del límite de difusión de oxígeno (100-200 μm), lo cual provoca un déficit de oxígeno que, sumado a la falta de nutrientes debido al gran consumo de los mismos por la rápida división y crecimiento celular, llevan a que las células tumorales entren en estado de hipoxia.²⁰ Se considera que la hipoxia es el mayor detonante para la activación del “interruptor angiogénico” en las células tumorales.¹⁷

Cuando las células se encuentran en estado de hipoxia liberan un factor de transcripción conocido como factor inducido por hipoxia (HIF), el cual está formado por dos subunidades HIF- α y HIF- β . La subunidad HIF- α se encuentra en el citoplasma y es dependiente de la concentración de oxígeno. En condiciones de normoxia, en las que la concentración de oxígeno es superior al 20 %, esta subunidad se degrada debido a la acción de la enzima prolil 4-hidroxilasa, mientras que, en condiciones de baja concentración de oxígeno, o hipoxia, esta enzima se encuentra inactivada de forma que HIF- α se ve estabilizada y es capaz de translocarse al núcleo dónde, al encontrarse con la subunidad HIF- β , dimeriza. La dimerización desencadena la transcripción de su gen diana que desemboca en la inducción de la angiogénesis (véase la Figura 1.6). El dímero HIF transcribe aquellos genes que contienen el fragmento de respuesta a la hipoxia (HRE) cuya secuencia es 5'-RCGTG-3'.⁹ Este fragmento se encuentra al inicio de

¹⁹ Wikimedia Commons, the free media repository. File: Tumor_angiogenesis.svg. (Consultado en febrero de 2023).

²⁰ Vito, A.; El-Sayes, N.; Mossman, K. Hypoxia-Driven Immune Escape in the Tumor Microenvironment. *Cells*. **2020**, 16, 9, 992. Doi: 10.3390/cells9040992.

la secuencia de aquellos genes pro-angiogénicos como VEGF, óxido nítrico sintasa (NOS), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o ANG.²¹

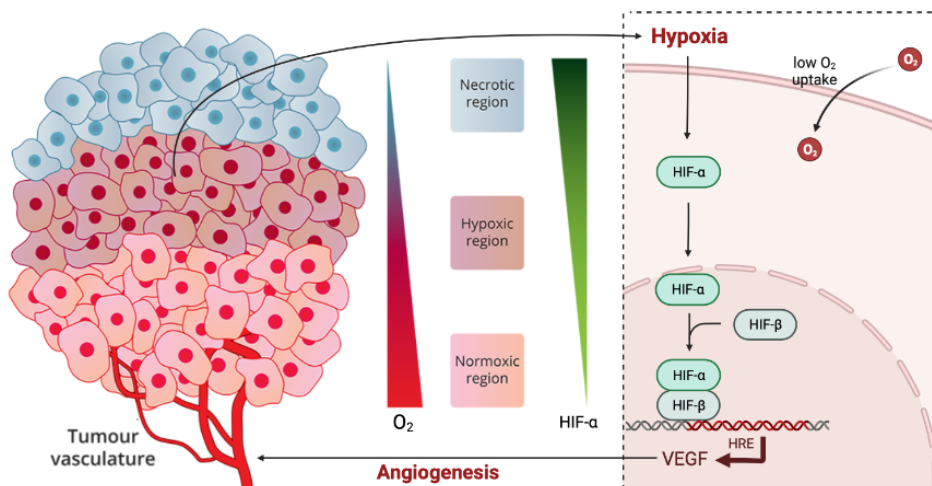


Figura 1.6. Cascada de señalización del factor inducido por hipoxia (HIF).²²

1.2.1. Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF)

Entre los factores que favorecen el crecimiento de los vasos sanguíneos, el VEGF se considera clave para iniciar la angiogénesis, mientras que otros, como ANG, son claves para la posterior maduración de los vasos.

El VEGF pertenece a una familia de factores de crecimiento vascular compuesta por cinco ligandos relacionados estructuralmente: VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD y PLGF (factor de crecimiento placentario). Estos factores se unen a sus correspondientes receptores de tipo tirosina-quinasa (VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3), además de a diferentes correceptores, como las neuropilinas (NRP1 y NRP2), cuya misión es la de estabilizar el complejo VEGF/VEGFR.²³

Las pequeñas diferencias moleculares, y el modo en el que interactúan con su receptor, hacen que cada ligando VEGF desencadene diferentes respuestas biológicas. En concreto, el VEGFA, VEGF de ahora en adelante, es el ligando clave en el proceso de la angiogénesis (véase la Figura 1.7).²³ Este es un homodímero unido por puentes disulfuro que, según los diferentes patrones de corte y unión en el proceso de transcripción del gen,

²¹ Carmeliet, P.; Jain, R. K.; Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. **2000**, 407, 249-257. Doi: 10.1038/35025220.

²² Disponible en web: oblatoinc.com/our-science/ (Descargada en febrero 2023) y modificada con BioRender.com.

²³ Rapisarda, A.; Melillo, G. Role of the VEGF/VEGFR axis in cancer biology and therapy. *Adv. Cancer Res.* **2012**, 114, 237-267. Doi: 10.1016/B978-0-12-386503-8.00006-5.

dan lugar a diversas isoformas que varían en el número de aminoácidos y en la forma en la que interactúan con el receptor. Las isoformas de VEGF conocidas son VEGF-111, VEGF-121, VEGF-145, VEGF-148, VEGF-165, VEGF-183, VEGF-189 y VEGF-206. La isoforma mayoritaria es VEGF-165 que, al igual que el resto de isoformas, se encuentra involucrada en la angiogénesis pero, además, está implicada en la permeabilidad, la supervivencia y la migración celular.^{16, 23}

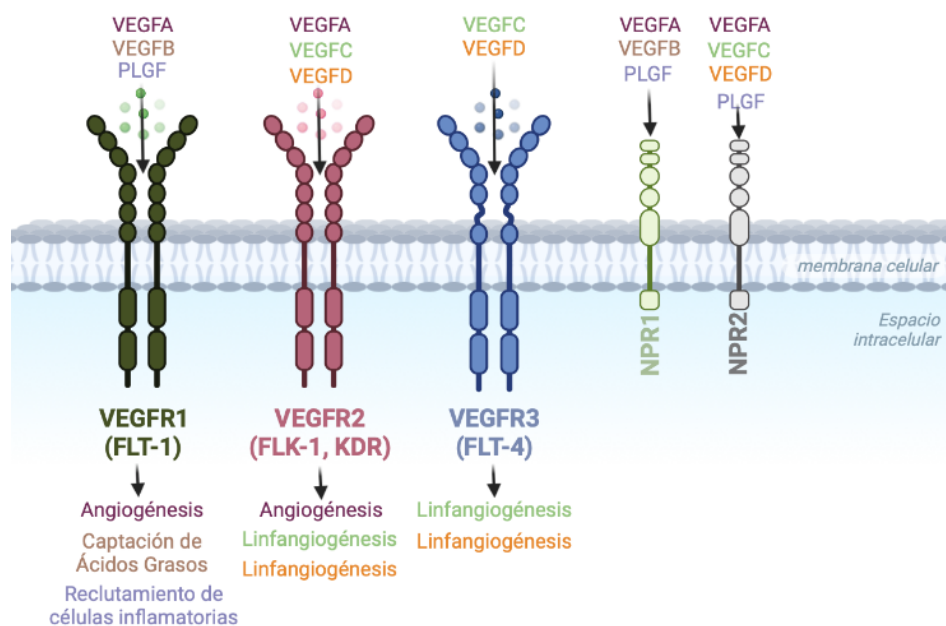


Figura 1.7. Implicaciones biológicas de la familia VEGF.^{8, 23}

Se ha visto que VEGF desempeña diferentes funciones dentro del TME y es secretado no solo por células tumorales sino también por células estromales, entre ellas macrófagos, células endoteliales y fibroblastos.²⁴ La expresión de VEGF, por tanto, se encuentra sobreestimulada en la mayoría de los cánceres, lo cual se debe en gran medida al estado de hipoxia (véase la Figura 1.6), aunque también puede ser estimulado por diferentes factores, entre ellos, FGF o el factor de necrosis tumoral (TNF).¹⁶

La señal de VEGF se ve mediada por sus receptores tirosina-quinasa específicos (VEGFR), que se encuentran también expresados en la mayoría de las células cancerosas, a pesar de que se creía que únicamente se expresaban en las células endoteliales. Así, la acción de VEGF puede ser

²⁴ Goel, H. L.; Mercurio, A. M. VEGF targets the tumour cell. *Nat. Rev. Cancer.* **2013**, 13, 871-882. Doi: 10.1038/nrc3627.

paracrina, cuando actúa sobre las células endoteliales, o autocrina, cuando actúa directamente sobre las células cancerosas que lo expresan.^{24, 25}

A pesar de que VEGF presenta mayor afinidad por VEGFR-1, el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular-2 (VEGFR-2) es el principal promotor de la angiogénesis al mediar la acción paracrina de VEGF en las células endoteliales. Esto es así a pesar de que la respuesta estimulada es más débil a la resultante de la interacción VEGF/VEGFR-1, por lo que se cree que VEGFR-1 actúa como secuestrador de VEGF para, de este modo, modular la cantidad de VEGF libre que puede unirse a VEGFR-2.

La fosforilación del receptor tirosina-quinasa producida en la unión VEGF/VEGFR-2 activa diversas cascadas de señalización (véase la Figura 1.8), las cuales conducen a la proliferación (ruta PLC γ /PKC/MAPK), la permeabilidad (ruta p38MAPK), la migración (ruta FAK y p38MAPK) y la supervivencia celular (ruta PI3K/AKT).²⁶

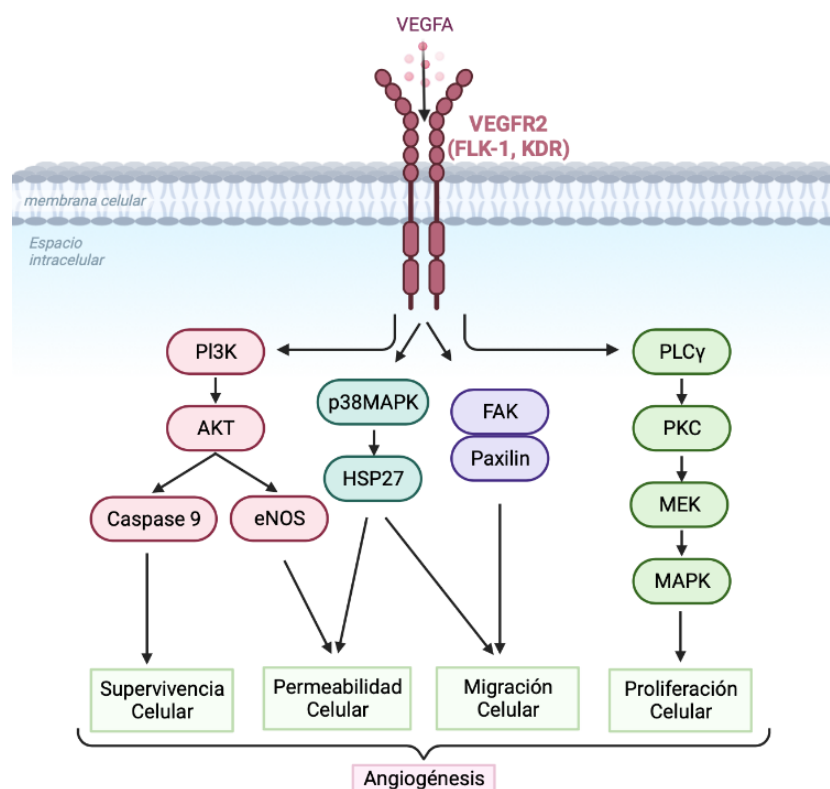


Figura 1.8. Señalización desencadenada en la interacción VEGF/VEGFR-2.^{8, 26}

²⁵ Weigand, M.; Hantel, P.; Kreienberg, R.; Waltenberger, J. Autocrine vascular endothelial growth factor signalling in breast cancer. Evidence from cell lines and primary breast cancer cultures in vitro. *Angiogenesis*. **2005**, *8*, 197-204. Doi: 10.1007/s10456-005-9010-0.

²⁶ Olsson, A. K.; Dimberg, A.; Kreuger, J.; Claesson-Welsh, L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2006**, *7*, 359-371. Doi: 10.1038/nrm1911.

VEGF es un factor de crecimiento implicado en multitud de respuestas patofisiológicas, además de las ya comentadas. Así, VEGF es capaz de inducir la acción de las integrinas presentes en las células endoteliales. Las integrinas son proteínas transmembrana involucradas en la comunicación entre las células presentes en el TME y se encargan del ensamblaje de los componentes de la matriz extracelular. VEGF también promueve la adhesión de las células que formarán los nuevos vasos sanguíneos.²⁷

Por otra parte, VEGF juega un papel clave en el TME al favorecer la progresión del tumor, lo cual ha llevado a estudiar más detenidamente la acción autocrina de este ligando. Como ya se ha comentado anteriormente, el hecho de que VEGF actúe de forma autocrina implica la expresión por parte de las células cancerosas de sus receptores específicos.

Se ha visto que la mayoría de las células cancerosas expresan VEGFR-2 en su membrana. Sin embargo, y a pesar de que este receptor es el principal mediador de la respuesta paracrina de VEGF, se cree que la señal autocrina de este factor de crecimiento es mediada por otros receptores diferentes de VEGFR-2. Es aquí donde juegan un papel muy importante las neuropilinas (NRP1 y NRP2). Estas se encuentran desprovistas de una cascada de señalización intrínseca, por lo que actúan como co-receptores de muchos receptores que juegan un papel crucial en el desarrollo del tumor. Además de estabilizar el complejo VEGF/VEGFR-2, las neuropilinas son capaces de asociarse a algunas integrinas específicas, favoreciendo la migración celular al causar cambios en el citoesqueleto y promover el desprendimiento de las células de su matriz extracelular.²⁸

La acción autocrina de VEGF sobre sus receptores específicos promueve el crecimiento, la supervivencia y la migración e invasión de las células cancerosas. A modo de ejemplo, VEGFR-1 media la señal autocrina de VEGF mediante la cascada de señalización ERK1/2, promoviendo así la migración y la invasión celular.²⁴ Se ha demostrado, además, que la migración e invasión de las células cancerosas también se ve mediada por

²⁷ Byzova, T.V.; Goldman, C. K.; Pampori, N.; Thomas, K. A.; Bett, A.; Shattil, S. J.; Plow, E. F. A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins. *Mol. Cell.* **2000**, 6, 851-860. Doi: 10.1016/S1097-2765(05)00076-6.

²⁸ Fukasawa, M.; Matsushita, A.; Korc, M. Neuropilin-1 interacts with integrin beta1 and modulates pancreatic cancer cell growth, survival and invasion. *Cancer Biol. Ther.* **2007**, 6, 1173-1180. Doi: 10.4161/cbt.6.8.4363.

la activación de la señalización de las integrinas al activarse la ruta de señalización PI3K/AKT mediada por la interacción VEGF/VEGFR-2.²⁷

También se ha demostrado que VEGF se encuentra implicado en el inicio de la carcinogénesis ya que su señal mediada por VEGFR-2 y NRP1 favorece la supervivencia de CSC, así como su capacidad de auto-renovación.²⁹

En los últimos años se está estudiando una posible acción intracrina de VEGF, en la que la señal de este ligando sería mediada por sus receptores sin ser previamente secretados, lo que implicaría que dichos receptores estarían también internalizados en la célula. Los mecanismos moleculares de esta acción intracrina están todavía por estudiar, pero se ha visto que la acción intracrina de VEGF está involucrada en el crecimiento y la supervivencia celular.³⁰

1.2.2. MYC como regulador endógeno de VEGF/VEGFR-2

De entre los agentes que promueven la sobreexpresión de factores pro-angiogénicos, cabe destacar a Myc, el cual es considerado el principal regulador del TME.

La familia de pro-oncogenes *Myc* está compuesta por tres genes parálogos *c-Myc*, *N-Myc* y *L-Myc* que codifican los factores de transcripción *c-Myc*, *Mycn* y *Mycl*, respectivamente. Estos factores promueven la expresión de una gran cantidad de genes involucrados en el crecimiento celular, el ciclo celular, la diferenciación, la apoptosis, la angiogénesis, el metabolismo, la reparación del ADN, la traducción de proteínas y la respuesta inmunológica en el tumor.³¹ En células no aberrantes del tejido adulto únicamente se expresa *c-Myc*, el cual está involucrado en la regulación de la proliferación celular al ser clave en la transición de fases del ciclo celular. Por el contrario, las células cancerosas sobreexpresan los tres miembros de la familia de oncogenes *Myc*.³²

²⁹ Mercurio, A.M. VEGF/Neuropilin Signaling in Cancer Stem Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 490. Doi: 10.3390/ijms20030490.

³⁰ Wiszniak, S.; Schwarz, Q. Exploring the Intracrine Functions of VEGF-A. *Biomolecules.* **2021**, *19*, 11, 128. Doi: 10.3390/biom11010128.

³¹ Duffy, M. J.; O'Grady, S.; Tang, M.; Crown, J. MYC as a target for cancer treatment. *Cancer Treat. Rev.* **2021**, *94*, 102154. Doi: 10.1016/j.ctrv.2021.102154.

³² Ponzilli, R.; Katz, S.; Barsyte-Lovejoy, D.; Penn, L. Z. Cancer therapeutics: targeting the dark side of Myc. *Eur. J. Cancer.* **2005**, *41*, 2485-2501. Doi: 10.1016/j.ejca.2005.08.017.

c-Myc es el miembro más estudiado de esta familia de oncogenes ya que su actividad se encuentra alterada en prácticamente todos los tipos de cáncer. La actividad de este factor de transcripción depende completamente de la dimerización de c-Myc con otro factor conocido como Max. Este dímero se estabiliza por interacciones entre dos residuos cargados presentes en c-Myc, lo que favorece la formación del heterodímero antes que el homodímero Max-Max y, a su vez, justifica que no se pueda formar el homodímero Myc-Myc.³² El heterodímero Myc-Max se une al ADN al reconocer la secuencia 5'-CACGTG-3', conocida como Caja E, y da lugar a la transcripción de diversos genes involucrados en la progresión y la supervivencia de las células tumorales.³³

Entre sus funciones como regulador del TME se ha visto que c-Myc coordina la expresión de diversas citoquinas involucradas en el “interruptor angiogénico”, el cual es vital para activar la angiogénesis (véase la Figura 1.9). Hay estudios que demuestran que c-Myc está directamente relacionado con la activación de este proceso al promover la expresión de VEGF y HIF- α en las células cancerosas y en los macrófagos asociados al tumor (TAM).³⁴

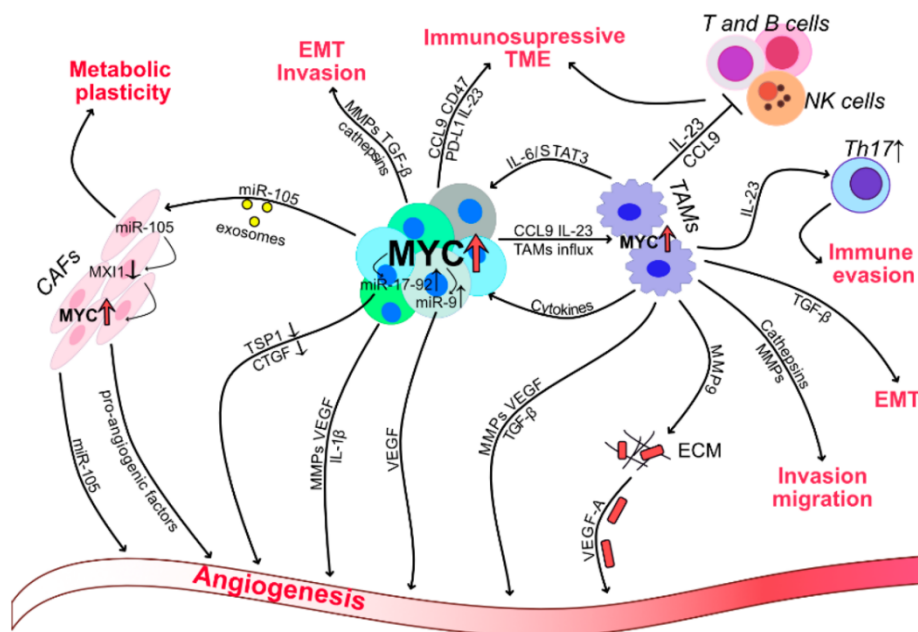


Figura 1.9. c-Myc como principal regulador del Microambiente Tumoral (TME).³⁴

³³ Pelengaris, S.; Khan, M.; Evan, G. c-MYC: more than just a matter of life and death. *Nat. Rev. Cancer* **2002**, *2*, 764-776. Doi: 10.1038/nrc904.

³⁴ Meškytė, E. M.; Keskas, S.; Ciribilli, Y. MYC as a Multifaceted Regulator of Tumor Microenvironment Leading to Metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 7710. Doi: 10.3390/ijms21207710.

c-Myc también regula la matriz metalopeptidasa-9 (MMP9), la cual es secretada por los TAM y se encarga de destruir la matriz extracelular para favorecer el crecimiento de nuevos vasos hacia el tumor.³⁴ Por otro lado, se ha visto que c-Myc también ejerce como inhibidor de citoquinas que actúan como factores antiangiogénicos, como la TSP-1 involucrada en la inhibición de la migración de células endoteliales y la neovascularización. De esta forma, la acción de c-Myc favorece todavía más la activación del crecimiento de nuevos vasos sanguíneos. No obstante, el mecanismo mediante el cual promueve la expresión de dichos factores se encuentra todavía por determinar.³⁵

1.2.3. Agentes antiangiogénicos

Por todo lo mencionado anteriormente, tanto VEGF como sus receptores asociados, especialmente VEGFR-2, han sido estudiados como dianas en multitud de nuevos tratamientos anticáncer, pretendiendo con la inhibición de estas proteínas, bloquear el proceso de angiogénesis tumoral.

Uno de los principales problemas de muchas de las terapias oncológicas es la resistencia que las células cancerosas presentan a los tratamientos. Por ejemplo, muchos tratamientos antiangiogénicos se centran en la interacción VEGF/VEGFR-2, pero el bloqueo de esta ruta de señalización lleva a las células cancerosas a la sobreexpresión de otros factores de crecimiento, como FGF o PDGF y sus receptores, a fin de compensar la inhibición causada por la terapia antiangiogénica y activar este proceso por una vía alternativa.³⁶

Los mecanismos de resistencia también han sido muy estudiados y han ayudado a diseñar nuevas estrategias de acción, las cuales están enfocadas en gran medida a terapias combinadas con el fin de bloquear simultáneamente varias rutas de señalización. A pesar de que este nuevo enfoque está dando muy buenos resultados, actualmente también se están explorando nuevas estrategias antiangiogénicas, entre ellas explorar la

³⁵ Baudino, T.A.; McKay, C.; Penderville-Samain, H.; Nilsson, J. A.; Maclean, K. H.; White, E.L.; Davis, A. C.; Ihle, J. N.; Cleveland, J. L.; c-Myc is essential for vasculogenesis and angiogenesis during development and tumor progression. *Genes Dev.* **2002**, *16*, 2530-2543. Doi: 10.1101/gad.1024602.

³⁶ Vafopoulou, P.; Kourti M. Anti-angiogenic drugs in cancer therapeutics: a review of the latest preclinical and clinical studies of anti-angiogenic agents with anticancer potential. *J. Cancer Metastasis Treat.* **2022**, *8*, 18. Doi: 10.20517/2394-4722.2022.08.

acción del ARN mensajero en la angiogénesis para sacar partido en su acción como mediador de inmunoterapias.³⁶

En los últimos años la FDA (Food and Drug Administration) ha aprobado hasta 10 fármacos antiangiogénicos, basados en moléculas pequeñas, que son en su mayoría inhibidores de receptores tirosina-quinasa. Estos son sorafenib (2005), sunitinib (2006), pazopanib (2009), axitinib (2012), regorafenib (2012), apatinib (2014), lenvatinib (2015), cabozatinib (2016), tivozanib (2017) y fruquitinib (2018).³⁷ Las estructuras de algunos de estos fármacos, de entre los que cabe destacar el sorafenib, se pueden ver en la Figura 1.10.

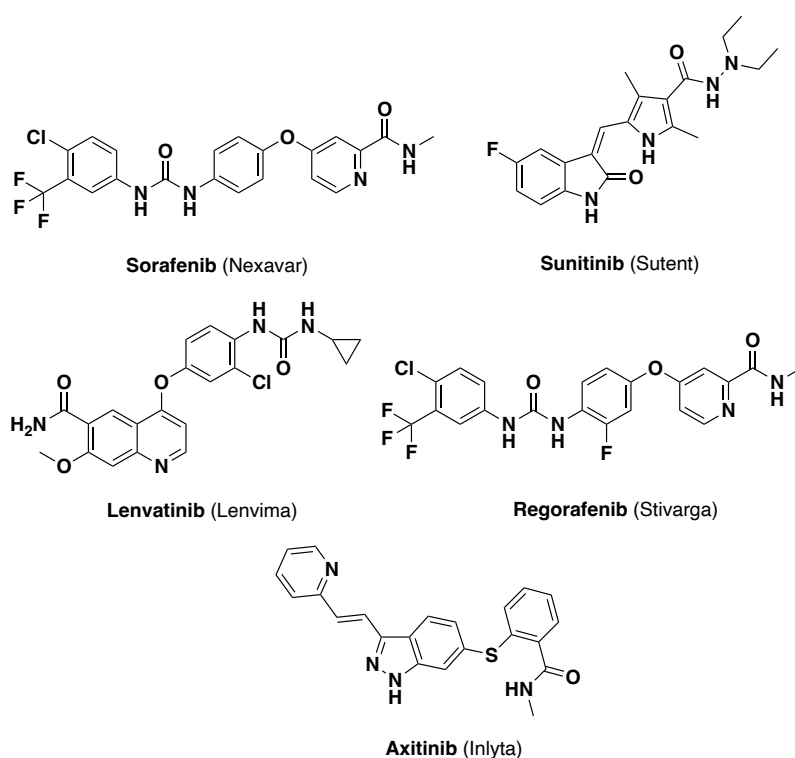


Figura 1.10. Estructuras de fármacos antiangiogénicos aprobados por la FDA.³⁷

El sorafenib fue aprobado por la FDA el año 2005 para el tratamiento del carcinoma renal primario. Dos años más tarde fue aprobado por la FDA para el tratamiento del carcinoma hepatocelular avanzado y, en 2013, recibió una tercera aprobación para el tratamiento del carcinoma de tiroides diferenciado. Este fue el primer fármaco basado en moléculas pequeñas que recibió la aprobación para estos tres tipos de cáncer como inhibidor antiangiogénico. El sorafenib es un inhibidor multiquinasa ya que es capaz

³⁷ Zhong, L.; Li, Y.; Xiong, L. *et al.* Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. *Sig. Transduct. Target. Ther.* **2021**, *6*, 201. Doi: 10.1038/s41392-021-00572-w.

de inhibir una gran variedad de receptores tirosina-quinasa como VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, c-Kit, FLT3, RET, PDGFR β y RAF. En 2015 la FDA aprobó el lenvatinib para el carcinoma de tiroides diferenciado, y más tarde, en 2018, esta misma agencia le concedió la aprobación para el carcinoma hepatocelular avanzado, convirtiéndose, junto al sorafenib, en los dos únicos fármacos de primera línea para esta indicación.³⁷

Un fluoroderivado del sorafenib, el regorafenib (véase su estructura en la Figura 1.10) fue aprobado en 2012 para el cáncer colorrectal metastizado. Esta indicación, diferente a la del sorafenib, es debida a que la introducción del átomo de flúor en la estructura del regorafenib permite a este fármaco interactuar, además de con VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, c-Kit, RET y PDGFR β , con PDGFR α , FGFR1, FGFR-2 y BRAF.

El sunitinib fue el segundo agente antiangiogénico inhibidor de tirosina-quinasa que fue aprobado por la FDA (año 2006). El sunitinib también es un inhibidor multiquinasa y sus dianas biológicas incluyen, entre otros, el receptor tirosina-quinasa VEGFR-2. Este fármaco recibió la aprobación para el tratamiento del carcinoma renal primario y para el tratamiento del estroma gastrointestinal resistente al imatinib, que fue el primer fármaco inhibidor de quinasa aprobado por la FDA.³⁷

El desarrollo de resistencias por parte del tumor obliga a seguir investigando nuevas terapias oncológicas. En relación a nuevos compuestos antiangiogénicos, que se encuentran actualmente en estudios clínicos, merece ser destacado el brivanib, un profármaco que presenta una gran actividad como inhibidor de VEGFR-2. El brivanib se encuentra en estudios clínicos de fase III en pacientes con carcinoma hepatocelular avanzado y cuyo tratamiento con sorafenib ha fallado.³⁷

Otros agentes antiangiogénicos en estudios preclínicos son el YLL545 y el AT-533, que están siendo estudiados en el tratamiento del cáncer de mama, y el R916562 que está siendo investigado en el tratamiento del cáncer de mama y en el tratamiento del cáncer renal. Las estructuras de estos compuestos se pueden ver en la Figura 1.11.³⁶

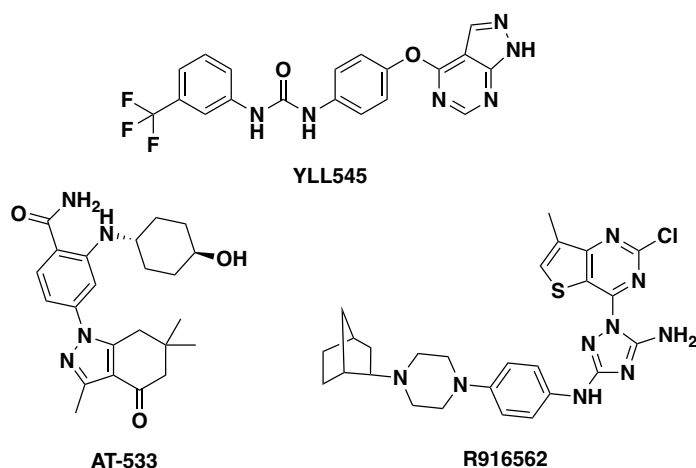


Figura 1.11. Estructura de fármacos antiangiogénicos en estudios preclínicos.^{38, 39, 40.}

YLL545 es un derivado del sorafenib capaz de inhibir el crecimiento celular, la proliferación, la migración y la invasión de las células cancerosas mediante la inhibición de VEGFR-2, mostrando resultados *in vivo* que superan o igualan a los del sorafenib.³⁸ AT-533 es un novedoso inhibidor de Hsp90, que presenta mejores propiedades y actividad que otros inhibidores de esta proteína que se encuentran en estudios clínicos. Hsp 90 es una proteína sobreexpresada en tumores que está muy relacionada con HIF- α , de forma que es posible inhibir la angiogénesis al bloquear esta proteína. Además, se ha visto que AT-533 también es capaz de bloquear VEGFR-2. Así, según estudios preclínicos AT-533 es capaz de inhibir el crecimiento y la angiogénesis del cáncer de mama al bloquear la vía HIF- α /VEGF/VEGFR-2.³⁹ Finalmente, R916562 es un inhibidor dual de VEGFR-2 y AXI, un receptor tirosina-quinasa implicado en la migración celular de las células endoteliales durante la angiogénesis. R916562 ha mostrado una actividad antiangiogénica comparable a la del sunitinib.⁴⁰

En general, la mayoría de los fármacos antiangiogénicos aprobados, así como los que están en estudio, son inhibidores multiquinasa dado que la angiogénesis se encuentra regulada por diversas cascadas de señalización

³⁸ Zhang, J.; Liu, C.; Shi, W.; Yang, L.; Zhang, Q.; Cui, J.; Fang, Y.; Li, Y.; Ren, G.; Yang, S.; Xiang, R. The novel VEGF receptor 2 inhibitor YLL545 inhibits angiogenesis and growth in breast cancer. *Oncotarget*. **2016**, 7, 41067-41080. Doi: 10.18632/oncotarget.9392.

³⁹ Zhang, P. C.; Liu, X.; Li, M. M.; Ma, Y. Y.; Sun, H. T.; Tian, X. Y.; Wang, Y.; Liu, M.; Fu, L. S.; Wang, Y. F.; Chen, H. Y.; Liu, Z. AT-533, a novel Hsp90 inhibitor, inhibits breast cancer growth and HIF-1 α /VEGF/VEGFR-2-mediated angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Biochem. Pharmacol.* **2020**, 172, 113771. Doi: 10.1016/j.bcp.2019.113771.

⁴⁰ Goff, D.; Zhang, J.; Heckrodt, T.; Yu, J.; Ding, P.; Singh, R.; Holland, S.; Li, W.; Irving, M. Discovery of dual Axl/VEGF-R2 inhibitors as potential anti-angiogenic and anti-metastatic drugs for cancer chemotherapy. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, 27, 3766-3771. Doi: 10.1016/j.bmcl.2017.06.071.

interconectadas. No obstante, esta baja selectividad puede dar lugar también a más efectos secundarios, lo que ha llevado en los últimos años a la aplicación de terapias combinadas, como la que resulta de la combinación de agentes antiangiogénicos con agentes para inmunoterapia. Por ejemplo, el axitinib (véase la estructura química en la Figura 1.10), un potente inhibidor selectivo de VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3 aprobado en el año 2012 por la FDA para el tratamiento de cáncer de riñón, fue aprobado en 2019 por la FDA para el tratamiento del cáncer de riñón avanzado en combinación con pembrolizumab, un anticuerpo monoclonal inhibidor de la proteína reguladora del sistema inmunológico PD-1 (Programmed Cell Death-1).^{36,41}

1.3. Oncoinmunología

Conocemos como sistema inmunitario a una compleja red de elementos y procesos biológicos que constituyen una línea de defensa contra agentes patógenos que provocan infecciones o enfermedades. Un individuo sano muestra tres líneas de defensa, siendo la primera de ellas la conocida como barrera natural, constituida por la piel y las mucosas. Si el agente patógeno supera esta primera barrera se desencadena la respuesta inmune, la cual se inicia con la denominada respuesta inmune innata, considerada como la segunda línea de defensa. Los agentes principales que actúan en la respuesta inmune innata son los macrófagos, los neutrófilos, las células dendríticas (DC) y las células NK (natural killer). Si la infección persiste, después de la respuesta inmune innata entra en acción la tercera barrera defensiva denominada respuesta inmune adaptativa, en la que actúan, además de los agentes que participan en la respuesta inmune innata, otros agentes como los linfocitos T y B. La respuesta inmune adaptativa, a diferencia de la innata, es más específica para el patógeno a combatir, se prolonga con el tiempo y es capaz de desarrollar una memoria inmunológica.^{42, 43}

⁴¹ Keating, G. M. Axitinib: a review in advanced renal cell carcinoma. *Drugs*. **2015**, 75, 1903-1913. Doi: 10.1007/s40265-015-0483-x.

⁴² Edmunds, G. L. Targeting Adenosine and TIM3 to Improve Anti-Tumour Immunity. Doctoral Thesis. University of Bristol. **2019**, <https://research-information.bris.ac.uk/en/studentTheses/targeting-adenosine-and-tim3-to-improve-anti-tumour-immunity> (Descargada en febrero de 2023)

⁴³ Costa, A.C.; Santos, J. M.O.; Gil da Costa R. M.; Medeiros, R. Impact of immune cells on the hallmarks of cancer: A literature review. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2021**, 168, 103541. Doi: 10.1016/j.critrevonc.2021.103541.

Las células cancerosas, como agentes extraños y malignos, pueden ser reconocidas por el sistema inmunitario. Esta idea fue expuesta por W. Coley, en el siglo XIX, que es considerado el padre de la inmunoterapia.⁴⁴ Sin embargo, no fue hasta el siglo XX cuando L. Thomas y F. M. Burnet acuñaron el término de inmunosupervivencia del cáncer para hacer referencia a la hipótesis, propuesta unos años antes por P. Ehrlich, de que el sistema inmune es capaz de reconocer y eliminar a las células cancerosas.⁴² Esta hipótesis contrasta con una de las señas de identidad del cáncer, como es la capacidad para evadir el sistema inmunitario (véase la Figura 1.4). En los últimos años ha aparecido el concepto de inmunoedición del cáncer, mediante el cual se pretende explicar la interacción existente entre el sistema inmunitario y las células tumorales, así como la capacidad de estas últimas para adaptarse y promover la supresión del sistema inmunitario.⁴⁵ El proceso de inmunoedición del cáncer consta de tres fases: eliminación, equilibrio y evasión (véase la Figura 1.12).^{46, 47}

La fase de eliminación es la que enmarca la inmunosupervivencia del cáncer, ya que en esta fase el sistema inmune innato y el adaptativo colaboran para reconocer y eliminar las células mutantes que han evadido los mecanismos intrínsecos de supresión del tumor.

A pesar de la acción del sistema inmune, algunas células tumorales sobreviven a la fase de eliminación y progresan a la fase de equilibrio. En esta fase, es el sistema inmune adaptativo el que juega un papel más importante debido a su respuesta más prolongada. En la fase de equilibrio las células cancerosas son eliminadas al mismo tiempo que se van acumulando, por lo que el tamaño del tumor se encuentra controlado.

Finalmente, la propia evolución de las células cancerosas, y la adopción de un TME inmunodeprimido, permite que las células tumorales pasen a la fase de evasión. En esta fase, el TME está compuesto por células inmunes

⁴⁴ Zhang, Y.; Zhang, Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. *Cell. Mol. Immunol.* **2020**, *17*, 807-821. Doi: 10.1038/s41423-020-0488-6.

⁴⁵ Dunn, G. P.; Bruce, A. T.; Ikeda, H.; Old, L. J.; Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* **2002**, *3*, 991-998. Doi: 10.1038/ni1102-991.

⁴⁶ Balta, E.; Wabnitz, G. H.; Samstag, Y. Hijacked Immune Cells in the Tumor Microenvironment: Molecular Mechanisms of Immunosuppression and Cues to Improve T Cell-Based Immunotherapy of Solid Tumors. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5736. Doi: 10.3390/ijms22115736.

⁴⁷ O'Donnell, J. S.; Teng, M. W. L.; Smyth, M. J. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2019**, *16*, 151-167. Doi: 10.1038/s41571-018-0142-8.

“secuestradas”, como pueden ser los TAM, los cuales promueven la progresión del tumor desregulando así la respuesta inmune de las células T.^{46, 47}

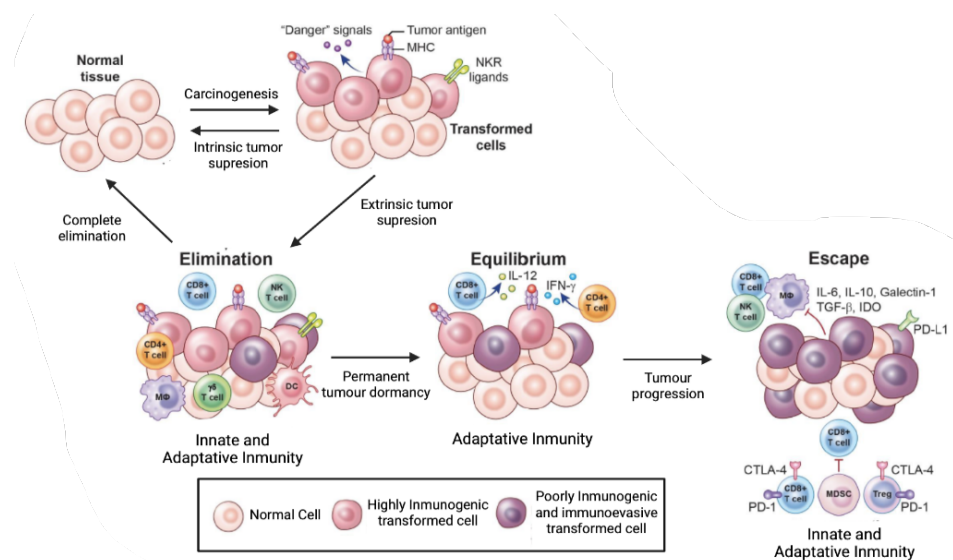


Figura 1.12. Proceso de inmunoección en el cáncer.^{48, 49}

1.3.1. Ciclo de inmunidad del cáncer

Durante la primera fase de la inmunoección, o fase de inmunosupervivencia del cáncer, e incluso en la fase de equilibrio, se encuentra activada la muerte celular, que se lleva a cabo siguiendo una serie de procesos relacionados conocidos como el ciclo de inmunidad del cáncer. Este ciclo consta de siete pasos que se describen esquemáticamente en la Figura 1.13.⁹

⁴⁸ Adaptado mediante BioRender.com de Hirankarn, N. Tumor Immunology. Facultad de Medicina, Chulalongkorn University.

⁴⁹ Wagner, M.; Koyasu, S. Cancer Immunoeediting by Innate Lymphoid Cells. *Trends. Immunol.* **2019**, *40*, 415-430. Doi: 10.1016/j.it.2019.03.004.

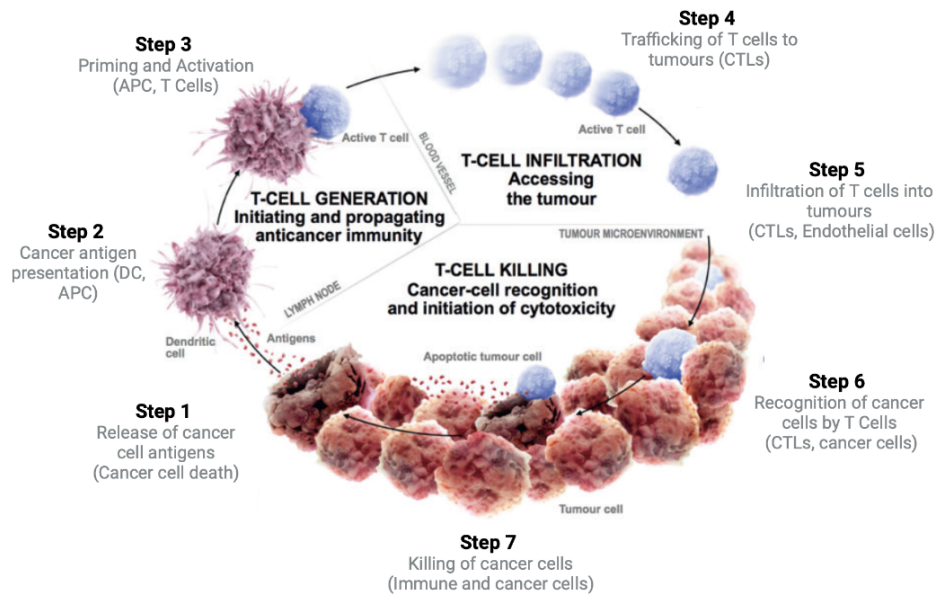


Figura 1.13. Ciclo de inmunidad del cáncer.⁵⁰

El ciclo de inmunidad del cáncer comienza cuando las células cancerosas dañadas o muertas liberan antígenos asociados al tumor (TAA) que las diferencian de las células sanas.

En la segunda etapa, se produce la captación de estos antígenos por las células dendríticas (DC), conocidas dentro de las células presentadoras de antígenos (APC), en las que también se encuentran los macrófagos y las células B, como APC profesionales, dada su elevada eficiencia promoviendo la respuesta de las células. Estas DC que han captado los TAA, viajan por el sistema linfático hasta los nodos linfáticos para encontrarse allí con las células T. También puede ocurrir que sean los TAA los que viajan a los nodos linfáticos donde son captados por las DC.

En la tercera etapa, en los nodos linfáticos, los antígenos son presentados a las células T a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), siendo reconocido por los receptores de las células T (TCR) presentes en la membrana de éstas. La interacción MHC-Antígeno-TCR activa a las células T en los nodos linfáticos.

En la cuarta etapa tras la maduración de las células T activadas, estas viajan a través de los vasos sanguíneos y se infiltran en el TME, finalizando de así la quinta etapa.

⁵⁰ The Cancer Immunity Cycle: A Framework for Cancer Immunotherapy. Sitio web: https://www.bsmo.be/wp-content/uploads/Article_Roche.pdf (Descargada en febrero de 2023)

Una vez en el tumor, comienza la sexta etapa, donde los TCR de las células T reconocen al MHCI (complejo mayor de histocompatibilidad de clase I) desencadenándose la última etapa en la que la respuesta inmunológica producida, conduce a la destrucción de las células cancerosas. La muerte de estas células, libera nuevos TAA que inician un nuevo ciclo del sistema inmunitario adaptativo.⁵¹ Esta respuesta inmune, sin embargo, tarda un tiempo en producirse siendo, mientras tanto, el sistema inmunitario innato el encargado de proteger al individuo y erradicar las células cancerosas.^{42, 52} En la acción del sistema inmune innato son las células NK las que juegan un papel más relevante puesto que exhiben una citotoxicidad similar a la de las células T. Durante la fase de respuesta del sistema inmune adaptativo las NK colaboran con los linfocitos T para erradicar las células tumorales activando el proceso de apoptosis (muerte celular programada), ya que las NK son capaces de reconocer a aquellas células malignas que carecen de MHCI y que, por tanto, son invisibles a las células T.⁵³

Las células T que expresan los TCR de cadena α y β , y que son capaces de reconocer el complejo MHC presentado por las DC, se dividen en CD4+ y CD8+. Estas últimas, tras ser activadas por las DC, son las principales encargadas de provocar la muerte de las células malignas, siendo, en cierta forma, análogas a las NK del sistema inmune innato. Para que esta activación tenga lugar son necesarias tres señales. La primera de ellas, como ya se ha comentado anteriormente, es la interacción entre el TCR y el complejo péptido-MHCI (pMHCI) presentado por APC. La segunda señal viene dada por la coestimulación de la interacción entre DC y CD8+, que lleva a la estabilización de la primera señal. La coestimulación más potente es la debida a la interacción entre CD28, presente en la superficie de CD8+, y CD80/86 (también conocida como B7-1/2 y que se expresa en la superficie de las APC). Finalmente, la tercera señal proviene de la señalización de distintas citoquinas secretadas, destacando de entre éstas la IL-2. No obstante, hay estudios que demuestran que si la afinidad del TCR por el complejo pMHCI es lo suficientemente potente, la activación y maduración

⁵¹ Chen, D. S.; Mellman, I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*. **2013**, 39, 1-10. Doi: 10.1016/j.immuni.2013.07.012.

⁵² Palucka, A. K.; Coussens, L. M. The Basis of Oncoimmunology. *Cell*. **2016**, 164, 1233-1247. Doi: 10.1016/j.cell.2016.01.049.

⁵³ Gonzalez, H.; Hagerling, C.; Werb, Z. Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression. *Genes. Dev.* **2018**, 32, 1267-1284. Doi: 10.1101/gad.314617.118.

de las células T se puede llevar a cabo sin la necesidad de las señales 2 y 3.^{54, 55} Una vez activadas, estas células maduran a células T citotóxicas (CTL), consideradas las células anticancerígenas más efectivas al ser capaces de reconocer, mediante el complejo pMHC-I, a las células cancerosas una vez infiltradas en el TME (véase la Figura.1.14).

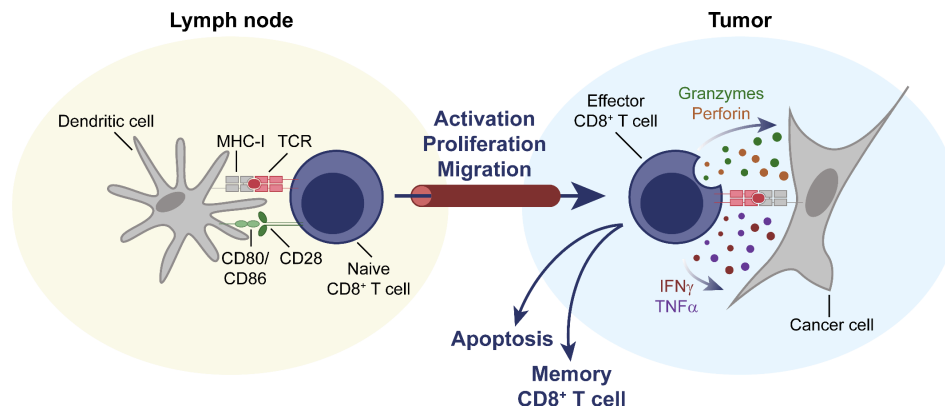


Figura 1.14. Acción citotóxica de las CD8+.⁵⁶

La cascada de señalización que se desencadena mediante la interacción TCR/pMHC-I, es la misma tanto para la activación de las CD8+ en los nodos linfáticos, como para desencadenar el proceso de muerte celular (apoptosis) de las células cancerosas, salvo por algunas diferencias que se explicaran a continuación.⁴²

La interacción TCR/pMHC-I activa a las tirosina-quinazas de la familia SRC, como LCK o FYN. La LCK se une al corresponsor CD8 y estabiliza la interacción entre el receptor TCR y pMHC-I. En este punto, la cascada de señalización va a depender de la conformación en la que se encuentre LCK, que cambia en función de la fosforilación/ desfosforilación de las tirosinas Y394 e Y505. La autofosforilación de Y394 estabiliza la conformación activa, mientras que la fosforilación de Y505 estabiliza la conformación inactiva. También se ha visto que la doble fosforilación de estas dos tirosinas proporciona una conformación activa de LCK. La regulación de la fosforilación y la desfosforilación de uno u otro residuo viene dada por una

⁵⁴ Raveney, B. J.; Morgan, D. J. Dynamic control of self-specific CD8+ T cell responses via a combination of signals mediated by dendritic cells. *J. Immunol.* **2007**, 179, 2870-2879. Doi: 10.4049/jimmunol.179.5.2870.

⁵⁵ Waldman, A. D.; Fritz, J. M.; Lenardo, M. J. A guide to cancer immunotherapy: from T cell basic science to clinical practice. *Nat. Rev. Immunol.* **2020**, 20, 651-668. Doi: 10.1038/s41577-020-0306-5.

⁵⁶ Drijvers, J. M.; Sharpe, A. H.; Haigis, M. C. The effects of age and systemic metabolism on anti-tumor T cell responses. *Elife.* **2020**, 9, e62420. Doi: 10.7554/eLife.62420.

tirosina fosfatasa transmembrana conocida como CD45.⁵⁷ En su forma activa la LCK mantiene un nivel óptimo de fosforilación en las cadenas CD3- ξ asociadas a TCR.⁴²

La fosforilación de estos inmunoreceptores favorece la llegada y posterior activación de ZAP70 que, a su vez, fosforila a la proteína transmembrana LAT que actúa como enlace para la activación de las células T (véase la Figura 1.15). La activación de LAT promueve el reclutamiento de diferentes moléculas de señalización, formándose un complejo proteico conocido como señalosoma LAT, que dirige la activación de diferentes rutas de señalización.⁵⁸ Estas rutas marcan la diferencia entre la cascada de señalización durante la activación y maduración de las CD8+ y la actividad de las CTL.

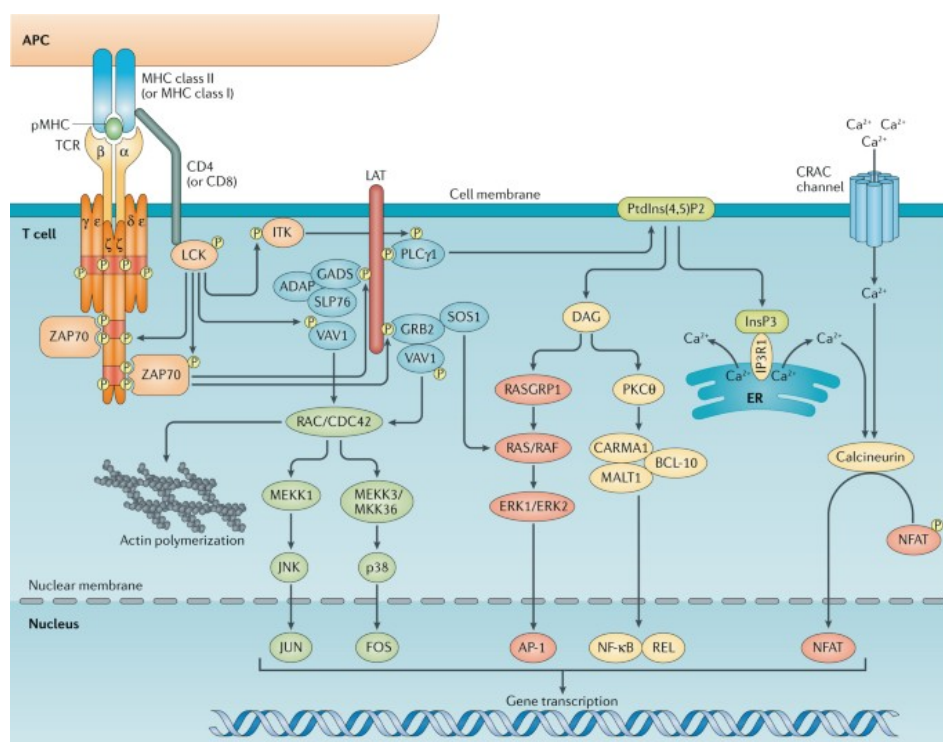


Fig.1.15. Cascada de señalización de las células T.⁵⁷

Durante la activación el principal objetivo de la cascada de señalización es la expresión de IL-2, una citoquina que promueve la proliferación celular favoreciendo la expansión de las células T activadas. La transcripción de esta citoquina se ve activada a través de la cascada RAS/MAPK.⁴² En

⁵⁷ Gaud, G.; Lesourne, R.; Love, P.E. Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* **2018**, 18, 485–497. Doi: 10.1038/s41577-018-0020-8.

⁵⁸ Brownlie, R.; Zamoyska, R. T cell receptor signalling networks: branched, diversified and bounded. *Nat. Rev. Immunol.* **2013**, 13, 257–269. Doi: 10.1038/nri3403.

cambio, en las células diana, esta interacción lleva, por un lado, a la secreción de gránulos que contienen perforinas y granzimas que activan el mecanismo de apoptosis en la célula cancerosa y, por otro lado, lleva a la secreción de citoquinas proinflamatorias como $\text{INF}\gamma$ y $\text{TNF-}\alpha$.⁵⁶ En este proceso la cascada de señalización del calcio se ve favorecida mediante la activación de PI3.⁵⁹

Por otro lado, las células T CD4+ , maduran a diferentes subtipos de células dependiendo de las citoquinas expresadas. Durante las primeras fases de la inmunomodulación del cáncer, éstas maduran a las células T auxiliares (T_H), que colaboran con las CTL favoreciendo la actividad antitumoral de forma directa e indirecta.⁵² Las T_H actúan de forma directa sobre las células tumorales expresando citoquinas como $\text{INF}\gamma$ y $\text{TNF-}\alpha$, o proteínas como perforinas y granzimas, las cuales como ya se ha visto, conducen a la apoptosis. Las T_H , al igual que las CD8+ , presentan TCR en su superficie capaces de reconocer en las células diana al complejo péptido-MHCII. Este reconocimiento, desencadena una cascada de señalización muy similar a la que tiene lugar en las CD8+ . Además, de forma indirecta las T_H contribuyen a la activación de las CD8+ mediante la interacción de CD40L, presente en la superficie de T_H , con CD40 en las DC, así como mediante la liberación de citoquinas como IL-2 e IL-15.⁴⁶

1.3.2. TME inmunodeprimido

Tal y como se va avanzando en las fases de la inmunomodulación del cáncer, los procesos implicados en el ciclo de inmunidad del cáncer se van viendo alterados, especialmente en la última fase de evasión, en la que el TME se encuentra inmunodeprimido. Las células tumorales desencadenan diversos mecanismos mediante los cuales se hacen invisibles a las células del sistema inmune. Por un lado, disminuyen la presencia de MHCI y MHCII en su superficie y, por otro lado, sobreexpresan proteínas que actúan como puntos de control inmune, destacando entre ellas PD-L1 (Programmed cell death-ligand 1), que es el ligando de PD-1 (Programmed cell death protein 1) presente en la superficie de las células T efectoras.

También contribuye a la inmunosupresión del TME el hecho de que, en infecciones crónicas como lo es el cáncer, las células T entran en un estado

⁵⁹ Schwarz, E. C.; Qu, B.; Hoth, M. Calcium, cancer and killing: the role of calcium in killing cancer cells by cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **2013**, 1833, 1603-1611. Doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.11.016.

de agotamiento debido a la continua expresión de antígenos. Las células T exhaustas continúan siendo activadas y madurando a células efectoras en los nodos linfáticos, sin embargo, al llegar al TME, éstas pierden su funcionalidad debido al incremento de receptores inhibidores en su membrana, y a la disminución de la cantidad de citoquinas efectoras liberadas, incrementándose, además, la secreción de citoquinas favorecedoras de la inhibición.⁶⁰ Entre los receptores inhibidores asociados a las células T se encuentran PD-1, CTLA-4, TIM-3 (T cell immunoglobulin domain and mucin domain protein 3), LAG-3 (lymphocyte activation gene protein 3), BTLA (band T lymphocyte attenuator) y TIGIT (T cell immunoglobulin and immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif domain). Además, también se ha visto que tiene lugar una menor liberación de citoquinas efectoras, como IL-2, INF γ , TNF- α y granzimas, mientras que aumenta la liberación de citoquinas supresoras como IL-10 y TGF- β , VEGF, e inflamatorias como IL-6.⁶¹

El TME inmunodeprimido, por su parte, está compuesto por una gran variedad de células inmunes con actividad pro-tumoral. Estas son células del sistema inmunitario que, debido a la liberación de diversos factores al TME, se han diferenciado desarrollando funciones que contribuyen a la progresión del tumor. Un ejemplo de este tipo de células son los monocitos, los cuales, al llegar al tumor durante las fases iniciales, se diferencian a macrófagos y DC. Sin embargo, cuando en el TME se comienzan a acumular factores inmunosupresores, estos monocitos se diferencian a células supresoras derivadas de células mieloides (MDSC), las cuales promueven la progresión del tumor actuando como reguladoras negativas de las NK y de las células T efectoras, e induciendo el agotamiento celular de estas últimas. La sobreexpresión del receptor CD40 en la membrana de las MDSC lleva a reclutar células T reguladoras (Treg), favoreciendo la diferenciación de los macrófagos a M2/TAM.⁶²

Los monocitos también se diferencian a macrófagos, los cuales son responsables de la eliminación de agentes infecciosos y de la regulación del

⁶⁰ Jiang, Y.; Li, Y.; Zhu, B. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell. Death. Dis.* **2015**, *6*, e1792 Doi: 10.1038/cddis.2015.162.

⁶¹ Wherry, E.J.; Kurachi, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat. Rev. Immunol.* **2015**, *15*, 486-499. Doi: 10.1038/nri3862.

⁶² Salemme, V.; Centonze, G.; Cavallo, F.; Defilippi, P.; Conti, L. The Crosstalk Between Tumor Cells and the Immune Microenvironment in Breast Cancer: Implications for Immunotherapy. *Front. Oncol.* **2021**, *11*, 610303. Doi: 10.3389/fonc.2021.610303.

sistema inmune adaptativo. Sin embargo, y en función de las citoquinas liberadas por el tumor, los monocitos se diferencian a M1 o M2/TAM, con actividad anti-tumoral y pro-tumoral, respectivamente. Los macrófagos M1 liberan citoquinas proinflamatorias como IL-2, $\text{INF}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$, las cuales, como ya se ha visto, promueven la activación de las células T efectoras.⁴⁶ A su vez, los macrófagos M2, más conocidos como TAM, están involucrados en muchos procesos que promueven la progresión del tumor. Centrándonos en su actividad inmunosupresora, TAM secreta IL-10 y $\text{TGF-}\beta$, citoquinas que favorecen el agotamiento celular y disminuyen la actividad de las células T al sobreexpresar en su membrana los ligandos de los receptores de inhibición PD-L1 y galectina (ligando de TIM-3).⁶² Hace unos años se creía que CD11b era una integrina característica de macrófagos con fenotipo M1 y, por tanto, su expresión estaba relacionada con acciones antitumorales.⁶³ Sin embargo, recientemente se ha demostrado que esta característica es propia de los macrófagos con fenotipo M2/TAM. CD11b es una proteína transmembrana sobreexpresada en células mieloides que favorece la polarización de éstas hacia macrófagos antiinflamatorios. Además, la interacción de CD11b con CD18 favorece la invasión y la metástasis de las células cancerosas al incrementar la expresión de MMP9.⁶⁴

Por otra parte, las CD4+, además de diferenciarse a T_H , también pueden diferenciarse a células T reguladoras (Treg) las cuales se encuentran más favorecidas en la fase de evasión de la inmunoección del cáncer, ya que, a diferencia de las anteriores, actúan modulando la actividad de CTL. Así, las Treg llevan a cabo funciones inmunosupresoras, diferenciándose de las T_H , por presentar altos niveles de CD25 en su membrana y expresar el factor de transcripción FOXP3. Las Treg se caracterizan por el bloqueo de la activación de CD8+ por dos vías. En la primera de ellas se sobreexpresa CTLA-4, el cual interacciona con CD80/86 en la membrana de las DC evitando así la interacción co-estimuladora de CD28/CD80/86 y, por tanto, desestabilizando la interacción TCR-pMHC I, lo que disminuye la activación de CD8+. En la segunda vía de desactivación se bloquea la maduración de las DC vía LAG-3/MHCII. Las Treg también son capaces de bloquear la

⁶³ Schmid, M.C.; Khan, S.Q.; Kaneda, M.M.; Pathria, P.; Shepard, R.; Louis, T.L.; Anand, S.; Woo, G.; Leem, C.; Faridi, M.H.; Geraghty, T.; Rajagopalan, A.; Gupta, S.; Ahmed, M.; Vazquez-Padron, R.I.; Cheresh, D.A.; Gupta, V.; Varner, J.A. Integrin CD11b activation drives anti-tumor innate immunity. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 5379. Doi: 10.1038/s41467-018-07387-4.

⁶⁴ Kumari, N.; Choi, S.H. Tumor-associated macrophages in cancer: recent advancements in cancer nanoimmunotherapies. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2022**, *41*, 68. Doi: 10.1186/s13046-022-02272-x.

respuesta inmune de forma indirecta liberando citoquinas antiinflamatorias como IL-10 o TGF- β .⁴⁶

Se ha visto que el balance entre T_H y Treg viene determinado por la proteína CD69 al asociarse con S100A8/A9, una proteína sobreexpresada en condiciones de inflamación.⁶⁵ CD69 es una proteína transmembrana descrita inicialmente como un marcador de activación de leucocitos. Recientemente se ha visto que CD69 actúa como regulador crucial de diversas respuestas inmunes.⁶⁶ Dependiendo del contexto celular, así como del ligando asociado, la actividad de CD69 adopta distintos roles en las fases de diferenciación de las células T durante la carcinogénesis.⁶⁵ La proteína CD69 es considerada un marcador de activación, dado que su expresión se encuentra estimulada por la activación de TCR en las células T. No obstante, es la sobreexpresión de esta proteína la que está relacionada con el agotamiento celular de las células T efectoras, con la consecuente pérdida de la acción inmune.⁶⁷ Además de favorecer la diferenciación de las Treg, CD69 es capaz de favorecer la infiltración de las células T efectoras en el TME mediante la interacción con MYL9/12 (myosin light chain 9/12), una proteína que se acumula en respuesta a la inflamación.⁶⁸

El conjunto de todas estas células y su actividad pro-tumoral constituyen un TME inmunodeprimido que, a su vez, promueve, como ya se ha visto, la sobreexpresión de receptores de inhibición en la superficie de las células T efectoras exhaustas que actúan como punto de control inmune (véase la Figura 1.16).

⁶⁵ Koyama-Nasu, R.; Wang, Y.; Hasegawa, I.; Endo, Y.; Nakayama, T.; Kimura, M.Y. The cellular and molecular basis of CD69 function in anti-tumor immunity. *Int. Immunol.* **2022**, *34*, 555-561. Doi: 10.1093/intimm/dxac024.

⁶⁶ Sancho, D.; Gómez, M.; Sánchez-Madrid, F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends. Immunol.* **2005**, *26*, 136-140. Doi: 10.1016/j.it.2004.12.006.

⁶⁷ Mita, Y.; Kimura, M.Y.; Hayashizaki, K.; Koyama-Nasu, R.; Ito, T.; Motohashi, S.; Okamoto, Y.; Nakayama, T. Crucial role of CD69 in anti-tumor immunity through regulating the exhaustion of tumor-infiltrating T cells. *Int. Immunol.* **2018**, *30*, 559-567. Doi: 10.1093/intimm/dxy050.

⁶⁸ Kimura, M.Y.; Koyama-Nasu, R. Yagi, R.; Nakayama, T. A new therapeutic target: the CD69-MyI9 system in immune responses. *Semin. Immunopathol.* **2019**, *41*, 349-358. Doi: 10.1007/s00281-019-00734-7.

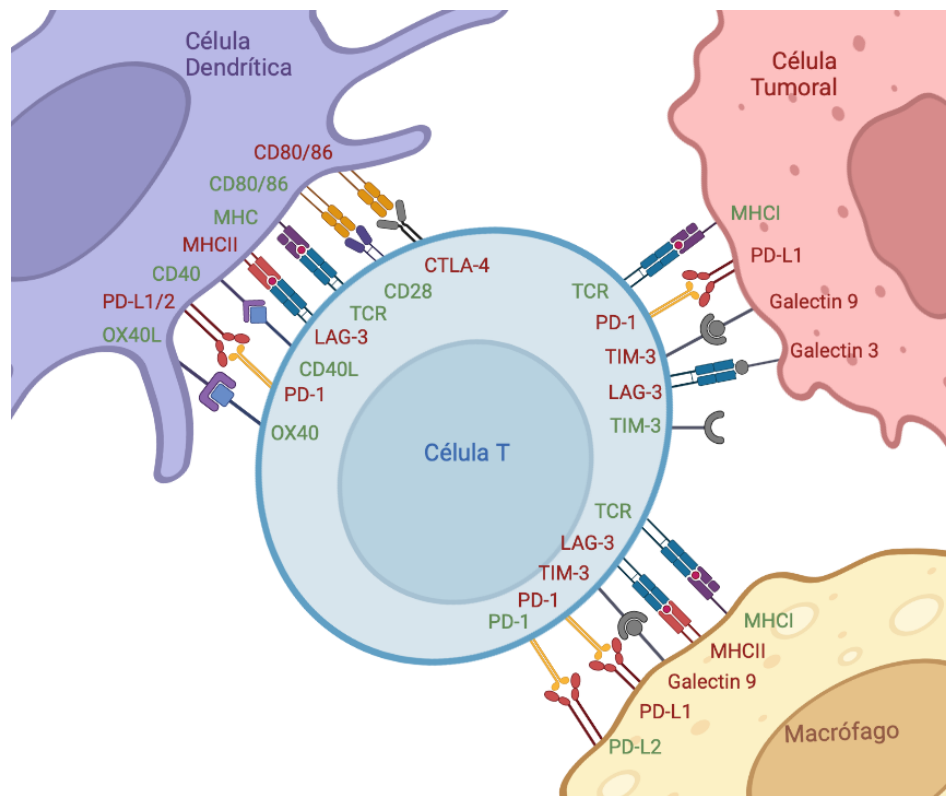


Figura 1.16. Receptores de inhibición y activación de las células T efectoras en el TME inmunodeprimido.⁸

LAG-3 es un receptor de inhibición capaz de detener la activación de las células T efectoras y la liberación de citoquinas anti-tumorales. El ligando por excelencia de este receptor es MHCII y su interacción evita la unión de esta al TCR de las CD4+ bloqueándose tanto su activación como su acción. A pesar de que la maduración y acción de las CD8+ no depende de MHCII, se ha visto recientemente que LAG-3 es capaz de regular también su acción al interactuar con galectina 3 o LSECtin (Liver sinusoidal endotelial cell lectin) en el TME.⁶⁹

Por otro lado, TIM-3 es un receptor tirosina-quinasa expresado en la membrana de las células T efectoras exhaustas. Cuando TIM-3 no se encuentra unido a su ligando, su región intracelular interacciona con BAT-3 (HLA-B-associated transcript 3) promoviendo el reclutamiento de LCK activo, lo cual deriva en la activación de la célula T, mientras que al unirse a su ligando galectina 9 se fosforila esta región, desprendiéndose BAT-3, lo

⁶⁹ Long, L.; Zhang, X.; Chen, F.; Pan, Q.; Phiphatwatchara, P.; Zeng, Y.; Chen, H. The promising immune checkpoint LAG-3: from tumor microenvironment to cancer immunotherapy. *Genes Cancer*. **2018**, 9, 176-189. Doi: 10.18632/genesandcancer.180.

que resulta en la activación de la actividad inhibidora de TIM-3.⁷⁰ Así, a pesar de que su elevada expresión en el TME está relacionado con una respuesta inmune exhausta, se ha visto que su expresión en ausencia de ligando puede producir la activación de las señales inmunes.⁴²

Además de estos receptores de inhibición, cabe destacar que, aunque en menor cantidad, las células T exhaustas también expresan ciertos receptores de activación como OX40. Este es un receptor que pertenece a la superfamilia de los receptores TNF (tumor necrosis factor) y se encuentra expresado en la superficie de las células CD8+ y CD4+ activadas y Treg, entre otras. Su ligando endógeno, OX40L, se expresa en la superficie de las APC activadas como DC y macrófagos.⁷¹ Se ha visto que la activación de este receptor en las células T efectoras exhaustas puede reactivar su capacidad antitumoral mediante la producción de citoquinas como IL-2 o INF γ . Por otro lado, la activación de este receptor en la superficie de las Treg desregula la expresión de FOXP3, lo que estimula la diferenciación de las CD4+ efectoras, favoreciendo así la actividad antitumoral.⁷²

Como se ha explicado, la acción de un sistema inmune deprimido juega un papel muy importante en el desarrollo de diferentes señas de identidad del cáncer, entre las que cabe mencionar la capacidad de las células cancerosas para activar la metástasis, la angiogénesis y sobre todo la capacidad de evasión del sistema inmunológico. Entre las células del sistema inmune con capacidad pro-tumoral destacan TAM, que juega un papel crucial secretando citoquinas involucradas en la progresión de las capacidades biológicas del cáncer.⁷³

1.3.3. Mecanismo de acción PD-1/PD-L1

Entre los puntos de control inmunológicos más estudiados destacan CTLA-4, así como PD-1 y su ligando PD-L1. CTLA-4 regula la actividad de las células T en las primeras fases de la inmunoección del cáncer al

⁷⁰ Wolf, Y.; Anderson, A.C.; Kuchroo, V.K. TIM3 comes of age as an inhibitory receptor. *Nat. Rev. Immunol.* **2020**, *20*, 173-185. Doi: 10.1038/s41577-019-0224-6.

⁷¹ Yang, Y.; Chai, X.; Xin, W.; Wang, D.; Dai, C.; Qian, F.; Yang, T. Generation and characterization of a high-affinity chimeric anti-OX40 antibody with potent antitumor activity. *FEBS. Lett.* **2021**, *595*, 1587-1603. Doi: 10.1002/1873-3468.14079.

⁷² Mascarelli, D.E.; Rosa, R.S.M.; Toscaro, J.M.; Semionatto, I.F.; Ruas, L.P.; Fogagnolo, C.T.; Lima, G.C.; Bajgelman, M.C. Boosting Antitumor Response by Costimulatory Strategies Driven to 4-1BB and OX40 T-cell Receptors. *Front. Cell. Dev. Biol.* **2021**, *9*, 692982. Doi: 10.3389/fcell.2021.692982.

⁷³ Costa, A.C.; Santos, J.M.O.; Gil da Costa, R.M.; Medeiros, R. Impact of immune cells on the hallmarks of cancer: A literature review. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **2021**, *168*, 103541. Doi: 10.1016/j.critrevonc.2021.103541.

bloquear a CD80, mientras que la interacción PD-1/PD-L1 limita la acción de las células T efectoras en el TME en las últimas fases de la inmunoección del cáncer.

PD-1 (también conocido como CD279) es un receptor de inhibición inmune expresado en la membrana de las CTL que se cree pertenece a la superfamilia B7-CD28, dada su similitud estructural con esta proteína, a pesar de presentar propiedades distintas. Este receptor tiene dos ligandos PD-L1 (CD274, B7-H1) y PD-L2 (CD273, B7-DC), ambos pertenecientes a la familia de proteínas B7.⁷⁴ Mientras que PD-L1 se expresa en la superficie de células de sistema inmune, como células T o macrófagos, y en las células cancerosas, PD-L2 tan solo se expresa en la superficie de macrófagos activados y DC.

En tejidos normales la interacción PD-1/PD-L1 es esencial para prevenir la sobreactivación de las células inmunes evitando de esta forma enfermedades autoinmunes. No obstante, esta interacción en el TME conlleva la evasión de la inmunosupervivencia.⁷⁵ La función de ambos ligandos es la misma, la inhibición de la respuesta inmune. Sin embargo, PD-1/PD-L2 en altas concentraciones de antígenos, como ocurre en el cáncer, reduce la producción de citoquinas supresoras, pero no es capaz de inhibir a las células T.⁷⁶

La interacción PD-1/PD-L1 se caracteriza por bloquear diversas cascadas de señalización (véase la Figura 1.17). En primer lugar, esta interacción bloquea directamente la cascada de señalización de las células T al inhibir la fosforilación de ZAP70 mediante la inhibición de la función de LCK. En consecuencia, la cascada de señalización PI3K/AKT se ve también inhibida. PI3K/AKT es la vía de señalización más castigada por la interacción PD-1/PD-L1 ya que, además de la inhibición indirecta ya comentada y de encontrarse también bloqueada directamente, esta se encuentra bloqueada también de forma indirecta al potenciar la actividad de PTEN (phosphatase and tensin homolog), el cual, mediante su acción fosfatasa, inhibe PIP3 inhibiendo a su vez AKT. La inhibición de esta vía desregula el aporte

⁷⁴ Dermani, F.K.; Samadi, P.; Rahmani, G.; Kohlan, A.K.; Najafi, R. PD-1/PD-L1 immune checkpoint: Potential target for cancer therapy. *J. Cell. Physiol.* **2019**, 234, 1313-1325. Doi: 10.1002/jcp.27172.

⁷⁵ Yi, M.; Niu, M.; Xu, L.; Luo, S.; Wu, K. Regulation of PD-L1 expression in the tumor microenvironment. *J. Hematol. Oncol.* **2021**, 14, 10. Doi: 10.1186/s13045-020-01027-5.

⁷⁶ Salmaninejad, A.; Valilou, S.F.; Shabgah, A.G.; Aslani, S.; Alimardani, M.; Pasdar, A.; Sahebkar, A. PD-1/PD-L1 pathway: Basic biology and role in cancer immunotherapy. *J. Cell. Physiol.* **2019**, 234, 16824-16837. Doi: 10.1002/jcp.28358.

nutricional y energético de las células T, además de favorecer la apoptosis de las mismas.⁷⁷ Otro mecanismo desregulado por la interacción PD-1/PD-L1 es la vía de señalización Ras/MEK/ERK al inhibir PLC γ .⁷⁶ Con todo, la activación de este inmunoregulator lleva al control de la citotoxicidad de las células efectoras y a la supresión de citoquinas involucradas en la activación inmunológica (IL-2, INF- γ y TNF- α).

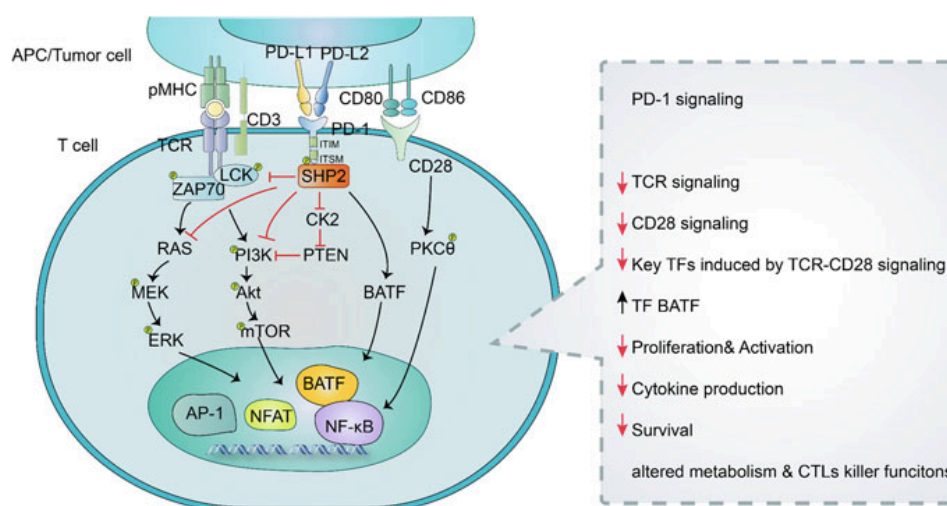


Figura 1.17. Vías de señalización bloqueadas por la interacción PD-1/PD-L1.⁷⁸

1.3.4. Reguladores endógenos de PD-L1

La sobreexpresión de PD-L1 en la membrana de las células cancerosas viene regulada por diferentes mecanismos que incluyen alteraciones genómicas, regulación epigenética, control basado en microRNA o reguladores endógenos basados en factores de transcripción tales como INF- γ , IL-6, TNF- α , TGF- β , HIF-1 o EGF (véase la Figura 1.18).⁷⁵

Cuando las células T efectoras llegan al TME, estas expresan ciertas citoquinas proinflamatorias, entre ellas INF- γ , que, además de promover la activación de la respuesta inmune, conduce a la estimulación de la expresión de PD-L1 en las células cancerosas a través de la vía JAK/STAT/IRF1.⁷⁷ Otra citoquina inflamatoria involucrada en la sobreexpresión de PD-L1 es IL-6, que sigue una vía similar a la del INF- γ .⁷⁵

⁷⁷ Han, Y.; Liu, D.; Li, L. PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. *Am. J. Cancer Res.* **2020**, 1;10, 727-742. PMID: 32266087.

⁷⁸ Ai, L.; Xu, A.; Xu, J. Roles of PD-1/PD-L1 Pathway: Signaling, Cancer, and Beyond. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2020**, 1248, 33-59. Doi: 10.1007/978-981-15-3266-5_3.

IL-6 es una citoquina inflamatoria que, de nuevo, no solo contribuye a la supervivencia tumoral, tanto al promover la expresión de PD-L1 como la de otras proteínas con actividad antiapoptótica, proangiogénica o prometastásica, sino que, además, juega un papel clave en la supervivencia, proliferación, diferenciación y reclutamiento de leucocitos, promoviendo, de esta forma, la inmunidad anti-tumoral.⁷⁹

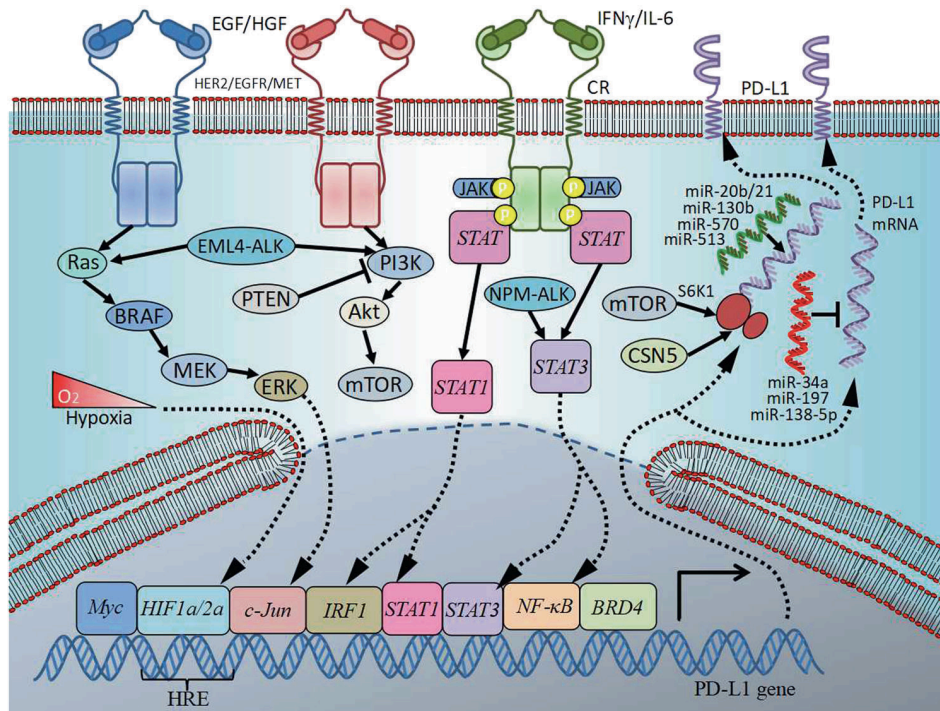


Figura 1.18. Control de la expresión de PD-L1 en células tumorales.⁸⁰

Por su parte, TNF- α también es una citoquina que presenta un papel dual en el TME. Se ha visto que es capaz de aumentar la transcripción de PD-L1 activando la vía NF- κ B (Nuclear factor- κ B) y, además, en su papel de citoquina pro-tumoral, promueve la expresión de factores involucrados en la angiogénesis (VEGF, VEGFR-2) y en el crecimiento celular (RAS, c-Myc). En altas concentraciones se ve beneficiado el papel de TNF- α como citoquina anti-tumoral, el cual es considerado más importante por muchos investigadores, ya que TNF- α es capaz de promover la muerte de las células tumorales y la llegada de linfocitos al TME.⁸¹

⁷⁹ Fisher, D.T.; Appenheimer, M.M.; Evans, S.S. The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment. *Semin. Immunol.* **2014**, *26*, 38-47. Doi: 10.1016/j.smim.2014.01.008.

⁸⁰ Zerdes, I.; Matikas, A.; Bergh, J.; Rassidakis, G.Z.; Foukakis, T. Genetic, transcriptional and post-translational regulation of the programmed death protein ligand 1 in cancer: biology and clinical correlations. *Oncogene.* **2018**, *37*, 4639-4661. Doi: 10.1038/s41388-018-0303-3.

⁸¹ Bertazza, L.; Mocellin, S. The dual role of tumor necrosis factor (TNF) in cancer biology. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 3337-3352. Doi: 10.2174/092986710793176339.

Otro de los factores de transcripción que regula la expresión de PD-L1 es c-Myc. Este, como ya se ha visto en este capítulo (véase el apartado 1.2.2), es considerado el principal regulador del TME. Entre sus muchas funciones, que a diferencia de los casos anteriores están siempre dirigidas a promover la progresión tumoral, c-Myc regula directamente la transcripción de PD-L1 al iniciar el proceso de transformación celular, y no como respuesta a una acción inmune antitumoral (véase la Figura 1.9 en la página 14).⁸² Además, c-Myc también contribuye a la evasión del sistema inmunitario favoreciendo el reclutamiento de TAM hacia el TME, regulando CD206 y expulsando, a su vez, CTL y NK del mismo al regular también IL-23.³⁴ Por otro lado, c-Myc está también involucrado en la sobreexpresión de TGF- β vía SMAD/SNAIL, el cual, a su vez, también favorece la expresión de PD-L1 mediante un mecanismo que se encuentra todavía por elucidar.⁷⁵

1.3.5. VEGF/VEGFR-2 como regulador inmune en el TME

El estudio de la biología del cáncer a nivel molecular va mostrando más y más indicios de la interconexión entre las diferentes señas de identidad del cáncer. Un ejemplo de esto lo encontramos con VEGF. Este factor de crecimiento, altamente reconocido como el principal iniciador de la angiogénesis (véase el apartado 1.2.1), se ha considerado recientemente como un factor de regulación de la inmunosupresión en el TME.⁸³ La sobreexpresión de VEGF en el TME se ha visto que conduce a la supresión de la acción inmunológica por cuatro mecanismos diferentes. En primer lugar mediante su ya conocida capacidad para promover la formación de nuevos vasos aberrantes, que no solo dificultan la llegada de fármacos al TME sino que facilitan la salida de las células inmunes de éste. VEGF también es capaz de inhibir la maduración de las DC, y la posterior proliferación e infiltración de las CTL y, además, favorece el reclutamiento de células inmunosupresoras como MDSC, Treg o TAM. Por tanto, VEGF está implicado en la inmunosupresión en diferentes fases del ciclo de inmunidad del cáncer (véase la Figura 1.13 en la página 22).

Los primeros pasos del ciclo dependen de la maduración de DC que son las principales APC. No obstante, VEGF es capaz de bloquear la

⁸² Spranger, S.; Gajewski, T.F.; Kline, J. MYC - a thorn in the side of cancer immunity. *Cell. Res.* **2016**, *26*, 639-640. Doi: 10.1038/cr.2016.50.

⁸³ Hack, S.P.; Zhu, A.X.; Wang, Y. Augmenting Anticancer Immunity Through Combined Targeting of Angiogenic and PD-1/PD-L1 Pathways: Challenges and Opportunities. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 598877. Doi: 10.3389/fimmu.2020.598877.

diferenciación y maduración de estas DC al bloquear la cascada de señalización de NF- κ B, interaccionando con su receptor VEGFR-1, expresado tanto en monocitos como en DC inmaduras (DCi). Además, a través de su receptor VEGFR-2, el cual se expresa mayormente en DC maduras (DCm), es capaz de inhibir la habilidad de estas DCm, que hayan evadido este primer mecanismo de bloqueo, para activar a las células T, aunque el mecanismo de acción no está claro todavía.⁸⁴

VEGF no es el único inmunosupresor involucrado en la regulación de DC, pues hay estudios que indican que PD-L1 también juega un papel clave en este proceso. Por otra parte, se ha demostrado que PD-L1 también está involucrada en la angiogénesis. Se ha visto que PD-L1 es capaz de unirse a VEGFR-2 activando la cascada de señalización FAK/AKT, regulando de esta forma los procesos biológicos que promueven la angiogénesis.⁸⁵ Teniendo todo esto en cuenta, no es de extrañar que en los últimos años estén siendo investigadas terapias combinadas anti-PD-L1/VEGFR-2 para la reactivación de la actividad antitumoral.

1.3.6. Agentes Inmunomoduladores

La inmunoterapia ha comenzado a ser de gran interés en la última década, siendo actualmente una de las principales estrategias estudiadas en clínica. Con la inmunoterapia, se pretende reactivar de nuevo la actividad citotóxica del sistema inmune bloqueando todos los procesos desregulados previamente explicados, siendo las principales dianas los puntos de control inmunológico (PD-1/PD-L1 principalmente). Las estrategias que se están estudiando están basadas en técnicas muy diferentes, siendo una de las más innovadoras la terapia basada en vacunas anticáncer, conocidas como inmunizadores activos.⁹

Por otro lado, los primeros fármacos aprobados por la FDA para inmunoterapia estaban basados en anticuerpos monoclonales. Pembrolizumab y Nivolumab, aprobados en 2014 por la FDA, fueron los primeros anticuerpos monoclonales anti-PD-1 en ser indicados para el

⁸⁴ Mimura, K.; Kono, K.; Takahashi, A.; Kawaguchi, Y.; Fujii, H. Vascular endothelial growth factor inhibits the function of human mature dendritic cells mediated by VEGF receptor-2. *Cancer Immunol. Immunother.* **2007**, *56*, 761-770. Doi: 10.1007/s00262-006-0234-7.

⁸⁵ Yang, Y.; Xia, L.; Wu, Y.; Zhou, H.; Chen, X.; Li, H.; Xu, M.; Qi, Z.; Wang, Z.; Sun, H.; Cheng, X. Programmed death ligand-1 regulates angiogenesis and metastasis by participating in the c-JUN/VEGFR2 signaling axis in ovarian cancer. *Cancer Commun. (Lond.)* **2021**, *41*, 511-527. Doi: 10.1002/cac2.12157.

tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas metastásico, del melanoma metastizado o resistente y del carcinoma renal avanzado.⁸⁶ Recientemente, también se han aprobado por la FDA algunos anticuerpos monoclonales anti-PD-L1, como el Avelumad en 2020 y el Durvalumad y Atezolizumad en 2022.⁸⁷ No obstante, los fármacos basados en anticuerpos causan muchos efectos secundarios asociados a la estabilidad e inmunogenicidad de los mismos. Además, se ha visto que estos anticuerpos, al ser moléculas de un tamaño macromolecular, tienen dificultades para acumularse en el TME y alcanzar la concentración más eficaz. Así, el estudio de fármacos basados en moléculas pequeñas está tomando un gran interés ya que, estas son más adecuadas para ser administradas por vía oral, son más estables y presentan una mejor permeabilidad de la membrana celular.⁸⁸

El estudio de nuevos fármacos basados en moléculas pequeñas para inmunoterapia ha comenzado a desarrollarse hace unos pocos años, lo que explica que todavía no se haya aprobado ninguna de estas moléculas por las agencias reguladoras. Los compuestos actualmente investigados como modulares de la interacción PD-1/PD-L1 basan su acción en diferentes mecanismos. Así, algunos buscan inhibir la expresión de estas proteínas bloqueando citoquinas reguladoras como INF- γ , otros están dirigidos a bloquear la cascada de señalización que desencadena la interacción PD-1/PD-L1, aunque la mayoría busca inhibir directamente la unión de PD-1 con su ligando bloqueando el sitio de unión de uno u otro.⁸⁹

En este último grupo se encuentra CA-170, uno de los primeros compuestos en pasar a estudios clínicos (véase la estructura en la Figura 1.19). Este es un inhibidor de PD-L1 y VISTA (anti-V-domain immunoglobulin suppressor of T cell activation) desarrollado conjuntamente por las farmacéuticas Curis y Aurigene. Los estudios realizados con CA-170 en pacientes, con cánceres de diversos tipos en fases avanzadas, demuestran

⁸⁶ Li, K.; Tian, H. Development of small-molecule immune checkpoint inhibitors of PD-1/PD-L1 as a new therapeutic strategy for tumour immunotherapy. *J. Drug Target.* **2019**, *27*, 244-256. Doi: 10.1080/1061186X.2018.1440400.

⁸⁷ Página web oficial de la FDA. <https://www.fda.gov/drugs/resources-information-approved-drugs> (Consultada en marzo de 2023).

⁸⁸ Wu, Q.; Jiang, L.; Li, S.C.; He, Q.J.; Yang, B.; Cao, J. Small molecule inhibitors targeting the PD-1/PD-L1 signaling pathway. *Acta. Pharmacol. Sin.* **2021**, *42*, 1-9. Doi: 10.1038/s41401-020-0366-x.

⁸⁹ Yamaguchi, H.; Hsu, J.M.; Yang, W.H.; Hung, M.C. Mechanisms regulating PD-L1 expression in cancers and associated opportunities for novel small-molecule therapeutics. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2022**, *19*, 287-305. Doi: 10.1038/s41571-022-00601-9.

que su administración oral aumenta la proliferación y la activación de las células T en el tumor.⁹⁰

Otro fármaco de administración oral, que está dando muy buenos resultados en pacientes con tumores sólidos en estado avanzado, es INCB086550 (véase la estructura en la Figura 1.19). Este inhibidor, que se encuentra en la fase II de los estudios clínicos, bloquea la interacción PD-1/PD-L1 al unirse con gran afinidad a PD-L1.⁹¹

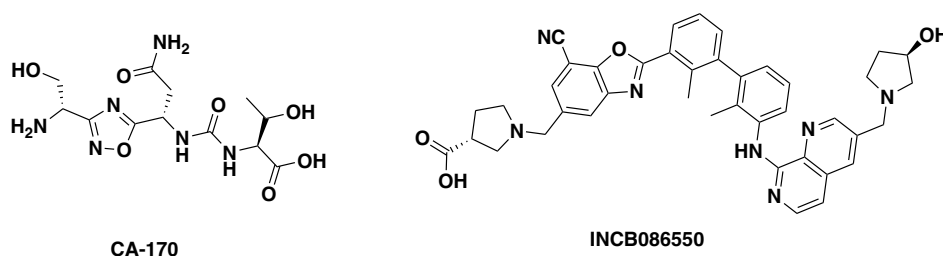


Figura 1.19. Estructura de inhibidores de la interacción PD-1/PD-L1 en estudios clínicos.

La lista de inhibidores de la interacción PD-1/PD-L1 es mucho más extensa y en ella destacan compuestos tales como IMM-010, MAX-10181, GS-4224, ASC61 y BPI-371153, que se encuentran en las primeras fases de estudios clínicos.⁹²

Por otro lado, Bristol-Myers Squibb (BMS) desarrolló en 2015 una librería de compuestos inhibidores de PD-1/PD-L1 basados en derivados bifenilicos. De esta librería destacan BMS-202 y BMS-8 (véanse las estructuras en la Figura 1.20), que inhiben la interacción de estas dos proteínas al unirse a PD-L1 y provocar su dimerización.⁹³

⁹⁰ Sasikumar, P.G.; Sudarshan, N.S.; Adurthi, S.; Ramachandra, R.K.; Samiulla, D.S.; Lakshminarasimhan, A.; Ramanathan, A.; Chandrasekhar, T.; Dhudashiya, A.A.; Talapati, S.R.; Gowda, N.; Palakolanu, S.; Mani, J.; Srinivasrao, B.; Joseph, D.; Kumar, N.; Nair, R.; Atreya, H.S.; Gowda, N.; Ramachandra, M. PD-1 derived CA-170 is an oral immune checkpoint inhibitor that exhibits preclinical anti-tumor efficacy. *Commun. Biol.* **2021**, *4*, 699. Doi: 10.1038/s42003-021-02191-1.

⁹¹ Koblisch, H.K.; Wu, L.; Wang, L.S.; Liu, P.C.C.; Wynn, R.; Rios-Doria, J.; Spitz, S.; Liu, H.; Volgina, A.; Zolotarjova, N.; Kapilashrami, K.; Behshad, E.; Covington, M.; Yang, Y.O.; Li, J.; Diamond, S.; Soloviev, M.; O'Hayer, K.; Rubin, S.; Kanellopoulou, C.; Yang, G.; Rupar, M.; DiMatteo, D.; Lin, L.; Stevens, C.; Zhang, Y.; Thekkat, P.; Geschwindt, R.; Marando, C.; Yeleswaram, S.; Jackson, J.; Scherle, P.; Huber, R.; Yao, W.; Hollis, G. Characterization of INCB086550: A Potent and Novel Small-Molecule PD-L1 Inhibitor. *Cancer Discov.* **2022**, *12*, 1482-1499. Doi: 10.1158/2159-8290.CD-21-1156.

⁹² Wu, Y.; Yang, Z.; Cheng, K.; Bi, H.; Chen, J. Small molecule-based immunomodulators for cancer therapy. *Acta Pharm. Sin. B.* **2022**, *12*, 4287-4308. Doi: 10.1016/j.apsb.2022.11.007.

⁹³ Zak, K.M.; Grudnik, P.; Guzik, K.; Zieba, B.J.; Musielak, B.; Dömling, A.; Dubin, G.; Holak, T.A. Structural basis for small molecule targeting of the programmed death ligand 1 (PD-L1). *Oncotarget.* **2016**, *7*, 30323-30335. Doi: 10.18632/oncotarget.8730.

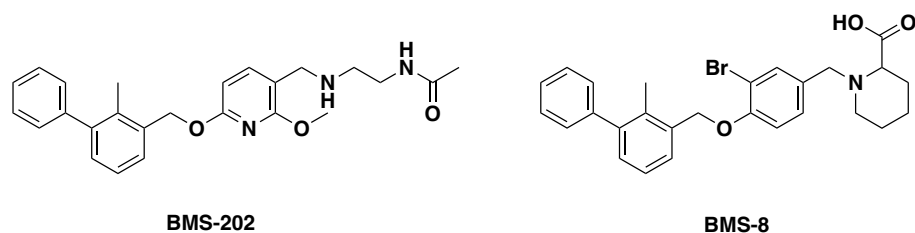


Figura 1.20. Inhibidores de la interacción PD-1/PD-L1 desarrollados por BMS.

Las estructuras de estos compuestos, que se encuentran en estudios preclínicos, han servido de inspiración para el diseño de muchos otros inhibidores basados en moléculas pequeñas.

Mucho queda por hacer en este campo de investigación, sobre todo si se tiene en cuenta la interconexión en el TME de muchas vías de señalización, lo que incrementa el interés en el desarrollo de nuevos fármacos multidiana o en la administración de terapias combinadas.

1.4. Química Médica

En el proceso de descubrimiento de nuevos fármacos, es vital conocer los procesos que se encuentran desregulados por la enfermedad con el fin de diseñar nuevos fármacos que bloqueen o alteren estos procesos. El descubrimiento y aprobación de un nuevo fármaco consta de diferentes etapas que pueden durar entre 12 y 15 años y en las que se ven interconectadas diferentes disciplinas. En este largo y costoso proceso alrededor de uno de cada 10.000 compuestos estudiados acaba siendo comercializado como fármaco (véase la Figura 1.21).⁹⁴

El desarrollo del nuevo fármaco comienza con el diseño, optimización y formulación de posibles moléculas activas dirigidas a una diana biológica, entendiendo por diana biológica aquellas proteínas, genes y otras moléculas a los que se dirigen los tratamientos.⁹⁵ Esta fase, junto a los estudios preclínicos de las nuevas moléculas, es la que conlleva un mayor tiempo y en ella la Química Médica juega un papel muy importante.

⁹⁴ Deore, A.B.; Dhumane, J.R.; Wagh, H.V.; Sonawane, R.B. The stages of drug discovery and development process. *Asian J. Pharm. Res. Dev.* **2019**, *7*, 62-67. Doi:10.22270/ajprd.v7i6.616.

⁹⁵ Sitio web oficial Instituto nacional del cáncer: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/> (Consultado en marzo de 2023).

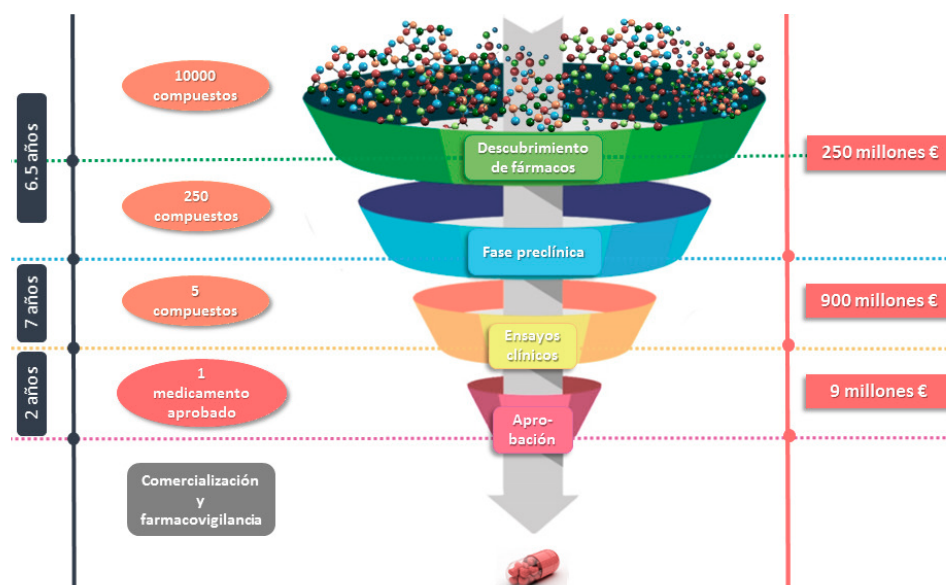


Figura 1.21. Proceso de comercialización de un fármaco.⁹⁶

Según la definición de la IUPAC (International Union for Pure and Applied Chemistry), la Química Médica es la disciplina encargada del descubrimiento, desarrollo, identificación e interpretación del modo de acción de compuestos biológicamente activos a nivel molecular. Además, esta disciplina también estudia el comportamiento metabólico y la relación estructura-actividad de los compuestos.⁹⁷ Para ello, la Química Médica ha de tener en consideración la farmacodinamia y la farmacocinética de las moléculas diseñadas,⁹⁸ con el fin de asegurar que estas sean seguras y provoquen un bajo grado de efectos secundarios.

La farmacodinamia hace referencia a la interacción de dichos compuestos activos con las dianas biológicas. En esta parte se llevan a cabo modificaciones estructurales con el fin de optimizar las interacciones del compuesto con su diana, haciéndolos más efectivos y selectivos.

La farmacocinética estudia el tiempo que permanece un fármaco en el cuerpo, desde su administración hasta su eliminación. A este proceso se lo conoce como ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción) y su

⁹⁶ Sitio web: <https://blogs.20minutos.es/ciencia-para-llevar-csic/2019/03/28/sabes-cuanto-tarda-un-nuevo-medicamento-en-llegar-a-tus-manos/> (Descargada en marzo de 2023).

⁹⁷ Imming, P. Medicinal Chemistry: Definitions and Objectives, Drug Activity Phases, Drug Classification Systems. *The Pract. Med. Chem.* **2015**, 3, 13. Doi: 10.1016/b978-0-12-417205-0.00001-8.

⁹⁸ Patrick, G. Medicinal Chemistry. *Instant notes.* **2006**, ISBN: 1-85996-207-6.

estudio proporciona la biodisponibilidad del fármaco, es decir, la concentración del fármaco disponible en el sitio de acción.⁹⁹

El descubrimiento de nuevos fármacos ha evolucionado considerablemente. En sus orígenes, los fármacos se diseñaban a partir de una gran batería de compuestos mediante estudios de prueba y error. Hay muchos ejemplos de fármacos descubiertos mediante este procedimiento, que se utilizan aún hoy en día. También cabe mencionar la obtención de fármacos a partir de productos naturales o modificaciones de los mismos, que permiten mejorar sus propiedades terapéuticas y/o su biodisponibilidad. Hoy en día, sin embargo, el diseño de los nuevos fármacos se encuentra dirigido de forma racional a una diana concreta gracias al desarrollo de técnicas computacionales que realizan un cribado virtual de estructuras que pueden interactuar con la diana escogida.¹⁰⁰

El cáncer, por su parte, es una enfermedad muy estudiada a nivel molecular, lo cual permite diseñar nuevos compuestos dirigidos a aquellas dianas con mayor implicación en la enfermedad. Como se ha explicado, el cáncer consta de muchos procesos desregulados que favorecen la conocida como resistencia a fármacos, lo que ha hecho necesario la aplicación de terapias combinadas o la aparición de fármacos multidiana. Estos últimos consisten en moléculas que tienen la capacidad de interactuar con diversas dianas al mismo tiempo (véase la Figura 1.22). El diseño de fármacos multidiana constituye un reto mayor, pero proporciona ciertas ventajas respecto a las terapias combinadas, las cuales, al consistir en la administración de diversos fármacos al mismo tiempo, se encuentran con la problemática de incluir ambos en una única formulación.

⁹⁹ Doogue, M.P.; Polasek, T.M. The ABCD of clinical pharmacokinetics. *Ther. Adv. Drug Saf.* **2013**, *4*, 5-7. Doi: 10.1177/2042098612469335.

¹⁰⁰ Doytchinova, I. Drug Design-Past, Present, Future. *Molecules.* **2022**, *27*, 1496. Doi: 10.3390/molecules27051496.

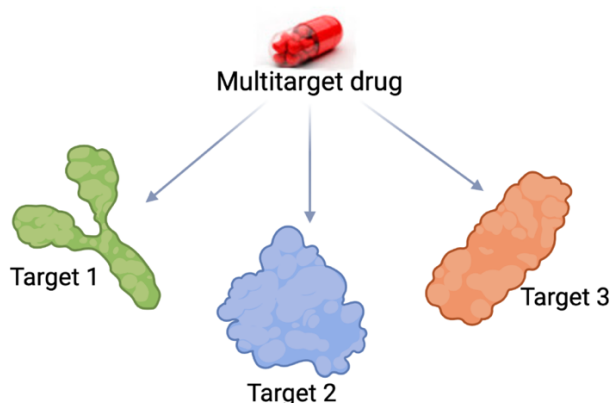


Figura 1.22. Compuestos multidiana.⁸

La cantidad de fármacos multidiana aprobados por la FDA ha ido en aumento durante los últimos años, constituyendo el 21% de los fármacos comercializados entre 2015 y 2017.¹⁰¹ En el caso del cáncer, algunos de los fármacos ya comercializados, como el sorafenib o el sunitinib, son considerados agentes multidiana al tratarse de inhibidores multiquinasa. Además de éstos, existen algunos fármacos con actividad dual, como el lapatinib, aprobado por la FDA en 2007 (véase la estructura en la Figura 1.23), que es un inhibidor reversible de HER-2 (human epidermal growth factor receptor-2) y EGFR (epidermal growth factor receptor), y duvelisib (véase la estructura en la Figura 1.23), un inhibidor de PI3K- δ y PI3K- γ , que está dando muy buenos resultados en clínica. La investigación de nuevos compuestos con actividad dual es considerada una estrategia muy prometedora en el tratamiento del cáncer.¹⁰²

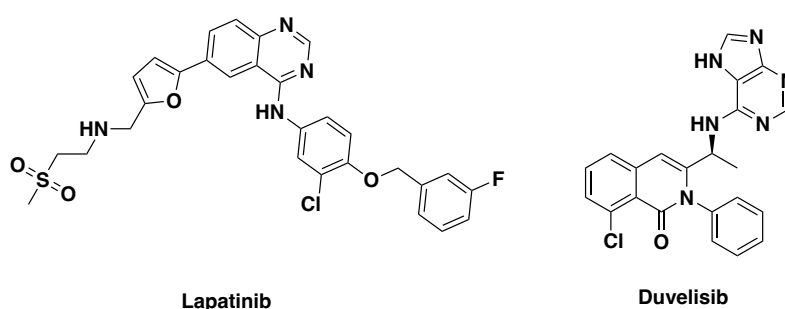


Figura 1.23. Estructuras de inhibidores multidiana en el cáncer.¹⁰³

¹⁰¹ Sánchez-Tejeda, J.F.; Sánchez-Ruiz, J.F.; Salazar, J.R.; Loza-Mejía, M.A. A Definition of "Multitargeticity": Identifying Potential Multitarget and Selective Ligands Through a Vector Analysis. *Front. Chem.* **2020**, *8*, 176. Doi: 10.3389/fchem.2020.00176.

¹⁰² Makhoba, X.H.; Viegas, C.Jr.; Mosa, R.A.; Viegas, F.P.D.; Pooe, O.J. Potential Impact of the Multi-Target Drug Approach in the Treatment of Some Complex Diseases. *Drug Des. Devel. Ther.* **2020**, *14*, 3235-3249. Doi: 10.2147/DDDT.S257494.

¹⁰³ Sitio web de la librería nacional de medicina: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound> (Consultado en abril 2023).

En esta Tesis se han estudiado diversos compuestos con potencial actividad frente a varias dianas, las cuales se han escogido debido a sus implicaciones en la enfermedad del cáncer. Las dianas escogidas son PD-L1, como regulador del bloqueo inmunológico; c-Myc, considerado el principal regulador del TME y VEGFR-2, el principal mediador de la señal de VEGF, el cual tiene un papel fundamental en la angiogénesis y en la regulación del sistema inmune.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

La presente tesis doctoral se enmarca en el campo de la investigación básica del cáncer, siendo su objetivo general la síntesis y evaluación biológica de una serie de moléculas con potencial actividad anticáncer.

Como ya se ha mencionado, son muchos los procesos desregulados en esta enfermedad, lo que hace necesario bloquear varios de estos procesos al mismo tiempo con el objetivo último de detener la progresión tumoral. Para ello, se han diseñado dos familias de compuestos con potencial actividad frente a tres dianas biológicas de especial relevancia en la progresión tumoral: PD-L1, c-Myc y VEGFR-2.

Los objetivos específicos de la tesis son los siguientes:

- Sintetizar una batería de derivados de triazol cuya estructura general se muestra como **E.III** en la Figura 2.1, con potencial actividad dual frente a PD-L1 y c-Myc.
- Sintetizar una batería de derivados de diarilurea cuya estructura se muestra como **U.III** en la Figura 2.1, con potencial actividad dual frente a PD-L1 y VEGFR-2.

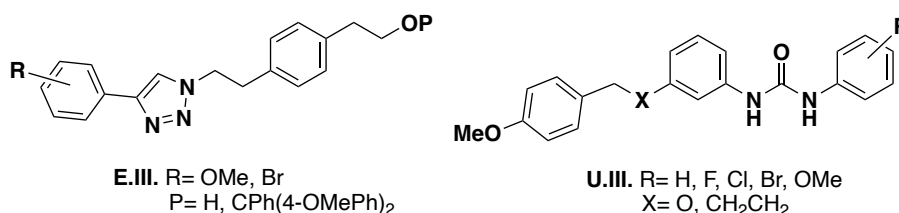


Figura 2.1. Estructuras generales de los compuestos.

- Evaluar la acción biológica de ambas familias de compuestos mediante la medición de su efecto: sobre la viabilidad celular en líneas tumorales y no tumorales, sobre las dianas biológicas de interés para cada una de ellas y sobre distintas células del sistema inmunológico.

3. DERIVADOS DE TRIAZOL

3. DERIVADOS DE TRIAZOL

3.1. Diseño de los derivados de triazol

Tal y como se ha explicado en la introducción de esta Tesis, el primer paso para el diseño de potenciales agentes anticancerígenos es determinar las dianas biológicas que se pretenden inhibir. Así, para esta primera familia de compuestos se propuso el diseño de moléculas que tuvieran capacidad inhibidora multidiana frente a PD-L1 y c-Myc, con el objetivo de obtener nuevos agentes inmunomoduladores, ya que, como se ha visto, PD-L1 es considerado uno de los principales reguladores del sistema inmunológico en el TME, mientras que c-Myc, por su parte, no solo es capaz de favorecer la expresión de PD-L1, sino que, a su vez, está involucrado en la regulación de muchos otros procesos que favorecen el proceso oncológico. De esta forma, la inhibición de ambas dianas podría tener un efecto sinérgico en la detención de la progresión tumoral.

El diseño de inhibidores de PD-L1 es posible gracias a la contribución realizada por el grupo de T. A. Holak, que consiguió elucidar las estructuras cristalinas de los complejos que los inhibidores diseñados por BMS formaban con el dímero de PD-L1. Esta elucidación permitió obtener un modelo de farmacóforo para estos inhibidores.¹⁰⁴ Este modelo consta de tres componentes estructurales importantes: el primero de ellos ha de ocupar la cavidad hidrofóbica de PD-L1 y en el caso de los compuestos de BMS esta la ocupa un sistema bifenílico, el segundo componente estructural ha de ocupar la zona central plana del sitio de unión y, a su vez, servir de eslabón entre los otros dos componentes y, finalmente, el tercer componente estructural se ha de posicionar en una zona polar que puede extenderse en mayor medida que las anteriores.¹⁰⁵

De esta forma, teniendo en cuenta el modelo de farmacóforo propuesto, así como trabajos anteriores realizados en nuestro grupo de

¹⁰⁴ Muszak, D.; Surmiak, E.; Plewka, J.; Magiera-Mularz, K.; Kocik-Krol, J.; Musielak, B.; Sala, D.; Kitel, R.; Stec, M.; Weglarczyk, K.; Siedlar, M.; Dömling, A.; Skalniak, L.; Holak, T.A. Terphenyl-Based Small-Molecule Inhibitors of Programmed Cell Death-1/Programmed Death-Ligand 1 Protein-Protein Interaction. *J. Med. Chem.* **2021**, 64, 11614-11636. Doi: 10.1021/acs.jmedchem.1c00957.

¹⁰⁵ Guzik, K.; Zak, K.M.; Grudnik, P.; Magiera, K.; Musielak, B.; Törner, R.; Skalniak, L.; Dömling, A.; Dubin, G.; Holak, T.A. Small-Molecule Inhibitors of the Programmed Cell Death-1/Programmed Death-Ligand 1 (PD-1/PD-L1) Interaction via Transiently Induced Protein States and Dimerization of PD-L1. *J. Med. Chem.* **2017**, 60, 5857-5867. Doi: 10.1021/acs.jmedchem.7b00293.

investigación,^{106,107} en los que se vio que compuestos con un anillo de triazol en su estructura (véase **E.I** y **E.II** en la Figura 3.1), daban buenos resultados inhibiendo tanto PD-L1 como c-Myc, se propusieron unos nuevos derivados cuya estructura general se refleja en la estructura **E.III** de la Figura 3.1.

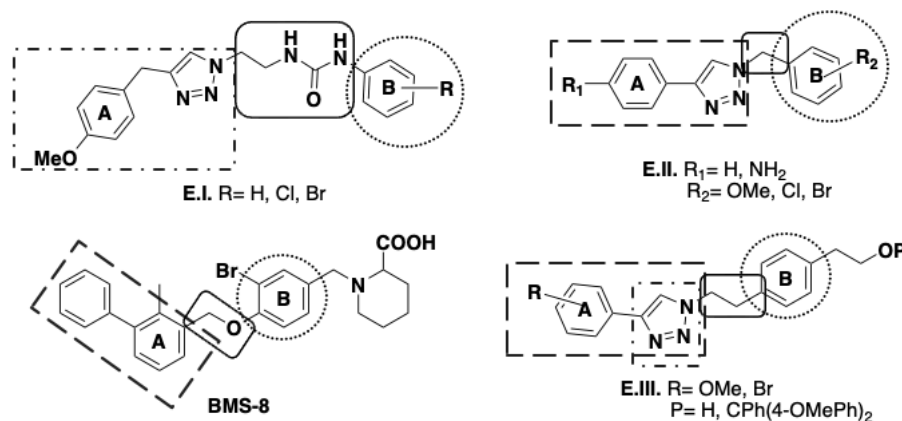


Figura 3.1. Estructura general de derivados con potencial actividad inmunomoduladora.

Los nuevos análogos **E.III** constan de una estructura biarílica con el anillo A unido directamente al anillo de triazol. Por otro lado, y con respecto al derivado **E.I**, se reduce la longitud del espaciador que conecta el anillo de triazol con el anillo B, mediante un grupo etilo, haciéndolo de esta forma más similar a la estructura de BMS-8 (véase la Figura 3.1). Finalmente, y en relación con los análogos estudiados previamente en el grupo, se alarga la cadena contigua al anillo B. Para corroborar que estos cambios eran adecuados, se llevaron a cabo estudios de modelización molecular partiendo de la proteína obtenida en la base de datos RCS PDB con código identificativo 5J89. Estos estudios revelaron que la unidad formada por el anillo A y el anillo de triazol establecían interacciones de π -stacking con los residuos aromáticos de la cadena B del dímero de PD-L1, mientras que el anillo B se colocaba en la cavidad hidrofóbica de la cadena A de PD-L1 dimérico (véase la Figura.3.2).

¹⁰⁶ Pla-López, A.; Castillo, R.; Cejudo-Marín, R.; García-Pedrero, O.; Bakir-Laso, M.; Falomir, E.; Carda, M. Synthesis and Biological Evaluation of Small Molecules as Potential Anticancer Multitarget Agents. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, 23, 7049. Doi:10.3390/ijms23137049.

¹⁰⁷ Conesa-Milián, L.; Falomir, E.; Murga, J.; Carda, M.; Marco, J.A. Novel multitarget inhibitors with antiangiogenic and immunomodulator properties. *Eur. J. Med. Chem.* **2019**, 148, 87–98. Doi:10.1016/j.ejmech.2019.03.012.

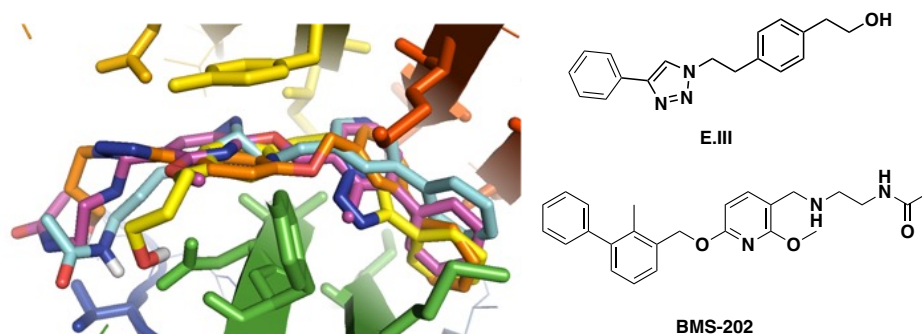


Figura 3.2. Modelización molecular en el sitio de unión de PD-L1. Superposición de **E-III** (amarillo) y **BMS-202** (rosa).

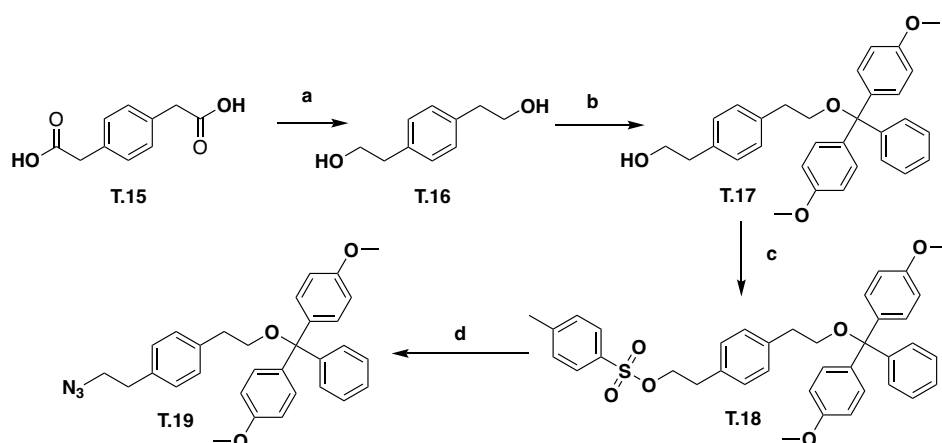
3.2. Síntesis de los derivados de triazol

La etapa clave en la síntesis de los derivados con estructura general **E.III** fue la reacción de cicloadición entre azidas de alquilo y los correspondientes aril-alquinos. El químico K. B. Sharpless fue el que desarrolló la metodología para la obtención, de manera regioselectiva, de anillos de triazol 1,4-disustituidos, denominando a este tipo de reacciones como *Click Chemistry*. Este concepto fue introducido en 2001 para describir reacciones de alto rendimiento, sin formación de subproductos, con economía atómica, que originan subproductos que se pueden eliminar sin cromatografía y que son fáciles de llevar a cabo empleando, además, disolventes benignos. K. B. Sharpless, junto a C. R. Bertozzi y M. P. Mendal, fue galardonado con el premio Nobel de Química en el año 2022 por asentar las bases de la *Click Chemistry*.¹⁰⁸

Para llevar a cabo la cicloadición fue necesaria la preparación previa de la azida y de los correspondientes alquinos. La ruta sintética seguida para la síntesis de la azida de interés (compuesto denominado en esta Tesis como **T.19**) se encuentra detallada en el Esquema 3.1. Así, el ácido comercialmente accesible 2,2'-(1,4-fenileno)diacético **T.15**, fue reducido a 2,2'-(1,4-fenileno)bis(etan-1-ol) **T.16** por reacción con $\text{BH}_3 \cdot \text{SMe}_2$. El diol **T.16** fue monoprottegido por reacción con cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo, lo que llevó a la obtención del compuesto **T.17**.¹⁰⁹ Este compuesto se convirtió en el tosilato **T.18**, el cual, mediante reacción con azida sódica en DMF, proporcionó la azida **T.19**.

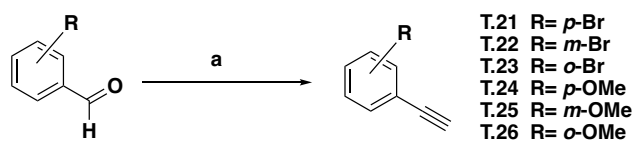
¹⁰⁸ Sitio web: <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/> (Consultado en marzo de 2023).

¹⁰⁹ Kwiatkowski, S.; Sviripa, V.M.; Zhang, Z.; Wendlandt, A.E.; Höbartner, Watt, D.S.; Stamm, S. Synthesis of a norcantharidin-tethered guanosine: Protein phosphatase-1 inhibitors that change alternative splicing. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, 26, 965-968. Doi: 10.1016/j.bmcl.2015.12.054.



Esquema 3.1. Ruta sintética para la formación de la azida **T.19**. Reactivos y condiciones: (a) $\text{BH}_3 \cdot \text{SMe}_2$, THF anhidro, temp. amb., 12 h (97 %); (b) cloruro de 4,4'-dimetoxitritilo, Et_3N , DMAP, CH_2Cl_2 , temp. amb., 22 h (35 %); (c) TsCl , Et_3N , DMAP, CH_2Cl_2 , temp. amb., 4 h (62 %); (d) NaN_3 , DMF, 50 °C, 3 h (83 %).

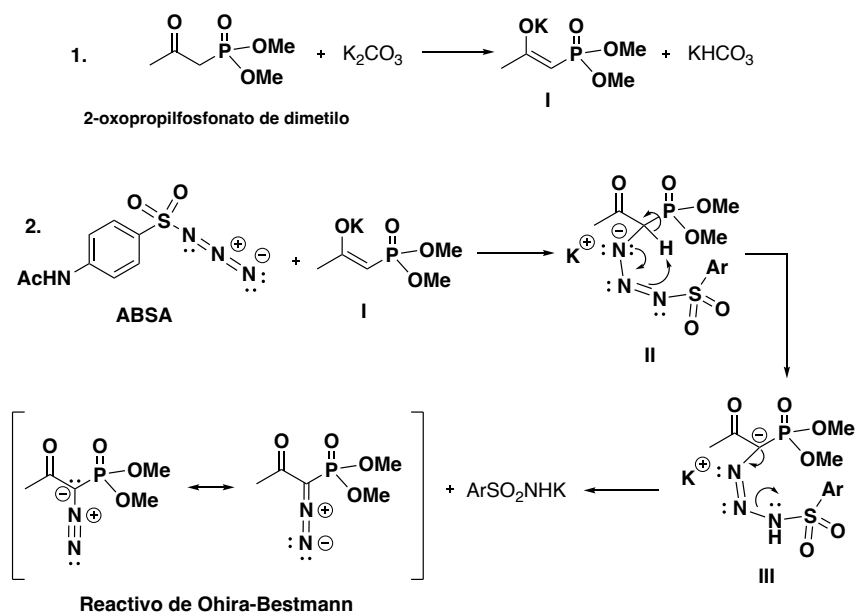
Por otro lado, la síntesis de los correspondientes alquinos no comerciales se llevó a cabo mediante la reacción de Ohira-Bestmann,¹¹⁰ un proceso que permite obtener alquinos terminales a partir de aldehídos (véase el Esquema 3.2.).



Esquema 3.2. Ruta sintética para la formación de los alquinos. Reactivos y condiciones: (a) 2-Oxopropilfosfonato de dimetilo, K_2CO_3 , ABSA, MeCN, temp. amb., 2 h luego adición del aldehído, MeOH, temp. amb., 15 h.

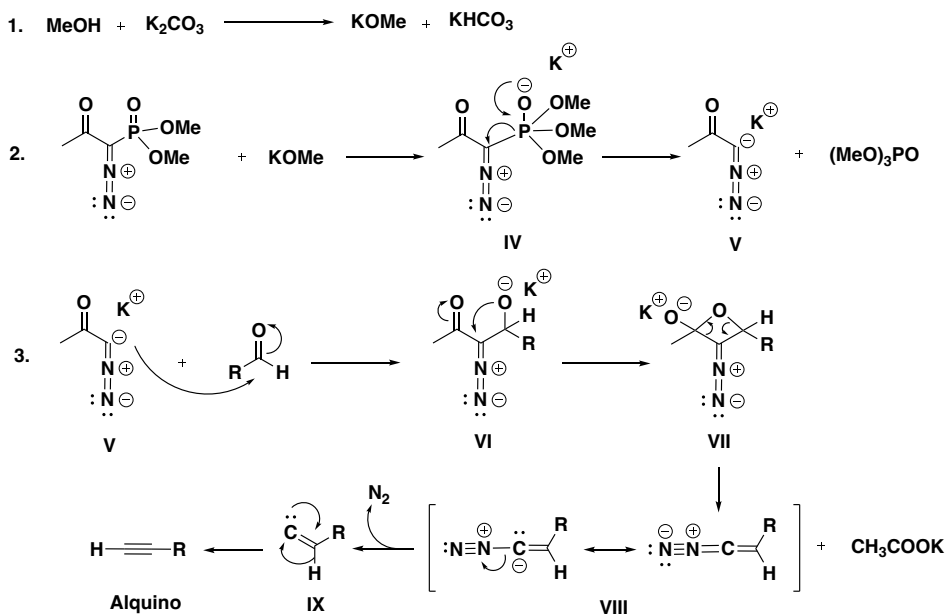
El reactivo de Ohira-Bestmann, necesario para conseguir la transformación indicada en el Esquema 3.2, se genera *in situ* a partir del 2-oxopropilfosfonato de dimetilo (véase el Esquema 3.3). Así, la reacción del 2-oxopropilfosfonato de dimetilo con carbonato potásico forma el enolato potásico **I** que ataca a la 4-acetamidobencenosulfonil azida (ABSA) para formar el intermedio **II**. Este intermedio captura un protón de manera intramolecular dando lugar al intermedio **III**, el cual, por eliminación del 4-acetamidobencenosulfonato potásico, forma el reactivo de Ohira-Bestmann 1-diazo-2-oxopropilfosfonato de dimetilo.

¹¹⁰ Jepsen, T.H.; Kristensen, J.L. In situ generation of the Ohira-Bestmann reagent from stable sulfonyl azide: scalable synthesis of alkynes from aldehydes. *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 9423-9226. Doi: 10.1021/jo501803f.



Esquema 3.3. Mecanismo de formación del reactivo de Ohira-Bestmann.

El alquino terminal se obtiene adicionando el aldehído correspondiente, disuelto en metanol, a la mezcla de reacción que contiene el reactivo de Ohira-Bestmann. El mecanismo de esta reacción se describe en el Esquema 3.4.

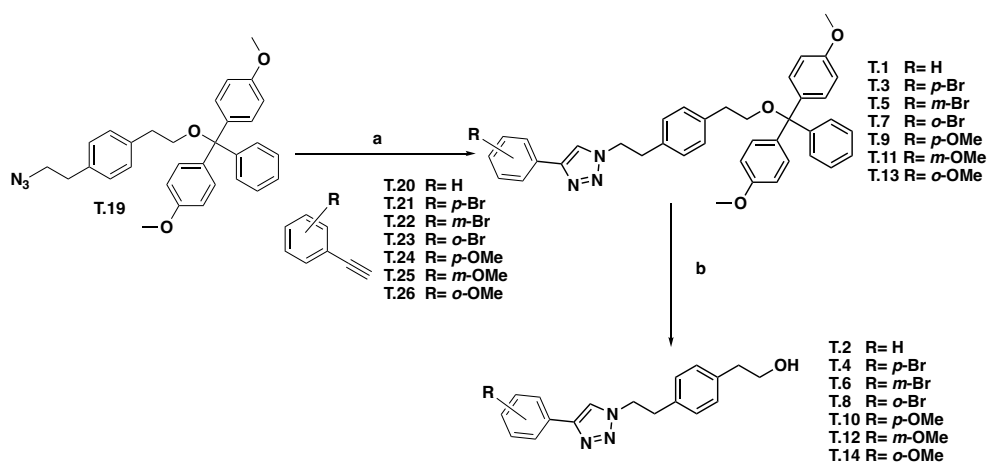


Esquema 3.4. Mecanismo para la formación del alquino.

Así, la reacción del metanol con carbonato potásico forma metóxido potásico que se adiciona a la parte de fosfonato de dimetilo del reactivo de Ohira-Bestmann. Esto genera el intermedio **IV** que elimina fosfato de trimetilo y forma el intermedio **V**. Éste se adiciona al aldehído para originar

el alcóxido **VI**, el cual se transforma en el oxafosfetano **VII**. La cicloeliminación en el oxafosfetano origina el diazoalqueno **VIII**, el cual pierde nitrógeno convirtiéndose en el vinilidencarbeneo **IX**. Este intermedio forma el alquino mediante migración 1,2 de hidruro.

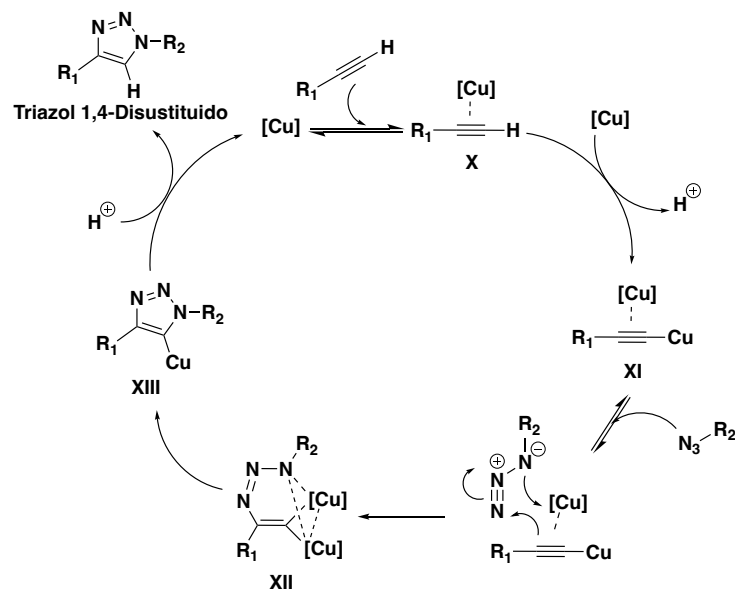
Finalmente, la reacción de tipo *click* se llevó a cabo calentando a 60 °C la mezcla de reacción entre la azida **T.19** con el correspondiente alquino **T.20-T.26** en una mezcla DMF/H₂O y en presencia de sulfato cúprico y ácido ascórbico. Esta reacción proporcionó los derivados de triazol protegidos **T.1**, **T.3**, **T.5**, **T.7**, **T.9**, **T.11**, y **T.13** (véase el Esquema 3.5). Estos compuestos se convirtieron en los alcoholes **T.2**, **T.4**, **T.6**, **T.8**, **T.10**, **T.12**, y **T.14** mediante desprotección con ácido trifluoroacético en metanol.



Esquema 3.5. Ruta sintética para la formación de los alquinos. Reactivos y condiciones: (a) Alquino (**T.20-T.26**), CuSO₄·5H₂O, ascorbato de sodio, DMF:H₂O 9:1, 60 °C, 2 h; (b) F₃CCOOH, MeOH, temp. amb., 30 min.

La formación regioselectiva de los triazoles 1,4-disustituidos se debe a la presencia de Cu(I), que se genera *in situ* por reducción del sulfato cúprico con ascorbato sódico. El ciclo catalítico de esta reacción se puede ver en el Esquema 3.6 y se inicia con la coordinación del Cu(I) al triple enlace (Intermedio **X**), lo que aumenta la acidez del alquino terminal y permite la formación de un alquinuro de cobre (Intermedio **XI**). La coordinación de este intermedio **X** con un segundo Cu(I) permite la reacción de cicloadición del intermedio **XI** con la azida y la generación de un inusual metalacido de cobre de seis miembros, estabilizado por el segundo átomo de cobre que actúa como un ligando donante (Intermedio **XII**). La contracción del anillo forma un derivado de triazolil-cobre (Intermedio **XIII**) que experimenta una protonólisis

para dar lugar al triazol 1,4-disustituido y Cu(I), completándose así, el ciclo catalítico.¹¹¹



Esquema 3.6. Mecanismo de la reacción de tipo *Click* catalizada por Cu(I).

¹¹¹ Worell, B.T.; Malik, J.A.; Fokin, V.V. Direct evidence of a dinuclear copper intermediate in Cu(I)-catalyzed azide-alkyne cycloadditions. *Science* **2013**, *340*, 457-460. Doi: 10.1126/science.1229506.

4. EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LOS DERIVADOS DE TRIAZOL

4. EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LOS DERIVADOS DE TRIAZOL

4.1. Introducción a los estudios biológicos

Para discernir si los compuestos sintetizados eran biológicamente activos se llevaron a cabo una serie de estudios *in vitro* en diferentes líneas celulares tumorales y no tumorales. Mediante los ensayos que se describirán a continuación se determinó la potencial actividad antitumoral de los derivados midiendo su capacidad antiproliferativa así como su capacidad para inhibir PD-L1 y c-Myc.

Las líneas celulares tumorales utilizadas fueron adenocarcinoma de colon (HT-29), adenocarcinoma de pulmón (A549) y adenocarcinoma de mama (MCF-7). En la Figura 4.1 se pueden apreciar las diferentes morfologías de los tres tipos de células tumorales.

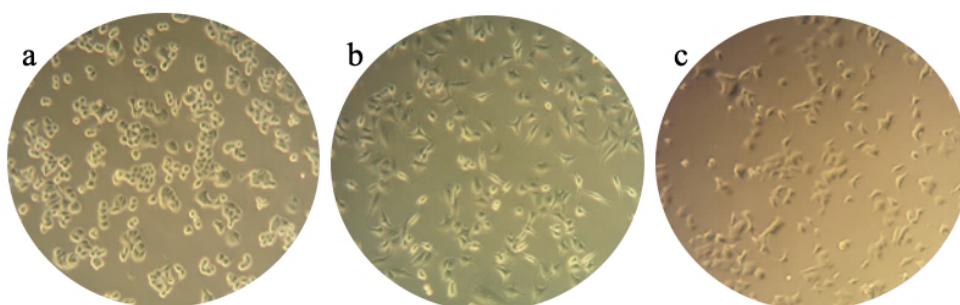


Figura 4.1. Líneas celulares tumorales. (a) HT-29; (b) A-549; (c) MCF-7.

La primera de ellas, HT-29, fue aislada de un tumor primario de una mujer caucásica de 44 años en 1964 por J. Fogh y G. Trempe. Esta es una línea celular muy utilizada para el estudio de diferentes aspectos de la biología del cáncer al tratarse de una línea muy estable en el medio de cultivo.¹¹² Por su parte, A-549 es la línea más utilizada para el estudio del cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). Esta línea celular fue aislada por D.J. Giard y su grupo de investigación en 1972 de un hombre caucásico de 58 años.¹¹³ Finalmente, MCF-7 es la línea celular más utilizada para el estudio del cáncer de mama. Fue desarrollada por H. D. Soule en 1970 al aislar las células tras un derrame pleural de un tumor metastizado de una mujer

¹¹² Martínez-Maqueda, D.; Miralles, B.; Recio, I. HT29 Cell Line. *The Impact of Food Bioactives on Health (Springer)*. **2015**, 113-124. Doi:10.1007/978-3-319-16104-4_11.

¹¹³ Giard, D.J.; Aaronson, S.A.; Todaro, G.J.; Arnstein, P.; Kersey, J.H.; Dosik, H.; Parks, W.P. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **1973**, 51, 1417-1423. Doi: 10.1093/jnci/51.5.1417.

blanca de 69 años llamada Helen Marlon. Las siglas de esta línea celular provienen de “Michigan Cancer Foundation”, lugar en el que se desarrolló al séptimo intento.¹¹⁴

Además de las líneas tumorales, en este trabajo se han utilizado, según las especificaciones de cada ensayo, diferentes líneas celulares no cancerosas. Estas son: una línea de células humanas embrionarias de riñón (HEK-293), una línea de células endoteliales de la microvasculatura humana (HMEC-1), una línea de células T inmortalizadas (JURKAT T) y una línea de células monocíticas humanas de leucemia (THP-1). La Figura 4.2 recoge las diferentes morfologías de estas células.

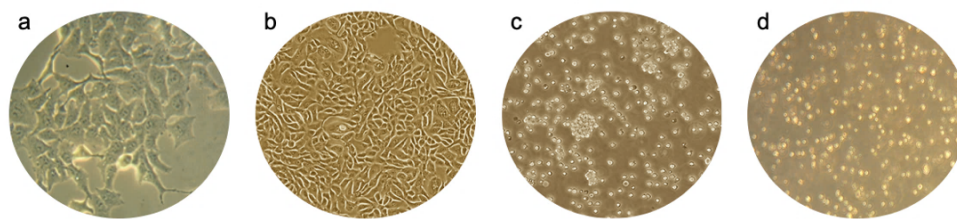


Figura 4.2. Líneas celulares no tumorales. (a) HEK-293; (b) HMEC-1¹¹⁵; (c) JURKAT¹¹⁹; (d) THP-1.

HEK-293 fue obtenida el año 1977 por F.L. Graham, aunque fue previamente aislada en 1970 por su mentor A. Van der Eb. Es una línea inmortalizada de células embrionarias de riñón que fue obtenida por transformación de cultivos de riñón embrionario humano normal con ADN de adenovirus 5.¹¹⁶ Esta línea celular es comúnmente utilizada en la investigación en cáncer como control en estudios de nuevos tratamientos en células cancerosas específicas.¹¹⁷ Por otro lado, HMEC-1 es una línea de células inmortalizadas desarrollada para facilitar el estudio de las células endoteliales. HMEC-1 se obtuvo al transfectar células endoteliales microvasculares dermatológicas con el plásmido basado en PBR-322.¹¹⁸

En lo que respecta a las líneas de células defensivas, las JURKAT son una línea de células T clonadas de la línea original extraídas del torrente

¹¹⁴ Lee, A.V.; Oesterreich, S.; Davidson, N.E. MCF-7 cells-changing the course of breast cancer research and care for 45 years. *J. Natl. Cancer Inst.* **2015**, *107*, djv073. Doi: 10.1093/jnci/djv073.

¹¹⁵ Sitio web: bioscience.lonza.com (Consultada mayo 2023).

¹¹⁶ Graham, F.L.; Smiley, J.; Russell, W.C.; Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **1977**, *36*, 59-74. Doi: 10.1099/0022-1317-36-1-59.

¹¹⁷ Sitio web: <https://www.synthego.com/hek293> (Consultado en abril de 2023).

¹¹⁸ Ades, E.W.; Candal, F.J.; Swerlick, R.A. George, V.G.; Summers, S.; Bosse, D.C.; Lawley, T.J. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J. Invest. Dermatol.* **1992**, *99*, 683-690. Doi: 10.1111/1523-1747.ep12613748.

sanguíneo periférico de un paciente de leucemia aguda de 14 años a finales de la década de los 70.¹¹⁹ La línea clonada Jurkat-E6, actualmente reconocida como la línea estándar de células JURKAT, es capaz de producir IL-2 al haber sido estimulado con ésteres de forbol, lo que es clave para el mantenimiento de estas células en el medio de cultivo. Esta es una línea muy utilizada en investigación del sistema inmune adaptativo y ha permitido elucidar la cascada de señalización de los TCR.¹²⁰ Por su parte, la línea THP-1 de monocitos también fue aislada del torrente sanguíneo periférico, esta vez, de un paciente de un año con leucemia aguda monocítica. Esta línea, desarrollada en 1980, ha sido muy utilizada desde entonces para investigar tanto la estructura como la respuesta inmune, no solo de los monocitos sino también de los macrófagos derivados de éstos en tejido canceroso y en tejido sano.¹²¹

4.1.1. Estudio de viabilidad celular

El primer estudio que se llevó a cabo fue el de viabilidad celular, la cual se entiende como el número de células metabólicamente activas presentes en una muestra. El estudio de la viabilidad celular está asociado al estudio de la proliferación celular, mediante el cual se obtiene información acerca de los mecanismos de acción de ciertos genes, proteínas o cascadas de señalización involucradas en la supervivencia celular tras entrar en contacto con diferentes agentes.¹²²

Existen muchas técnicas para estudiar la viabilidad celular, de esta forma, la técnica utilizada va a depender de la información que se desea extraer del ensayo. Así, en este trabajo, se distinguirán dos técnicas, la primera de ellas, se realizará en monocultivo, es decir, en presencia de una única línea celular. Esta técnica, que se conoce como ensayo MTT, permite obtener el valor de IC₅₀ y, por tanto, conocer cuál es la mejor concentración de trabajo para cada compuesto.

En esta Tesis también se ha medido la viabilidad celular en co-cultivo, que se caracteriza por el crecimiento conjunto de dos o más líneas celulares a

¹¹⁹ Sitio web: <https://www.atcc.org/products/tib-152> (Consultado en abril de 2023).

¹²⁰ Abraham, R.T.; Weiss, A. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat. Rev. Immunol.* **2004**, *4*, 301-308. Doi: 10.1038/nri1330.

¹²¹ Chanput, W.; Mes, J.J.; Wichers, H.J. THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *Int. Immunopharmacol.* **2014**, *23*, 37-45. Doi: 10.1016/j.intimp.2014.08.002.

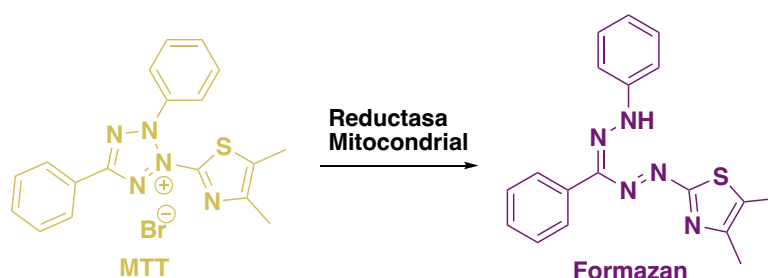
¹²² Adan, A.; Kiraz, Y.; Baran, Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **2016**, *17*, 1213-1221. Doi: 10.2174/1389201017666160808160513.

fin de observar cómo estas interaccionan entre sí.¹²³ En este caso, la viabilidad celular se midió mediante la técnica de citometría de flujo.

4.1.1.1. Ensayo de MTT

Este ensayo se llevó a cabo con el fin de evaluar la concentración a la cual los compuestos no producen una toxicidad directa en las células y determinar las dosis a las que éstos se van a administrar en el resto de los ensayos. En este ensayo se obtuvo el valor de IC₅₀ de cada compuesto, el cual hace referencia a la concentración a la que un compuesto es capaz de inhibir la proliferación celular en un 50 % respecto al control celular (células sin tratar).

El ensayo MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) se basa en conversión de esta sal de tetrazolio, que es de color amarillo, en formazán, de color morado, por la acción de las células metabólicamente activas. La responsable de la reducción del MTT en formazán es la enzima reductasa que se encuentra en las mitocondrias de las células vivas (véase Esquema 4.1), por lo que es posible correlacionar la concentración de formazán con la cantidad de células vivas presentes en el cultivo estudiado.¹²⁴



Esquema 4.1. Reducción del MTT a formazán.

Para cuantificar la cantidad de formazán, este se solubiliza en dimetilsulfóxido (DMSO) y, a continuación, se mide la absorbancia a 550 nm con un espectrofotómetro. Finalmente, se realiza un ajuste de los resultados obtenidos para cada concentración a una representación sinusoidal, cuyo punto de inflexión se corresponde con el valor de IC₅₀. Para este ajuste se utiliza el programa GraphPad Prism 4. En la Figura 4.3 se muestra una placa de células en la que se ha realizado el ensayo y se puede ver el cambio de coloración.

¹²³ Choi, K.C. Co-Culture System. *Encyclopedia*. Disponible online: <https://encyclopedia.pub/entry/6632> (Consultado en mayo 2023).

¹²⁴ Van Meerloo, J.; Kaspers, G.J.; Cloos, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol. Biol.* **2011**, 731, 237-245. Doi: 10.1007/978-1-61779-080-5_20.

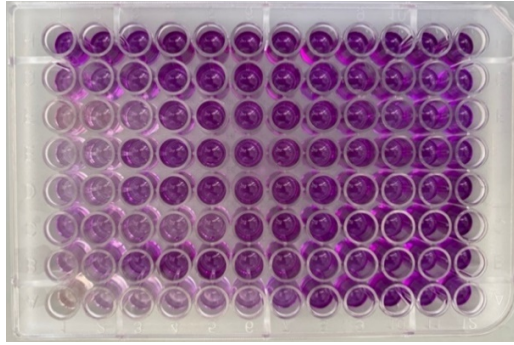


Figura 4.3. Placa de células al finalizar el ensayo de MTT.

Así, los pocillos de la placa en la Figura 4.3 con mayor intensidad de color morado se corresponden con una mayor concentración de células vivas.

4.1.1.2. Citometría de flujo

La citometría de flujo es una técnica que permite analizar y cuantificar distintos tipos de partículas y se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas y de una en una por delante de un haz de luz láser focalizado. La citometría de flujo permite diferenciar el tamaño y la granularidad o complejidad de cada célula, así como diferentes componentes dentro de ésta, al ser posible también medir de forma simultánea la fluorescencia relativa de la misma (véase la Figura 4.4).¹²⁵ Esto hace que esta técnica sea muy versátil y útil para determinar el comportamiento de distintos tipos celulares que han sido previamente co-cultivados.

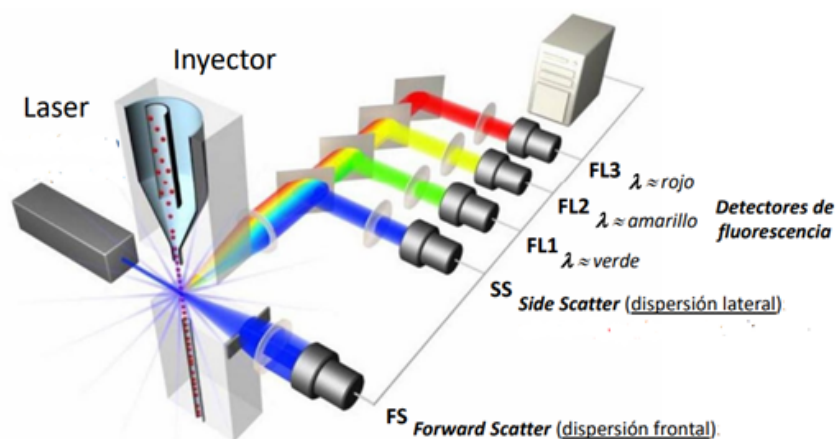


Figura 4.4. Fundamento de la citometría de flujo.¹²⁶

¹²⁵ Pérez-Lara, J. C.; Santiago-Cruz, W.; Romero-Ramírez, H.; Rodríguez-Alba, J. C. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*. **2019**, *18*, 41-52.

¹²⁶ Sitio web: <https://cscmetabolism.com/2022/01/19/cuanto-sabes-acerca-de-la-citometria-de-flujo/> (Descargada mayo 2023).

La citometría de flujo distingue los distintos tipos de líneas celulares en base a sus propiedades físico-químicas, gracias a la capacidad de las células para dispersar el haz de luz. Así, en la denominada dispersión frontal (FSC, *forward scattering*) se obtiene información sobre el tamaño de la célula y en la dispersión lateral (SSC, *side scattering*), que mide la luz dispersada en un ángulo de 90° respecto a la fuente de radiación, se obtiene información sobre la complejidad y la granularidad celular (véase la Figura 4.5). Con ello se obtienen datos acerca de la cantidad de células vivas que constituye cada población, lo que permite cuantificar la viabilidad celular de forma relativa.

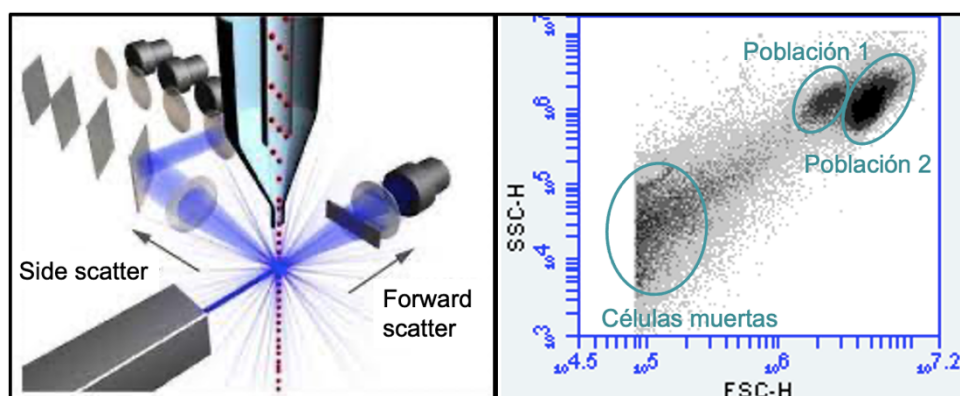


Figura 4.5. Diferencias poblacionales según la luz dispersada.¹²⁷

4.1.2. Interacción directa con las dianas biológicas

En general, las proteínas presentan un sitio de unión con unas características específicas, por lo que es importante determinar si, independientemente de las condiciones del TME, los compuestos sintetizados serán capaces de interactuar con sus dianas biológicas. Para ello, se utiliza la técnica de desplazamiento térmico de proteínas (TSA).

Esta técnica se basa en la determinación de la estabilidad térmica de las proteínas y la variación de esta temperatura cuando se encuentra interactuando con un ligando debido a la estabilización/desestabilización del complejo proteico.¹²⁸ Por lo general, las proteínas se empaquetan formando estructuras tridimensionales con el fin de minimizar la energía. Este empaquetamiento deja en el interior de la estructura los residuos

¹²⁷ Adaptación. Maciorowski, Z. *Basics of Flow Cytometry*. Curie Institute. (Descargada mayo 2023)

¹²⁸ Ding, Y.; Ball, K.A.; Webb, K.J.; Gao, Y.; D'Alessandro, A.; Old, W.M.; Stowell, M.H.B.; Ding, X. On-Chip Acousto Thermal Shift Assay for Rapid and Sensitive Assessment of Protein Thermodynamic Stability. *Small*. **2020**, *16*, 2003506. Doi: 10.1002/smll.202003506.

hidrofóbicos y, en el exterior los residuos hidrofílicos. Estas estructuras se estabilizan mediante enlaces intermoleculares débiles, como son los enlaces de hidrógeno o fuerzas de van der Waals, los cuales, al aumentar la temperatura, se rompen provocando la desestabilización o lo que es lo mismo, la desnaturalización de la proteína (véase la Figura 4.6).¹²⁹

La temperatura de fusión de la proteína (T_m), se corresponde con la temperatura a la que una proteína se desnaturaliza en un 50 %, es decir, la temperatura a la que la proteína ha perdido prácticamente su estructura tridimensional dejando expuestos los residuos hidrofóbicos.

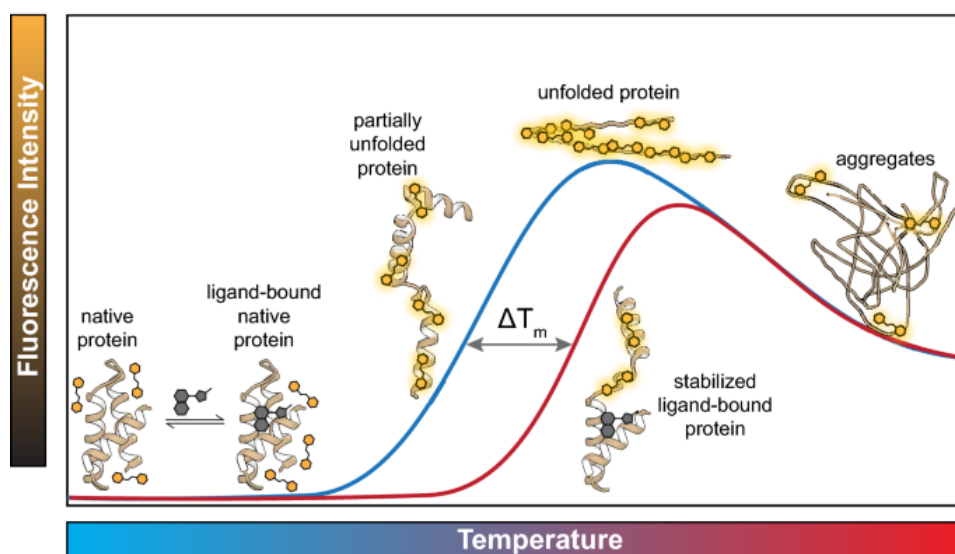


Figura 4.6. Ejemplificación de la determinación de T_m por TSA.¹²⁹

Para determinar la T_m de una proteína se utiliza un equipo de PCR a tiempo real, el cual permite monitorizar dicha desnaturalización mediante fluorescencia al marcar la proteína con la molécula SYPRO Orange, un fluoróforo que se une a los residuos hidrofóbicos de la molécula. Así, la fluorescencia emitida por la proteína aumenta a medida que los residuos hidrofóbicos van quedando expuestos por el aumento de la temperatura.¹³⁰

4.1.3. Efecto sobre las dianas biológicas

En muchos casos las proteínas implicadas en procesos celulares se encuentran protegidas en el interior de ciertas membranas, por lo que se hace necesario estudiar la capacidad de los compuestos para inhibir sus

¹²⁹ Samuel, E.L.G.; Holmes, S.L.; Young, D.W. Processing binding data using an open-source workflow. *J. Cheminform.* **2021**, *13*, 99. Doi:10.1186/s13321-021-00577-1.

¹³⁰ Sitio web: <https://www.reactionbiology.com/services/biophysical-assays/thermal-shift-assay-tsa> (Consultado mayo 2023)

proteínas diana cuando estas se encuentran en condiciones naturales y no purificadas. Con estos estudios, se pretende identificar si los compuestos serán capaces de superar las barreras naturales de la célula para llegar al lugar dónde han de llevar a cabo su acción.

Las técnicas empleadas en esta Tesis para estudiar la interacción de los compuestos con las proteínas diana se detallan a continuación.

4.1.3.1. Citometría de flujo

La citometría de flujo, como se ha visto en el apartado 4.1.1.2 es una técnica muy versátil que te permite estudiar diferentes características de la célula al mismo tiempo, gracias a los distintos filtros que contiene. Así, para estudiar la capacidad de los compuestos para inhibir las distintas dianas biológicas, se marca la célula con los correspondientes anticuerpos unidos a un fluorocromo (véase la Figura 4.7). La gama de fluorocromos disponibles en el mercado es cada vez más amplia, sin embargo, se ha de encontrar la mejor combinación entre ellos con el fin de evitar solapamiento de señales y poder medir, de esta forma, diversas proteínas al mismo tiempo. Al igual que los fluoróforos, los equipos de citometría de flujo han ido mejorando con los años, de forma que, dependiendo del equipo utilizado, se pueden medir al mismo tiempo diferentes proteínas en función de la cantidad de filtros de los que disponga el equipo.

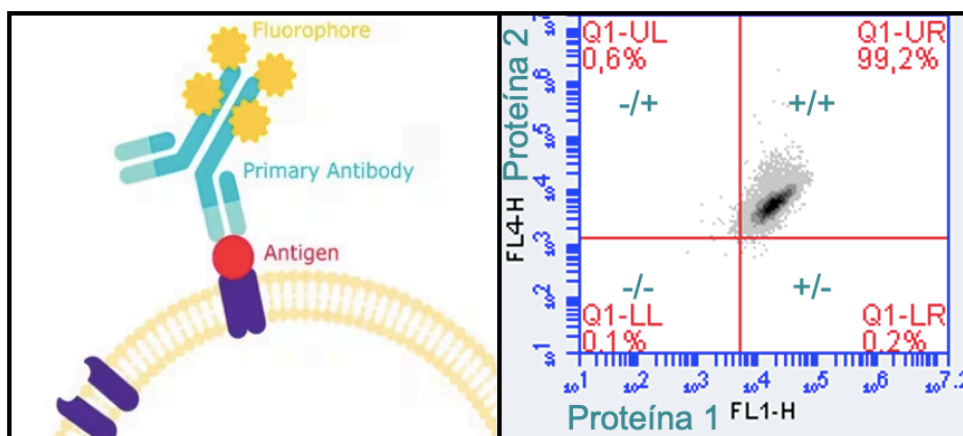


Figura 4.7. Cuantificación de proteínas por citometría de flujo.¹³¹

¹³¹ Adaptación: <https://www.sigmaaldrich.com/> (Descargada mayo 2023)

Esta técnica permite correlacionar la intensidad de fluorescencia obtenida con la cantidad de proteína libre presente en la célula, pudiendo de esta forma cuantificar la cantidad de proteína libre de forma relativa.

4.1.3.2. Estudio de la expresión génica

Para establecer si nuestros compuestos estudiados ejercían algún efecto en el nivel de expresión génica de las dianas de interés empleamos la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que muestra una gran sensibilidad para estudiar los ácidos nucleicos.¹³² Con esta técnica se amplifica una secuencia de ADN específica por la acción de la ADN polimerasa. La secuencia de ADN puede venir de ADN genómico o de una hebra de ADN complementario obtenida de la retrotranscripción del ARN mensajero, siendo conocida esta última como RT-PCR (reverse transcription-PCR).¹³³

Existen distintos tipos de PCR fruto de la evolución de la técnica. La PCR a tiempo real, también conocida como PCR cuantitativa (qPCR), combina la amplificación del ADN y la detección en un único paso, de forma que es posible visualizar en tiempo real el resultado de la reacción que tiene lugar en la muestra. Otro tipo de PCR que ha evolucionado de esta es la RT-PCR, la cual permite el estudio del ARN mensajero (ARNm). Esta puede ser en un único paso, en la que la retrotranscripción se realiza directamente antes de la amplificación, o en dos pasos, en la que se requiere de un paso previo en el que se obtiene el ADN complementario (cDNA) antes de introducir la muestra en el equipo para la amplificación.¹³⁴

Una vez en el equipo y con todos los componentes necesarios, se llevan a cabo repetidos ciclos de replicación del ADN que constan de tres fases (véase la Figura 4.8).

¹³² Tamay de Dios, L.; Ibarra, C.; Velasquillo, C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real (qPCR) *Investigación en Discapacidad. Medigraphic.com.* **2013**, 2, 70-78.

¹³³ Kadri, K. Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. *IntechOpen.* **2020**. doi: 10.5772/intechopen.86491.

¹³⁴ Jalali, M.; Zaborowska, J.; Jalali, M. The polymerase chain reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR. *Basic Science Methods for Clinical Researchers.* **2017**, 1–18. Doi:10.1016/b978-0-12-803077-6.00001-1.

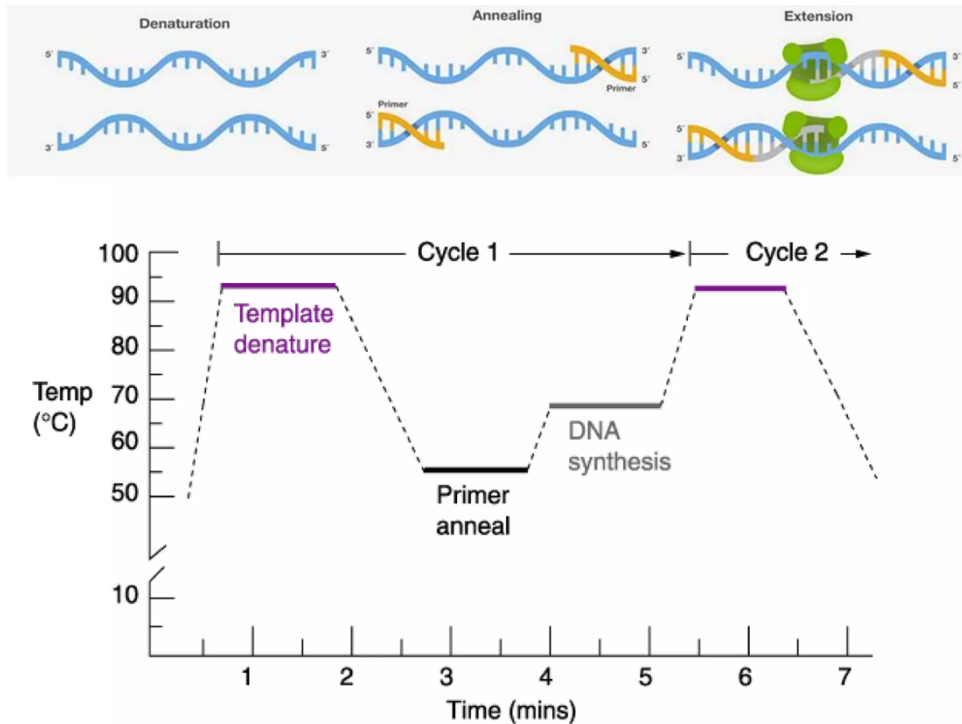


Figura 4.8. Ciclo de amplificación del ADN.¹³⁵

La primera de ellas es la fase de desnaturalización, en la que se aumenta la temperatura hasta 95 °C, lo que provoca la rotura de los enlaces de hidrógeno que unen las bases nitrogenadas y por tanto la separación de ambas hebras de ADN.

Una vez separadas las dos hebras molde, comienza la fase de alineamiento, en la que se desciende a una temperatura entre 40-70 °C, adoptando la que se conoce como temperatura de hibridación del primer o cebador. En esta etapa, los primer se alinean en la zona específica de la hebra molde en sentido 3'-5'.

La fase de elongación es la tercera y última fase del ciclo, en la cual la temperatura se sube a 72 °C, conocida como temperatura de elongación. En esta fase la Taq polimerasa se une a los primer y comienza la replicación del ADN. Una vez finaliza la elongación se aumenta de nuevo la temperatura a 95 °C, lo que provoca una nueva separación de las hebras del ADN y el inicio de un nuevo ciclo de replicación.¹³³

La sucesión de ciclos conlleva la amplificación del ADN de la muestra, de forma que del proceso se obtiene una gráfica en la

¹³⁵ Sitio Web: https://www.slideshare.net/sara_abudahab/polymerase-chain-reaction-85874296 (Descargada mayo 2023).

que se pueden diferenciar tres zonas, o fases, la primera de ellas, es la basal, en esta no se ha amplificado lo suficiente el ADN como para obtener señal por lo que es mayoritariamente ruido, la segunda fase, es la de crecimiento exponencial en la que ya se obtiene señal hasta que, finalmente, se llega a la última fase, que es la fase estacionaria, en la que se estabiliza la señal marcando la meseta (véase la Figura 4.9). En esta curva, al punto en el que se comienza a detectar señal por encima de la línea basal se le conoce como umbral o valor Ct, y este es clave para la cuantificación de la muestra.¹³⁶

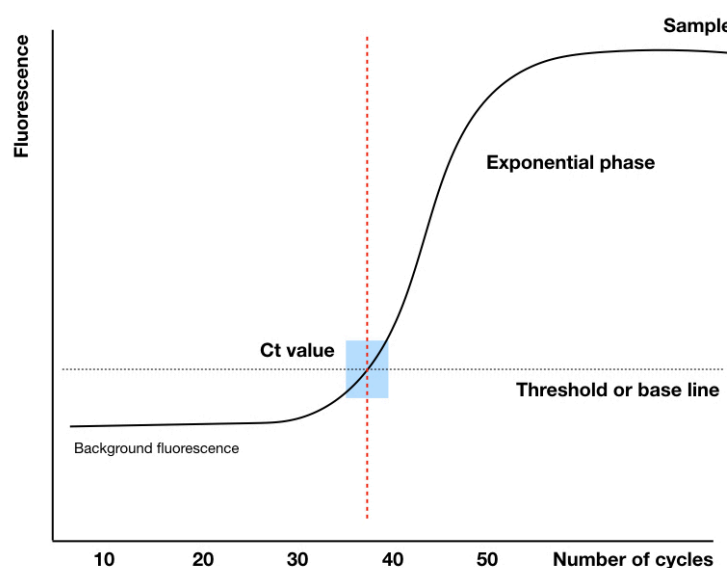


Figura 4.9. Curva de amplificación por PCR.¹³⁷

Para obtener la cantidad de ADN de cada muestra primero es necesario conocer la eficiencia (E) de los primer, la cual es vital dado que afecta el valor de Ct obtenido y, por tanto, la posterior cuantificación del ADN. Para considerarse aceptable, la eficiencia de los primer ha de encontrarse entre 85-110 %.¹³⁸ Para el cálculo de la eficiencia se utiliza la fórmula siguiente:

$$E (\%) = \left(10^{\left(\frac{-1}{\text{pendiente}}\right)} - 1 \right) \times 100$$

¹³⁶ Rodríguez Rodríguez, G.; Rodríguez, A.; Herzberg, M.A.; Herzberg, Z.; Alfonso, A. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real. *Mens. Bioquim.* **2021**, *45*, 11-22. Disponible online: <http://bq.facmed.unam.mx/tab>.

¹³⁷ Sitio web: <https://geniticeducation.co.in/explaining-the-ct-value-threshold-cycle-of-qpcr/> (Descargada mayo 2023).

¹³⁸ Sitio web: <https://goldbio.com/articles/article/How-To-Interpret-RT-qPCR-Results> (Consultado mayo 2023).

La pendiente, se obtiene de la representación de la curva de calibrado en la que se enfrenta el logaritmo de la concentración de ADN frente al Ct obtenido para cada muestra.

Una vez conocida la eficacia, ya se puede realizar la cuantificación de la muestra, la cual puede ser absoluta o relativa, en esta última se compara la expresión del gen de interés frente a un segundo gen que se considera un control. Este es el análisis más común y se puede realizar mediante dos métodos, el método Livak, el cual asume que la eficiencia se encuentra entre 90,5-100 % y, por tanto, no la tiene en cuenta para el cálculo, o el método Pfaffl, que asume que la eficiencia del gen de interés es diferente a la del control y por tanto las tiene en cuenta a la hora de cuantificar. En este trabajo, se ha utilizado este último método.

El método Pfaffl comienza con el cálculo de la conversión de eficiencia del primer (PEC) según la siguiente fórmula:

$$PEC = (E(\%)/100) + 1$$

Esto es necesario dado que no se pueden introducir las eficiencias como porcentajes en la fórmula. Además, se basa en que una eficiencia del 100 % se corresponde con un PEC igual a 2. A continuación, se calcula la variación de Ct (ΔCt) para ambos genes, esta se calcula como la diferencia de la media control de Ct (cCt) y el valor de Ct para cada muestra. Para el cálculo de cCt, es necesario definir las muestras que se van a incluir en el cálculo que se utilizará para calibrar los resultados. Esta elección depende de las características del ensayo y, siempre que la elección se mantenga en cada uno de los análisis realizados, será tomada por buena, ya que al final este es un cálculo relativo. Finalmente, se calcula la proporción de expresión del gen (RQ) según la fórmula específica de este método:¹³⁹

$$RQ = \frac{PEC(gen\ diana)^{\Delta Ct(gen\ diana)}}{PEC(gen\ referencia)^{\Delta Ct(gen\ referencia)}}$$

Este valor se corresponde por tanto, con la cantidad del gen diana que se ha expresado en la muestra.

¹³⁹ Sitio web: <https://toptipbio.com/pfaffl-method-qpcr/> (Consultado mayo 2023).

4.1.3.3. Ensayo ELISA

El ensayo ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) es una técnica de biología molecular muy utilizada para la detección y cuantificación de sustancias, como pueden ser antígenos que se encuentran disueltas en un determinado tampón o en el mismo medio de cultivo. Esta técnica inmunológica se basa, como muchas otras técnicas, en la capacidad de los anticuerpos para detectar el antígeno de interés e interactuar con éste de forma específica.¹⁴⁰ Entre las muchas ventajas de esta técnica destaca la capacidad de detectar cantidades muy pequeñas de antígenos, llegando incluso hasta el rango picomolar. Además, es un ensayo sencillo que permite cuantificar tipos de muestras muy distintos.¹⁴¹

La cuantificación de la muestra mediante este método se basa en el uso de un sustrato que pueda generar color durante el proceso de detección. Usualmente, la enzima empleada para la cuantificación final es una peroxidasa HRP (Horseradish peroxidase) que es capaz de oxidar la tetrametilbencidina (TMB) incolora a la correspondiente diimina, de color azul. Al detener la reacción en medio ácido el color de la disolución cambia a amarillo y de esta se obtiene un valor de absorbancia a 450 nm (véase la Figura 4.10).

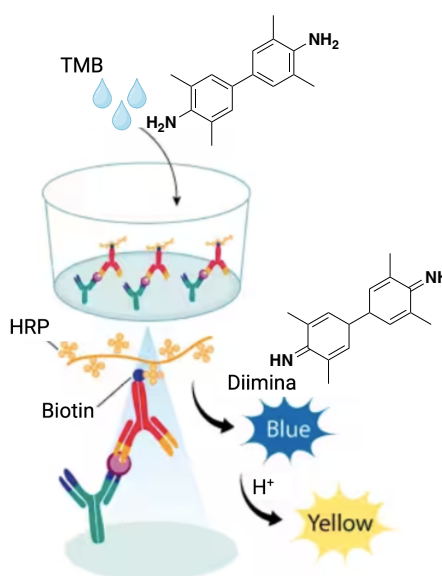


Figura 4.10. Oxidación del TMB por acción de la HRP.¹⁴²

¹⁴⁰ Alhajj, M.; Farhana, A. Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *StatPearls*. **2023**. Disponible online: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555922/#_NBK555922_pubdet_ (Consultado mayo 2023).

¹⁴¹ Sitio web: <https://www.abcam.com/kits/elisa-principle> (Consultado mayo 2023).

¹⁴² Imagen adaptada de Sitio web: <https://www.rndsystems.com/products/quantikine-hs-colorimetric-sandwich-elisas-high-sensitivity> (Descargado mayo 2023)

Existen cuatro tipos de ensayos ELISA según los anticuerpos utilizados durante la detección. Ensayo ELISA directo, en el que el anticuerpo primario está directamente unido al HRP y reconoce al antígeno. ELISA indirecto, en el que la detección se lleva a cabo en dos pasos y consta de un anticuerpo primario que reconoce el antígeno de interés y, posteriormente, un anticuerpo secundario ya unido a la peroxidasa que reconoce a este anticuerpo primario. ELISA competitivo, en el que el antígeno de interés compite con un antígeno de referencia por unirse al anticuerpo primario. Y finalmente, Elisa tipo “sándwich”, que es el más utilizado por ser el más específico, en este el antígeno se encuentra entre dos anticuerpos primarios, el primero de ellos se encuentra adherido a la base del pocillo funcionando como anticuerpo de captura, a este se le une el antígeno de interés de forma específica. Al antígeno se le une un segundo anticuerpo primario complementario y a éste, finalmente se le unirá un anticuerpo secundario, que reconocerá la peroxidasa para facilitar la detección (véase la Figura 4.11).¹⁴¹

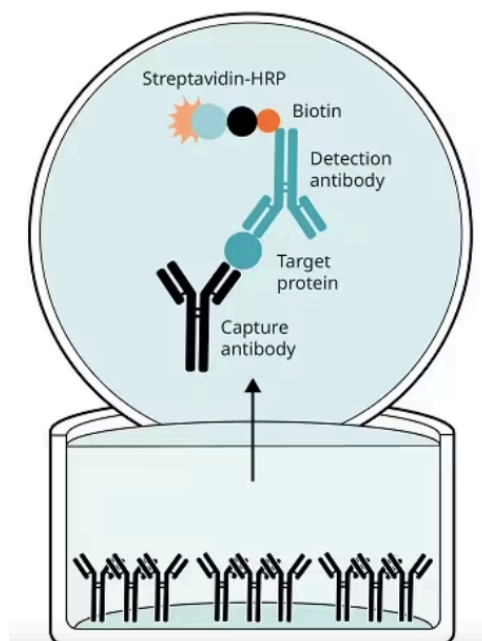


Figura 4.11. Configuración básica del ensayo ELISA tipo “sándwich”.¹⁴¹

4.1.3.4. Microscopía Confocal

La microscopía óptica de barrido confocal es una técnica que permite la visualización de un único plano focal de la célula con gran resolución, gracias a que el microscopio produce una fuente de luz puntual y rechaza todo lo que queda fuera de foco (véase la Figura 4.12). Esto permite estudiar

diferentes capas de la célula o tejido, lo cual la diferencia de la microscopía óptica convencional.¹⁴³

El microscopio confocal cuenta con fotomultiplicadores que facilitan la elección de fotones de interés, lo que permite visualizar, con una mayor resolución que un microscopio de fluorescencia clásico, estructuras microscópicas fluorescentes por naturaleza o previamente marcadas con fluorocromos. En el microscopio de fluorescencia clásico, los tejidos y muestras celulares aparecen como muestras gruesas, dando lugar a imágenes debidas a la superposición de los elementos que se encuentran fuera de foco y que emiten luz.

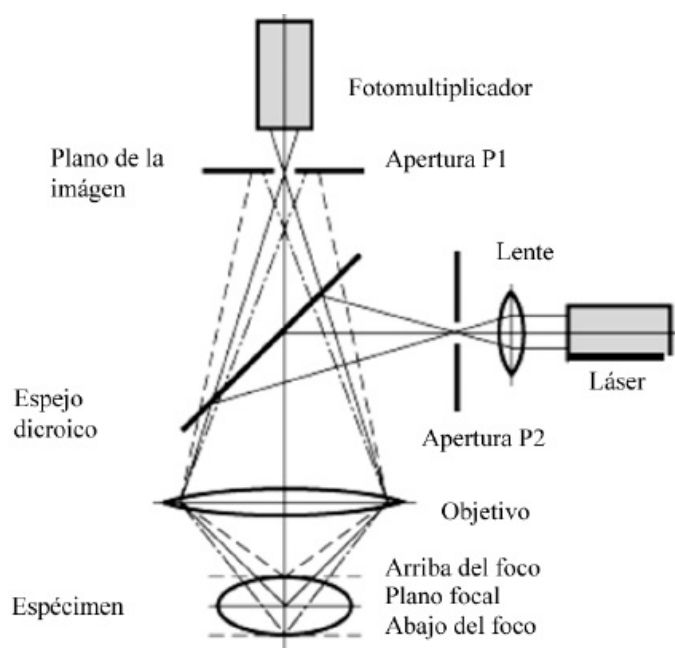


Figura 4.12. Esquema Microscopio confocal.¹⁴⁴

Por tanto, la mayor capacidad de la microscopía confocal para eliminar las emisiones que se encuentran fuera de foco y visualizar diferentes planos focales dentro de una misma muestra, da lugar a imágenes más limpias que aportan mucha más información.¹⁴⁵ Esto la hace una técnica con multitud

¹⁴³ Elliott, A.D. Confocal Microscopy: Principles and Modern Practices. *Curr. Protoc. Cytom.* **2020**, 92, e68. Doi: 10.1002/cpcy.68.

¹⁴⁴ Guarneros García, O.; de Vicente y Oliva, J.; Ocaña Moreno, J.L.; Maya Méndez, M.E.; Rodríguez Reyna, S.L.; Espericueta González, D.E. Uso del microscopio confocal para la caracterización dimensional en micromecanizados (step height). *Ingeniería mecánica, tecnología y desarrollo*, **2012**, 4, 73-80. Disponible web: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1665-73812012000100005&lng=es&tng=es. (Consultado mayo 2023).

¹⁴⁵ López-Macay, A.; Fernández-Torres, J.; Zepeda, A. Principios y aplicaciones de la microscopía láser confocal en la investigación biomédica. *Invest. en Discapacidad*. **2016**, 5, 156-164. Disponible en www.medigraphic.org.mx (Descargado mayo 2023).

de aplicaciones que facilita el análisis de la expresión de proteínas o biomoléculas en diferentes tipos de muestras biológicas.

4.2. Evaluación biológica–Familia de Triazoles

La familia de triazoles consta de 14 compuestos, cuya estructura general se puede ver en el Esquema 3.5 (en la página 52), y comprende no solo a los alcoholes finales sino también a los precursores de éstos con el grupo hidroxilo protegido mediante un grupo dimetoxitritilo.

4.2.1. Ensayo de viabilidad celular

En primer lugar, se estudió la capacidad de los compuestos **T.1- T.14** para inhibir la viabilidad celular mediante el ensayo de MTT con el cual se determinó el valor de sus IC_{50} . Este ensayo se llevó a cabo tras 48 h de incubación utilizando HT-29, MCF-7 y A-549 como líneas tumorales de estudio y HEK-293 como línea de células no cancerosas con el objetivo de determinar el índice de selectividad de los compuestos.

De este ensayo se pudo deducir que ninguno de los compuestos testados tiene actividad en ninguna de las líneas celulares utilizadas, mostrando valores de IC_{50} mayores a 300 μ M en todos los casos.

En vista de los resultados obtenidos se determinó 100 μ M como la concentración a emplear en el resto de los ensayos.

4.2.2. Efecto sobre las dianas c-Myc y PD-L1

La capacidad para inhibir las proteínas diana C-Myc y PD-L1 se midió mediante citometría de flujo. Los compuestos **T.1-T.14** se utilizaron en dosis de 100 μ M en monocultivos de HT-29, MCF-7 y A-549 durante 24 h de incubación. Para este ensayo, se utilizó BMS-8 un inhibidor de PD-L1 (véase la estructura en la Figura 1.20, en la página 39), como control positivo y las células tratadas con DMSO como control negativo. Los resultados se encuentran recogidos en la Tabla 4.1 como porcentajes de proteína total libre en cada muestra respecto del control.

En la Tabla 4.1 se puede ver que los resultados varían en función de la línea celular utilizada. En general, los bromo derivados protegidos **T.3, T.5** y **T.7** son los que presentan una mayor actividad dual en todas las líneas testadas. Además, los derivados que presentan el grupo hidroxilo protegido (**T.1, T.3, T.5, T.7, T.9, T.11** y **T.13**, sombreados en la tabla), presentan, en

comparación, mayor actividad que los derivados desprotegidos con el grupo hidroxilo libre.

Tabla 4.1. Efecto sobre c-Myc y PD-L1 total en las distintas líneas celulares testadas.

Comp. 100 μ M	HT-29		MCF-7		A-549	
	%c-Myc	% PD-L1	%c-Myc	% PD-L1	%c-Myc	% PD-L1
Control	100	100	100	100	100	100
BMS-8	119 \pm 9	68 \pm 10	77 \pm 12	130 \pm 3	142 \pm 8	70 \pm 8
T.1	135 \pm 5	85 \pm 3	73 \pm 1	90 \pm 8	182 \pm 27	63 \pm 16
T.2	115 \pm 8	82 \pm 6	122 \pm 13	115 \pm 7	79 \pm 10	76 \pm 2
T.3	67 \pm 8	47 \pm 1	65 \pm 4	108 \pm 13	66 \pm 5	58 \pm 10
T.4	108 \pm 8	111 \pm 8	91 \pm 8	237 \pm 19	95 \pm 2	55 \pm 8
T.5	66 \pm 10	38 \pm 1	61 \pm 11	87 \pm 1	72 \pm 9	70 \pm 16
T.6	149 \pm 12	104 \pm 6	81 \pm 6	110 \pm 4	84 \pm 9	62 \pm 4
T.7	43 \pm 7	45 \pm 7	51 \pm 3	80 \pm 4	67 \pm 6	86 \pm 20
T.8	88 \pm 2	115 \pm 5	92 \pm 6	81 \pm 1	48 \pm 7	44 \pm 8
T.9	71 \pm 10	57 \pm 8	88 \pm 4	89 \pm 5	61 \pm 3	92 \pm 21
T.10	83 \pm 8	82 \pm 2	91 \pm 6	114 \pm 9	126 \pm 2	62 \pm 14
T.11	50 \pm 3	48 \pm 4	81 \pm 2	108 \pm 7	55 \pm 4	104 \pm 1
T.12	84 \pm 2	157 \pm 6	81 \pm 4	88 \pm 1	113 \pm 9	67 \pm 8
T.13	68 \pm 3	102 \pm 1	77 \pm 5	87 \pm 6	51 \pm 2	120 \pm 5
T.14	67 \pm 4	138 \pm 2	71 \pm 5	71 \pm 0	85 \pm 10	54 \pm 7

En la acción sobre c-Myc cabe destacar que, además de los bromo derivados protegidos **T.3**, **T.5** y **T.7**, el *m*-OMe derivado **T.11** inhibe a la mitad c-Myc en las líneas celulares HT-29 y A-549. En el caso de A-549 también destacan los dos metoxiderivados protegidos **T.9** y **T.13**, con rangos de inhibición del 40 y 50 % respectivamente.

En lo que respecta a PD-L1 total, se puede ver en la Tabla 4.1 que los derivados protegidos son más activos que los desprotegidos sobre HT-29 y MCF-7, mientras que en A-549 la tendencia cambia siendo los derivados desprotegidos los que presentan una mayor actividad con rangos de inhibición del 50-60 %.

4.2.2.1. Estudio de la correlación dosis/efecto

El bromo derivado **T.3** fue seleccionado para el estudio de correlación dosis/efecto en las dos líneas celulares HT-29 y MCF-7, que son las que se mostraron más sensibles al efecto de estos compuestos. La Tabla 4.2 muestra los resultados a las diferentes concentraciones ensayadas, siempre usando como referencia el control negativo.

Tabla 4.2. Correlación dosis/efecto en c-Myc y PD-L1 para el compuesto **T.3**.

Dosis	HT-29		MCF-7	
	%c-Myc	% PD-L1	%c-Myc	% PD-L1
100μM	67 \pm 8	47 \pm 1	65 \pm 4	108 \pm 13
50μM	88 \pm 5	90 \pm 3	75 \pm 9	69 \pm 4
25μM	100 \pm 3	111 \pm 4	62 \pm 5	58 \pm 3
10μM	79 \pm 1	101 \pm 31	56 \pm 5	52 \pm 2

De los resultados anteriores se puede concluir que, en el caso de HT-29, a concentraciones inferiores a 50 μ M, **T.3** deja de tener efecto en ambas proteínas, por lo que cabe deducir que hay una dependencia entre la actividad y la dosis del compuesto. En MCF-7, sin embargo, vemos que la acción sobre c-Myc no depende de la dosis administrada, mientras que en lo que respecta a PD-L1 se observa un aumento de efecto a medida que se disminuye la concentración, viéndose un efecto máximo a 10 μ M.

4.2.3. Estudio del efecto sobre las dianas biológicas c-Myc y PD-L1

En vista de los resultados detallados anteriormente, se seleccionaron los bromo derivados de triazol protegidos **T.3** (*p*-Br), **T.5** (*m*-Br) y **T.7** (*o*-Br) para profundizar en mayor medida en los ensayos biológicos, al ser estos compuestos los que mostraron una mayor actividad. Además, se escogió MCF-7 para estos estudios por ser esta línea celular la que se mostró como la más sensible a la acción de dichos compuestos.

4.2.3.1. Interacción directa

Para determinar la afinidad de los compuestos **T.3**, **T.5** y **T.7** con las proteínas c-Myc y PD-L1 se llevó a cabo el ensayo de desplazamiento térmico (TSA). Con este ensayo se quería asegurar que la inhibición observada (véase la Tabla 4.1) se debe a dicha interacción. A continuación,

en la Tabla 4.3 se presenta la variación de temperatura de desnaturalización para cada compuesto (ΔT_m) como la media de diversas medidas.

Tabla 4.3. Variación de la temperatura de desnaturalización debida a la interacción directa con las dianas.

Comp.	ΔT_m (°C)	
	c-Myc	PD-L1
T.3	-3	-1
T.5	-3	-1
T.7	-5	-2

Tal y como se puede ver en la Tabla 4.3 todos los compuestos provocaron una variación de la temperatura de desnaturalización en ambas proteínas provocando, además, una desestabilización de las mismas. De entre los tres compuestos evaluados cabe destacar a **T.7** (*o*-Br) como el compuesto que provoca una mayor desestabilización en ambas proteínas diana.

En la Figura 4.13 se muestran las curvas de desnaturalización para **T.7** (en verde) junto a las curvas control correspondientes a cada proteína de interés purificada (en azul). De esta forma, es posible apreciar la diferencia de T_m para cada una de las dos muestras, y por tanto consecuente desestabilización de ambas proteínas al interactuar con **T.7** (*o*-Br).

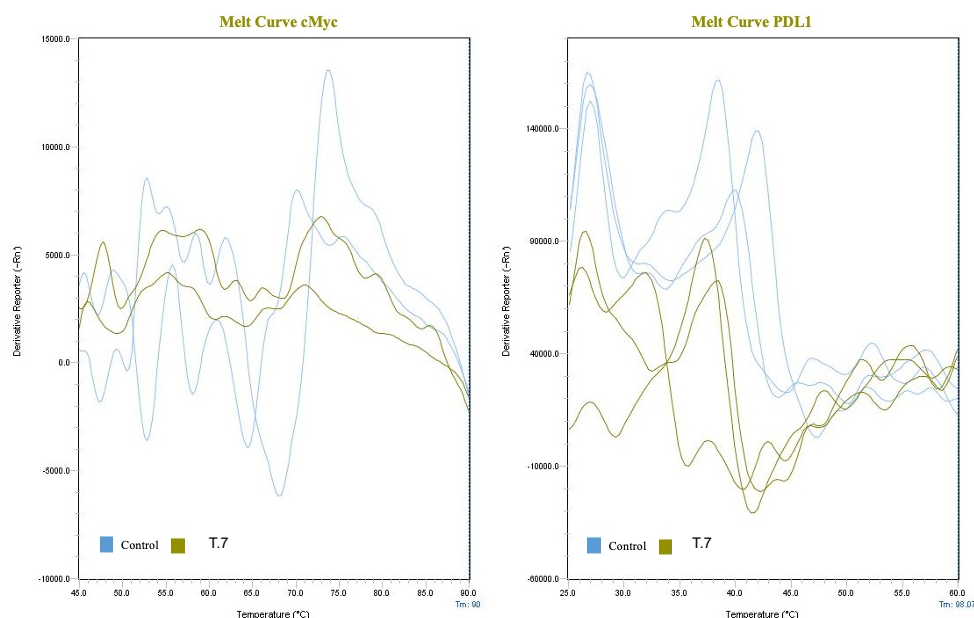


Figura 4.13. Curvas de desnaturalización de c-Myc y PD-L1 provocadas por la interacción con **T.7** (*o*-Br).

4.2.3.2. Visualización del efecto sobre las dianas

El efecto de los compuestos seleccionados sobre las dianas biológicas c-Myc y PD-L1 también se estudió mediante inmunofluorescencia. En la Figura 4.14 se pueden ver los resultados obtenidos tras 24 h de incubación de MCF-7 con los compuestos. En azul se observan los núcleos, que se marcaron con Hoescht, en verde se observa c-Myc y en rojo PD-L1. Los resultados se comparan con las células tratadas con DMSO como control negativo y BMS-8 como control positivo.

En la Figura 4.14 se observa que, en el control, c-Myc se localiza en el núcleo de la célula y cerca de la membrana celular, mientras que PD-L1 se coloca preferiblemente en la membrana o citosol, favoreciéndose de esta forma el contacto con el entorno celular. El tratamiento con BMS-8 no alteró la disposición de c-Myc, mientras que PD-L1 se ubicó, preferentemente, en el núcleo viéndose alterada e incluso desaparecida la presencia de PD-L1 en la membrana.

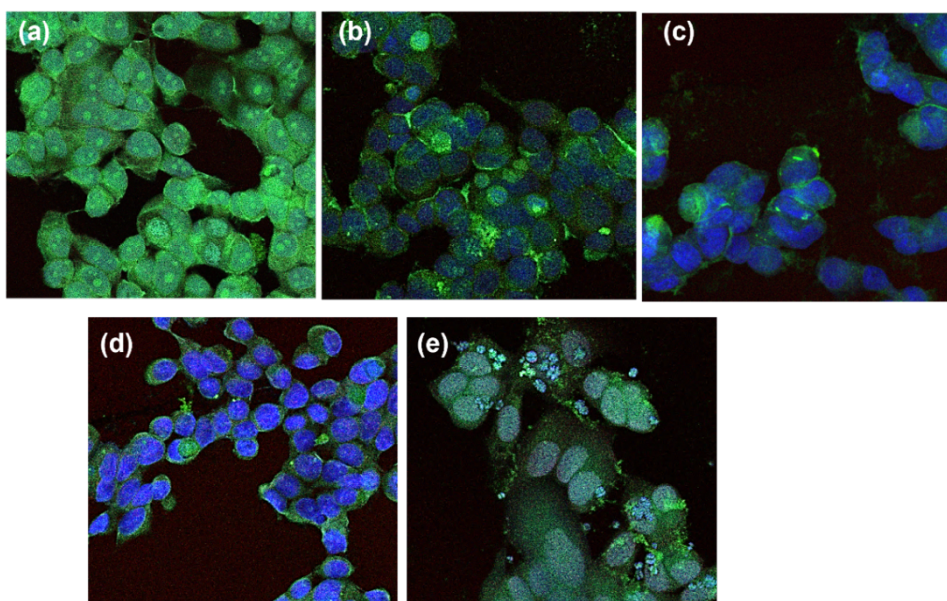


Figura 4.14. Imágenes de microscopia confocal en MCF-7. (a) T.3 (*p*-Br), (b) T.5 (*m*-Br), (c) T.7 (*o*-Br), (d) Control, (e) BMS-8.

Cuando las muestras se trataron con los compuestos, se observó que T.3 (*p*-Br) no provocaba diferencias con respecto al control, acumulándose c-Myc en el núcleo y PD-L1 en el citosol. Con el compuesto T.5 (*m*-Br) se observó que el PD-L1 se acumulaba en la interfaz de células y en el núcleo de las mismas, mientras que c-Myc formaba agregados alrededor de la membrana nuclear. Finalmente, cuando las células se trataron con el compuesto T.7 (*o*-Br), se observó la permanencia de PD-L1 en el citosol, al

igual que en el control, mientras que c-Myc se encontraba formando agregados en el núcleo de las células.

4.2.3.3. Efecto sobre la expresión de c-Myc y PD-L1

La capacidad de los compuestos para inhibir la expresión génica de las dos dianas de interés se estudió mediante qPCR a tiempo real. Para ello, línea de células cancerosas MCF-7 se trató, durante 24 h, con los compuestos a 100 μ M, utilizando, de nuevo, las células tratadas con DMSO como control negativo y BMS-8 como control positivo. La Figura 4.15 muestra los resultados obtenidos para la inhibición génica de c-Myc y PD-L1, utilizando el método Pfaffl para el análisis de datos.

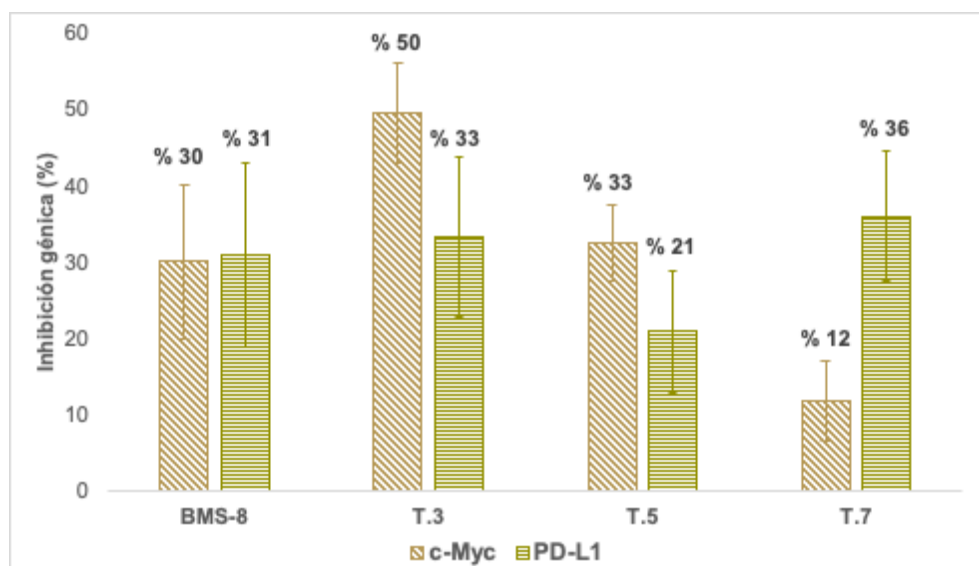


Figura 4.15. Inhibición génica de c-Myc y PD-L1 al tratar las células con los compuestos seleccionados.

Los resultados mostrados en la Tabla 4.15 ponen de manifiesto que los compuestos ensayados fueron capaces de disminuir la expresión de ambas dianas. Destaca el compuesto **T.3** (*p*-Br) como el más activo, ya que fue capaz de inhibir la expresión de c-Myc a la mitad, superando, además, al compuesto de referencia en la inhibición de PD-L1.

4.2.4. Ensayo de viabilidad celular en co-cultivo

La acción de los compuestos sobre la proliferación de células cancerosas se estudió también en presencia de células T Jurkat, una línea de células defensivas que expresa PD-1. Para ello, cada una de las líneas de células cancerosas (HT-29, MCF-7 y A-549) estimuladas con $\text{INF}\gamma$ se puso en contacto, durante 24 h, con los compuestos a 100 μ M y en presencia de la

línea de células T Jurkat en una proporción 1:5 (células cancerosas: células T). Al igual que en el ensayo anterior se utilizó BMS-8 como control positivo y las células tratadas con DMSO como control negativo. La Tabla 4.4 muestra el porcentaje de células vivas respecto al control, tanto para la línea de células cancerosas como para la línea de células T Jurkat.

En la Tabla, se puede observar que la actividad varía dependiendo de la línea celular estudiada, siendo, la línea de cáncer de pulmón A-549 la que muestra una tendencia diferente al resto.

Tabla 4.4. Efecto sobre la viabilidad celular en Co-cultivo con Células T Jurkat.

Comp. 100 μ M	HT-29: Jurkat		MCF-7: Jurkat		A-549: Jurkat	
	HT-29	JURKAT	MCF-7	JURKAT	A-549	JURKAT
Control	100	100	100	100	100	100
BMS-8	34 \pm 5	148 \pm 11	57 \pm 7	53 \pm 27	111 \pm 9	99 \pm 9
T.1	81 \pm 12	108 \pm 6	56 \pm 6	86 \pm 13	127 \pm 1	88 \pm 18
T.2	79 \pm 20	107 \pm 4	80 \pm 6	87 \pm 22	123 \pm 25	89 \pm 17
T.3	111 \pm 5	108 \pm 33	45 \pm 4	75 \pm 10	75 \pm 7	86 \pm 4
T.4	115 \pm 14	145 \pm 9	87 \pm 6	218 \pm 69	79 \pm 5	122 \pm 11
T.5	68 \pm 3	48 \pm 1	37 \pm 5	96 \pm 8	105 \pm 3	93 \pm 9
T.6	104 \pm 4	116 \pm 7	65 \pm 8	119 \pm 1	75 \pm 3	119 \pm 6
T.7	52 \pm 6	70 \pm 8	41 \pm 4	94 \pm 12	100 \pm 4	79 \pm 11
T.8	97 \pm 10	95 \pm 5	49 \pm 10	164 \pm 9	72 \pm 9	88 \pm 34
T.9	51 \pm 17	56 \pm 18	69 \pm 9	84 \pm 17	106 \pm 1	462 \pm 99
T.10	145 \pm 16	120 \pm 23	94 \pm 2	148 \pm 20	103 \pm 4	100 \pm 4
T.11	65 \pm 6	76 \pm 52	50 \pm 1	79 \pm 13	102 \pm 4	511 \pm 86
T.12	60 \pm 3	104 \pm 5	78 \pm 4	123 \pm 11	86 \pm 2	83 \pm 6
T.13	153 \pm 15	110 \pm 9	43 \pm 1	79 \pm 5	103 \pm 4	90 \pm 2
T.14	67 \pm 10	106 \pm 9	47 \pm 1	127 \pm 6	78 \pm 9	109 \pm 20

Así, en los resultados de la Tabla 4.4 se ve como los compuestos en la línea A-549 tienen una actividad moderada con rangos de inhibición del 30 % por parte de los derivados desprotegidos **T.4** (*p*-Br), **T.6** (*m*-Br), **T.8** (*o*-Br), **T.12** (*m*-OMe) y **T.14** (*o*-OMe). Entre los análogos protegidos cabe destacar únicamente a **T.3** (*p*-Br) que presenta una actividad similar a los compuestos ya mencionados. De estas observaciones se puede concluir que, en el caso de la línea A-549, al aumentar la polaridad de la molécula, aumenta el efecto

sobre la viabilidad celular en co-cultivo. En cambio, esta tendencia es justo la contraria en las otras dos líneas celulares testadas HT-29 y MCF-7, siendo, además, el efecto sobre éstas mayor. Así, cabe destacar a los derivados protegidos **T.5** (*m*-Br), **T.7** (*o*-Br), **T.9** (*p*-OMe) y **T.11** (*m*-OMe) que presentan rangos de inhibición de la viabilidad celular de 40-50 % sobre HT-29 en co-cultivo con las células T Jurkat.

Finalmente, los compuestos presentan un mayor efecto sobre la viabilidad celular en MCF-7, destacando en general los derivados protegidos, al igual que ocurre en HT-29, con rangos de inhibición del 60 %, frente al 30 % que muestran los derivados desprotegidos.

4.2.4.1. Efecto sobre las dianas VEGFR-2 y PD-L1 en co-cultivo

Con el fin de comprobar si la inhibición de la viabilidad celular se correlacionaba con una mayor inhibición de PD-L1 en la membrana de las células cancerosas, se estudió el efecto sobre esta diana por citometría de flujo en las mismas condiciones que el estudio de viabilidad. Además, aprovechando la versatilidad del equipo, también estudiamos el efecto sobre VEGFR-2, una proteína de gran interés terapéutico, como ya se ha visto anteriormente en este trabajo. Los resultados obtenidos se muestran, como porcentajes de proteína de membrana libre respecto el control, en la Tabla 4.5.

De la Tabla 4.5 se deduce que ninguno de los compuestos presenta una acción significativa sobre VEGFR-2 en ninguna de las líneas celulares estudiadas. Sin embargo, atendiendo a su acción sobre PD-L1 de membrana, los compuestos si presentan actividad, destacando la acción sobre MCF-7. En esta línea celular encontramos excelentes rangos de inhibición de 60-70 % para los bromo derivados protegidos (**T.3**, **T.5** y **T.7**) y para todos los metoxi derivados (**T.9-T.14**). Estos resultados se correlacionan con los datos de viabilidad celular mostrados en la Tabla 4.2, dónde MCF-7 destacaba como la línea celular en la que la acción de las células T Jurkat era mayor.

En cuanto a la acción sobre HT-29, destacan los bromo derivados desprotegidos (**T.4**, **T.6** y **T.8**) junto con los metoxi derivados **T.9** (*p*-OMe), **T.13** y **T.14** (*o*-OMe) que muestran rangos de inhibición del 40- 50 %.

Tabla 4.5. Efecto sobre VEGFR-2 y PD-L1 de membrana en las distintas líneas celulares cancerosas co-cultivadas con células T Jurkat.

Comp. 100 μ M	HT-29		MCF-7		A-549	
	% VEGFR-2	% PD-L1	% VEGFR-2	% PD-L1	% VEGFR-2	% PD-L1
Control	100	100	100	100	100	100
BMS-8	63 \pm 4	105 \pm 3	100 \pm 2	97 \pm 33	104 \pm 9	103 \pm 3
T.1	85 \pm 0	143 \pm 48	76 \pm 1	109 \pm 9	79 \pm 7	96 \pm 9
T.2	101 \pm 11	124 \pm 34	86 \pm 2	82 \pm 6	90 \pm 10	60 \pm 6
T.3	81 \pm 7	80 \pm 2	81 \pm 4	52 \pm 9	73 \pm 4	77 \pm 4
T.4	94 \pm 3	54 \pm 3	121 \pm 19	89 \pm 3	99 \pm 4	80 \pm 3
T.5	85 \pm 4	153 \pm 17	85 \pm 4	43 \pm 6	92 \pm 2	115 \pm 0
T.6	98 \pm 2	63 \pm 6	98 \pm 6	66 \pm 11	87 \pm 7	75 \pm 1
T.7	93 \pm 3	89 \pm 4	100 \pm 0	50 \pm 14	89 \pm 5	73 \pm 6
T.8	97 \pm 4	58 \pm 6	108 \pm 6	46 \pm 9	104 \pm 5	84 \pm 8
T.9	76 \pm 13	63 \pm 11	76 \pm 10	40 \pm 5	92 \pm 3	82 \pm 2
T.10	94 \pm 6	126 \pm 7	105 \pm 3	48 \pm 7	107 \pm 1	84 \pm 6
T.11	79 \pm 10	104 \pm 14	92 \pm 10	48 \pm 7	85 \pm 1	94 \pm 1
T.12	113 \pm 4	88 \pm 5	103 \pm 8	41 \pm 2	99 \pm 6	77 \pm 3
T.13	89 \pm 2	57 \pm 12	120 \pm 8	33 \pm 4	80 \pm 8	83 \pm 6
T.14	97 \pm 6	61 \pm 3	91 \pm 6	80 \pm 5	106 \pm 1	85 \pm 3

4.2.4.2. Efecto sobre CD80 y CD11b en la línea de células T en co-cultivo

El efecto de los compuestos sobre las proteínas de membrana CD80 y CD11b en las células T Jurkat, co-cultivadas con distintas líneas celulares cancerosas, se muestra en la Tabla 4.6 como cantidad de proteína libre respecto al control tras 24 h de incubación.

En la Tabla 4.6 se indica la cantidad de proteína libre respecto del control en la membrana de las células T Jurkat, tras ser co-cultivadas durante 24 h con las tres líneas cancerosas. En general, y a diferencia del resto de estudios, destaca la acción sobre ambas dianas cuando las células T Jurkat se encuentran co-cultivadas con A-549, obteniéndose, con los análogos desprotegidos, rangos de inhibición de CD11b del 30 %. Estos datos podrían estar relacionados con la moderada acción de estos derivados frente a la viabilidad celular de esta línea de células cancerosas. Para el resto de líneas, sin embargo, la acción es muy moderada o nula.

Tabla 4.6. Efecto sobre CD80 y CD11b de membrana en las células T Jurkat co-cultivadas con distintas líneas celulares cancerosas.

Comp. 100µM	JURKAT (HT-29)		JURKAT (MCF-7)		JURKAT (A-549)	
	% CD80	% CD11b	% CD80	% CD11b	% CD80	% CD11b
Control	100	100	100	100	100	100
BMS-8	102 ± 1	91 ± 8	117	111	96 ± 2	75 ± 24
T.3	94 ± 5	81 ± 11	88	76	83 ± 5	76 ± 32
T.4	86 ± 6	82 ± 17	89 ± 6	98 ± 16	90 ± 4	83 ± 11
T.5	97 ± 4	89 ± 13	94	85	93 ± 12	94 ± 10
T.6	98 ± 2	99 ± 3	104 ± 5	94 ± 4	99 ± 9	71 ± 36
T.7	94 ± 6	133 ± 9	96	90	98 ± 3	92 ± 6
T.8	101 ± 4	95 ± 6	100 ± 10	110 ± 10	73 ± 15	71 ± 29
T.9	92 ± 8	92	96 ± 3	111 ± 10	70 ± 24	91 ± 3
T.10	92 ± 3	89 ± 5	87 ± 6	92 ± 5	81 ± 22	78 ± 29
T.11	100 ± 8	118 ± 44	97 ± 1	84 ± 4	55 ± 2	86 ± 7
T.12	97 ± 1	91 ± 2	102 ± 5	111 ± 3	81 ± 22	72 ± 24
T.13	89 ± 1	89 ± 4	92 ± 2	93 ± 5	78 ± 23	82 ± 22
T.14	96 ± 1	89 ± 5	100	100	102 ± 6	62 ± 25

4.2.5. Ensayo viabilidad celular en co-cultivo

Los compuestos seleccionados para completar el estudio fueron los bromo derivados protegidos **T.3** (*p*-Br), **T.5** (*m*-Br) y **T.7** (*o*-Br). Así, con estos tres compuestos se llevó a cabo el estudio de viabilidad celular en co-cultivo de MCF-7 con la línea de células defensivas THP-1. Este estudio se realizó a tiempos de incubación de 24 y 48 h y con dos proporciones distintas de células cancerosas/células defensivas. En una de ellas la proporción fue 1:5 MCF-7:THP-1 y en la otra la proporción fue 2:1 MCF-7:THP-1. Los resultados se muestran en la Tabla 4.7 utilizando, al igual que en resto de ensayos, BMS-8 como control positivo y las células tratadas con DMSO como control negativo.

Tabla 4.7. Efecto sobre la viabilidad celular en co-cultivo con monocitos THP-1.

Comp. 100 μM	1:5 MCF-7:THP-1		2:1 MCF-7:THP-1	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Control	100	100	100	100
BMS-8	91 \pm 30	42 \pm 5	100 \pm 4	58 \pm 10
T.3	52 \pm 7	28 \pm 2	83 \pm 9	51 \pm 17
T.5	52 \pm 4	42 \pm 10	107 \pm 3	69 \pm 10
T.7	42 \pm 10	41 \pm 10	92 \pm 11	60 \pm 13

De los resultados mostrados en la Tabla 4.7 se puede concluir que en general el efecto sobre la viabilidad celular es mayor a 48 h independientemente de la proporción MCF-7/THP-1 utilizada. Cuando se emplearon los compuestos **T.5** (*m*-Br) y **T.7** (*o*-Br) en un exceso de THP-1 el efecto en la viabilidad celular de MCF-7 no variaba prácticamente nada con el tiempo, manteniéndose entre 40 y 50 %. Cuando se empleó **T.3** (*p*-Br), sin embargo, la viabilidad celular disminuyó considerablemente, pasando de 50 % a 28 %. Por otro lado, cuando las células cancerosas se encuentran en mayor proporción respecto a las defensivas, se observó que, a pesar de que a 24 h el efecto en la viabilidad celular era moderado, este aumentaba considerablemente a las 48 h de incubación obteniéndose una inhibición de la viabilidad de MCF-7 del 50 % para **T.3** (*p*-Br) y 30 y 40 % para **T.5** (*m*-Br) y **T.7** (*o*-Br) respectivamente.

Al igual que en el estudio de viabilidad celular anterior, se aprovechó la versatilidad de la técnica de citometría de flujo para estudiar el efecto de los compuestos sobre VEGFR-2 y PD-L1 de membrana cuando se co-cultivaron las células MCF-7 con THP-1 en las condiciones detalladas. De estos resultados se puede concluir que el efecto sobre estas dianas es muy moderado e incluso inexistente. Destacar únicamente que **T.3** (*p*-B) y **T.7** (*o*-Br) fueron capaces de inhibir en un 30 % VEGFR-2 de membrana tras 24 h de incubación de MCF-7 con THP-1 (proporción 2:1, MCF-7:THP-1) en una concentración de 100 μ M.

Por otro lado, los compuestos ensayados no mostraron ningún efecto, o una acción muy moderada, sobre las dianas CD80 y CD11b en la membrana de las THP-1 tras ser co-cultivadas con la línea celular MCF-7.

4.2.5.1. Estudio de la correlación dosis/efecto

De nuevo, el p-bromo derivado **T.3** fue seleccionado para realizar un estudio de correlación dosis/efecto sobre la viabilidad celular de MCF-7 en co-cultivo con THP-1. La Figura 4.16 muestra los resultados a las diferentes concentraciones testadas, y a dos tiempos de incubación, para una proporción MCF-7:THP-1 de 1:5.

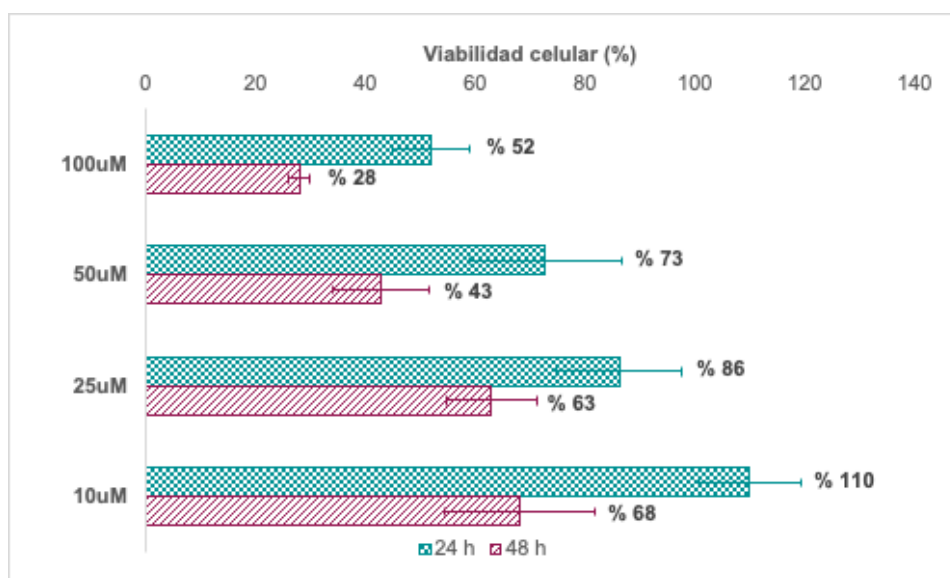


Figura 4.16. Correlación dosis/efecto en la viabilidad celular de MCF-7 en co-cultivo con THP-1 y tratada con el compuesto **T.3** (*p*-Br).

De los resultados de la Figura 4.16 se puede concluir que, en ambos tiempos de incubación, se establece una relación entre la dosis administrada y el efecto sobre la viabilidad de MCF-7, de forma que cuanto menor es la concentración de compuesto menor es el efecto observado. Aun así, tras 48 h de tratamiento, se observa que el efecto a concentraciones menores de 25 μ M, la acción se estabiliza con rangos de inhibición del 30 % de la viabilidad celular.

4.2.6. Estudio de citoquinas secretadas en el medio

Finalmente, se estudió la acción de los compuestos **T.3** (*p*-Br), **T.5** (*m*-Br) y **T.7** (*o*-Br) en la secreción al medio de cultivo de las citoquinas IL-6 y TNF- α , ambas muy implicadas en la enfermedad del cáncer. Este estudio se ha llevado a cabo sobre el medio recolectado en el tratamiento de monocultivo de MCF-7 y THP-1 así como el medio recolectado del co-cultivo (proporción 1:5) de ambas líneas celulares tras 24 h de incubación con los compuestos a 100 μ M.

En la Tablas 4.8 se muestran los resultados obtenidos para IL-6 como porcentajes respecto al control negativo cuando las células fueron tratadas con DMSO y utilizando BMS-8 como compuesto de referencia.

Tabla 4.8. IL-6 (%) secretado al medio.

Comp.	MCF-7	THP-1	MCF-7 + THP-1
Control	100	100	100
BMS-8	41 ± 65	0	0
T.3	92 ± 4	183 ± 5	156 ± 12
T.5	73 ± 29	173 ± 24	137 ± 24
T.7	91 ± 39	158 ± 11	115 ± 4

Los resultados de la Tabla 4.8 muestran que los compuestos son capaces de disminuir la expresión de IL-6 cuando se trata la línea de células cancerosas MCF-7 en monocultivo, tal y como lo hace el compuesto de referencia. Sin embargo, al tratar en monocultivo la línea de células defensivas THP-1 con los compuestos, estos siguen una tendencia contraria al BMS-8, aumentando la secreción de IL-6, un efecto que se mantiene cuando ambas líneas se encuentran en co-cultivo.

Seguidamente, en la Tabla 4.9 se muestran los resultados obtenidos para TNF- α , también como porcentajes respecto al control negativo cuando las células fueron tratadas con DMSO y BMS-8 como compuesto de referencia. En monocultivo de MCF-7 no se detectó la presencia de TNF- α para ninguna de las muestras. Por ello, en la Tabla 4.9 se presentan los resultados en monocultivo de THP-1 y del co-cultivo MCF-7/THP-1. De estos se deduce que los compuestos son capaces de promover la expresión de la citoquina TNF- α en monocultivo de THP-1, un efecto que se ve todavía más aumentado en co-cultivo de MCF-7 y THP-1 para los compuestos **T.3** (*p*-Br) y **T.5** (*m*-Br).

Tabla 4.9. TNF- α (%) secretado al medio.

Comp.	THP-1	MCF-7 + THP-1
Control	100	100
BMS-8	287	1709 ± 192
T.3	185 ± 4	276 ± 20
T.5	144 ± 9	238 ± 13
T.7	144 ± 19	171 ± 9

4.3. Evaluación biológica de los derivados—Estancia de Investigación

La evaluación biológica de los compuestos se amplió durante una estancia de investigación en el grupo del profesor Alan Serrels ubicado en el Instituto de Genética y Cáncer de la Universidad de Edimburgo. Durante esta estancia de investigación se profundizó en el efecto de los derivados seleccionados **T.3** (*p*-Br), **T.5** (*m*-Br) y **T.7** (*o*-Br) sobre las células T.

4.3.1. Introducción a los estudios biológicos

Los estudios realizados durante esta estancia se llevaron a cabo en dos líneas celulares distintas. Una de ellas cancerosa y otra defensiva. En el caso de la línea de células cancerosas se utilizó una línea de adenocarcinoma pancreático ductal (PDAC), cuya morfología se puede ver en la Figura 4.17.

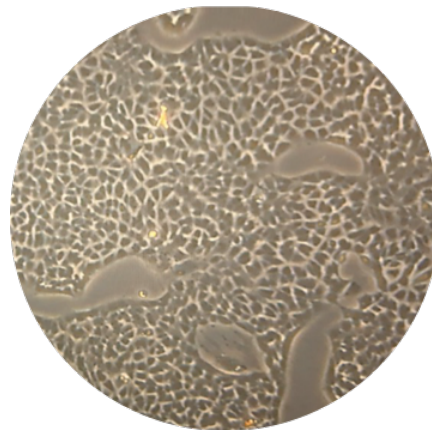


Figura 4.17. Adenocarcinoma de Páncreas Ductal (PDAC).

El PDAC, uno de los tipos de cáncer con mayor prevalencia, se caracteriza por la formación de tumores grandes con gran facilidad para metastaziar, lo que provoca una tasa de supervivencia menor al 20 %.¹⁴⁶ Además, este tipo de cáncer tiene un microentorno no inmunogénico, inmunodeprimido y resistente a terapias, lo cual hace que la búsqueda de inmunoterapias para este tipo de cáncer sea un desafío.

Por otro lado, se utilizó una línea de células T CD8+, conocidas como OT-I, que son una línea de células defensivas extraídas de los nodos linfáticos

¹⁴⁶ Sarantis, P.; Koustas, E.; Papadimitropoulou, A.; Papavassiliou, A.G.; Karamouzis, M.V. Pancreatic ductal adenocarcinoma: Treatment hurdles, tumor microenvironment and immunotherapy. *World. J. Gastrointest. Oncol.* **2020**, *12*, 173-181. Doi: 10.4251/wjgo.v12.i2.173.

de ratones y que han sido modificadas para que sus células T reconozcan un único antígeno a la hora de formar el complejo TCR-pMHC, concretamente el péptido de ovoalbúmina (OVA) SIINFEKL (véase la Figura 4.18).¹⁴⁷ Estas células han sido altamente utilizadas para estudios de autoinmunidad y tolerancia o para estudiar la respuesta inmune en aquellas líneas celulares cancerosas que han sido diseñadas para expresar el péptido OVA.¹⁴⁸

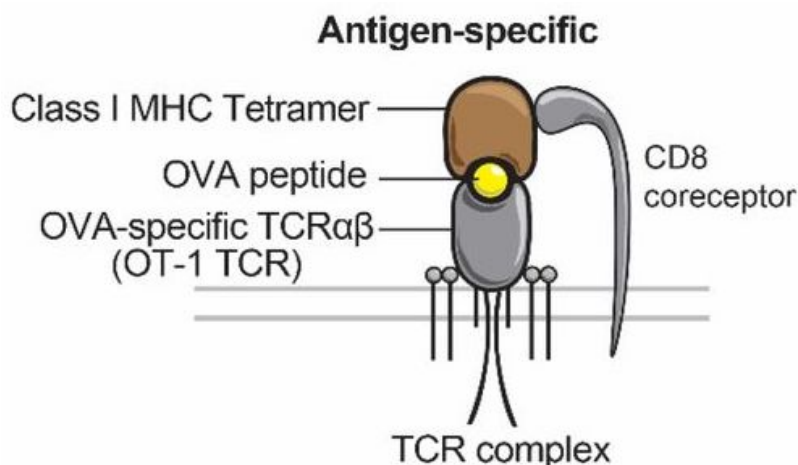


Figura 4.18. Reconocimiento específico del péptido OVA para la formación del complejo TCR-pMHC.¹⁴⁹

De esta forma, la combinación de estas dos líneas celulares, ambas provenientes de ratón, forman un sistema de co-cultivo robusto para poder estudiar la capacidad de los compuestos como oncoinmunomoduladores.

Las técnicas utilizadas para los ensayos fueron la citometría de flujo (véanse los apartados 4.1.1.2 y 4.1.3.1), el ensayo ELISA (véase el apartado 4.1.3.3) y Western blot la cual se explicará a continuación. Con estas técnicas se llevó a cabo un estudio tanto de la viabilidad celular como del efecto de los compuestos sobre PD-L1 en las células PDAC, así como un estudio detallado del efecto de nuestros compuestos sobre las células defensivas OT-I.

¹⁴⁷ Pritchard, G.; Cross, E.; Strobel, M.; Jamenson, S.C.; Kedl, R.M.; Hogquist, K.A.; Hunter, C.A. Spontaneous partial loss of the OT-I transgene. *Nat. Immunol.* **2016**, *17*, 471. Doi: 10.1038/ni.3411.

¹⁴⁸ Clarke, S.R.; Barnden, M.; Kurts, C.; Carbone, F.R.; Miller, J.F.; Heath, W.R. Characterization of the ovalbumin-specific TCR transgenic line OT-I: MHC elements for positive and negative selection. *Immunol. Cell Biol.* **2000**, *78*, 110-117. Doi: 10.1046/j.1440-1711.2000.00889.x.

¹⁴⁹ Chua, X.Y.; Salomon, A. Ovalbumin antigen-specific activation of T cell receptor closely resembles soluble antibody stimulation as revealed by BOOST phosphotyrosine proteomics. *Proteome Res.* **2021**, *20*, 6, 3330-3344. Doi: 10.1021/acs.jproteome.1c00239.

4.3.1.1. Western blot

La técnica de western blot es muy utilizada para la cuantificación relativa de proteínas específicas y se basa en la especificidad del reconocimiento entre antígeno y anticuerpo.¹⁵⁰ En esta técnica las proteínas de una muestra se separan mediante electroforesis en función de su peso molecular. Una vez separadas, la información del gel se transfiere a una membrana en la que cada proteína aparece como una banda. Para el reconocimiento de las proteínas, dicha membrana se ha de incubar con los anticuerpos específicos de las proteínas de interés y, posteriormente, para que sea posible procesar las imágenes mediante luminiscencia, se han de incubar con un anticuerpo secundario que reconozca el anticuerpo primario utilizado y además presente una actividad enzimática que dé lugar a la producción de luz. Normalmente se utiliza la peroxidasa del rábano (HRP) como actividad enzimática conjugada al anticuerpo secundario (véase la Figura 4.19).¹⁵¹

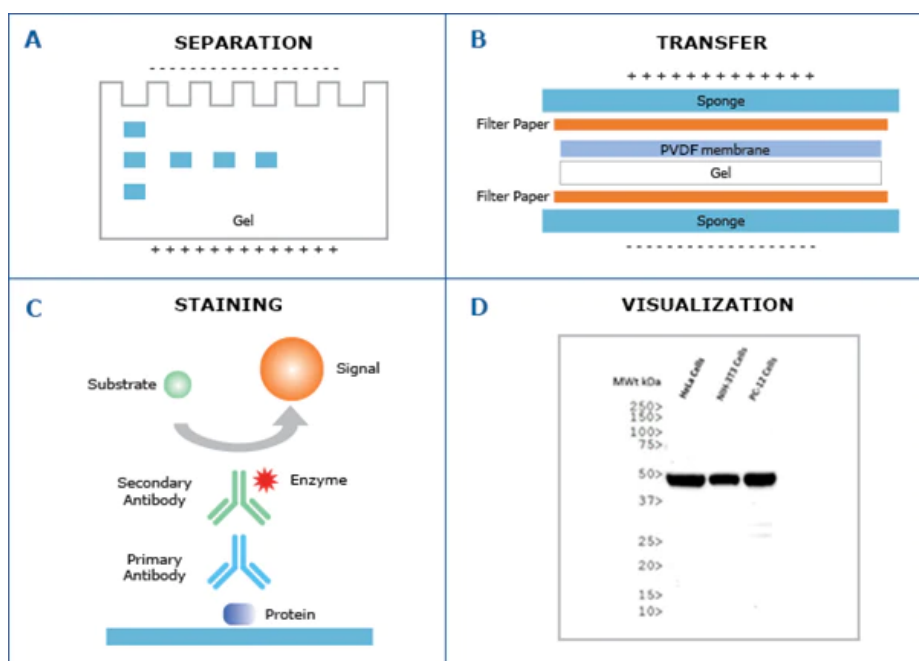


Figura 4.19. Pasos a seguir en la técnica de Western blot.¹⁵²

Antes de comenzar con el proceso de Western blot la muestra necesita de un procesamiento previo en el que se extraen todas las proteínas presentes en

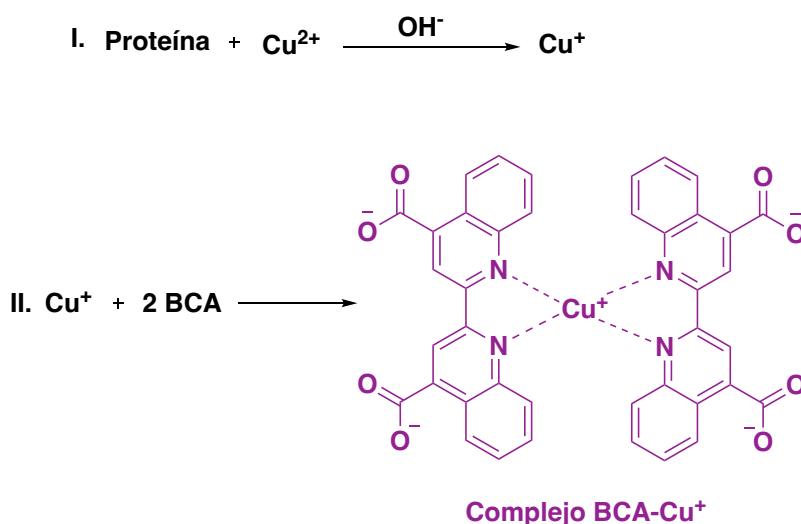
¹⁵⁰ De la Fuente Gonzalez, A.; Rodríguez Lozano, J.; Fonseca Capdevila, E. Análisis de Proteínas mediante electroforesis e inmunotransferencia (Western blot). *Piel*. **2007**, 22, 252-258. Doi: 10.1016/S0213-9251(07)73064-2.

¹⁵¹ Mahmood, T.; Yang, P.C. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *N. Am. J. Med. Sci.* **2012**, 4, 429-434. Doi: 10.4103/1947-2714.100998.

¹⁵² Sitio web: <https://www.e-allscience.com/blogs/articulos/introduccion-a-western-blot> (Descargada mayo 2023).

la célula, con cuidado de que estas no se desnaturalicen. Un paso muy importante para que la técnica se realice correctamente, y se puedan comparar los resultados entre muestras, es la determinación de la concentración de proteínas total presente para, de esta forma, utilizar una concentración equivalente en todas las muestras.¹⁵¹ Para esto se utiliza el ensayo del ácido bicinconínico (BCA), un método de detección y cuantificación colorimétrica de la proteína total de una muestra.

Este ensayo se basa en la reducción del Cu^{2+} a Cu^+ por la acción de las proteínas en un medio alcalino y la posterior reacción de dicho catión con el reactivo BCA, lo que origina un complejo Cu^+ -BCA de coloración morada (véase el Esquema 4.20). El complejo formado es soluble en agua y produce una señal de absorbancia a 562 nm que es directamente proporcional a la cantidad de proteína.¹⁵³



Esquema 4.2. Fundamento químico del ensayo BCA.

Esta técnica proporciona una cuantificación relativa. Para una cuantificación real y reproducible es vital la selección de un correcto gen constitutivo para normalizar los datos obtenidos. Es importante que este gen constitutivo no interfiera con la señal de la muestra, por lo que se ha de tener en cuenta su peso molecular.¹⁵⁴ En esta Tesis se utilizó GAPDH o tubulina, como genes constitutivos, en función del peso molecular de la proteína de interés.

¹⁵³ Sitio web: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/protein-biology/protein-assays-analysis/protein-assays/bca-protein-assays.html> (Consultado Mayo 2023).

¹⁵⁴ Sitio web: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/BID/Technical-Notes/ibright-normalization-western-blotting-relative-quantitation-technical-note.pdf> (Descargado septiembre 2022).

El primer paso para la cuantificación, consiste en determinar la intensidad de señal de las bandas obtenidas, tanto para las muestras como para los genes constitutivos. Para ello, se pueden utilizar diferentes programas, en nuestro caso se utilizó el programa "ImageStudio Lite" un software de procesamiento de imágenes. Una vez obtenidos los resultados, se lleva a cabo la normalización de los datos y para ello se calcula el factor de normalización mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Factor de Normalización} = \frac{\text{Señal del gen constitutivo observada en cada banda}}{\text{Mayor señal observada para el gen constitutivo}}$$

Finalmente, se normalizan las señales obtenidas para la proteína de interés mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Señal Experimental normalizada} = \frac{\text{Señal observada en cada banda}}{\text{Factor de normalización para esa banda}}$$

Con la señal ya normalizada se puede llevar a cabo el procesamiento que cada tipo de muestra requiera, como por ejemplo la normalización respecto a un control.¹⁵⁴

4.3.2. Viabilidad celular y acción sobre PD-L1

El estudio de viabilidad celular se llevó a cabo en la línea de células PDAC mediante citometría de flujo, y se aprovechó la versatilidad de esta técnica para estudiar la acción de los compuestos sobre PD-L1 de membrana. Las células PDAC se incubaron con los compuestos a 100 μM durante 24 h utilizando las células tratadas con DMSO como control negativo. Este mismo estudio se llevó a cabo co-cultivando las células PDAC con un exceso de OT-I (proporción 1:5) bajo las mismas condiciones mencionadas.

Ambos estudios demostraron que los compuestos no tenían ninguna acción sobre PD-L1 de membrana ni en monocultivo ni en co-cultivo. Estos resultados eran inesperados, sobre todo si se tiene en cuenta la actividad de los compuestos sobre PD-L1 en las líneas de células tumorales humanas HT-29, MCF-7 y A-549. Por ello se llevó a cabo un estudio bibliográfico para discernir si había alguna diferencia entre PD-L1 de ratón (mPD-L1) y PD-L1 humana (hPD-L1). Esta investigación bibliográfica puso de manifiesto que los compuestos basados en moléculas pequeñas no son capaces de interaccionar con mPD-L1, ejemplificado con los compuestos desarrollados por BMS, conocidos por inhibir hPD-L1. Esto es sorprendente dado que los

cambios en la secuencia de ambas proteínas son tan insignificantes que se ha visto que, tanto mPD-L1 como hPD-L1 son capaces de interactuar con hPD-1 con gran afinidad, provocando el bloqueo inmune en ambos casos.¹⁵⁵

Por otro lado, en lo que a viabilidad se refiere, en general los derivados no presentaron actividad sobre las células PDAC en monocultivo, mientras que todos ellos incrementaron dicha viabilidad en co-cultivo con OT-1, siendo este aumento significativo en el caso de **T.7** (*o*-Br).

También se estudió la disminución de la viabilidad de las células PDAC por la acción efectiva de las células T OT-I en contacto con los compuestos a 100 μ M tras 24 h de incubación. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.20 como porcentajes respecto al control negativo de las células tratadas con DMSO.

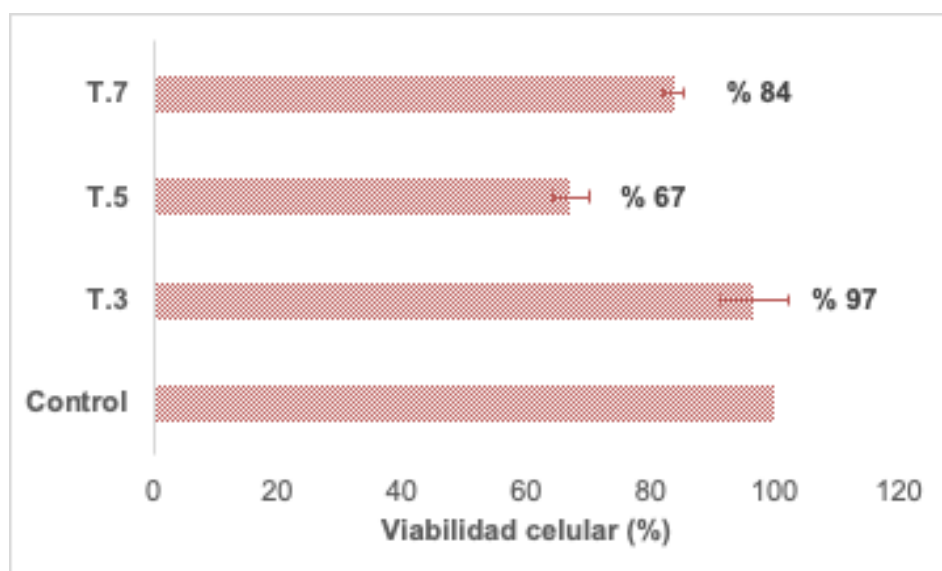


Figura 4.20. Viabilidad celular de PDAC por la acción efectiva de las células T OT-I.

De los resultados mostrados en la Figura 4.20 se puede concluir que los derivados **T.3** (*p*-Br) y **T.7** (*o*-Br) tienen un efecto moderado en la reactivación de las células OT-I, mientras que **T.5** (*m*-Br) es capaz de provocar una inhibición del 30 % en la viabilidad celular.

¹⁵⁵ Magiera-Mularz, K.; Kocik, J.; Musielak, B.; Plewka, J.; Sala, D.; Machula, M.; Grudnik, P.; Hajduk, M.; Czepiel, M.; Siedlar, M.; Holak, T.A.; Skalniak, L. Human and mouse PD-L1: similar molecular structure, but different druggability profiles. *iScience*. **2020**, *24*, 101960. Doi: 10.1016/j.isci.2020.101960.

4.3.2.1. Estudio del TNF- α secretado al medio

Sobre el medio recogido del ensayo anterior se llevó a cabo un test ELISA para estudiar la secreción de TNF- α . En este estudio se observó que, en el medio recogido de las muestras de PDAC en monocultivo, no había presencia de la citoquina TNF- α , mientras que en el medio proveniente de las muestras de co-cultivo PDAC/OT-I se obtuvieron los resultados presentados en la Figura 4.21, de nuevo referenciados a un control negativo. Estos resultados muestran que cada uno de los compuestos provoca una tendencia distinta. Cabe destacar **T.7** (*o*-Br) como el más activo ya que aumenta la secreción de la citoquina TNF- α de forma significativa. Por otra parte, **T.5** (*m*-Br) inhibe la secreción de TNF- α en un 40 % mientras que **T.3** (*p*-Br) no tienen ningún efecto sobre TNF- α .

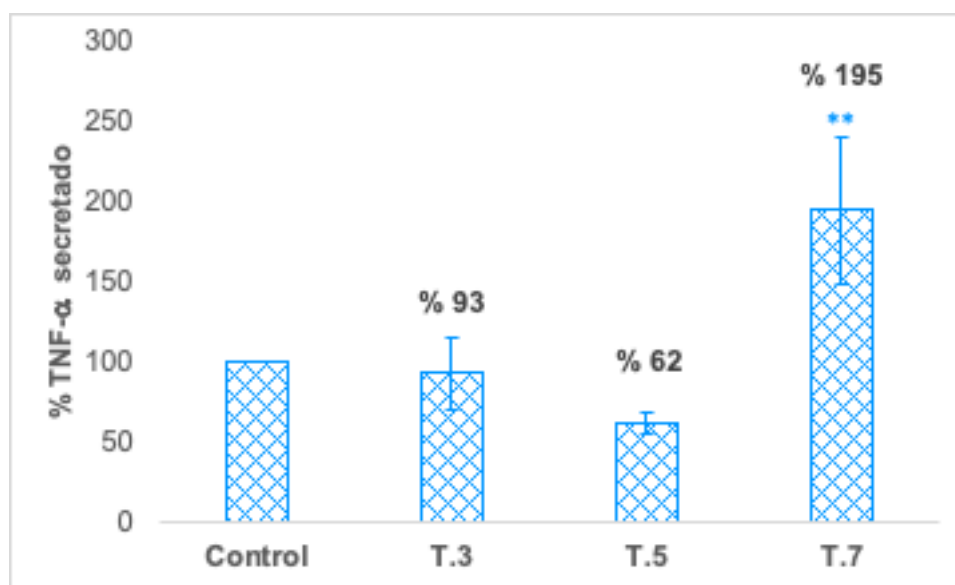


Figura 4.21. Secreción de TNF- α al medio obtenido del co-cultivo PDAC/OT-I.

4.3.3. Estudio sobre las células T OT-1

Para comprobar si los resultados obtenidos por la acción efectiva de OT-I sobre las células PDAC, se debía al efecto directo de los compuestos sobre este tipo de células, se llevó a cabo un estudio de los derivados seleccionados en monocultivo con las células CD8+.

En primer lugar, se comprobó que los compuestos a la concentración de trabajo (100 μ M) no eran tóxicos para estas células mediante el estudio de la viabilidad celular por citometría de flujo. De este ensayo se obtuvo que

ninguno de los derivados testados tenía efecto en la viabilidad celular de las OT-I tras 24 h de incubación.

4.3.3.1. Efecto sobre inmunorreceptores de membrana en las CD8+

Con el fin de comprobar el efecto de los compuestos sobre las OT-I se estudió, mediante citometría de flujo, el efecto sobre los receptores inmunes LAG-3, TIM-3, PD-1, CD69 y OX40 presentes en la superficie de las células T exhaustas. Los resultados se muestran en la Tabla 4.10 referenciados a las células tratadas con DMSO como control negativo. De los resultados se puede concluir que, en general, los compuestos promueven la expresión de estos inmunorreceptores, destacando la acción sobre OX40, un marcador co-estimulador. También destaca el compuesto T.5 (*m*-Br), que es capaz de inhibir CD69, un marcador de agotamiento celular, en un 40 %. Así, en general las células CD8+ podrían encontrarse en un estado de activación en respuesta a la acción de los compuestos ensayados.

Tabla 4.10. Efecto sobre inmunorreceptores en la membrana de CD8+.

Comp.	LAG-3	TIM-3	PD-1	CD69	OX40
Control	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
T.3	1,27 ± 0,33	1,35 ± 0,16	1,31 ± 0,15	1,02 ± 0,04	1,82 ± 0,58
T.5	1,14 ± 0,18	1,27 ± 0,22	1,38 ± 0,04	0,66 ± 0,10*	1,39 ± 0,22
T.7	0,87 ± 0,09	1,12 ± 0,12	0,92 ± 0,09	0,98 ± 0,07	1,62 ± 0,66

4.3.3.2. Efecto sobre la cascada de señalización OT-I

También se estudió, mediante la técnica de Western blot, el efecto de los compuestos sobre la cascada de señalización de las OT-I. Para ello, se incubaron los compuestos a 100 μM con OT-I, y de la suspensión celular obtenida se preparó la muestra para el estudio de FYN y LCK sin fosforilar y fosforilada en Y505 y Y395, ZAP70 sin fosforilar y fosforilada y el complejo LAT fosforilado y sin fosforilar. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.22. Cabe señalar que los resultados son parte de una única réplica ya que por motivos de tiempo no se pudo repetir el ensayo.

De los resultados obtenidos se puede concluir que mientras que ninguno de los compuestos tiene un efecto sobre FYN, estos si son capaces de aumentar la expresión de LCK así como su forma fosforilada Y505. Por otra parte, en cuanto a su acción sobre ZAP70 y LAT se aprecia una acción

contraria sobre sus formas sin fosforilar y fosforilada, provocándose una disminución de la expresión de ZAP70 sin fosforilar y LAT fosforilada, destacando, sobre todo, la inhibición de esta última. En general, se puede decir que todos los compuestos están involucrados en la modulación de la cascada de señalización de las CD8+ desencadenada por la acción de TCR teniendo, por tanto, implicaciones en su estado de activación.

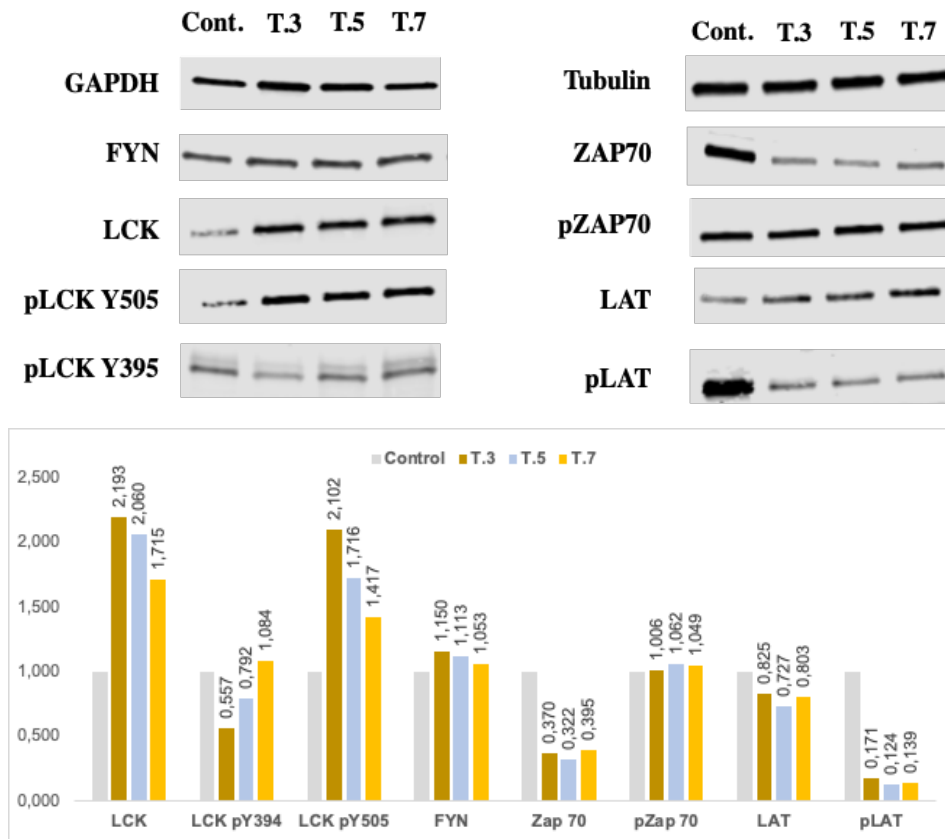


Figura 4.22. Expresión de las proteínas implicadas en la cascada de señalización de OT-I por Western blot.

4.4. Conclusiones

Tras el estudio de la actividad biológica de los derivados de triazol, se ha visto que las pequeñas variaciones en la estructura química de los mismos ha derivado en variaciones en su actividad según la línea celular estudiada así como según la diana de interés. En este sentido y para estudiar la correlación entre la estructura y su efecto tanto en las dianas como en la viabilidad celular en co-cultivo, se han representado los resultados obtenidos para cada compuesto en cada línea celular en tres gráficas que se recogen en la Figura 4.23. De estas gráficas se puede deducir que, en general, en la línea HT-29 existe una buena correlación entre el efecto sobre las dianas

biológicas y la inhibición de la viabilidad celular, siendo los derivados más lipofílicos, es decir, los que poseen el grupo protector dimetoxitritilo, los que mejor mantienen esta correlación, destacando sobre los que presentan un grupo hidroxilo libre en el extremo de la molécula. Esta correlación, sin embargo, no es clara para la línea A-549, lo cual se puede atribuir a la baja sensibilidad de esta línea a la acción de los compuestos.

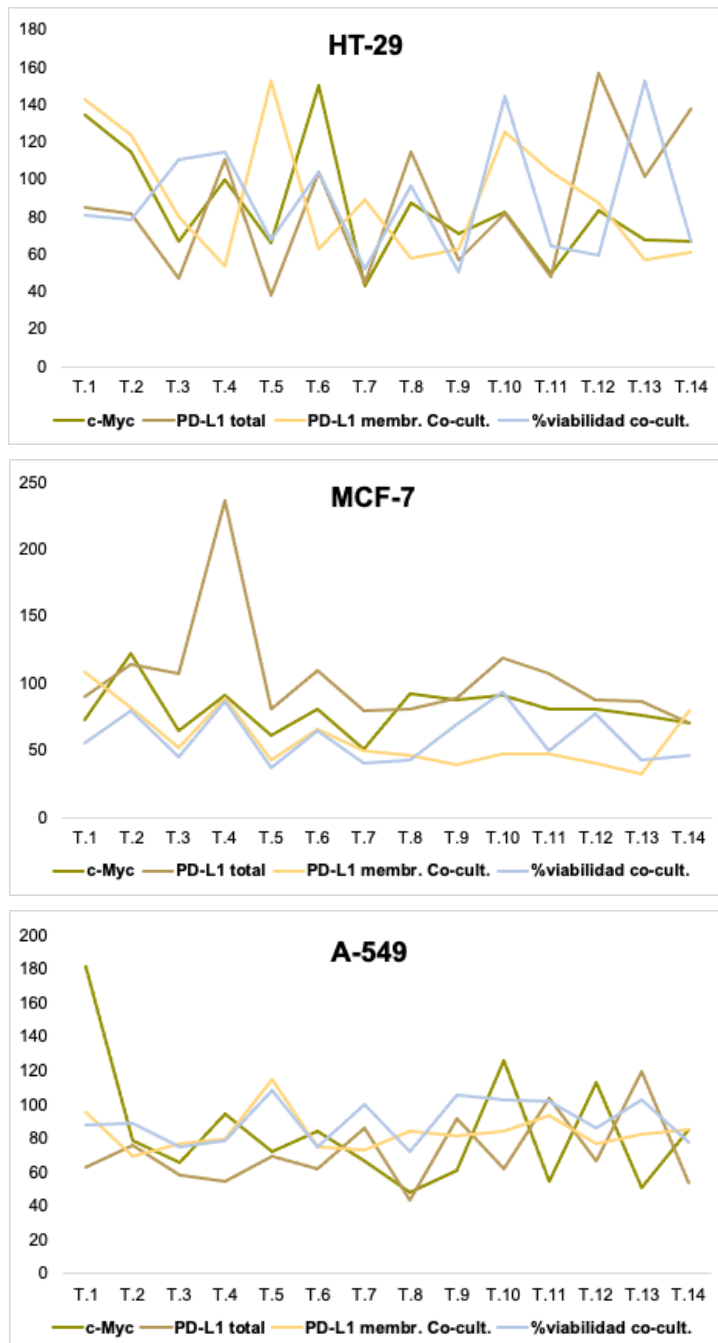


Figura 4.23. Efecto de los derivados de triazol (T.1 -T.14) sobre las dianas biológicas y la viabilidad celular en co-cultivo con células T Jurkat en las tres líneas celulares estudiadas.

En la Figura 4.23 se puede ver que MCF-7 es la línea más sensible a la acción de estos derivados de triazol. Al igual que en HT-29, la correlación es clara, sobre todo en el caso de los bromo-derivados (**T.3-T.8**), dónde destaca la acción de **T.3**, **T.5** y **T.7**, cuyas estructuras se pueden ver en la Figura 4.24.

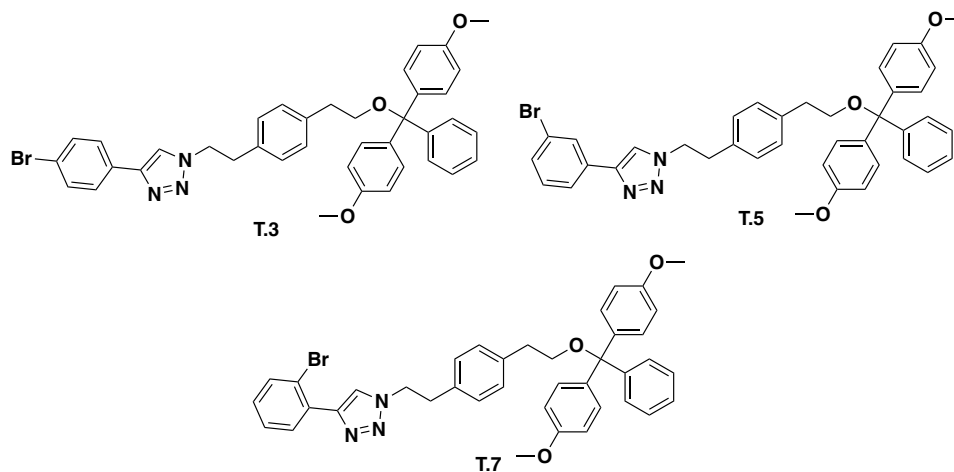


Figura 4.24. Estructuras químicas de bromo-derivados

Es decir, los derivados más lipofílicos en un extremo y con sustituyentes que retiran electrones, del sistema feniltriazol en el otro proporcionan en general un mayor efecto multidiana: la viabilidad celular disminuye en cocultivo y las tasas de inhibición de PD-L1 y c-Myc son buenas.

Estos tres derivados fueron seleccionados para ampliar el estudio de su acción farmacológica, del que se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- En el estudio sobre la interacción directa sobre ambas dianas, utilizando la técnica de TSA, destacó el compuesto **T.7** (*o*-Br), que es el que provoca una mayor desestabilización del complejo proteína-ligando con valores de ΔT_m de -5 y -2 para c-Myc y PD-L1 respectivamente.
- En el estudio sobre el efecto en la expresión génica de c-Myc y PD-L1 destacó **T.3** (*p*-Br). Este compuesto mejora el efecto del compuesto de referencia con rangos de inhibición génica de 50 y 33 % para c-Myc y PD-L1 respectivamente.
- En el estudio de la correlación dosis/efecto, el compuesto **T.3** (*p*-Br) es el que mostró mayor actividad frente a ambas dianas biológicas, con rangos de inhibición del 50 % a 10 μ M.

- En el estudio sobre la secreción al medio de IL-6 y TNF- α , de nuevo destacó el compuesto **T.3** (*p*-Br) al ser el que provocó una mayor secreción de ambas citoquinas al medio por parte de las células defensivas THP-1.
- En el estudio sobre la acción de los compuestos sobre CD8+ se vio que en general, estos derivados estaban involucrados en la modulación de la cascada de señalización iniciada por TCR, encontrándose estas células en un estado de activación derivada de la acción de los mismos.

En la Figura 4.25 se compara la inhibición, provocada por los bromo derivados, sobre la viabilidad celular de MCF-7 en co-cultivo con las líneas de células defensivas THP-1 y células T Jurkat, De esta figura se puede concluir que el compuesto **T.3** (*p*-Br) es el que muestra una mayor actividad en esta línea celular.

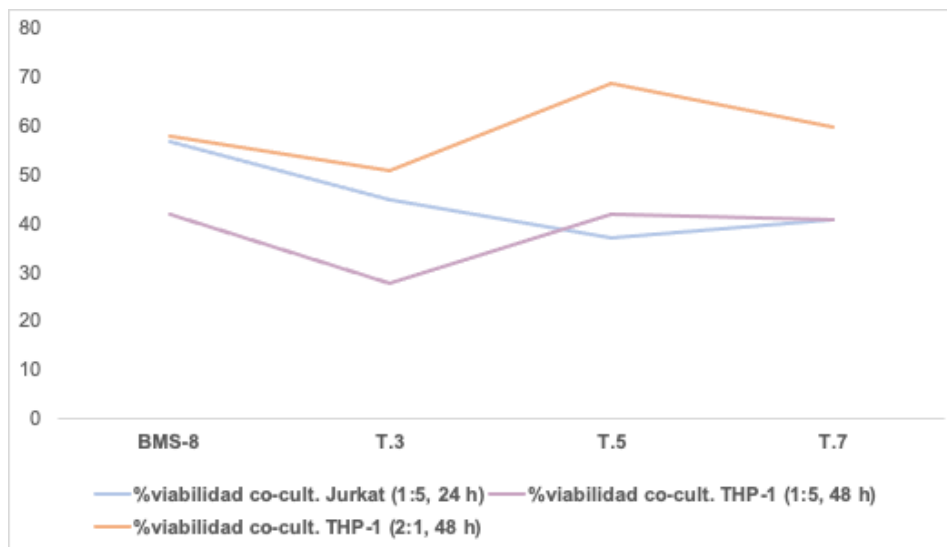


Figura 4.25. Comparación del efecto de los bromo derivados seleccionados sobre la viabilidad celular de MCF-7 en co-cultivo con células inmunes.

5. DERIVADOS DE DIARILUREA

5. DERIVADOS DE DIARILUREA

5.1. Diseño de los derivados de diarilurea

Siguiendo en la línea de los inhibidores multidiaria inmunoreguladores, se decidió estudiar una nueva familia de compuestos que presentara actividad no solo frente a PD-L1, sino también frente a VEGFR-2. Como se ha visto, VEGFR-2 es el principal mediador de la señal de VEGF, y está implicado tanto en la angiogénesis como en la regulación de la supresión del sistema inmune, dado que la formación de vasos sanguíneos defectuosos promueve la eliminación de las células inmunes del TME.⁸³

Para el diseño de la nueva familia de compuestos se tuvieron en cuenta trabajos previos realizados en el grupo de investigación.^{107, 156} En estos estudios se vio que los derivados funcionalizados **U.I** y **U.II**, que contienen un grupo urea en su estructura, mostraron una gran capacidad antiangiogénica e inmunomoduladora. (véase la Figura 5.1).

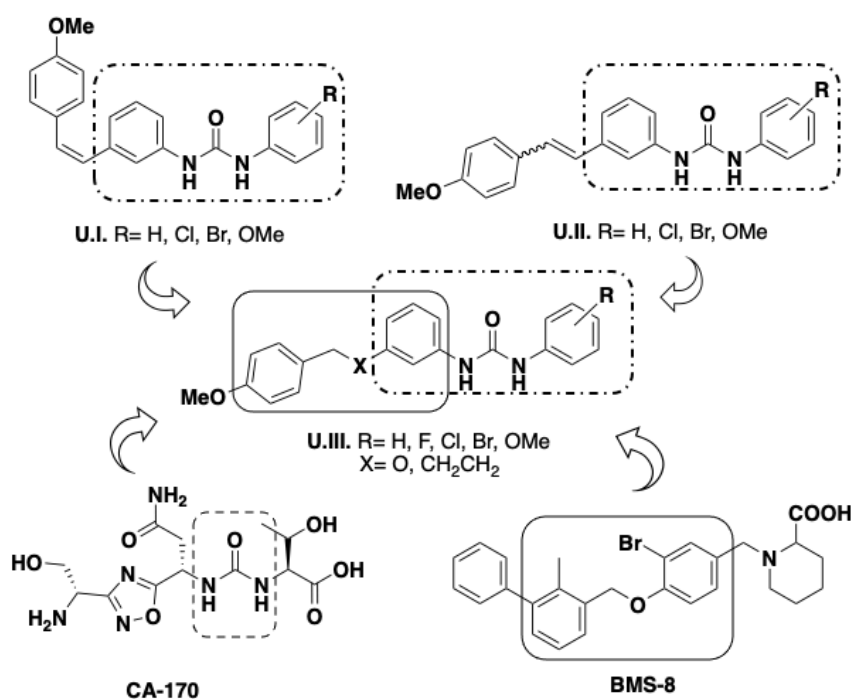


Figura 5.1. Estructura general de derivados con potencial actividad inmunomoduladora.

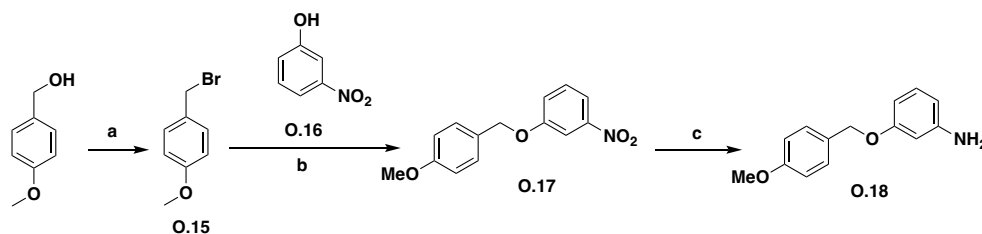
¹⁵⁶ Martín-Beltrán, C.; Gil-Edo, R.; Hernández-Ribelles, G.; Agut, R.; Marí-Mezquita, P.; Carda, M. and Falomir, E. Aryl Urea Based Scaffolds for Multitarget Drug Discovery in Anticancer Immunotherapies. *Pharmaceuticals*. **2021**, *14*, 337-350. Doi: 10.3390/ph14040337.

De entre los compuestos **U.I** y **U.II** destacaban los (*Z*) y (*E*)-estiril-*p*-bromo derivados, los cuales mostraban rangos de inhibición del 50 y 80 % para VEGFR-2 y PD-L1, respectivamente. Además, el (*Z*)-estiril-*p*-bromo derivado fue capaz de inhibir la proliferación de células cancerosas en un 90 % al ser éstas co-cultivadas con una línea de células defensivas. Además, en la literatura hay ejemplos de moléculas con una unidad urea que actúan como inhibidores de PD-L1 (CA-170 propuesto por Arginine), y como inhibidores de VEGFR-2 (sorafenib).

Basándonos en estos resultados, y en la estructura del compuesto BMS-8, diseñamos dos nuevas familias de compuestos con la estructura general **U.III** indicada en la Figura 5.1. En el caso de la primera familia se empleó una cadena de oxametileno para conectar la parte de *p*-metoxifenilo con la funcionalidad de diarilurea, de manera similar a la cadena conectora que contiene la estructura del BMS-8. Mientras que, para la segunda familia se utilizó una cadena conectora más larga de tipo propilo.

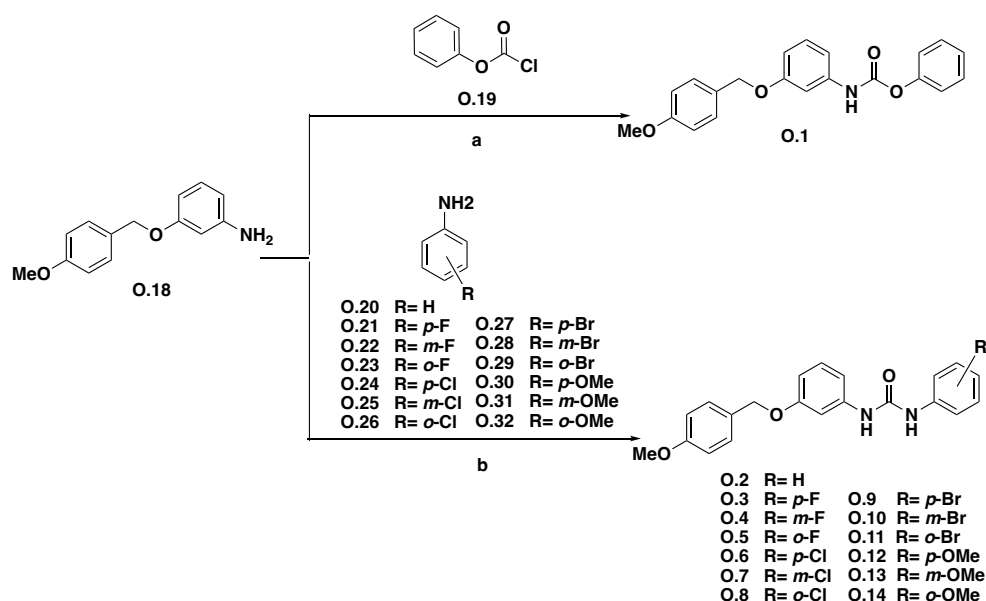
5.2. Síntesis de diarilureas con puente oxametileno

Para la preparación de la primera familia de diarilureas, con puente oxametileno como cadena conectora, se siguió la ruta sintética descrita en los Esquemas 5.1 y 5.2. La síntesis de los derivados se inició con la preparación de la anilina **O.18** (véase el Esquema 5.1). Para ello, el (4-metoxifenil)metanol comercial se convirtió en el 1-(bromometil)-4-metoxibenceno **O.15** mediante reacción con PBr_3 . Seguidamente, la reacción $\text{S}_{\text{N}}2$ de **O.15** con el fenóxido, generado *in situ* al reaccionar el nitrofenol **O.16** con carbonato potásico, proporcionó el 1-((4-metoxibenzil)oxi)-3-nitrobenzono **O.17**. Finalmente, la anilina deseada **O.18** se obtuvo por reducción del nitroderivado **O.17**.



Esquema 5.1. Ruta sintética para la formación de la anilina **O.18**. Reactivos y condiciones: (a) PBr_3 , Et_2O , 0 °C, después temp. amb., 2 h (96 %); (b) **O.16**, K_2CO_3 , acetona, temp. amb., 16 h (90 %); (c) H_2 , Pd/C, AcOEt, temp. amb., 18 h (84 %).

La anilina **O.18** se utilizó tanto en la síntesis del carbamato **O.1**, como en la síntesis de las benziletiloxiaril ureas de interés **O.2-O.14**, siguiendo dos métodos de reacción diferentes. En el primero de ellos se obtuvo el carbamato **O.1** por reacción de la anilina **O.18** con cloroformiato de fenilo. En el segundo, las ureas se obtuvieron mediante un proceso *one pot* en dos pasos.^{157,158,159} En primer lugar las anilinas **O.20-O.32** se hicieron reaccionar con trifosgeno y los intermedios generados en estas reacciones se trataron con la anilina **O.18**, lo que permitió la obtención de las ureas **O.2-O.14**.



Esquema 5.2. Ruta sintética para la formación de los derivados de diarilurea. Reactivos y condiciones: (a) Cloroformiato de fenilo (**O.19**), piridina, THF, 0 °C, 20 min, después temp. amb., 1 h. (78 %); (b) Anilina (**O.20-O.32**), trifosgeno, Et₃N, THF, temp. amb., 1 h, después 55 °C, 5 h, luego adición de la anilina **O.18**, Et₃N, THF, 40-50 °C, 24 h (41-99 %).

5.3. Síntesis de ureas con puente propilo

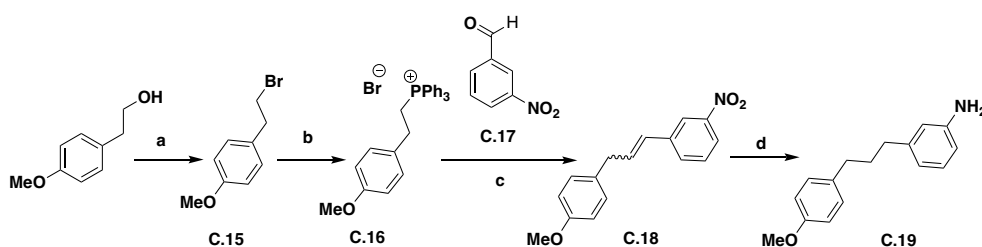
La segunda familia de compuestos se caracteriza por tener una cadena de propilo como espaciador. La ruta sintética que se siguió para su obtención es similar a la descrita anteriormente, variando tan solo la obtención de la anilina a partir de la cual se obtienen las diarilureas de interés (véanse los Esquemas 5.3 y 5.4).

¹⁵⁷ Zhou, S.; Yao, T.; Yi, J.; Li, D.; Xiong, J. A simple and efficient synthesis of diaryl ureas with reduction of the intermediate isocyanate by triethylamine. *J. Chem. Res.* **2013**, 37, 315-319. Doi: 10.3184/174751913X13663925002708.

¹⁵⁸ Majer, P.; Randad, R. S.; A safe and Efficient Method For preparation of N,N'-Unsymmetrically disubstituted ureas utilizing triphosgene. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 1937-1938. Doi: 10.1021/jo00086a061.

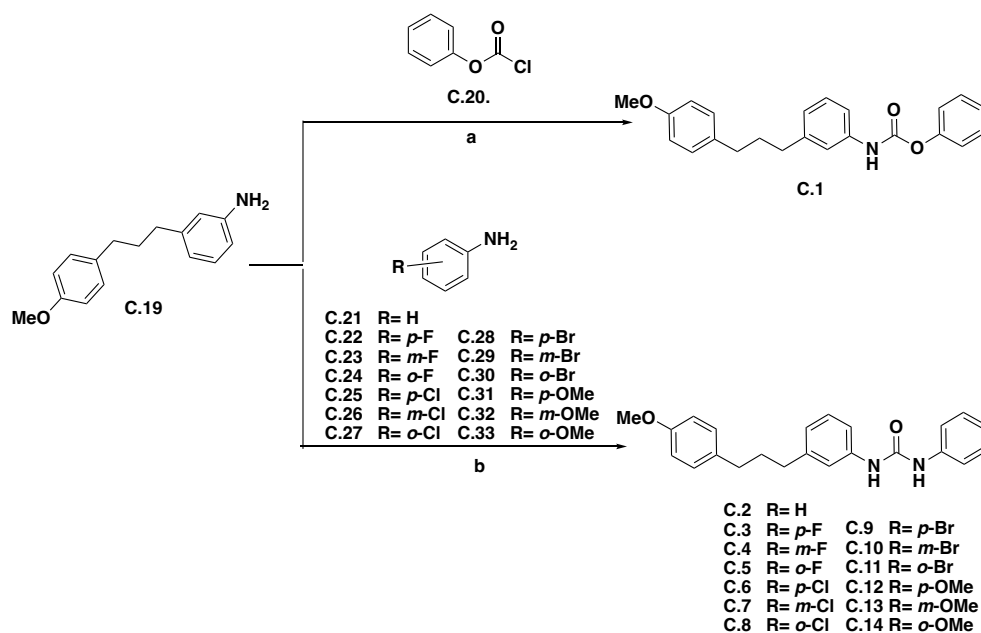
¹⁵⁹ Zhang, G.; Fu, X.; Peng, X.; Chen, J. Synthesis of a new series of 4-quinazoliny piperazine aryl ureas. *J. Chem. Res.* **2013**, 37, 730-732. Doi: 10.3184/174751913X13824453043915.

Así, para la formación de la anilina **C.19**, el 2-(4-metoxifenil)etan-1-ol, comercialmente accesible, se trató con PBr_3 para obtener el 1-(2-bromoetil)-4-metoxibenceno **C.15**. Este compuesto, por reacción con trifenilfosfano, se convirtió en la sal de fosonio **C.16**. La reacción de Wittig entre la sal de fosonio **C.16** y el 3-nitrobenzaldehído **C.17** se llevó a cabo en diclorometano en presencia de carbonato potásico y 18-corona-6 y proporcionó una mezcla *E/Z* de 1-(3-(4-metoxifenil)prop-1-en-1-il)-3-nitrobenzoceno **C.18**. Finalmente, la hidrogenación de la mezcla de estereoisómeros proporcionó la anilina **C.19**.



Esquema 5.3. Ruta sintética para la formación de la anilina **C.19**. Reactivos y condiciones: (a) PBr_3 , tolueno, $110\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h (94 %); (b). PPh_3 , EtOH, $80\text{ }^\circ\text{C}$, 6 días (83 %); (c) **C.17**, K_2CO_3 , 18-corona-6, CH_2Cl_2 , $40\text{ }^\circ\text{C}$, 24 h (79 %); (d). H_2 , Pd/C, AcOEt, temp. amb., 18 h (78 %).

Al igual que en la síntesis de los anteriores derivados de diarilurea, la anilina obtenida se utilizó para la síntesis del carbamato **C.1** y de las diarilureas **C.2-C.14**, siguiendo las mismas condiciones de reacción anteriormente descritas (véase el Esquema 5.4.).



Esquema 5.4. Ruta sintética para la formación de los derivados de diarilurea. Reactivos y condiciones: (a) Cloroformiato de fenilo (**C.20**), piridina, THF, 0 °C, 20 min, después temp. amb., 1 h. (71 %); (b) Anilina (**C.21- C.33**), trifosgeno, Et₃N, THF, temp. amb., 1 h, después 55 °C, 5 h; luego anilina **C.19**, Et₃N, THF, 40-50 °C, 24 h. (34- 92 %).

6. EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LOS DERIVADOS DE DIARILUREA

6. EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LOS DERIVADOS DE DIARILUREA

6.1. Introducción a los estudios biológicos

Las líneas celulares utilizadas para el estudio de los derivados de diarilurea fueron las mismas que las utilizadas en el estudio de los derivados de tipo triazol: HT-29, A-549 y MCF-7 como líneas tumorales y HEK-293, HMEC-1 y THP-1 como líneas celulares no cancerosas (véanse especificaciones de cada línea en el apartado 4.1). Además, las técnicas utilizadas para este estudio también fueron esencialmente las mismas: ensayo MTT (véase el apartado 4.1.1.1), citometría de flujo (véanse los apartados 4.1.1.2 y 4.1.3.1), ensayo ELISA (véase el apartado 4.1.3.3) y microscopia confocal (véase el apartado 4.1.3.4). Mediante estas técnicas se estudió el efecto de los compuestos sobre la viabilidad celular de las células cancerosas en monocultivo y en co-cultivo, así como el efecto sobre las dianas biológicas de interés, que fueron, principalmente, VEGFR-2 y PD-L1. Además, también se estudió la capacidad antiangiogénica de los derivados.

6.1.1. Estudio de capacidad antiangiogénica

El estudio de la capacidad antiangiogénica de los compuestos permite determinar el efecto de los compuestos sobre la formación de nuevas redes microvasculares. En la angiogénesis son las células endoteliales las encargadas de la formación de los nuevos vasos sanguíneos llevando a cabo, además, para ello funciones como la degradación de la matriz extracelular (ECM), la migración, la proliferación y la diferenciación de los microtúbulos. En el estudio *in vitro* de la acción antiangiogénica, las células endoteliales se cultivaron en las condiciones óptimas para que se den las funciones arriba comentadas.¹⁶⁰

Uno de los principales estudios *in vitro* relacionados con el proceso de angiogénesis es el estudio de diferenciación celular. En este proceso se mide la capacidad de las células endoteliales para la formación de estructuras tridimensionales con forma tubular. Así, para simular las condiciones *in vivo*, en las que las células endoteliales están rodeadas de la

¹⁶⁰ Goodwin, A.M. In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. *Microvasc. Res.* **2007**, 74, 172-183. Doi: 10.1016/j.mvr.2007.05.006.

matriz extracelular, éstas se siembran sobre un soporte que mimetiza dicha matriz.¹⁶¹

Existen diversas membranas que favorecen la formación de microtúbulos. En este trabajo se ha utilizado una membrana conocida como Matrigel®, la cual fue extraída del sarcoma Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) de ratón, un tumor rico en proteínas de la ECM.¹⁶² Este material está compuesto, principalmente, por laminina, pero también contiene colágeno IV y entactina, lo que favorece la formación de microtúbulos por parte de las células endoteliales (véase la Figura 6.1).¹⁶³

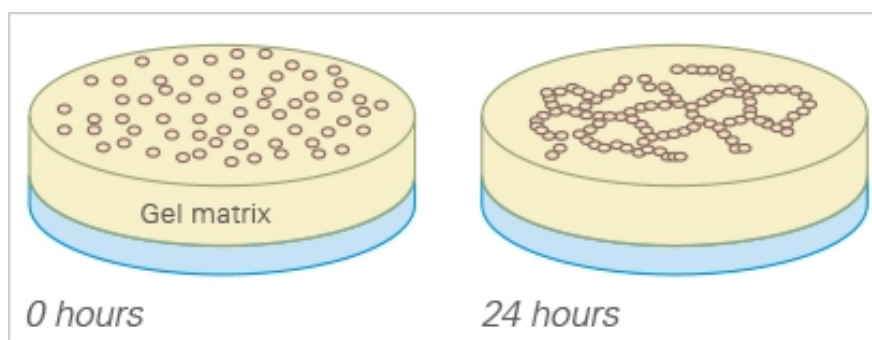


Figura 6.1. Formación de microtúbulos en Matrigel®.¹⁶¹

El efecto de los compuestos sobre la formación de microtúbulos se puede analizar atendiendo a dos mecanismos distintos. En el primero de ellos se estudia la actividad antiangiogénica midiéndose la capacidad de los compuestos para evitar la formación de microtúbulos, y en el segundo se estudia la actividad antivascular midiéndose la capacidad de los compuestos para romper los microtúbulos ya formados.

6.2. Evaluación biológica de la familia de diarilureas con puente oxametileno

En primer lugar, se detallarán los resultados obtenidos para la familia de diarilureas con puente oxametileno formada por 14 compuestos cuya estructura general se puede ver en el Esquema 5.2 (en la página 97). Esta

¹⁶¹ Sitio web: <https://ibidi.com/content/322-angiogenesis-assays> (Consultado mayo 2023).

¹⁶² Ikeda, T.; Yoshitake, Y.; Yoshitomi, Y.; Saito-Takatsuji, H.; Ishigaki, Y.; Yonekura, H. EPAC2 acts as a negative regulator in Matrigel-driven tubulogenesis of human microvascular endothelial cells. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 19453. Doi:10.1038/s41598-021-98906-9.

¹⁶³ Aisenbrey, E.A.; Murphy, W.L. Synthetic alternatives to Matrigel. *Nat. Rev. Mater.* **2020**, *5*, 539-551. Doi: 10.1038/s41578-020-0199-8.

familia está compuesta por el carbamato **O.1** y trece benziletiloxiaril ureas **O.2-O.14**.

6.2.1. Ensayo de viabilidad celular

Mediante el estudio de MTT se midió la capacidad de los compuestos **O.1-O.14** para inhibir la viabilidad celular. Para este ensayo se utilizaron las líneas celulares cancerosas HT-29, A-549 y las líneas celulares no tumorales HEK-293 y HMEC-1, las cuales se emplearon para determinar la selectividad de los compuestos hacia las células tumorales. Los valores de IC₅₀ obtenidos tras 48 h de incubación se muestran en la Tabla 6.1 junto a los compuestos de referencia Sorafenib (véase la estructura en la Figura 1.10, en la página 16) y BMS-8 (véase la estructura en la Figura 1.20, en la página 39).

Tabla 6.1. Valores de IC₅₀ para los compuestos **O.1-O.14**.*

Comp.	HT-29	A-549	HEK-293	HMEC-1
Sorafenib	17 ± 4	27 ± 2	5,0 ± 0,7	34 ± 3
BMS-8	19 ± 2	6 ± 1	60 ± 10	–
O.1.	6,8 ± 0,5	3,7 ± 0,5	>100	>100
O.2.	21 ± 10	6 ± 3	1,4 ± 0,2	>100
O.3.	5,5 ± 1,2	3,4 ± 0,8	>100	>100
O.4.	>100	>100	3,7 ± 0,8	>100
O.5.	>100	>100	16 ± 4	>100
O.6.	12 ± 4	15 ± 2	>100	>100
O.7.	38 ± 15	>100	3,3 ± 0,5	>100
O.8.	50 ± 4	48 ± 3	27 ± 9	>100
O.9.	11 ± 1	1,6 ± 0,8	>100	>100
O.10.	25 ± 2	3,9 ± 0,4	0,7 ± 0,3	>100
O.11.	41 ± 5	25 ± 1	8,7 ± 0,7	>100
O.12.	2,0 ± 1,2	12 ± 1	>100	>100
O.13.	>100	>100	12 ± 1	>100
O.14.	>100	>100	>100	>100

*Los datos son el promedio (±SD) de tres experimentos.

De los resultados mostrados en la Tabla 6.1 se puede concluir que ninguno de los derivados presenta actividad sobre la línea de células endoteliales HMEC-1, mientras que la mayoría de los derivados muestra actividad antiproliferativa en el rango micromolar frente a las dos líneas de

células tumorales HT-29 y A-549. Los compuestos **O.4** (*m*-F), **O.5** (*o*-F), **O.13** (*m*-OMe) y **O.14** (*o*-OMe) no presentan efecto alguno sobre la actividad proliferativa en ninguna de las dos líneas cancerosas, mientras que **O.7** (*m*-Cl) es activo únicamente en HT-29. En referencia a los valores de IC₅₀ obtenidos para HEK-293, únicamente el carbamato **O.1** y los derivados *para*-sustituidos (**O.3**, **O.6**, **O.9** y **O.12**) muestran valores por encima de 100 μM, mientras que el resto tiene una acción inhibitoria en el rango micromolar. En vista de estos resultados, se escogieron los compuestos **O.1**, **O.3**, **O.6**, **O.9** y **O.12** para el cálculo de índice de selectividad tumoral (SI) (véase la Tabla 6.2), el cual se obtuvo al dividir el valor de IC₅₀ para la línea de células HEK-293 entre el valor de IC₅₀ obtenido para la línea de células cancerosas.

Tabla 6.2. Índices de selectividad tumoral (SI) para el carbamato y *p*-aril urea derivados.

Comp.	SI HT-29	SI A-549
	(IC ₅₀ HEK-293/IC ₅₀ HT-29)	(IC ₅₀ HEK-293/A-549)
Sorafenib	0.3	0.2
BMS-8	3	10
O.1	>15	>27
O.3	>18	>29
O.6	>8	>7
O.9	>9	>62
O.12	>50	>9

Para el resto de los derivados, sin embargo, el SI obtenido fue menor de 1, lo que significa que tienen una baja selectividad para ejercer su acción sobre las células cancerosas. A la vista de los resultados mostrados en la Tabla 6.2 se escogieron los derivados con mayores SI (**O.1**, **O.3**, **O.9** y **O.12**) para llevar a cabo un estudio más exhaustivo de su acción biológica. Además, también se estableció en 20 μM la concentración de trabajo.

6.2.2. Efecto sobre las dianas PD-L1 y VEGFR-2

La inhibición de PD-L1 y VEGFR-2 se estudió mediante citometría de flujo. Para ello, los compuestos seleccionados, el carbamato **O.1** y las *p*-aril ureas **O.3** (*p*-F), **O.9** (*p*-Br) y **O.12** (*p*-OMe), se incubaron a una concentración de 20 μM en HT-29 y A-549 durante 24 h. Tanto la cantidad de proteína total como de membrana se midió utilizando sorafenib y BMS-8 como control positivo y las células tratadas con DMSO como control negativo. En la Tabla 6.3 se muestran únicamente los resultados para la

cantidad de proteína libre total ya que se vio que los derivados no mostraban ningún efecto sobre PD-L1 y VEGFR-2 de membrana.

Tabla 6.3. Efecto sobre PD-L1 y VEGFR-2 total en las líneas celulares estudiadas.

Comp.	HT-29		A-549	
	% PD-L1	% VEGFR-2	% PD-L1	% VEGFR-2
Control	100	100	100	100
Sorafenib	96 ± 49	132 ± 15	102 ± 10	95 ± 8
BMS-8	82 ± 21	86 ± 21	96 ± 29	122 ± 13
O.1	68 ± 5	43 ± 12	141 ± 1	107 ± 18
O.3	71 ± 15	62 ± 15	107 ± 13	97 ± 12
O.9	40 ± 2	46 ± 18	80 ± 7	141 ± 13
O.12	118 ± 3	168 ± 12	135 ± 18	143 ± 10

En general, los compuestos son más activos frente a HT-29, no observándose efecto, o muy débil, en A-549. En HT-29 destaca el compuesto **O.9** (*p*-Br) como el más activo frente a ambas dianas, con rangos de inhibición de alrededor del 60 % tanto para PD-L1 como para VEGFR-2. Aunque el efecto es menor, también cabe destacar el carbamato **O.1**, con rangos de inhibición del 40 % y 60 % para PD-L1 y VEGFR-2, respectivamente, y el *p*-fluoro derivado **O.3** que presenta un rango de inhibición de alrededor del 50 % en ambas proteínas. El compuesto **O.12**, por su parte no tiene ningún efecto sobre las dianas.

6.2.2.1. Efecto sobre las dianas biológicas en MCF-7

En vista de la elevada selectividad de los compuestos seleccionados hacia las células HT-29, se decidió ampliar el estudio a la línea celular MCF-7. Para ello se determinó, en primer lugar, la acción sobre la viabilidad celular mediante el parámetro de IC₅₀ y el SI. A continuación, se estudió el efecto sobre las proteínas de interés, PD-L1 y VEGFR-2, a una concentración de 20 μM.

Tabla 6.4. Efecto sobre PD-L1 y VEGFR-2 en MCF-7.

Comp.	IC ₅₀ (μM)	SI MCF-7	% PD-L1		% VEGFR-2	
			Memb.	Total	Memb.	Total
Control	-	-	100	100	100	100
BMS-8	20 ± 3	3	88 ± 11	197	107 ± 4	93
Sorafenib	14 ± 4	0,3	89 ± 2	80 ± 13	116 ± 3	201
O.1	20 ± 9	>5	81 ± 8	85 ± 15	89 ± 11	110 ± 12
O.3	0,17 ± 0,03	>580	81 ± 10	62 ± 15	91 ± 12	72 ± 10
O.9	1,3 ± 0,4	>77	94 ± 12	87 ± 23	82 ± 6	88 ± 11
O.12	>200	-	100 ± 7	57 ± 15	81 ± 11	83 ± 21

En la Tabla 6.4 se puede ver que los compuestos estudiados presentaron un SI elevado en la línea MCF-7, como ya se había observado en las otras dos líneas tumorales, por lo que se puede concluir que los compuestos analizados tienen una gran selectividad por estas líneas celulares cancerosas. En relación con el efecto sobre las dianas biológicas, los compuestos muestran un efecto muy débil en esta línea celular para ambas dianas. Destaca el compuesto **O.12** (*p*-OMe) que, no habiendo exhibido actividad en las dos líneas estudiadas previamente, muestra alrededor del 40 % de inhibición de PD-L1 total en MCF-7.

Como la línea HT-29 se había mostrado más sensible a la acción de los compuestos seleccionados, se escogió esta línea celular para proseguir el estudio de la acción biológica de nuestros compuestos.

6.2.2.2. Visualización del efecto sobre VEGFR-2 mediante inmunofluorescencia

Para estudiar el efecto sobre VEGFR-2 de forma visual, se llevó a cabo un estudio de inmunofluorescencia mediante microscopía confocal. Para ello los compuestos se incubaron en HT-29 a 20 μM durante 24 h. Sin embargo, no se apreciaron grandes diferencias entre las células tratadas con los compuestos estudiados y las células control tratadas sólo con DMSO, tal y como se puede apreciar en la Figura 6.2, dónde se han marcado en azul los núcleos y en verde VEGFR-2.

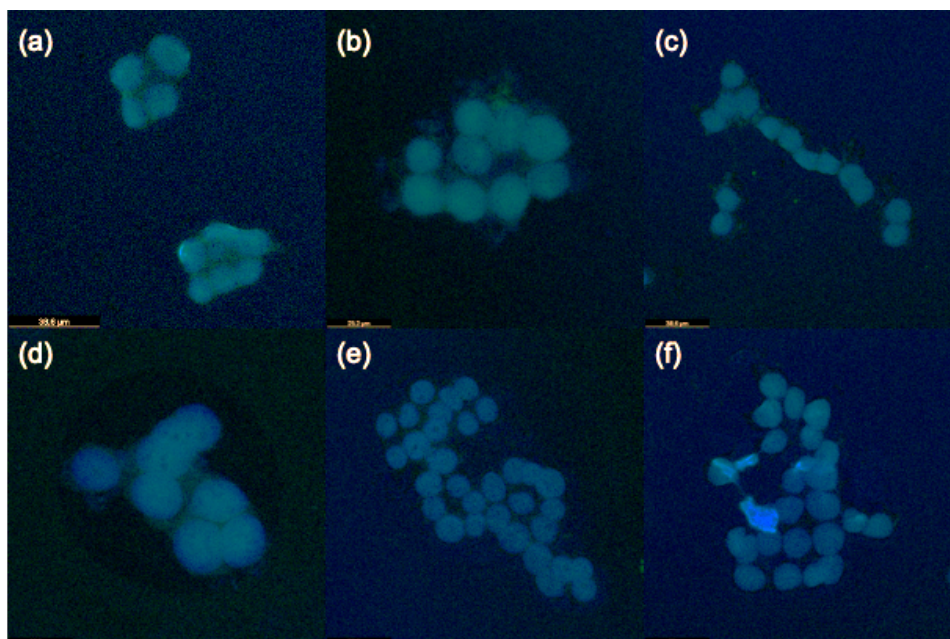


Figura 6.2. Imágenes de microscopia confocal en HT-29. (a) Control; (b) BMS-8; (c) **O.1**; (d) **O.3** (*p*-F); (e) **O.9** (*p*-Br); (f) **O.12** (*p*-OMe).

6.2.2.3. Estudio de citoquinas excretadas en el medio

Del medio recolectado, tras el tratamiento de HT-29 con los compuestos seleccionados a 20 μ M durante 24 h, se estudió el efecto sobre la secreción de VEGF al medio mediante el ensayo ELISA. Los resultados mostraron que ninguno de los compuestos tenía efecto alguno sobre VEGF, de lo que cabe concluir que éstos son selectivos para VEGFR-2.

6.2.3. Efecto sobre la formación de microtúbulos en las células endoteliales

La inhibición de la formación de nuevos vasos sanguíneos se midió en células HMEC-1 sembradas sobre Matrigel®. Este estudio se llevó a cabo con el carbamato **O.1** y la *p*-arilurea **O.9** a diferentes concentraciones, con el fin de determinar la concentración mínima a la que presentaban actividad. En la Tabla 6.5 se muestra la mínima concentración a la que estos dos compuestos presentan actividad antiangiogénica junto a los compuestos de referencia Sunitinib (véase la estructura en la Figura 1.10 en la página 16) y Sorafenib.

Tabla 6.5. Concentración mínima de inhibición de la formación de microtúbulos.

Comp.	Minima Conc. Activa (μM)
Sunitinib	3
Sorafenib	10
O.1	20
O.9	20

Al medir el efecto antiangiogénico de los compuestos encontramos que éstos eran capaces de impedir la formación de microtúbulos hasta una concentración de 20 μM, tal y como se puede apreciar en las imágenes recogidas en la Figura 6.3.

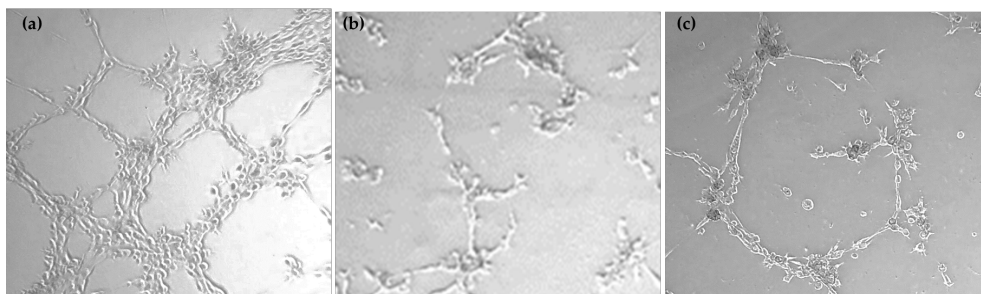


Figura 6.3. Efecto sobre la formación de microtúbulos. (a) Control; (b) **O.1** a 20 μM; (c) **O.9** a 20 μM. (×20 Mag.).

Por otra parte, también se evaluó la capacidad antivascular de estos dos derivados, de nuevo a distintas concentraciones, tras incubar los compuestos durante 24 h una vez formados los microtúbulos. En este ensayo se observó que el compuesto **O.9** (*p*-Br), no tenía ningún efecto antivascular, habiéndose probado hasta en concentraciones de 100 μM. El carbamato **O.1**, sin embargo, mostró actividad antivascular hasta una concentración mínima de 5 μM, tal y como se puede apreciar en la Figura 6.4.

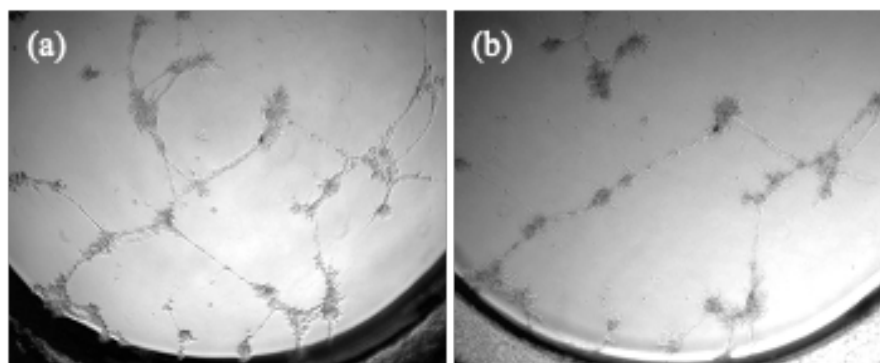


Figura 6.4. Efecto sobre la destrucción de microtúbulos. (a) Control; (b) **O.1** a 5 μ M. ($\times 20$ Mag.).

6.2.4. Ensayo de viabilidad celular en co-cultivo

La acción sobre la viabilidad celular de HT-29 en co-cultivo con THP-1 se estudió a dos tiempos de incubación (24 y 48 h) y con dos proporciones de HT-29/THP-1, una con un exceso de células defensivas (1:5 HT-29:THP-1) y otra con una proporción más similar a la que se da en el TME (2:1 HT-29:THP-1). La Tabla 6.6 muestra el porcentaje de células vivas respecto a las células tratadas con DMSO como control negativo para HT-29 en monocultivo y en co-cultivo con THP-1.

Tabla 6.6. Efecto sobre la viabilidad celular de HT-29 en monocultivo y en co-cultivo con THP-1.

Comp.	Monocult.	1:5 HT-29:THP-1		2:1 HT-29:THP-1	
	HT-29	24 h	48 h	24 h	48 h
BMS-8	102 \pm 23	88 \pm 3	102 \pm 12	106 \pm 10	101 \pm 3
O.1	82 \pm 4	90 \pm 6	97 \pm 5	88 \pm 9	85 \pm 14
O.3	89 \pm 7	80 \pm 4	102 \pm 16	83 \pm 5	95 \pm 5
O.9	86 \pm 9	83 \pm 13	106 \pm 8	95 \pm 16	92 \pm 20
O.12	95 \pm 21	86 \pm 4	119 \pm 14	88 \pm 3	85 \pm 11

Los resultados recogidos en la Tabla 6.6 muestran que el efecto sobre la viabilidad celular es mayor tras 24 h de tratamiento, independientemente de la proporción HT-29/THP-1 utilizada, siendo en estas condiciones los compuestos **O.3** (*p*-F) y **O.12** (*p*-OMe) los más activos con un 20 % de inhibición. Además, **O.12** sigue siendo activo tras 48 h de incubación en una proporción 2:1 HT-29:THP-1.

A pesar de que los compuestos no mostraron ninguna actividad, tras 48 h de incubación en la proporción 1:5 HT-29:THP-1, en la Figura 6.5 se puede

ver que las células cancerosas mostraron algunos cambios en su morfología.

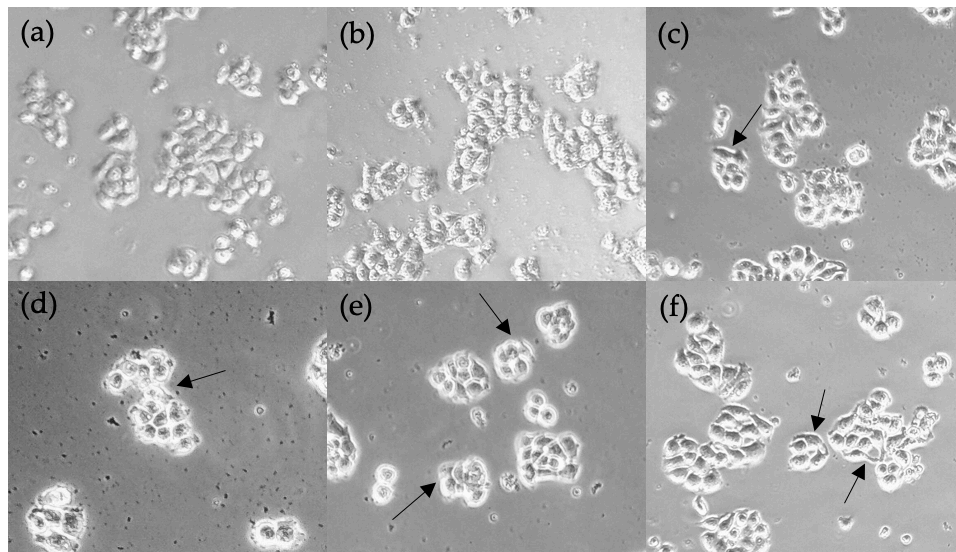


Figura 6.5. Alteraciones morfológicas sufridas por las células HT-29 tras 48 h de incubación en co-cultivo con un exceso de THP-1. (a) Control; (b) BMS-8 at 20 μ M; (c) **0.1** (carbamato); (d) **0.3** (*p*-F); (e) **0.9** (*p*-Br); (f) **0.12** (*p*-OMe). (magn. $\times 20$).

En la Figura 6.5 se puede ver que, tanto la muestra control como el compuesto de referencia BMS-8, mantienen la morfología característica de las HT-29, incrementándose con este último la granularidad en el citosol de la célula. El tratamiento con el carbamato **0.1**, sin embargo, lleva a una pequeña pérdida del contacto entre las células y la aparición de clústeres celulares con superficies irregulares (marcadas con una flecha en la Figura 6.5 (c)). Con los *p*-aril urea derivados se observan medios menos concluidos, con células que adoptan morfologías alargadas más comunes de los fibroblastos. Todos estos cambios morfológicos, relacionados con la pérdida de la apariencia epitelial, se deberían a la acción sinérgica de los compuestos y de las células inmunes.

6.2.4.1. Efecto sobre las dianas VEGFR-2 y PD-L1 en co-cultivo

Mediante citometría de flujo se estudió el efecto sobre las dianas biológicas en la membrana de HT-29 en co-cultivo con THP-1. Los datos de la Tabla 6.7 muestran el efecto sobre VEGFR-2 de membrana como porcentajes de proteína de membrana libre respecto del control. Los compuestos presentaron una actividad muy moderada e incluso nula, sobre todo tras 48 h de incubación frente a PD-L1 de membrana, destacando

únicamente **O.12** (*p*-OMe) con una inhibición del 30 % de PD-L1 tras 24 h de incubación en condiciones de un exceso de células cancerosas frente a la línea de células monocíticas (proporción 2:1 HT-29:THP-1).

Tabla 6.7. Efecto sobre VEGFR-2 de membrana en HT-29 en co-cultivo con THP-1 a distintas proporciones y en dos tiempos de incubación.

% VEGFR-2 Comp.	1:5 HT-29:THP-1		2:1 HT-29:THP-1	
	24h	48 h	24 h	48 h
Control	100	100	100	100
BMS	90 ± 7	87 ± 9	91 ± 1	99 ± 3
O.1.	90 ± 12	81 ± 2	90 ± 1	103 ± 5
O.3.	101 ± 14	85 ± 2	90 ± 3	99 ± 3
O.9.	96 ± 11	81 ± 6	87 ± 3	99 ± 3
O.12.	96 ± 10	81 ± 8	87 ± 5	97 ± 1

El efecto sobre VEGFR-2, como se puede ver en la Tabla 6.7, también es muy moderado. En general, este efecto depende de la proporción utilizada. Así, con una proporción 1:5 HT-29:THP-1 los compuestos tienen un mayor efecto sobre VEGFR-2 a 48 h pero cuando se invierten las poblaciones, éstos son más activos a 24 h. Cabe destacar las ureas **O.9** (*p*-Br) y **O.12** (*p*-OMe) como las más activas, con una inhibición de alrededor de 20 %, tanto tras 48 h de incubación cuando la proporción es 1:5, como tras 24 h de incubación cuando la proporción es 2:1.

6.2.4.2. Efecto sobre las dianas CD80 y CD11b en la línea THP-1 en co-cultivo

Utilizando la técnica de citometría de flujo también se estudió el efecto de los compuestos sobre las células defensivas. En este estudio se investigó el efecto sobre la viabilidad de las células defensivas en co-cultivo con HT-29 y también se determinó el efecto sobre dos proteínas de membrana CD80 y CD11b localizadas en la superficie de las células THP-1. Del estudio de viabilidad celular, llevado a cabo en las mismas condiciones descritas en los apartados anteriores, se puede concluir que no se veía afectada la viabilidad celular de THP-1, tanto en monocultivo como en co-cultivo. Únicamente se observó una acción moderada del carbamato **O.1** y de las ureas **O.9** (*p*-Br) y **O.12** (*p*-OMe), que inhibieron alrededor del 15 % tras 24 h de incubación con un exceso de células cancerosas (2:1 HT-29:THP-1). En cuanto al

efecto sobre las dianas CD80 y CD11b, no se observó efecto alguno sobre la primera de ellas en ninguna de las condiciones estudiadas, sin embargo, sí que hubo efecto significativo sobre CD11b, tal y como se muestra en la Figura 6.6.

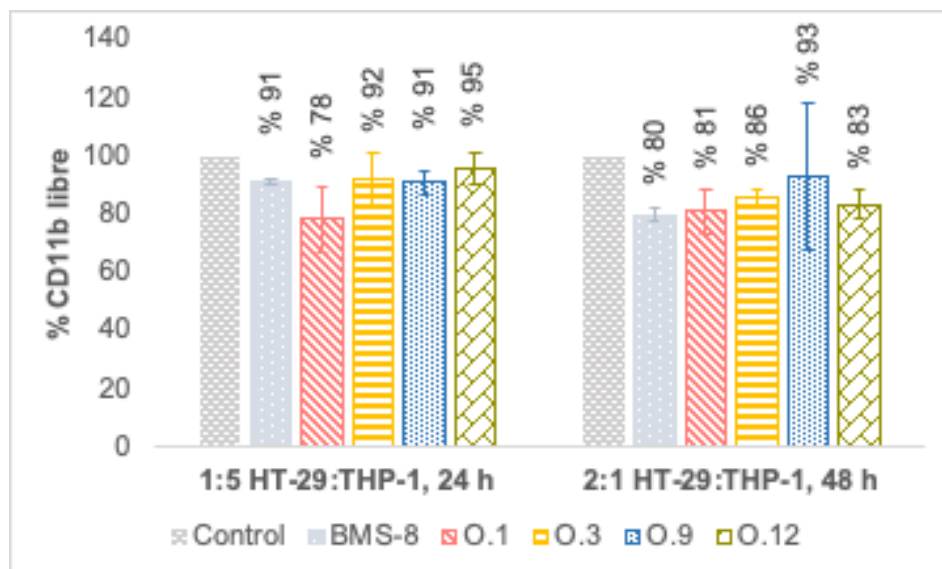


Figura.6.6. Efecto sobre CD11b de membrana en las células THP-1 co-cultivadas con HT-29.

El efecto sobre CD11b en la membrana de las células THP-1 sigue, sorprendentemente, una tendencia contraria a la que se vio sobre VEGFR-2 en la membrana de las células cancerosas. Se observó que, cuando la relación era 1:5 HT-29:THP-1, los compuestos tenían un mayor efecto sobre CD11b a 24 h mientras que cuando la relación era 2:1, los compuestos eran más activos a 48 h. Así, el carbamato **O.1** y las ureas **O.3** (*p*-F) y **O.12** (*p*-OMe), tras 48 h de incubación y en una proporción 2:1 HT-29:THP-1 inhiben alrededor del 20 % de CD11b. Además, el carbamato **O.1** en condiciones de exceso de THP-1 (1:5 HT-29:THP-1) es capaz de inhibir esta proteína en un 30 %.

6.2.5. Evaluación biológica de los derivados—Estancia de Investigación

El carbamato **O.1** y las benziletiloxiaril urea **O.3** (*p*-F), **O.9** (*p*-Br) y **O.12** (*p*-OMe) fueron estudiados con más profundidad durante la estancia de investigación. Los estudios realizados con estos derivados fueron los mismos que los que se llevaron a cabo en la anterior familia (véanse los fundamentos en el apartado 4.3.1).

6.2.5.1. Viabilidad celular y efecto sobre PD-L1

En primer lugar, se llevó a cabo un estudio de viabilidad celular en células PDAC mediante citometría de flujo, y aprovechando, de nuevo, la versatilidad de la técnica se estudió también la acción de los compuestos sobre PD-L1 de membrana. Para ello, se incubaron las células PDAC con los compuestos a una concentración de 20 μ M durante 24h utilizando como control las células tratadas con DMSO. Además, se realizó el mismo estudio sobre la viabilidad de las células PDAC y la acción sobre PD-L1 en presencia de una línea de células T (OT-I) en una proporción 1:5 PDAC:OT-I siguiendo las mismas condiciones ya mencionadas.

En el estudio sobre el efecto en PD-L1 se vio que los compuestos no tenían ningún efecto sobre esta proteína, ni en monocultivo de PDAC ni en co-cultivo. Esto a pesar de no ser muy sorprendente, dado que el efecto sobre hPD-L1 era moderado, podría deberse de nuevo a las diferencias entre mPD-L1 y hPD-L1 ya mencionadas anteriormente (véase el apartado 4.3.2).

En el estudio de viabilidad celular, los derivados, en general, no presentaron actividad sobre las células PDAC en monocultivo, destacando únicamente el compuesto **O.3** (*p*-F), que fue capaz de inhibir dicha viabilidad de forma significativa en un 15 %. En contraste, todos los compuestos testados dieron lugar a un incremento de la viabilidad celular de PDAC de forma significativa en co-cultivo con OT-I.

Otro de los estudios que se llevó a cabo fue el de la inhibición de la viabilidad de las células PDAC por la acción efectiva de las células T OT-I tras 24 h de incubación en presencia de los compuestos a una concentración de 20 μ M. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 6.7 como porcentajes de la viabilidad celular con respecto al control negativo de las células tratadas con DMSO.

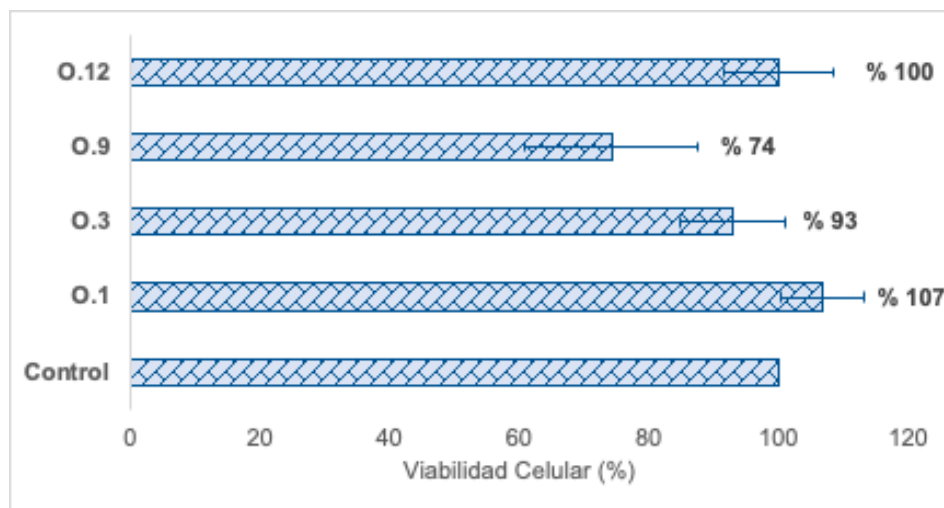


Figura 6.7. Viabilidad celular de PDAC por la acción efectiva de las células T OT-I.

En la Figura 6.7 se puede ver que, de forma excepcional la *p*-bromo urea **0.9**, que presenta una inhibición de la viabilidad celular del alrededor del 30 % por la acción efectiva de las células T CD8+. El resto de los compuestos, sin embargo, no tiene ningún efecto aparente en la reactivación de las células OT-I.

6.2.5.1.1. Estudio de TNF- α secretado al medio

De forma paralela, se recogió el medio de cultivo tras la incubación y se llevó a cabo un ensayo tipo ELISA con el fin de estudiar la secreción de TNF- α . De esta prueba se concluyó que ninguno de los compuestos promovía la secreción de TNF- α al medio recogido de las muestras de PDAC en monocultivo, Sin embargo, del mismo estudio sobre el medio recogido de la incubación en co-cultivo de PDAC y CD8+ se determinó que, en general, todos los derivados estudiados tenían una actividad moderada sobre esta citoquina (véase la Figura 6.8). En el caso del carbamato **0.1** y la urea **0.9** (*p*-Br) se encontró una inhibición de la secreción de TNF- α en un 10 y un 20 % respectivamente, mientras que **0.3** (*p*-F) y **0.12** (*p*-OMe) aumentaron dicha secreción alrededor del 20 %, tomando como referencia siempre los niveles de secreción encontrados cuando las células están sin tratar (control).

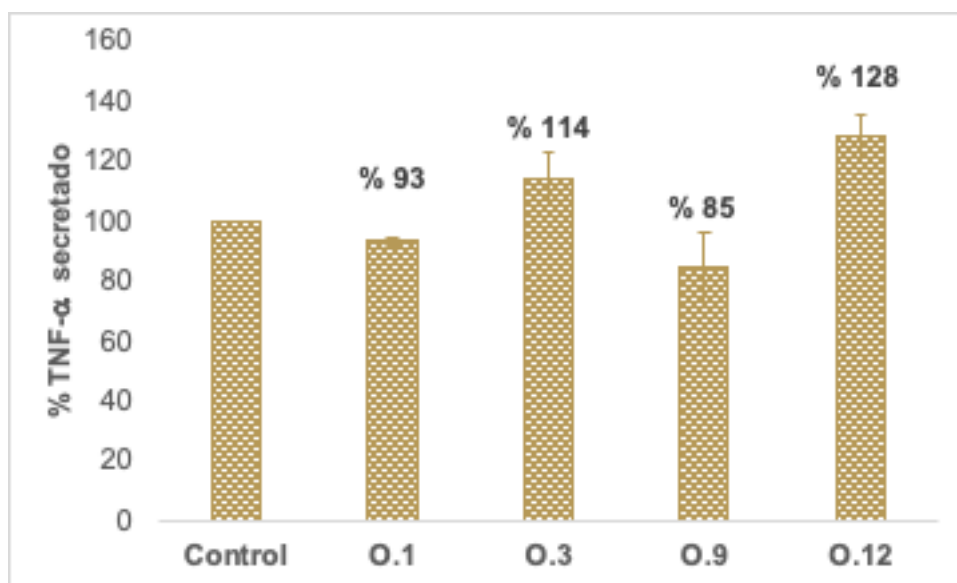


Figura 6.8. Secreción de TNF- α al medio obtenido del co-cultivo PDAC/OT-I.

6.2.5.2. Estudio sobre las células T OT-1

En vista de los moderados resultados obtenidos por parte de los compuestos seleccionados, se procedió a realizar un estudio sobre la acción de los mismos en monocultivo de OT-I. Con el fin de asegurarnos que la concentración a la que se ensayaban los compuestos era segura para las CD8+, se llevó a cabo un estudio de viabilidad celular por citometría de flujo. De este ensayo se obtuvo que ninguno de los derivados tenía efecto en la viabilidad celular de las OT-I tras 24 h de incubación a una concentración de 20 μ M.

6.2.5.2.1. Efecto sobre los inmunorreceptores de membrana en las CD8+

En primer lugar, y para averiguar cómo afectaban los compuestos a las CD8+, se estudió mediante citometría de flujo el efecto sobre los receptores inmunes LAG-3, TIM-3, PD-1, CD69 y OX40 presentes en la superficie de las células T exhaustas. Los resultados obtenidos se recogen en la Figura 6.9 como porcentajes de proteína libre relativa a las células tratadas con DMSO como control negativo, tras la incubación de las OT-I durante 24 h con los compuestos a 20 μ M.

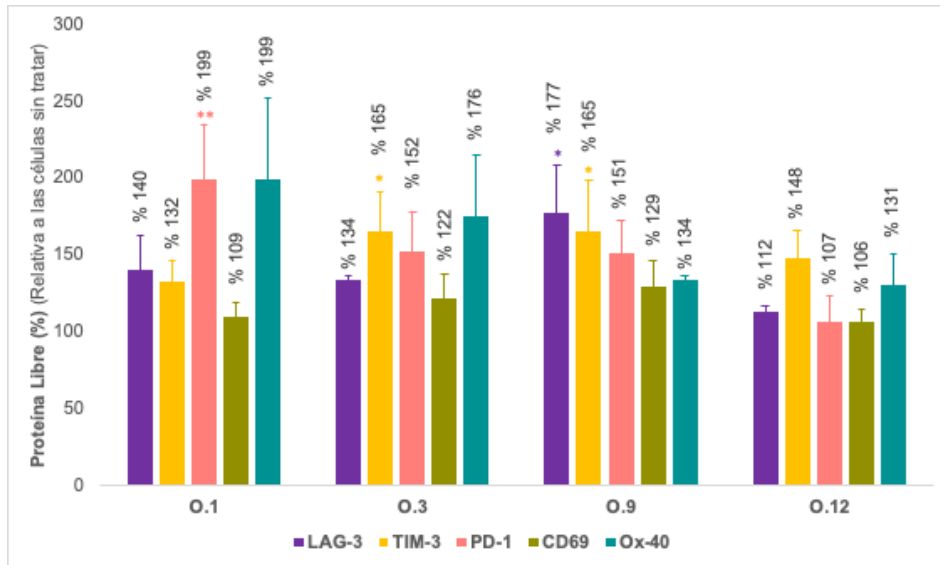


Figura 6.9. Efecto sobre los inmunoreceptores en la membrana de CD8+.

Resulta interesante comprobar que tres de los cuatro compuestos estudiados promueven la expresión de alguno de los receptores de co-estimulación y co-inhibición de la activación de estas células, lo que puede implicar un estado de activación adquirido en respuesta a la estimulación producida por los derivados.

6.2.5.2.2. Efecto sobre la cascada de señalización OT-I

Finalmente se estudió el efecto de los compuestos sobre la cascada de señalización de las OT-I mediante la técnica de Western blot. Para ello se cuantificaron las proteínas implicadas en los primeros pasos de la cascada de señalización activada por el reconocimiento de TCR en las células T, después de un tratamiento de 24 horas con los compuestos a 20 μ M.

Los resultados obtenidos se muestran en la Figuras 6.10 mediante las bandas obtenidas para cada proteína y la correspondiente cuantificación. Estos resultados son parte de una única réplica ya que por motivos de tiempo no se pudo repetir el ensayo.

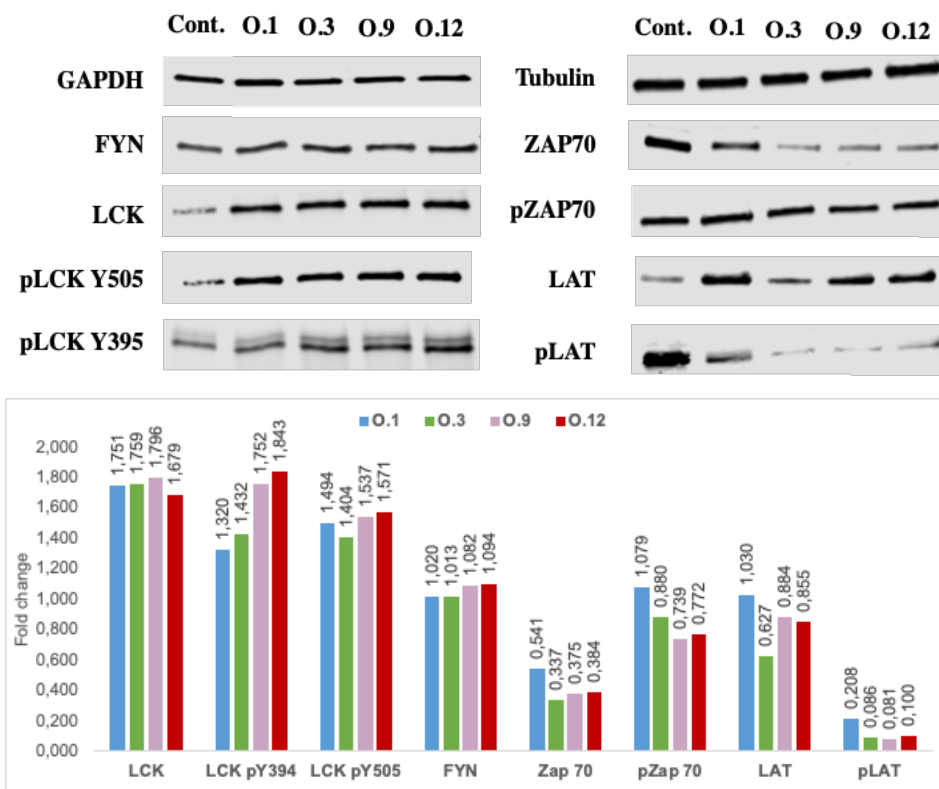


Figura 6.10. Expresión de las proteínas implicadas en la cascada de señalización de OT-I por Western blot.

A la vista de los resultados preliminares obtenidos, podemos concluir que ninguno de los compuestos tiene efecto sobre FYN, siendo muy diferente, sin embargo, la acción frente a LCK y sus formas fosforiladas, en donde se aprecia que, en general, todos los compuestos estudiados aumentan su respuesta.

En cuanto a las proteínas implicadas en los siguientes pasos de la cascada de señalización, vemos que todos los compuestos disminuyen notablemente la expresión de ZAP70 respecto al control, con rangos de inhibición de entre 50 y 60 %. Los compuestos mostraron un efecto más moderado sobre la inhibición de la forma fosforilada, con rangos de inhibición del 20-30 %.

Finalmente, atendiendo al efecto sobre LAT encontramos que este es contrario al previamente visto sobre ZAP70, teniendo un efecto moderado sobre la expresión de LAT en contraste a la prácticamente completa inhibición de la proteína LAT fosforilada.

6.3. Evaluación biológica de la familia de diarilureas con puente propilo

La familia de diarilureas que contienen un puente propilo consta, al igual que las anteriores, de catorce compuestos, cuya estructura general se puede ver en el Esquema 5.4 (en la página 99), y contiene al carbamato **C.1** y a trece benciletilenaril ureas **C.2-C.14**.

6.3.1. Ensayo de viabilidad celular

La capacidad para inhibir la viabilidad celular de los compuestos **C.1-C.14** se midió utilizando el ensayo de MTT. Este ensayo se llevó a cabo durante 48 h de incubación en HT-29 y A-549, como líneas cancerosas y HEK-293 y HMEC-1, como línea de células sanas para determinar el margen terapéutico. En la Tabla 6.8 se muestran los valores de IC₅₀ para nuestros compuestos y los compuestos de referencia sorafenib y BMS-8.

Tabla 6.8. Valores de IC₅₀ para los derivados **C.1-C.14**.*

Comp.	HT-29	A-549	HEK-293	HMEC -1
Sorafenib	17 ± 4	27 ± 2	5.0 ± 0.7	34 ± 3
BMS-8	19 ± 2	6 ± 1	60 ± 10	---
C.1.	>100	>100	>100	>100
C.2.	25 ± 5	>100	12 ± 1	>100
C.3.	>100	>100	>100	>100
C.4.	>100	>100	22 ± 5	>100
C.5.	58 ± 16	29 ± 5	24 ± 4	>100
C.6.	4 ± 1	20 ± 10	4 ± 1	>100
C.7.	14 ± 3	19 ± 1	14 ± 3	18 ± 8
C.8.	47 ± 2	>100	37 ± 8	>100
C.9.	1,9 ± 0,6	7 ± 1	2,1 ± 0,2	>100
C.10.	11 ± 2	8 ± 2	9 ± 4	17 ± 7
C.11.	15 ± 4	20 ± 5	27 ± 4	25 ± 1
C.12.	>100	1,2 ± 0,2	>100	>100
C.13.	8 ± 5	18 ± 5	15 ± 3	20 ± 5
C.14.	>100	>100	>100	>100

*Los datos son el promedio (±SD) de tres experimentos.

De la Tabla 6.8 se deduce que los compuestos exhiben un mayor efecto en la línea de cancer colorectal HT-29 que en la de pulmón A-549. De hecho,

en la línea HT-29 se observan valores de IC_{50} en el rango micromolar para todos los compuestos ensayados, excepto para el carbamato **C.1** y las ureas **C.3** (*p*-F), **C.4** (*m*-F), **C.12** (*p*-OMe) y **C.14** (*o*-OMe), que no muestran ninguna actividad. En el caso de la línea A-549, los compuestos que no presentan ninguna actividad son de nuevo el carbamato **C.1** y las ureas **C.2** (fenil urea), **C.3** (*p*-F), **C.4** (*m*-F), **C.8** (*o*-Cl) y **C.14** (*o*-OMe).

En el caso de las líneas de células no tumorales, los compuestos ensayados exhibieron en HEK-293 una tendencia similar a la mostrada en HT-29 con una mayoría de compuestos mostrando un efecto moderado sobre la viabilidad celular excepto el carbamato **C.1** y las ureas **C.3** (*p*-F), **C.12** (*p*-OMe) y **C.14** (*o*-OMe), que dieron lugar a valores de IC_{50} por encima de los 100 μ M. Finalmente, salvo algunas excepciones, la mayoría de los compuestos ensayados no presentaron ninguna actividad frente a la línea de células endoteliales, HMEC-1.

Para comprobar el margen de seguridad de los compuestos se determinó el índice de selectividad tumoral (SI) obtenido de la relación entre el valor de IC_{50} para la línea de células HEK-293 y el valor de IC_{50} obtenido en la línea de células cancerosas, HT-29 y A-549 (véase la Tabla 6.9).

En la Tabla 6.9 se puede ver que la mayoría de los compuestos ensayados presenta un margen de selectividad muy bajo (SI próximos o por debajo de 1). Por ello se escogieron aquellos compuestos que no tenían ningún efecto sobre la viabilidad celular en ninguna de las líneas estudiadas. Estos compuestos fueron el carbamato **C.1**, y las ureas **C.3** (*p*-F), **C.12** (*p*-OMe) y **C.14** (*o*-Ome) (sombreadas en la Tabla 6.9).

Tabla 6.9. Índices de selectividad tumoral (SI) para los compuestos **C.1-C.14**.

Comp.	SI HT-29	SI A-549
	(IC ₅₀ HEK293/IC ₅₀ HT-29)	(IC ₅₀ HEK293/ IC ₅₀ A-549)
Sorafenib	0.3	0.2
BMS-8	3	10
C.1	No hay efecto	No hay efecto
C.2	0.5	< 2
C.3	No hay efecto	No hay efecto
C.4	< 0,2	< 0,2
C.5	2,0	0,8
C.6	1,0	0.2
C.7	1,0	1.2
C.8	0.8	< 0,4
C.9	1,1	1,2
C.10	0,8	1,1
C.11	1,8	1,3
C.12	No hay efecto	83
C.13	1,9	0,8
C.14	No hay efecto	No hay efecto

6.3.2. Efecto sobre las dianas PD-L1 y VEGFR-2

La capacidad de los compuestos seleccionados **C.1**, **C.3**, **C.12** y **C.14** para inhibir PD-L1 y VEGFR-2 se estudió mediante citometría de flujo en HT-29. Se decidió realizar el estudio únicamente en la línea de cáncer de colon debido a que, en general, tal y como se ha visto en los derivados estudiados anteriormente (**O.1-O.14**), así como en estudios anteriores llevados a cabo en el grupo,^{107, 156} esta es la línea más sensible a la acción de los derivados de tipo diarilurea.

Para este ensayo, los compuestos seleccionados se incubaron en HT-29 durante 24 h a dos concentraciones distintas, 20 y 100 μ M, con el fin de comprobar la correlación dosis/efecto. Se midió tanto la capacidad para inhibir PD-L1 y VEGFR-2 total como de membrana. Sin embargo, los compuestos no mostraron ningún efecto significativo sobre las dianas en membrana, por eso, en la Tabla 6.10 se muestran únicamente los resultados obtenidos para la cantidad de proteína libre total, utilizando sorafenib y BMS-

8 como control positivo y las células tratadas con DMSO como control negativo.

Tabla 6.10. Efecto sobre PD-L1 y VEGFR-2 total en HT-29.

Comp.	20 μ M		100 μ M	
	PD-L1 (%)	VEGFR-2 (%)	PD-L1 (%)	VEGFR-2 (%)
Control	100	100	100	100
Sorafenib	96 \pm 49	132 \pm 15	102 \pm 10	95 \pm 8
BMS-8	82 \pm 21	86 \pm 21	67 \pm 20	-
C.1	70 \pm 16	51 \pm 10	91 \pm 7	191 \pm 87
C.3	70 \pm 4	38 \pm 7	222 \pm 69	40 \pm 7
C.12	25 \pm 5	30 \pm 10	96 \pm 1	65 \pm 45
C.14	45 \pm 11	228 \pm 66	145 \pm 8	32 \pm 9

De la Tabla 6.10 se deduce que el efecto de los compuestos sobre ambas dianas no depende de la dosis administrada, ya que los compuestos son más activos a dosis más pequeñas. Cabe destacar el derivado **C.12** (*p*-OMe) como el inhibidor dual más activo, el cual muestra un rango de inhibición del 75 % en ambas proteínas a una concentración de 20 μ M. Por su parte, el carbamato **C.1** y la *p*-fluorofenil urea **C.3** mostraron rangos de inhibición del 30 y del 45 % para PD-L1 y VEGFR-2, respectivamente. Finalmente, **C.14** (*o*-OMe) mostró actividad dependiente de la dosis frente a VEGFR-2, siendo capaz de inhibir en un 65 % esta proteína a 100 μ M, mientras que frente a PD-L1, **C.14** siguió la tendencia exhibida por resto de los análogos, siendo capaz de inhibir esta proteína a la mitad únicamente a bajas concentraciones (20 μ M).

6.3.2.1. Visualización del efecto sobre VEGFR-2

El efecto de los compuestos en la disposición de VEGFR-2 dentro de la célula, se estudió mediante microscopia confocal. Para ello, se incubaron los compuestos a 100 μ M en HT-29 durante 24 h. En la Figura 6.11 se pueden ver las imágenes adquiridas para cada compuesto con el núcleo de las células marcado en azul y en rojo marcado el VEGFR-2. Los resultados se comparan con las células tratadas con DMSO.

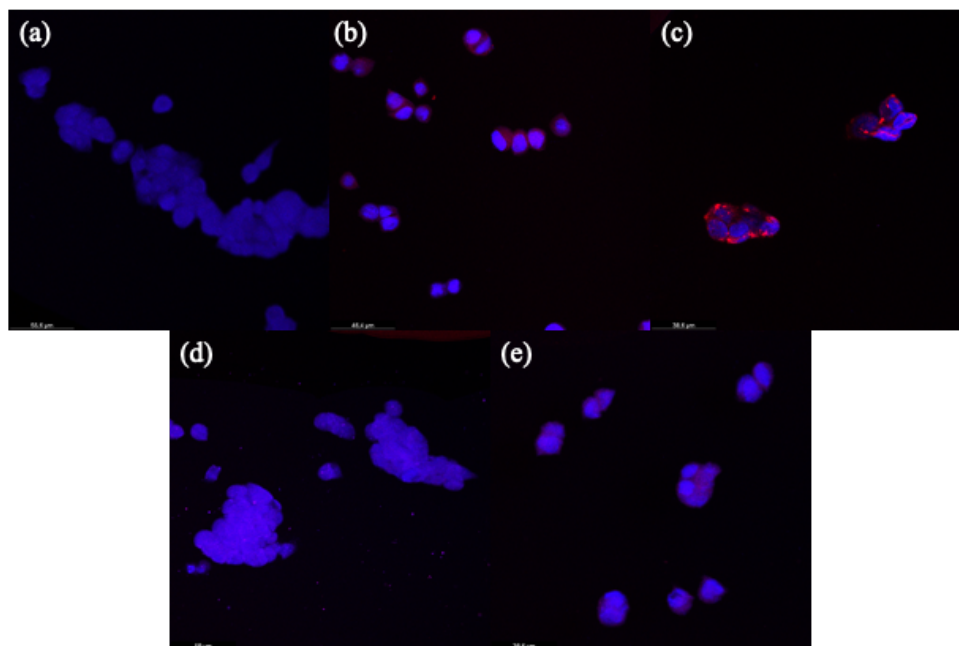


Figura 6.11. Imágenes de microscopía confocal en HT-29. (a) Control, (b) **C.1**, (c) **C.3** (*p*-F), (d) **C.12** (*p*-OMe), (e) **C.14** (*o*-OMe).

En las imágenes de la Figura 6.11 no se aprecia acumulación de VEGFR-2 en el control, puesto que esta proteína se encuentra uniformemente distribuida en el núcleo de la célula. Cuando las muestras se trataron con nuestros compuestos se observó que con **C.12** (*p*-OMe) VEGFR-2 se disponía de forma similar a la de la muestra control. Esta distribución, sin embargo, era algo diferente con el resto de análogos, en el caso del carbamato **C.1** y **C.14** (*o*-OMe) el VEGFR-2 se acumula preferentemente en el citosol de la célula, siendo esta acumulación más notable en el caso del carbamato. No obstante, el cambio más pronunciado se aprecia con **C.3** (*p*-F) en el que VEGFR-2 forma agregados por todo el citosol celular, lo que podría ser debido a la inhibición de VEGFR-2 ocasionada por este compuesto (véase la Tabla 6.10).

6.3.3. Efecto sobre la formación de microtúbulos en las células endoteliales

La habilidad de los compuestos seleccionados para inhibir la formación de nuevos vasos sanguíneos se midió mediante la línea de células endoteliales HMEC-1 sobre Matrigel®. Este estudio se llevó a cabo a diferentes concentraciones con el fin de determinar la concentración mínima de inhibición. La Tabla 6.11 recoge la concentración mínima la que los

compuestos ensayados presentan actividad antiangiogénica, junto a los compuestos de referencia sunitinib y sorafenib.

Tabla 6.11. Concentración mínima de inhibición en la formación de microtúbulos.

Comp.	Minima Conc. Activa (µM)
Sunitinib	3
Sorafenib	10
C.1	5
C.3	50
C.12	20
C.14	>100

Como se puede ver en la Tabla 6.11, el carbamato **C.1** es el más activo entre los derivados estudiados consiguiendo inhibir la formación de microtúbulos en HMEC-1 hasta una concentración de 5 µM, mejorando con esto la actividad del sorafenib. Las ureas **C.3** (*p*-F) y **C.12** (*p*-OMe) mostraron una actividad más moderada con concentraciones mínimas de actividad de 50 y 20 µM, respectivamente, mientras que **C.14** (*o*-OMe) no mostró ninguna actividad antiangiogénica. De nuevo, se puede concluir que estos resultados se correlacionan con los resultados obtenidos para la inhibición de VEGFR-2 mostrados en la Tabla 6.10. La Figura 6.12 recoge las imágenes en la que se puede apreciar la actividad inhibitoria de los dos compuestos más activos **C.1** y **C.12** a diferentes concentraciones.

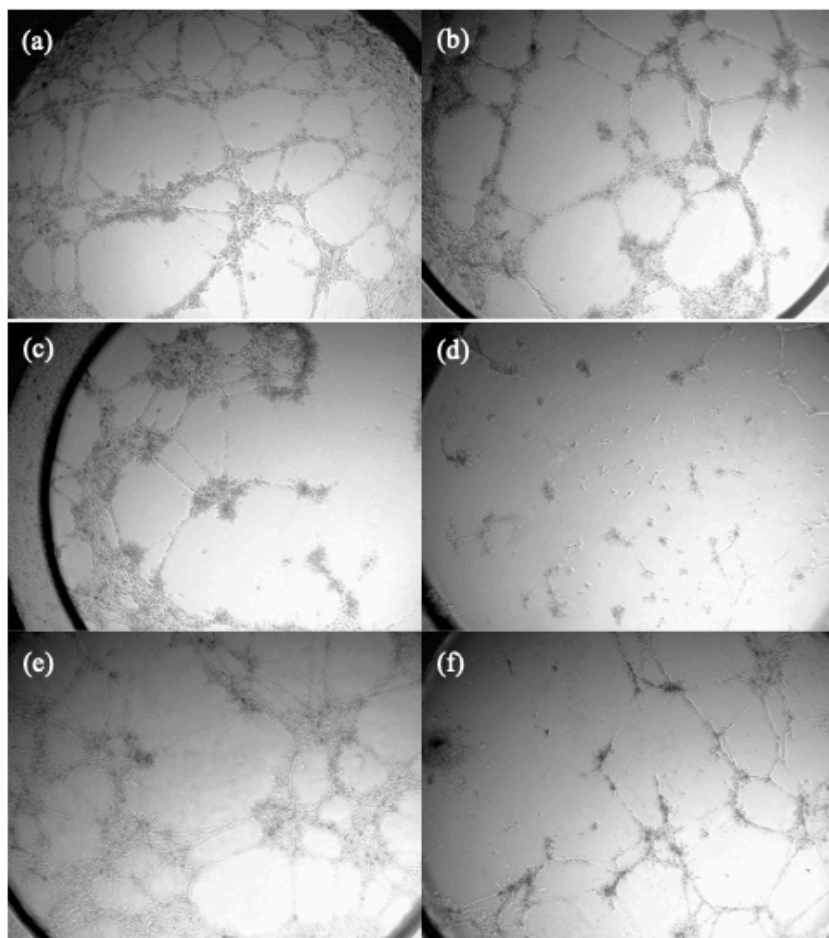


Figura 6.12. Efecto sobre la formación de microtúbulos . (a) Control; (b) **C.1** a 5 μM ; (c) **C.1** a 10 μM ; (d) **C.1** a 20 μM ; (e) **C.12** a 20 μM ; (f) **C.12** a 50 μM . ($\times 20$ Mag.).

La capacidad antivascular de los compuestos seleccionados también se midió utilizando Matrigel® tras 24 h de incubación de los compuestos en concentraciones comprendidas entre 20 y 100 μM . Únicamente el carbamato **C.1** presentó actividad, siendo capaz de destruir los microtúbulos formados a concentraciones mayores de 50 μM , tal y como se puede ver en la Figura 6.13.

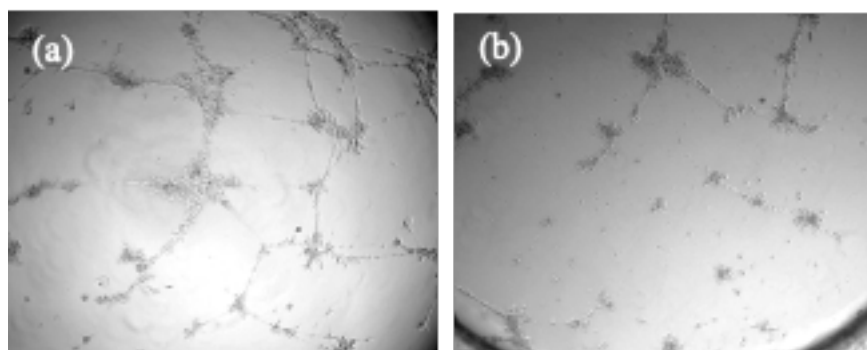


Figura 6.13. Efecto sobre la destrucción de microtúbulos . (a) Control; (b) **C.1** a 50 μM . ($\times 20$ Mag.).

6.3.4. Ensayo de viabilidad celular en co-cultivo

La acción sobre la viabilidad de HT-29 se midió también en co-cultivo con la línea de células monocítica THP-1. El estudio se realizó a los tiempos de incubación de 24 y 48 h, con las proporciones de 1:5 y 2:1 de HT-29:THP-1 con los compuestos en concentración de 100 μM . La Tabla 6.12 muestra el porcentaje de células vivas respecto al control para la línea de células cancerosas en co-cultivo con THP-1, utilizando BMS-8 como compuesto de referencia.

Tabla 6.12. Efecto sobre la viabilidad celular de HT-29 en co-cultivo con THP-1.

Comp.	1:5 HT-29:THP-1		2:1 HT-29:THP-1	
	24h	48h	24h	48h
Control	100	100	100	100
BMS-8	11 \pm 6	21 \pm 3	8 \pm 12*	16 \pm 2*
C.1	48 \pm 8	52 \pm 3	70 \pm 8	66 \pm 8
C.3	78 \pm 8	64 \pm 3	67 \pm 9	57 \pm 5
C.12	84 \pm 2	67 \pm 11	93 \pm 8	89 \pm 10
C.14	64 \pm 14	68 \pm 8	82 \pm 7	58 \pm 5

La Tabla 6.12 muestra que los compuestos son más activos tras 48 h de incubación, independientemente de la proporción celular utilizada. El carbamato **C.1** y la diarilurea **C.3** (*p*-F) fueron los que presentaron mayor actividad con rangos de inhibición de 45-50 % en ambas condiciones tras 48 h de incubación. **C.12** (*p*-OMe), por su parte, mostró un 40 % de inhibición tras 48 h de incubación cuando la proporción fue de 1:5 HT-29:THP-1,

mientras que **C.14** (*o*-OMe) mostró más actividad cuando la proporción fue de 2:1 HT-29:THP-1.

Cabe destacar que la baja viabilidad mostrada por el compuesto de referencia es debida a un cambio de las características físico-químicas de la población celular, tal y como se puede ver en la Figura 6.14.

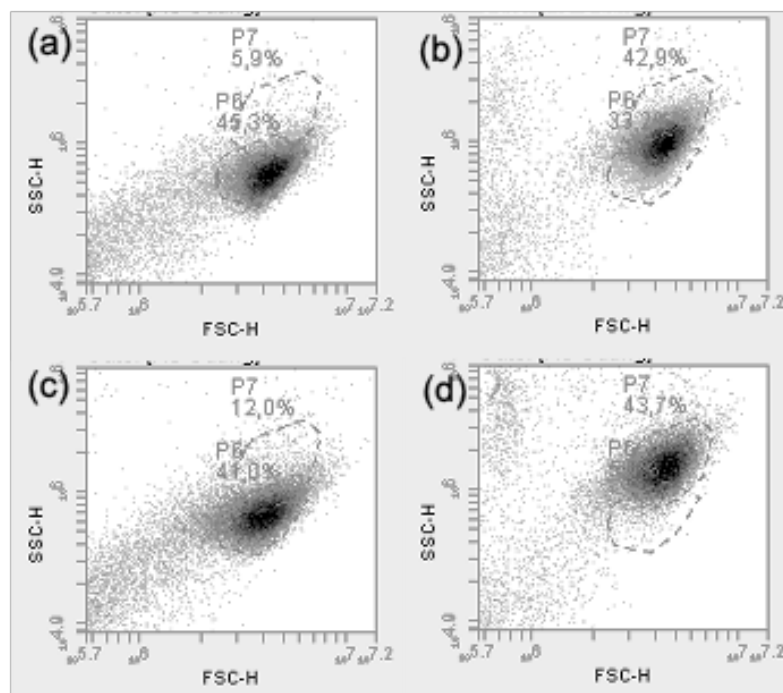


Figura 6.14. Cambio poblacional en HT-29 tras incubarse en co-cultivo con THP-1 (proporción 2:1) (a) Control 24 h; (b) BMS-8 24 h; (c) Control 48 h; (d) BMS-8 48 h.

En la Figura 6.15 se pueden ver algunos cambios morfológicos exhibidos por las células HT-29 después de ser tratadas durante 48 h en co-cultivo con THP-1 en una proporción 1:5.

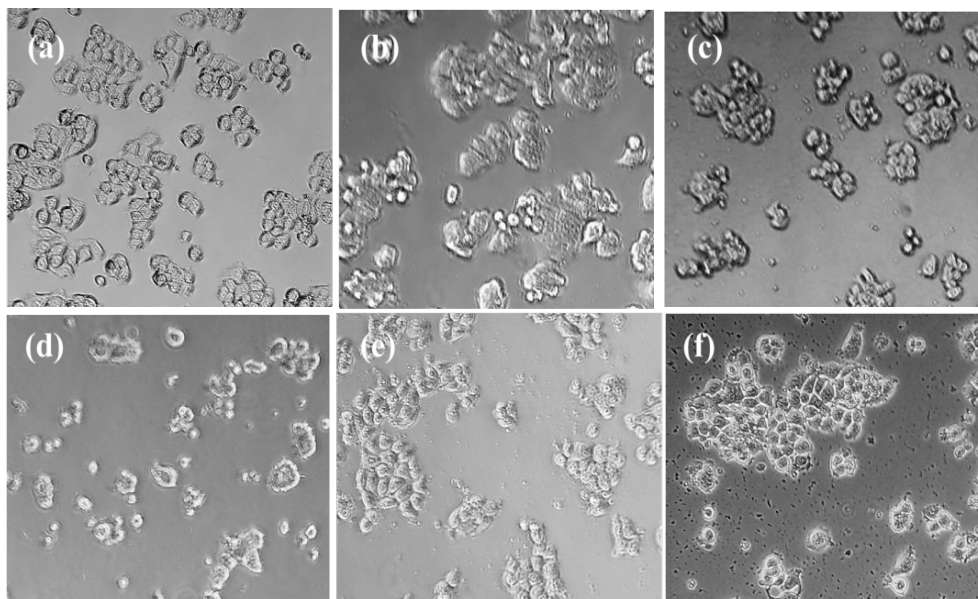


Figura 6.15. Alteraciones morfológicas sufridas por las células HT-29 tras 48 h de incubación en co-cultivo con un exceso de THP-1 (Proporción 1:5). (a) Control; (b) BMS-8; (c) **C.1**; (d) **C.3** (*p*-F); (e) **C.12** (*p*-OMe); (f) **C.14** (*o*-OMe). (magn. $\times 20$).

Las imágenes de la Figura 6.15 muestran que en el control, correspondiente a las células tratadas con DMSO, se conserva la morfología redondeada característica de la naturaleza epitelial de las HT-29. Sin embargo, cuando estas células fueron tratadas, tanto con el compuesto de referencia como con los compuestos sintetizados, se conservó parte de la morfología natural de la célula pero se vio aumentada la granularidad del citosol. Además, el tratamiento con los derivados seleccionados produce una pérdida de la adhesión celular, apreciándose la aparición de clústeres celulares con superficies irregulares.

Por otra parte, se estudió el efecto de los compuestos sobre VEGFR-2 y PD-L1 de membrana en condiciones de co-cultivo, manteniendo las mismas condiciones estudiadas para la viabilidad celular, sin embargo, no se observó inhibición de estas dos proteínas.

6.3.4.1. Efecto sobre CD80 y CD11b en la membrana de THP-1 en co-cultivo

El efecto provocado por los derivados sobre la línea celular monocítica THP-1 se estudió mediante citometría de flujo. Para ello se midió la viabilidad celular y el efecto sobre las proteínas de membrana CD80 y CD11b de THP-1 en co-cultivo con HT-29. Este estudio se realizó bajo las mismas condiciones de co-cultivo detalladas anteriormente para las células

cancerosas. De los resultados obtenidos, se puede concluir que ninguno de los compuestos presentaba un efecto sobre la viabilidad celular de las células inmunes, mientras que los resultados más significativos sobre el efecto en CD80 y CD11b se muestran en la Figura 6.16.

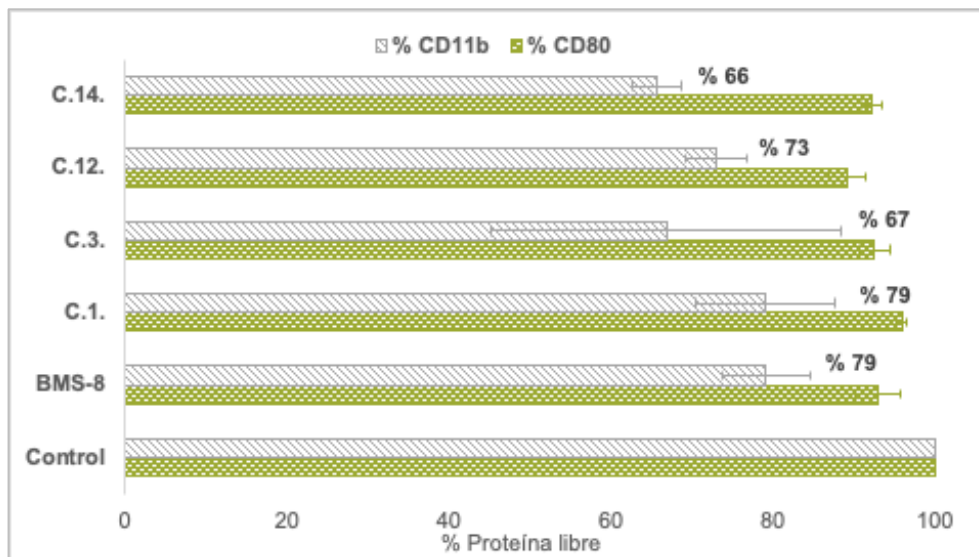


Figura 6.16. Efecto sobre CD80 y CD11b de membrana en las células THP-1 co-cultivadas con HT-29 durante 24 h en una proporción 1:5.

De los resultados mostrados en la Figura 6.16 se puede deducir que los derivados no afectaban considerablemente a CD80, aunque sí exhibían una mayor actividad sobre CD11b, mostrando resultados que mejoraban, en ocasiones, los obtenidos para el compuesto de referencia. En este sentido cabe destacar **C.3** (*p*-F) y **C.14** (*o*-OMe), que mostraban rangos de inhibición del 35 %.

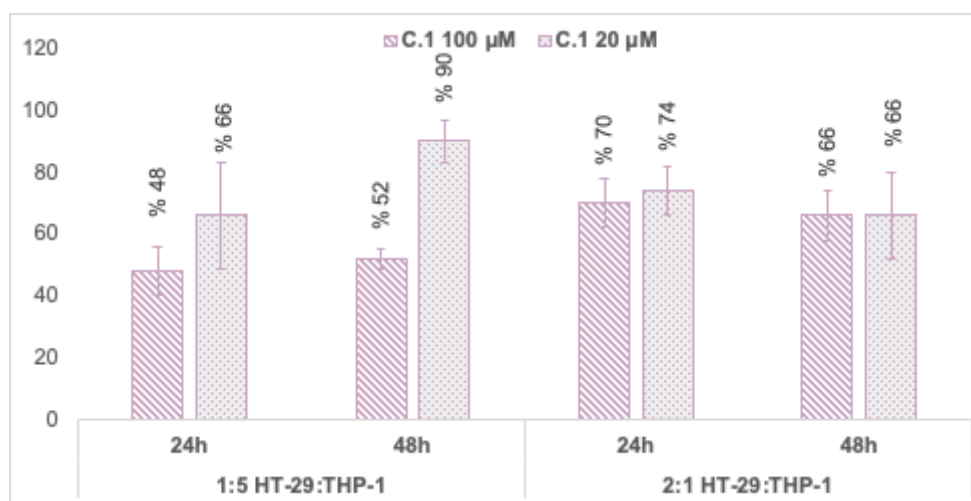
6.3.4.2. Variación del efecto con la dosis

Para determinar el efecto de la dosis administrada sobre la viabilidad de las células cancerosas, y sobre las dianas biológicas en co-cultivo con las células defensivas, se repitió el estudio, pero con dosis de compuesto de 20 μ M, ya que ésta era la concentración más activa en la inhibición de las dianas biológicas de interés (véase la Tabla 6.10). Para este estudio se pusieron en contacto las células cancerosas HT-29 con la línea de células monocítica THP-1 durante 24 h en una proporción 1:5. El estudio se realizó tanto sobre las células cancerosas como sobre las defensivas, mostrándose en la Tabla 6.13 los resultados obtenidos.

Tabla 6.13. Efecto sobre HT-29 y THP-1, en relación 1:5, tras 24 h de incubación con los compuestos a 20 μ M en co-cultivo.

Comp. 20 μ M	HT-29			THP-1		
	% Viabilidad	% VEGFR-2	% PD-L1	% Viabilidad	% CD80	% CD11b
Control	100	100	100	100	100	100
BMS-8	88 \pm 3	90 \pm 7	94 \pm 5	94 \pm 1	101 \pm 6	91 \pm 1
C.1	66 \pm 17	104 \pm 17	94 \pm 6	109 \pm 6	106 \pm 6	90 \pm 8
C.3	93 \pm 14	100 \pm 3	92 \pm 7	106 \pm 7	88 \pm 2	98 \pm 6
C.12	100 \pm 18	97 \pm 2	84 \pm 2	106 \pm 10	87 \pm 1	99 \pm 3
C.14	111 \pm 11	95 \pm 2	86 \pm 1	109 \pm 5	88 \pm 1	98 \pm 4

De los resultados mostrados en la Tabla 6.13 se puede concluir que a 20 μ M los compuestos no tienen ningún efecto, o un efecto muy moderado, tanto sobre la viabilidad celular de ambas líneas, como sobre las proteínas estudiadas para cada una de ellas. Destaca, únicamente, el carbamato **C.1** que es capaz de reducir la viabilidad celular de las HT-29 en un 40 %. Así, se amplió el estudio de este compuesto a una concentración de 20 μ M en todas las condiciones estudiadas a 100 μ M para comprobar si mejoraba estos resultados obtenidos, los resultados se recogen en la Figura 6.17.

**Figura 6.17.** Comparación de la viabilidad celular de HT-29 tratadas en co-cultivo con el carbamato **C.1** a 100 y a 20 μ M.

De los resultados mostrados en la Figura 6.17 se puede concluir que cuando el co-cultivo se encuentra en una proporción 1:5 HT-29:THP-1 la acción de **C.1** sobre la viabilidad celular es dependiente de la dosis, observándose mayor actividad a 100 μ M. Sin embargo, con una proporción

2:1 HT-29:THP-1 la actividad fue prácticamente la misma, independientemente de la dosis y en ambos tiempos de incubación, lo que resulta muy interesante, dado que al ser esta la situación más similar a la encontrada en el TME, se podría fijar la concentración óptima para este compuesto 20 μ M.

6.4. Conclusiones

Una vez evaluadas la diarilureas con puente oxametileno y puente propilo, se va a comparar su acción para determinar el compuesto más activo. En primer lugar, en cuanto a la capacidad para inhibir la proliferación de células en monocultivo, destacan entre los derivados de tipo benciletiloxiarilo **O.1** (carbamato), **O.3** (*p*-F), **O.9** (*p*-Cl) y **O.12** (*p*-OMe), por presentar índices de selectividad tumoral mayores a 10, y entre los de tipo benciletilenarilo derivados **C.1** (carbamato), **C.3** (*p*-F), **C.12** (*p*-OMe) y **C.14** (*o*-OMe), por no presentar efecto sobre dicha viabilidad. Con ello, estos fueron los derivados que se estudiaron con más detalle. Además, estos compuestos exhiben una acción inhibidora de las proteínas PD-L1 y VEGFR-2, tal y como se recoge en la Figura 6.18. Este efecto dual se produce en dosis de 20 μ M y destacan por su mayor inhibición dual los compuestos **O.9** (*p*-Br) y **C.12** (*p*-OMe).

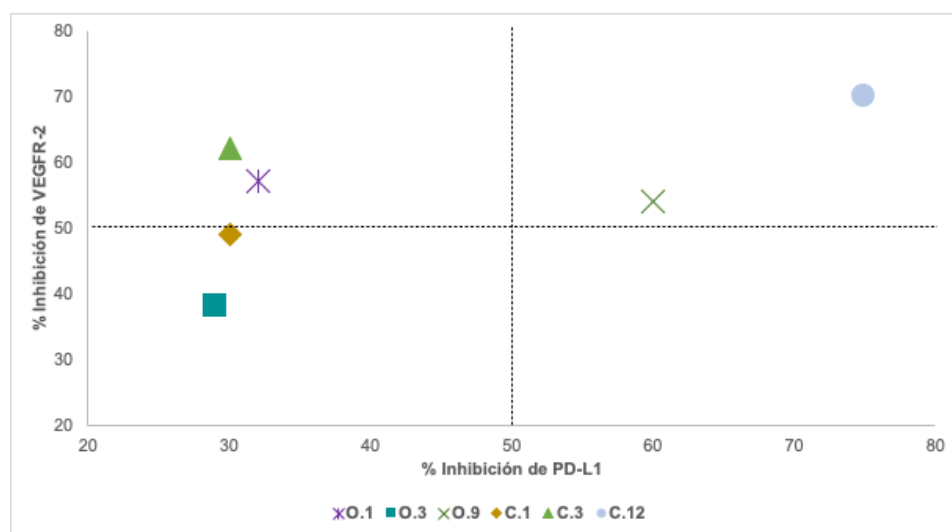


Figura 6.18. Relación entre la inhibición de ambas dianas, VEGFR-2 y PD-L1 para cada una de las diarilureas.

Por otra parte, comparando, la capacidad antiangiogénica de estos compuestos, destacan los carbamatos **C.1**, que es capaz de inhibir la formación de microtúbulos hasta una concentración de 5 μ M mejorando la acción del sorafenib, y **O.1**, además de **O.9** y **C.12** con concentración

mínima de 20 μM . En cuanto a la actividad antivascular, despunta de nuevo el benciletiloxiaril carbamato **O.1** con una concentración mínima capaz de destruir los microtúbulos a 5 μM . Del resto solo el carbamato **C.1** tiene una actividad antivascular moderada hasta una concentración de 50 μM (véase la estructura de estos derivados en la Figura 6.19).

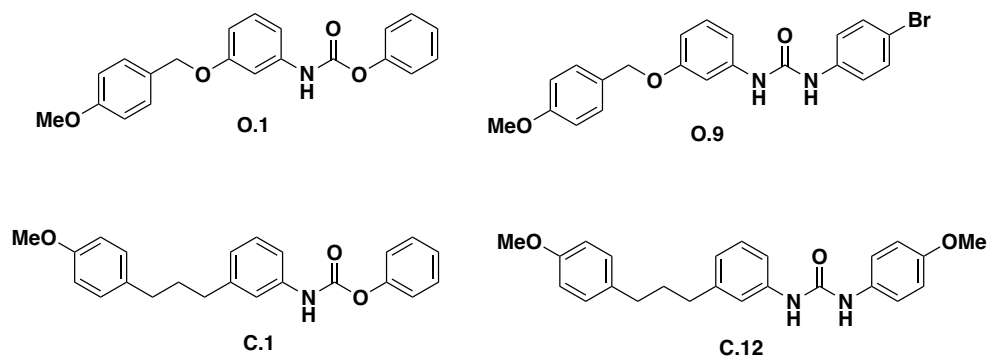


Figura 6.19. Estructura general de derivados de diarilurea.

En cuanto al estudio de co-cultivo de HT-29 con THP-1 se pueden establecer las siguientes conclusiones:

- Todos los benciletiloxiaril derivados presentan una actividad moderada en la viabilidad celular de HT-29 en co-cultivo, siendo esta mayor tras 24 h de incubación en una proporción 1:5 HT-29:THP-1 a una concentración de 20 μM .
- Todos los benciletilenaril derivados presentan una mayor actividad sobre la viabilidad celular de HT-29 en co-cultivo con THP-1 tras 48 h de incubación, independientemente de la proporción HT-29/THP-1 estudiada, destacando el carbamato **C.1** y la urea **C.3** (*p*-F) como los más activos con rangos de inhibición del 45-50 % a una dosis de 100 μM .
- Únicamente el carbamato **C.1** presentó un 40 % de inhibición de la viabilidad celular tras 24 h de incubación y en proporción 1:5 a 20 μM . Lo cual hace que este compuesto destaque sobre los benciletiloxiaril derivados, en cuanto a efecto sobre la viabilidad en co-cultivo.
- En cuanto al efecto sobre las proteínas de membrana de THP-1, CD11b, cabe destacar el benciletiloxiaril carbamato **O.1**, con un rango de inhibición del 30 % a 20 μM tras 24 h de incubación en

proporción 1:5 y las benciletilenaril ureas **C.3** y **C.12** que inhiben esta proteína en un 35 % a 100 μ M y bajo las mismas condiciones.

Finalmente, del estudio del efecto sobre las CD8+ de los benziletiloxiaril derivados seleccionados, se puede concluir que estos promueven un estado de activación de las OT-I al favorecer la sobreexpresión de receptores tanto inmunoestimuladores como inmunoinhibidores. Esto se ve corroborado de nuevo al estudiar el efecto sobre la cascada de señalización de TCR.

7. CONCLUSIONES GENERALES

7. CONCLUSIONES GENERALES

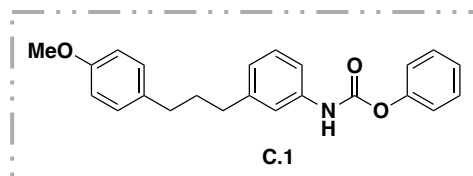
Como discusión final de los resultados obtenidos en esta tesis, se puede concluir que en general, se han cumplido los objetivos establecidos, habiendo encontrado nuevos compuestos con prometedora actividad oncoimmunomoduladora mediante la inhibición de las dianas de interés propuestas, PD-L1, c-Myc y VEGFR-2.

Se ha diseñado una primera familia de catorce compuestos en la que se ha propuesto una estructura basada en un anillo de triazol con modificaciones a izquierda y derecha que le han conferido características distintas a la molécula, las cuales hemos visto definirán la actividad de las mismas. En general, a partir de estos análisis comparativos, podemos suponer que nuestros compuestos y, en particular, los bromo-derivados más lipofílicos **T.3**, **T.5** y **T.7** son capaces de regular no sólo la expresión total de PD-L1 sino también la de c-Myc, y, además, su acción influye en el comportamiento de las células defensivas frente a las células cancerosas, sobre todo en la línea de cáncer de mama MCF-7, que se ha impuesto como la línea más sensible a estos compuestos.

Con todos los estudios biológicos que hemos realizado sobre los derivados de tipo triazol, hemos llegado a la conclusión de que la presencia de un grupo hidrofóbico y voluminoso en un extremo de la molécula y un grupo electrón-aceptor son la combinación óptima para el desarrollo de agentes con potencial efecto oncoimmunomodulador, probablemente porque con esta se favorece la entrada en la célula.

De entre los derivados de tipo triazol, destaca el compuesto **T.3**, ya que combina los mejores resultados en la mayoría de las acciones biológicas estudiadas. A dosis no tóxicas, es capaz de inhibir a más de la mitad la proliferación de las células tumorales, MCF-7; cuando se cultivan en presencia de células defensivas T, Jurkat T, o monocitos, THP-1. Además, inhibe la presencia de PD-L1 y de c-Myc en las células tumorales incluso a dosis bajas, 10 μ M, clarificando que su actividad no es dependiente de la dosis, siendo capaz, además de inhibir la expresión de los genes PD-L1 y c-Myc en más de un 20%.

en co-cultivo son los bencilenaril derivados lo que presentan una mayor actividad, destacando el carbamato **C.1**, que a dosis en el rango micromolar bajo es capaz de inhibir más del 50 % la proliferación de las células cancerosas en presencia de las defensivas.



En vista de estos resultados, podemos deducir que una mayor distancia entre la diarilurea y el anillo aromático del extremo de la molécula potencia el efecto de los compuestos en cuanto a su acción moduladora del sistema inmunitario frente a la proliferación tumoral.

Finalmente, como conclusión general a esta Tesis hay que decir Tras la evaluación *in vitro* se puede concluir que algunos de los compuestos sintetizados presentan una prometedora actividad anticancerígena que abre la vía a estudiar su acción *in vivo*.

8. SUMMARY OF THE THESIS

**“All sorts of things can happen when
you’re open to new ideas and playing
around with things”**

Stephanie Kwolek

8. SUMMARY OF THE THESIS

8.1. Introduction

8.1.1. Cancer

Cancer is one of the leading causes of mortality worldwide (see Figure 1.1 on page 1). Only in Spain, it is estimated that in 2023 the number of diagnosed cancer cases will reach 279.260 cases. Patient survival in Spain has doubled in the last 40 years thanks to investment in research.

According to the World Health Organization (WHO), cancer is the term used to describe diseases caused by the uncontrolled growth of abnormal or mutant cells capable of invading organs or tissues different from the original one. Most cancers are characterized by forming solid tumours.

Although more than 200 different types of cancers are known, it has been found that at the molecular level, all tumour cells present a series of common characteristics known as the hallmarks of cancer. Fourteen cancer hallmarks are known, common to all cancer cells (see Figure 1.4 on page 6). In that sense, recognition of these cancer hallmarks allows the development of specific treatments targeting those mechanisms that have been altered during the process of malignant cell formation.

8.1.2. Angiogenesis

One of the most studied hallmarks of cancer is tumour angiogenesis, a process by which new blood vessels are formed from existing ones to provide oxygen and nutrients to tumour cells. The network of blood vessels resulting from tumour angiogenesis shows a chaotic and disorganized structure as a consequence of its rapid formation.

Angiogenesis is regulated by a balance between pro- and anti-angiogenic factors that determine the position of what is known as the "angiogenic switch" (see Figure 1.5 on page 8), so that, in tumour cells, the balance is tipped towards proangiogenic factors, causing the "angiogenic switch" to be mostly activated.

As the tumour grows, the tumour cells become more distant from the pre-existing blood vessels, thus moving away from the oxygen diffusion limit (100-200 μm). This causes an oxygen deficit, to which is added the lack of nutrients due to the high consumption of nutrients and rapid cell division and

growth, which causes cells to enter into a state of hypoxia. Hypoxia is considered the main trigger that activates the "angiogenic switch" in tumour cells leading to expression of proangiogenic factors such as VEGF (Vascular endothelial growth factor).

8.1.2.1. Vascular endothelial growth factor (VEGF)

VEGF, which is considered a key angiogenesis initiator, belongs to a family of vascular growth factors composed of five ligands whose tyrosine kinase receptors are VEGFR-1, VEGFR-2 and VEGFR-3.

VEGF is a homodimer linked by disulphide bridges that, depending on the different patterns of cleavage and binding in the gene transcription process, give rise to various isoforms, being the most important VEGF-165, which, as the other isoforms, is involved in angiogenesis but it is also involved in cell permeability, survival and migration.

VEGF has been shown to play different roles within TME and is secreted by tumour cells and stromal cells, including macrophages, endothelial cells and fibroblasts. VEGF expression is therefore over-stimulated in most cancers and its signalling is mediated by its specific tyrosine kinase receptors (VEGFR), which are also expressed in most cancer cells. Thus, the action of VEGF can be paracrine, when it acts on endothelial cells, or autocrine when it acts directly on the cancer cells that express it.

Vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2) is the main mediator of the paracrine action of VEGF on endothelial cells. Phosphorylation of the receptor tyrosine kinase, as a consequence of VEGF/VEGFR-2 junction, activates several signalling cascades (see Figure 1.8 on page 11), which lead to proliferation (PLC γ /PKC/MAPK pathway), permeability (p38MAPK pathway), migration (FAK and p38MAPK pathway) and cell survival (PI3K/AKT pathway).

Moreover, VEGF plays a key role in TME by favouring tumour progression, which has led to further study of the autocrine action of this ligand that promotes growth, survival and migration and invasion of cancer cells. For example, VEGFR-1 mediates VEGF autocrine signalling through the ERK1 or 2 signalling pathway promoting cell migration and invasion. In addition, it has been shown that cancer cell migration and invasion is also mediated by

the activation of integrin signalling upon activation of the PI3K/AKT signalling pathway mediated by the VEGF/VEGFR-2 interaction.

8.1.2.2. MYC as an endogenous regulator of VEGF/VEGFR-2

Among the agents that promote the overexpression of pro-angiogenic factors, Myc is considered to be the master regulator of TME.

c-Myc is the most studied member of its family of oncogenes as its activity is altered in almost all types of cancer. Its activity depends entirely on the dimerization of c-Myc with another factor known as Max, which is stabilised by interactions between two charged residues present in c-Myc. The Myc-Max heterodimer binds to DNA by recognising the 5'-CACGTG-3' sequence, known as the E-box, and triggers transcription of several genes involved in tumour cell progression and survival.

Among its functions as a regulator of TME, c-Myc has been shown to coordinate the expression of several cytokines involved in the 'angiogenic switch', which is vital for activating angiogenesis (see Figure 1.9 on page 14). Studies show that c-Myc is directly involved in the activation of this process by promoting the expression of VEGF and HIF- α in cancer cells and tumour-associated macrophages (TAMs).

8.1.2.3. Antiangiogenic agents

Both VEGF and its associated receptors, especially VEGFR-2, have been studied as therapeutic targets for many new anticancer treatments.

In recent years, the FDA (Food and Drug Administration) has approved up to 10 anti-angiogenic drugs based on small molecules, most of which are tyrosine kinase receptor inhibitors. These are sorafenib (2005), sunitinib (2006), pazopanib (2009), axitinib (2012), regorafenib (2012), apatinib (2014), lenvatinib (2015), cabozatinib (2016), tivozanib (2017) and fruquitinib (2018). The structures of some of these drugs can be seen in Figure 1.10 (on page 16).

Sorafenib was approved by the FDA in 2005 for the treatment of primary renal carcinoma. Two years later it was approved by the FDA for the treatment of advanced hepatocellular carcinoma, and in 2013 it received a third approval for the treatment of differentiated thyroid carcinoma. Sorafenib is a multikinase inhibitor as it can inhibit a wide variety of tyrosine kinase

receptors such as VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, c-Kit, FLT3, RET, PDGFR β and RAF.

Sunitinib, for its part, was the second anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitor agent to be approved by the FDA (2006). Sunitinib is also a multikinase inhibitor and its biological targets include, among others, the receptor tyrosine kinase VEGFR-2. The drug was approved for the treatment of primary renal carcinoma and for the treatment of gastrointestinal stromal that has shown resistance to imatinib, which was the first kinase inhibitor drug approved by the FDA.

8.1.3. Oncoimmunology

The immune system is a complex network of biological elements and processes that constitute a line of defence against pathogens that cause infection or disease.

Cancer cells, as foreign and malignant agents, can be recognised by the immune system. In the 20th century, the term cancer immunosurveillance was coined to refer to the hypothesis that the immune system can recognise and eliminate cancer cells. In recent years, the concept of cancer immunoediting has emerged to explain the interaction between the immune system and tumour cells and their ability to adapt and promote immune suppression. This process consists of three phases: elimination, equilibrium and evasion (see Figure 1.12 on page 21). The elimination phase is the phase that frames cancer immunosurveillance, in which the innate and adaptive immune systems work together to recognise and eliminate mutant cells. However, some tumour cells survive the elimination phase and progress to the equilibrium phase where cancer cells are eliminated as they accumulate, so that the size of the tumour is controlled. Finally, the evolution of the cancer cells themselves, and the adoption of an immunosuppressive TME, allows the tumour cells to move into the evasion phase. In this phase, the TME is composed of "hijacked" immune cells, such as TAMs, which promote tumour progression by deregulating the T-cell immune response.

8.1.3.1. Cancer immunity cycle

During the first phase of immunoediting or the cancer-killing phase, and even in the equilibrium phase, cell death is activated, which is carried out following a serie of related processes known as the cancer immunity cycle.

In this process, dendritic cells (DCs) promote the defensive cell response through MHC-Antigen-TCR interaction, which is the same interaction that leads to the destruction of cancer cells.

T cells expressing TCRs that can recognise the MHC complex presented by DCs are divided into CD4⁺ and CD8⁺. The latter ones are primarily responsible for killing malignant cells. Once activated, these cells mature into cytotoxic T cells (CTL), which are considered the most effective anti-cancer cells as they can recognise cancer cells through the pMHCI complex once they infiltrate the TME (see Figure 1.14 on page 24).

The signalling cascade triggered in these cells by the TCR/pMHCI interaction is the same for both activation of these cells in the lymph nodes and for triggering the process of cell death (apoptosis) of cancer cells, except for some differences.

The TCR/pMHCI interaction activates tyrosine kinases of the SRC family, such as LCK or FYN. LCK binds to the CD8 co-receptor and stabilises the interaction between the TCR receptor and pMHCI. At this point, the signalling pathway will depend on the conformation of LCK, which changes depending on the phosphorylation/dephosphorylation of tyrosines Y394 and Y505. Autophosphorylation of Y394 stabilises the active conformation, while phosphorylation of Y505 stabilises the inactive conformation. Dual phosphorylation of these two tyrosines has also been shown to provide an active conformation of LCK. The regulation of phosphorylation and dephosphorylation of either residue is provided by a transmembrane tyrosine phosphatase known as CD45. In its active form, therefore, LCK maintains an optimal level of phosphorylation on TCR-associated CD3- ξ chains.

Phosphorylation of these immunoreceptors promotes the arrival and subsequent activation of ZAP70, which in turn phosphorylates the transmembrane protein LAT that acts as a link for T-cell activation (see Figure 1.15 on page 25). LAT activation promotes the recruitment of different signalling molecules forming a protein complex, known as the LAT signalosome, which directs the activation of different signalling pathways. These different pathways make the difference between the signalling cascade during CD8⁺ activation and maturation and CTL activity.

During activation, the main target of the signalling cascade is the expression of IL-2, a cytokine that promotes cell proliferation by favouring

the expansion of activated T cells. In contrast, in target cells, this interaction leads, on the one hand, to the secretion of granules containing perforins and granzymes that activate the apoptosis mechanism in the cancer cell, and, on the other hand, leads to the secretion of pro-inflammatory cytokines such as $\text{INF}\gamma$ and $\text{TNF-}\alpha$.

8.1.3.2. Immunosuppressive TME

As the stages of cancer immunoediting progress the processes involved in the cancer immunity cycle are altered, especially in the last phase of evasion in which TME is immunosuppressed. T cells, under these conditions, enter into a state of exhaustion so that when they reach the TME they lose their functionality due to an increase of inhibitory receptors on their membrane and a decrease of the amount of effector cytokines released. T cell-associated inhibitory receptors include PD-1, CTLA-4, TIM-3 (T cell immunoglobulin domain and mucin domain protein 3) and LAG-3 (lymphocyte activation gene protein 3). In addition, a decreased release of effector cytokines such as IL-2, $\text{INF}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$, and granzymes has also been shown to occur while the release of suppressor cytokines, such as IL-10 and $\text{TGF-}\alpha$, VEGF and inflammatory cytokines such as IL-6, is increased.

The immunosuppressed TME, on the other hand, is composed of a variety of immune cells with pro-tumoral activity. These are cells of the immune system that, due to the release of some specific factors into the TME, have been differentiated to develop functions that contribute to tumour progression. An example of such cells are monocytes which differentiate into M1 or M2/TAM, with anti-tumoral and pro-tumoral activity, respectively. M2 macrophages, better known as TAMs, are involved in many processes that promote tumour progression. It has been shown that CD11b is a transmembrane protein, specific to M2/TAM phenotype macrophages, whose interaction with CD18 promotes cancer cell invasion and metastasis by increasing the expression of MMP9.

CD4⁺ cells, on the other hand, can be differentiated into T_H and Treg, this last ones are those more favoured in the evasion phase of cancer immunoediting. Unlike T_H cells, Treg cells act by modulating CTL activity. The balance between T_H and Treg is determined by the CD69 protein when associated with S100A8/A9. These proteins are overexpressed under inflammatory conditions. CD69 is a transmembrane protein initially described

as a marker of leukocyte activation. Recently, CD69 has been shown to act as a crucial regulator of various immune responses. Depending on the cellular context, as well as the associated ligand, CD69 activity takes on different roles in the differentiation phases of T cells during carcinogenesis.

Together, all these cells and their pro-tumoral activity constitute an immunosuppressed TME which, in turn, promotes, as already seen, the overexpression of inhibitory receptors on the surface of exhausted effector T cells that act as immune checkpoints (see Figure 1.16 on page 30).

LAG-3 is an inhibitory receptor capable of arresting effector T-cell activation and anti-tumour cytokine release. The main ligand of this receptor is MHCII and its interaction prevents its binding to the CD4+ TCR and blocks both its activation and action. On the other hand, TIM-3 is a tyrosine kinase receptor expressed on the membrane of exhausted effector T cells. When TIM-3 is not bound to its ligand, it promotes the recruitment of active LCK, resulting in T cell activation, whereas the binding of its ligand, galectin 9, results in inhibitory activity. Thus, although its elevated expression in the TME is associated with an exhausted immune response, it has been shown that its expression in the absence of a ligand can lead to the activation of immune signalling.

In addition to these inhibitory receptors, it is worth noting that, although in smaller numbers, exhausted T cells also express certain activation receptors such as OX40, whose activation in exhausted effector T cells has been shown to reactivate their anti-tumour capacity through the production of cytokines such as IL-2 or INF γ .

8.1.3.3. Mechanism of action of PD-1/PD-L1

Among the most studied immune checkpoints are found PD-1 and its ligand PD-L1, whose interaction limits the action of effector T cells in the TME in the late stages of cancer immunoediting.

In normal tissues, PD-1/PD-L1 interaction is essential to prevent the over-activation of immune cells, thus preventing autoimmune diseases. However, this interaction in TME leads to the evasion of immunosurveillance. PD-1/PD-L1 interaction is characterised by blocking several signalling cascades (see Figure 1.17 on page 33) leading to the control of effector cell cytotoxicity and

the suppression of cytokines involved in immune activation (IL-2, INF- γ and TNF- α).

8.1.3.4. Endogenous regulators of PD-L1

PD-L1 overexpression in cancer cell membrane is regulated by different mechanisms including genomic alterations, epigenetic regulation, microRNA-based control or endogenous transcription factor-based regulators such as INF- γ , IL-6, TNF- α , TGF- α , HIF-1 or EGF (see Figure 1.18 on page 34).

Among the inflammatory cytokines involved in PD-L1 overexpression, IL-6 is an inflammatory cytokine that contributes to tumour survival, by promoting the expression of PD-L1 and other proteins with anti-apoptotic, pro-angiogenic or pro-metastatic activity, and also plays a key role in the survival, proliferation, differentiation and recruitment of leukocytes, thus promoting anti-tumour immunity.

TNF- α is also a cytokine with a dual role in TME. It has been shown to increase PD-L1 transcription by activating the NF- κ B (Nuclear factor- κ B) pathway and, in addition, in its role as a pro-tumour cytokine, it promotes the expression of factors involved in angiogenesis (VEGF, VEGFR-2) and cell growth (RAS, c-Myc). While, at high concentrations, TNF- α plays a role as an anti-tumour cytokine promoting tumour cell death and the arrival of lymphocytes to the TME.

PD-L1 expression is also regulated by c-Myc. Among its many functions, aimed at promoting tumour progression, c-Myc directly regulates PD-L1 transcription at the initiation of the cell transformation process, rather than in response to anti-tumour immune action (see Figure 1.9 on page 14). In addition, c-Myc also contributes to immune evasion by promoting the recruitment of TAMs to the TME.

8.1.3.5. VEGF/VEGFR-2 as an immune regulator in TME

VEGF has recently been considered a factor regulating immunosuppression in TME. Overexpression of VEGF in TME has been shown to lead to suppression of immune action by four different mechanisms. Firstly, through its well-known ability to promote the formation of new aberrant vessels, which not only hinder the delivery of drugs to the TME but also facilitate the exit of immune cells from this. VEGF is also able to inhibit

DC maturation, and the subsequent proliferation and infiltration of CTLs, and also promotes the recruitment of immunosuppressive cells such as MDSCs, Treg or TAMs. Thus, VEGF is involved in immunosuppression at different stages of the cancer immunity cycle.

Moreover, PD-L1 has also been shown to be involved in angiogenesis by binding to VEGFR-2 and activating the FAK/AKT signalling pathway, thereby regulating biological processes that promote angiogenesis.

8.1.3.6. Immunomodulator agents

Immunotherapy has become of great interest in the last decade and is currently one of the main strategies being studied in the clinic. The first drugs approved by the FDA for immunotherapy were based on monoclonal antibodies. However, these drugs cause many side effects associated with their stability and immunogenicity. Thus, the study of drugs based on small molecules is becoming of great interest as they are more suitable for oral administration, are more stable and have better cell membrane permeability.

The study of new small molecule-based drugs for immunotherapy started to be developed a few years ago, which explains why none of these molecules have yet been approved by regulatory agencies. The compounds currently being investigated as PD-1/PD-L1 interaction modulators base their action on different mechanisms. Thus, some seek to inhibit the expression of these proteins by blocking regulatory cytokines such as $\text{INF-}\gamma$, others are aimed at blocking the signalling cascade that triggers the PD-1/PD-L1 interaction, although most seek to directly inhibit the binding of PD-1 to its ligand by blocking the binding site of one or the other. In this latter group, we found CA-170, one of the first compounds to move into clinical trials (see structure in Figure 1.19 on page 38), which was described as a PD-L1 and VISTA inhibitor.

On the other hand, Bristol-Myers Squibb (BMS) developed in 2015 a library of PD-1/PD-L1 inhibitor compounds based on biphenyl derivatives. Of particular note from this library are BMS-202 and BMS-8 (see structures in Figure 1.20 on page 39), which inhibit the interaction of these two proteins by binding to PD-L1 and causing its dimerization.

8.1.4. Medicinal Chemistry

In the process of discovering new drugs, the knowledge of the deregulated processes at the cellular level must allow new drugs to be designed to block them.

The development of a new drug begins with the design, optimisation and formulation of possible active molecules directed to a biological target, where biological targets are understood to be proteins, genes and other molecules at which the treatments are directed. This phase, together with pre-clinical studies of these molecules, is the most time-consuming. In these early phases, medicinal chemistry is the discipline that plays the most important role.

According to the IUPAC definition, medicinal chemistry is the discipline responsible for the discovery, development, identification and interpretation of the mode of action of biologically active compounds at the molecular level. In addition, the discipline studies the metabolic behaviour and structure-activity relationships of these compounds. To this end, medicinal chemistry must take into consideration the pharmacodynamics and pharmacokinetics of the molecules designed to ensure that they are safe and produce as few side effects as possible.

On the other hand, cancer is a disease that has been extensively studied at the molecular level, which allows the design of new compounds aimed at those therapeutic targets with the greatest involvement in the disease. As explained, cancer consists of many deregulated processes that favour what is known as drug resistance, which has made it necessary to apply combined therapies or the appearance of multi-targeted drugs. The latter consists of molecules with the ability to interact with several targets at the same time. The design of multi-drug targets is a major challenge but provides certain advantages over combination therapies, which consist of the administration of several drugs at the same time, and which face the problem of including both drugs in a single formulation.

In this thesis, we have studied several compounds with potential activity against various targets, which have been chosen because of their implications in cancer disease. The targets chosen are PD-L1, as a regulator of immune blockade; c-Myc considered the master regulator of TME and

VEGFR-2, the main mediator of VEGF signalling, which plays a key role in angiogenesis and also coordinates the regulation of the immune system.

8.2. Objectives

The present doctoral thesis is framed within the field of basic cancer research, being its general objective the synthesis and biological evaluation of a serie of molecules with potential anticancer activity.

As already mentioned, there are many deregulated processes in this disease, which makes it necessary to block several of these processes at the same time with the aim of stopping tumour progression. To this porpouse, two families of compounds have been designed with potential activity against three biological targets of particular relevance in tumour progression: PD-L1, c-Myc and VEGFR-2.

The specific objectives of the thesis are the following:

- To synthesize a set of triazole derivatives whose structures are shown as **E.III** in Figure 8.1, with potential dual activity against PD-L1 and c-Myc.
- To synthesize a set of diarylurea derivatives whose structures are shown as **U.III** in Figure 8.1, with potential dual activity against PD-L1 and VEGFR-2.

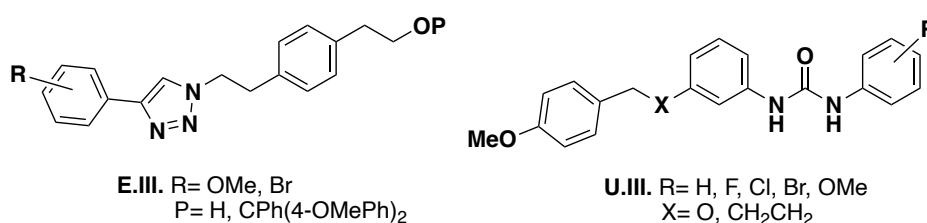


Figure 8.1. General structures of the compounds.

- To evaluate the biological activity of both families of compounds by measuring their effect: on cell viability, on the biological targets of interest for each of them and on different cells of the immune system.

8.3. Triazole-scaffold derivatives

8.3.1. Design of Triazole derivatives

For this family of compounds, the design of molecules with multitarget inhibitory capacity against PD-L1 and c-Myc was proposed with the aim of obtaining new immunomodulatory agents.

The elucidation of the crystal structures of the complexes formed by the inhibitors designed by BMS with the PD-L1 dimer allowed us to obtain a pharmacophore model for these inhibitors. This model consists of three important structural components. The first one has to occupy the hydrophobic cavity of PD-L1, in the case of the BMS compounds it is a biphenyl system which occupies this cavity in a favourable way. The second structural component has to occupy the central flat area of the binding site and, in turn, serve as a linker between the other two components. The third structural component has to be positioned in a polar area that can be extended better than the previous ones.

Thus, taking into account the proposed pharmacophore model, as well as our previous work, the general structure **E.III** was proposed (see Figure 8.2).

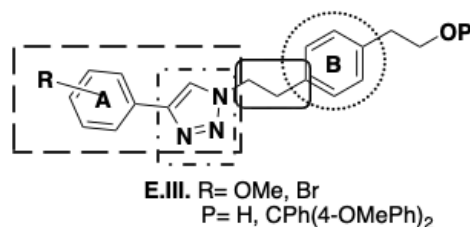


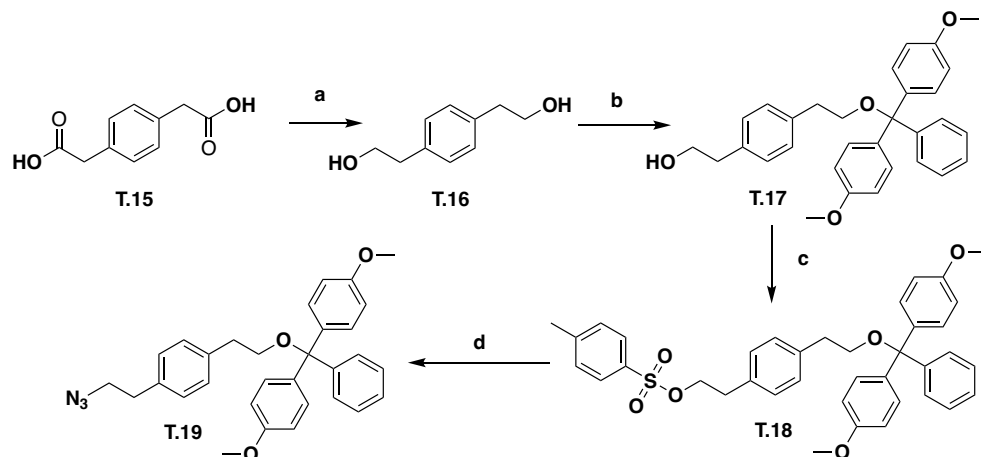
Figure 8.2. General structure of derivatives with potential immunomodulatory activity.

Molecular modelling studies revealed that the unit formed by the A-ring and the triazole ring established π -stacking interactions with the aromatic residues of the B-chain of PD-L1, while the B-ring was placed in the hydrophobic cavity of the A-chain of PD-L1.

8.3.2. Synthesis

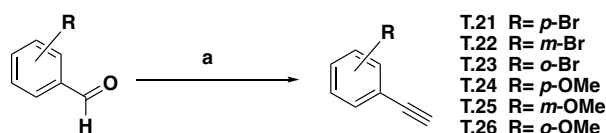
The key step in the synthesis of derivatives with general **E.III** structure was the cycloaddition reaction between alkyl azides and the corresponding aryl alkynes.

In order to carry out the cycloaddition, the preparation of the azide and the corresponding alkynes was necessary. The synthetic route followed for the synthesis of the azide of interest (compound named in this Thesis as **T.19**) is detailed in Scheme 8.1.



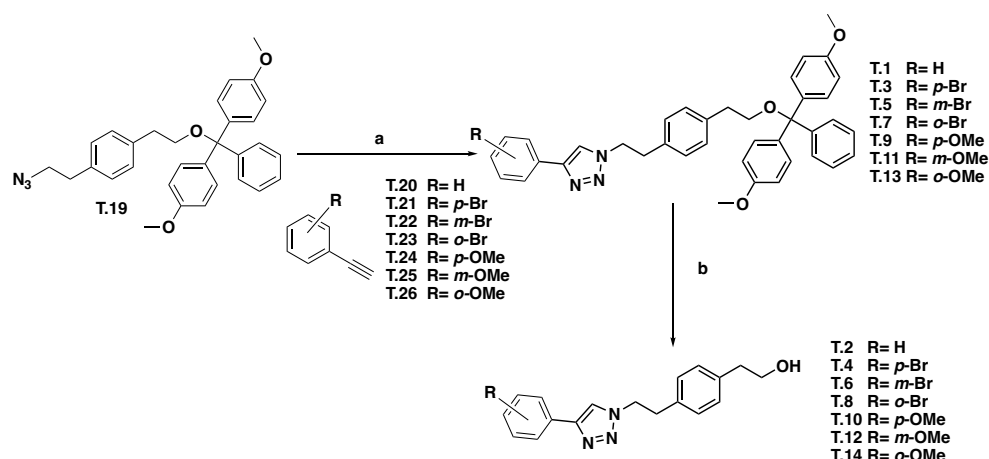
Scheme 8.1. Synthetic route to azide **T.19**. Reagents and conditions: (a) $\text{BH}_3 \cdot \text{SMe}_2$, THF, r.t., 12 h, (97 %); (b) 4,4'-dimethoxytrityl chloride, Et_3N , DMAP, CH_2Cl_2 , r.t., 22 h, (35 %); (c) TsCl , Et_3N , DMAP, CH_2Cl_2 , r.t., 4 h (63 %); (d) NaN_3 , DMF, 50 °C, 3 h, (83 %).

The synthesis of the corresponding non-commercial alkynes, on the other hand, was carried out by the Ohira-Bestmann reaction, a process that allows terminal alkynes to be obtained from aldehydes (Scheme 8.2).



Scheme 8.2. Synthetic route to alkynes. Reagents and conditions: (a) dimethyl 2-oxopropylphosphonate, K_2CO_3 , ABSA, MeCN, r.t., 2 h then addition of the aldehyde, MeOH, r.t., 15 h.

Finally, compounds **T.1-T.14** were obtained by click chemistry reaction following scheme 8.3.



Scheme 8.3. Synthetic route to triazole derivatives. Reagents and conditions: (a) Alkyne (**T.20-T.26**), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, sodium ascorbate, $\text{DMF}:\text{H}_2\text{O}$, 60°C , 2 h; (b) Trifluoroacetic acid, MeOH, r.t., 30 min.

8.3.3. Biological evaluation

The triazole family consists of 14 compounds, which general structure can be seen in Scheme 8.3, and comprises not only the final alcohols but also their precursors with the hydroxyl group protected by a dimethoxytrityl group.

8.3.3.1. Cell viability study

Firstly, the ability of compounds **T.1-T.14** to inhibit cell viability was studied using the MTT assay to determine their IC_{50} values. This assay was carried out after 48 h of incubation using tumour lines HT-29, MCF-7 and A-549 and non-cancer cell line HEK-293 in order to determine the selectivity index of the compounds.

From this assay it could be deduced that none of the compounds tested exhibited activity in any of the cell lines, showing IC_{50} values higher than $300\ \mu\text{M}$ in all cases. In view of these results, $100\ \mu\text{M}$ was determined as the concentration to be used in the following assays.

8.3.3.2. Effect on the total PD-L1 and c-Myc in tumour cells

The ability to inhibit c-Myc and PD-L1 target proteins was measured by flow cytometry. Compounds **T.1-T.14** were used at a dose of $100\ \mu\text{M}$ in HT-29, MCF-7 and A-549 monocultures for 24 h incubation.

Table 4.1 (on page 71) shows that the results vary depending on the cell line used. In general, derivatives with the protected hydroxyl group (**T.1**, **T.3**, **T.5**, **T.7**, **T.9**, **T.11** and **T.13**), show comparatively higher activity than the

unprotected derivatives with the free hydroxyl group highlighting the protected bromo derivatives **T.3**, **T.5** and **T.7** which showed the highest dual activity in all the cell lines tested.

In the action on c-Myc it should be noted that, in addition to the bromo-protected derivatives **T.3**, **T.5** and **T.7**, the *m*-OMe derivative **T.11** inhibits c-Myc by half in the cell lines HT-29 and A-549. In the case of A-549, the two protected methoxy derivatives **T.9** and **T.13** also stand out, with inhibition ranges of 40 and 50 %, respectively.

Regarding total PD-L1, it can be seen in Table 4.1 that the protected derivatives are more active than the unprotected ones on HT-29 and MCF-7, while in A-549 the trend changes, with the unprotected derivatives showing the highest activity with inhibition ranges of 50-60 %.

The *p*-bromide derivative **T.3** was selected for the dose/effect correlation study in the two cell lines HT-29 and MCF-7, which are the most sensitive to the effect of these compounds. Results depicted that, in the case of HT-29 and at concentrations below 50 μ M, **T.3** ceases to have any effect on both proteins, so it can be deduced that there is a dependence between the activity and the dose of the compound. In MCF-7, however, we observed that the action on c-Myc does not depend on the dose administered, while with regard to PD-L1, an increase in effect is observed as the concentration decreases, with a maximum effect at 10 μ M.

The ability of the compounds to inhibit gene expression of the two targets of interest was also studied by using real-time qPCR. For this purpose, the MCF-7 cancer cell line was treated for 24 h with the compounds at 100 μ M. Results showed that the compounds tested were able to reduce the expression of both targets. Compound **T.3** (*p*-Br) stands out as the most active as it was able to inhibit c-Myc expression by half and also outperformed the reference compound in the inhibition of PD-L1.

8.3.3.3. Cell viability in co-culture

The action of the compounds on cancer cell proliferation was also studied in the presence of Jurkat T cells. For this purpose, each of the cancer cell lines (HT-29, MCF-7 and A-549), stimulated with $\text{INF}\gamma$, was co-cultured, for 24 h, with the compounds at 100 μ M and in the presence of the Jurkat T cell line in a 1:5 ratio (cancer cells/T cells).

Table 4.4 (on page 76) shows that the activity varies depending on the cell line studied. Lung cancer line A-549 showed a different trend from the rest, with a moderate activity of 30 % for the unprotected derivatives **T.4** (*p*-Br), **T.6** (*m*-Br), **T.8** (*o*-Br), **T.12** (*m*-OMe) and **T.14** (*o*-OMe). Among the protected analogues, only **T.3** (*p*-Br) has a similar activity to the previously mentioned compounds. This tendency is just the opposite in the other two cell lines tested, HT-29 and MCF-7, with a greater effect on the latter. Thus, the protected derivatives **T.5** (*m*-Br), **T.7** (*o*-Br), **T.9** (*p*-OMe) and **T.11** (*m*-OMe) showed cell viability inhibition range of 40-50 % on HT-29 in co-culture with Jurkat T cells. Finally, the compounds showed a greater effect on cell viability in MCF-7, with the protected derivatives standing out in general, as is the case with HT-29, with inhibition ranges of 60 %, compared to 30 % for the unprotected derivatives.

The therapeutic targets were also studied taking advantage of the cytometer technique's versatility. In that sense, membrane PD-L1 and VEGFR-2 were studied.

Table 4.5 (on page 78) shows that none of the compounds has a significant action on VEGFR-2 in any of the cell lines studied. However, in terms of their action on membrane PD-L1, the compounds do show activity, with the action on MCF-7 standing out. In this cell line, we found excellent inhibition ranges of 60-70 % for the protected bromo derivatives (**T.3**, **T.5** and **T.7**) and for all methoxy derivatives (**T.9-T.14**). These results correlate with the cell viability data shown in Table 4.2 (on page 72), where MCF-7 stood out as the cell line in which the action of Jurkat T cells was greatest.

The compounds selected to complete the study were the protected bromine derivatives **T.3** (*p*-Br), **T.5** (*m*-Br) and **T.7** (*o*-Br). Thus, with these three compounds the cell viability study was carried out in the co-culture of MCF-7 with the THP-1 defensive cell line.

This study, which results are depicted in Table 8.1, was carried out at incubation times of 24 and 48 h and with two different ratios of cancer cells/defensive cells. In one the ratio was 1:5 MCF-7:THP-1 and in the other, the ratio was 2:1 MCF-7:THP-1.

Table 8.1. Effect on cell viability in co-culture with THP-1 monocytes.

Comp. 100 μ M	1:5 MCF-7:THP-1		2:1 MCF-7:THP-1	
	24 h	48 h	24 h	48 h
Control	100	100	100	100
BMS-8	91 \pm 30	42 \pm 5	100 \pm 4	58 \pm 10
T.3	52 \pm 7	28 \pm 2	83 \pm 9	51 \pm 17
T.5	52 \pm 4	42 \pm 10	107 \pm 3	69 \pm 10
T.7	42 \pm 10	41 \pm 10	92 \pm 11	60 \pm 13

From the results shown in Table 8.1, it can be concluded that, in general, the effect on cell viability is greater at 48 h regardless the MCF-7/THP-1 ratio. When **T.5** (*m*-Br) and **T.7** (*o*-Br) were used in excess of THP-1, the effect on MCF-7 cell viability was almost unchanged over time, remaining between 40 and 50 %. When **T.3** (*p*-Br) was used, however, cell viability decreased considerably from 50 % to 28 %. On the other hand, when cancer cells are in higher proportion to defensive cells, it was observed that, although at 24 h the effect on cell viability was moderate, it increased considerably at 48 h of incubation, obtaining an inhibition of MCF-7 viability of 50 % for **T.3** (*p*-Br) and 30 and 40 % for **T.5** (*m*-Br) and **T.7** (*o*-Br) respectively.

In view of these results, the bromine derivative **T.3** (*p*-Br) was selected for a dose/effect correlation study on MCF-7 cell viability in co-culture with THP-1. Figure 8.3 shows the results at the different concentrations tested, at two incubation times for a 1:5 MCF-7:THP-1 ratio. From this study, it can be concluded that for both incubation times, a relationship is established between the dose administered and the effect on MCF-7 viability.

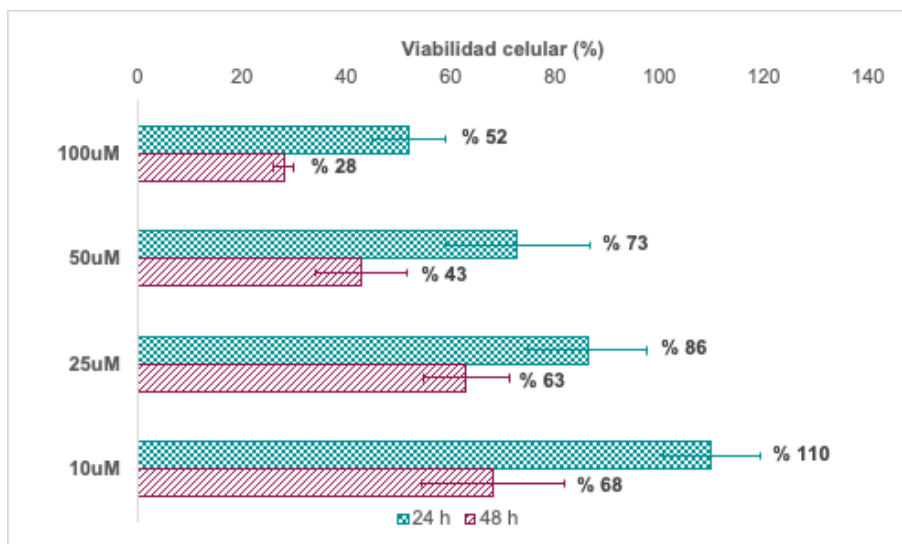


Figure 8.3. Dose/effect correlation on MCF-7 cell viability in co-culture with THP-1 when treated with compound **T.3** (*p*-Br).

8.3.3.4. Cytokines secretion by triazole derivatives

The action of **T.3** (*p*-Br), **T.5** (*m*-Br) and **T.7** (*o*-Br) on the secretion of the cytokines IL-6 and TNF- α into the culture medium was studied by ELISA test. Results regarding IL-6 showed that the compounds were able to decrease IL-6 expression when treating the MCF-7 cancer cell line in monoculture, as does the reference compound. However, when treating the THP-1 defensive cell line in monoculture, the compounds follow an opposite trend to BMS-8, increasing IL-6 secretion, an effect that is maintained when both lines are co-cultured.

Regarding TNF- α , compounds are able to promote the expression of this cytokine in THP-1 monoculture, an effect that is further enhanced in co-culture of MCF-7 and THP-1 for compounds **T.3** (*p*-Br) and **T.5** (*m*-Br).

8.3.3.5. Study of the compounds effect on OT-I T cells

In order to test the effect of the compounds on OT-I, we studied by flow cytometry the effect on the immune receptors LAG-3, TIM-3, PD-1, CD69 and OX40 present on the surface of exhausted T cells. The results in Table 4.10 (on page 90) shown that the compounds promote the expression of these immunoreceptors, most notably on OX40, a co-stimulatory marker. Also noteworthy is compound **T.5** (*m*-Br), which is able to inhibit by 40 % the expression of CD69, a marker of cellular exhaustion. Thus, in general, CD8+ cells could be in a state of activation in response to the action of the tested compounds.

In order to corroborate this hypothesis, the effect of the compounds on the OT-I signalling pathway was also studied by Western blot. From the results in Figure 8.4, it can be concluded that while none of the compounds has an effect on FYN, they are able to increase the expression of LCK as well as its phosphorylated form Y505. On the other hand, as regards their action on ZAP70 and LAT, the opposite action was observed, causing a decrease in the expression of both and, above all, significant inhibition of the phosphorylated form of LAT. In general, it can be said that all compounds are involved in the modulation of the CD8+ signalling cascade triggered by the action of TCRs, thus having implications for their activation status.

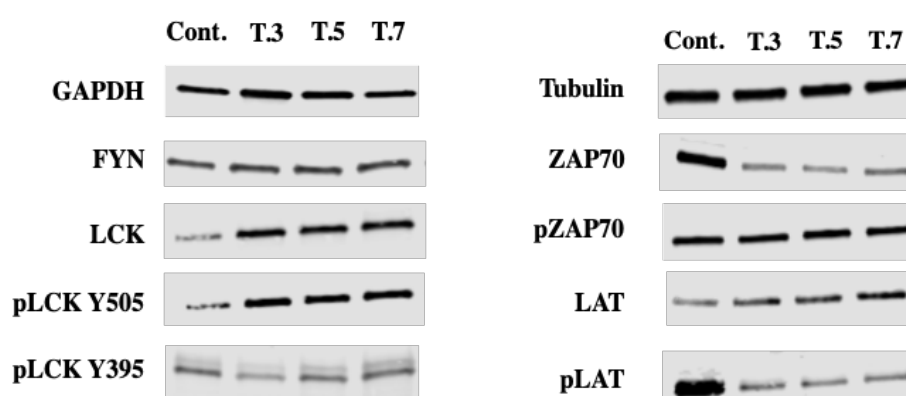


Figure 8.4. Expression of proteins involved in the OT-I signalling pathway by Western blot.

8.3.4. Discussion

After studying the biological activity of these triazole derivatives, it was found that the small variations in their chemical structure led to variations in their activity depending on the cell line studied and the target of interest. In this sense, and in order to establish the correlation between structure-activity and how the effect on the targets affects cell viability in co-culture, the results obtained for each compound in each cell line are shown in Figure 4.23 (on page 92). From those graphs, it can be deduced that, in general, in the HT-29 line there is a good correlation between the effect on the biological targets and the inhibition of cell viability, with the derivatives protected with the dimethoxytrityl group standing out from the unprotected ones. This correlation, however, is not clear for the A-549 line, which can be attributed to the low sensitivity of this line to the action of the compounds.

Figure 4.23 shows that MCF-7 is the most sensitive line to the action of these triazole derivatives. As in HT-29, the correlation is clear, especially in

the case of the bromo-derivatives (**T.3-T.8**), where the action of **T.3**, **T.5** and **T.7** stands out, the structures of whom can be seen in Figure 8.5.

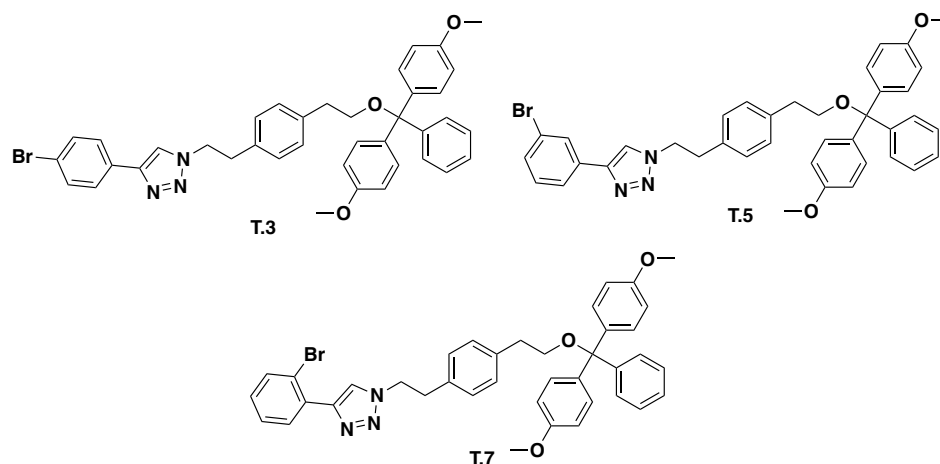


Figure 8.5. Bromo-derivatives structure.

These derivatives were selected to complete the study from which the following conclusions can be drawn:

- In the study on the direct interaction on both targets, using the TSA technique, the compound **T.7** (*o*-Br) stood out, causing the highest destabilisation of the protein-ligand complex with values of ΔT_m of -5 and -2 for c-Myc and PD-L1 respectively.

- In the study on the effect on gene expression of c-Myc and PD-L1, **T.3** (*p*-Br) stood out. This compound enhances the effect of the reference compound with gene inhibition ranges of 50 and 33 % for c-Myc and PD-L1 respectively.

- In the dose/effect correlation study, compound **T.3** (*p*-Br) showed the highest activity against both biological targets, with inhibition ranges of 50 % at 10 μ M.

- In the study on the secretion of IL-6 and TNF- α into the medium, compound **T.3** (*p*-Br) again stood out as the one that provoked the greatest secretion of both cytokines into the medium by THP-1 defence cells.

- The study on the action of the compounds on CD8⁺ showed that in general, these derivatives were involved in the modulation of the TCR-initiated signalling cascade, with these cells being in a state of activation derived from the action of the compounds.

Comparing the inhibition of MCF-7 cell viability in co-culture with the THP-1 and Jurkat T-cell defensive cell lines, caused by the compound action, it can be concluded that compound **T.3** (*p*-Br) shows the highest activity on this cell line.

8.4. Diarylurea derivatives

8.4.1. Design of diarylurea derivatives

Following the line of immunoregulatory multitarget inhibitors, it was decided to study a new family of compounds with activity not only against PD-L1 but also against VEGFR-2. The design of the new family of compounds took into account previous work carried out by the research group. Based on these results, and on the structure of the BMS-8 compound, we designed two new families of compounds with the general **U.III** structure shown in Figure 8.6. In the case of the first family, an oxamethyl chain was used to connect the *p*-methoxyphenyl part to the diarylurea functionality, similar to the connecting chain contained in the BMS-8 structure. For the second family, a longer propyl connecting chain was used.

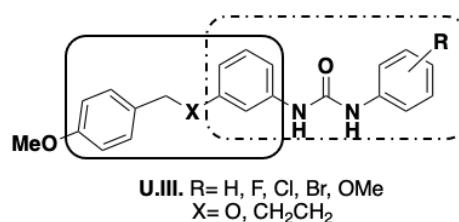
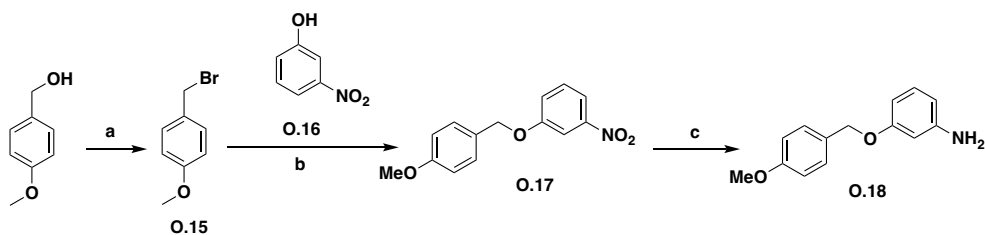


Figure 8.6. General structure of derivatives with potential immunomodulatory activity.

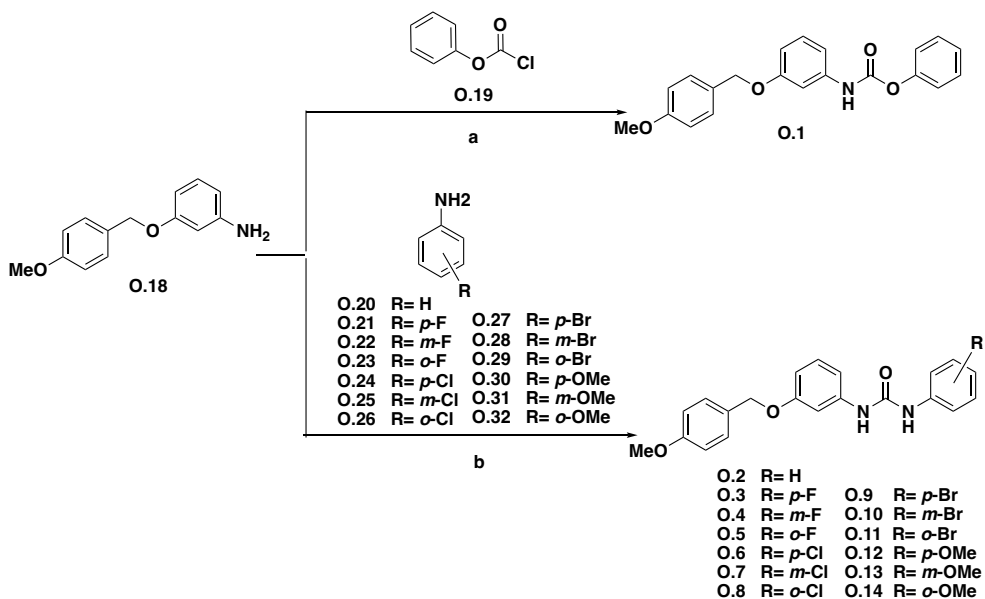
8.4.2. Synthesis

8.4.2.1. BenzylethoxyAryl Ureas

For the preparation of the first family of diarylureas with an oxamethylene bridge as the connecting chain, the synthetic route described in Schemes 8.4 and 8.5 was followed.



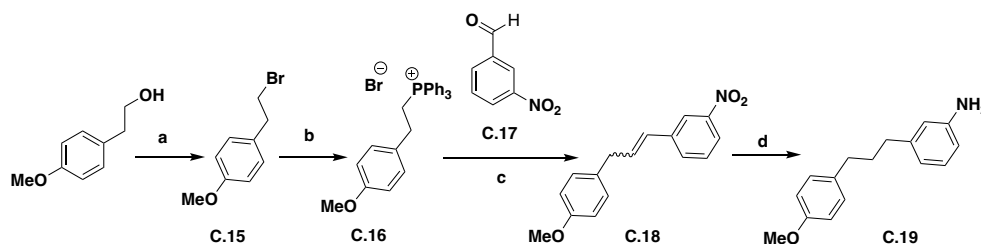
Scheme 8.4. Synthetic route to aniline **O.18**. Reagents and conditions: (a) PBr_3 , Et_2O , $0\text{ }^\circ\text{C}$, then r.t., 2 h (96 %); (b) **O.16**, K_2CO_3 , acetone, r.t., 16 h (90 %); (c) H_2 , Pd/C, AcOEt, r.t., 18 h (84 %).



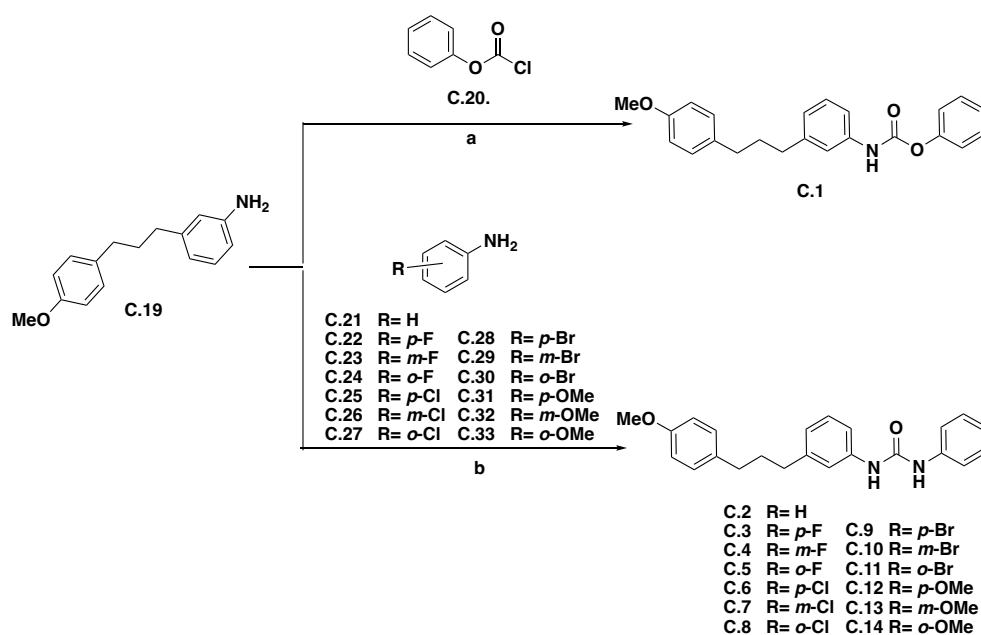
Scheme 8.5. Synthetic route to diarylurea derivatives. Reagents and conditions: (a) Phenyl chloroformate (**O.19**), pyridine, THF, $0\text{ }^\circ\text{C}$, 20 min, then r.t., 1 h. (78 %); (b) Aniline (**O.20-O.32**), triphosgene, Et_3N , THF, r.t., 1 h, then $55\text{ }^\circ\text{C}$, 5 h, then addition of aniline **O.18**, Et_3N , THF, $40\text{-}50\text{ }^\circ\text{C}$, 24 h (41-99 %).

8.4.2.2. BenzylethyleneAryl Ureas

The second family of compounds bears a propyl chain as a spacer. The synthetic route is similar to the one described above, varying only the formation of the aniline from which diarylureas of interest are obtained (see Schemes 8.6 and 8.7).



Scheme 8.6. Synthetic route to aniline **C.19**. Reagents and conditions: (a) PBr_3 , toluene, $110\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h (94 %); (b) PPh_3 , EtOH, $80\text{ }^\circ\text{C}$, 6 days (83 %); (c) **C.17**, K_2CO_3 , 18-crown-6, CH_2Cl_2 , $40\text{ }^\circ\text{C}$, 24 h (79 %); (d). H_2 , Pd/C, AcOEt, r.t., 18 h (78 %).



Scheme 8.7. Synthetic route to diarylurea derivatives. Reagents and conditions: (a) Phenyl chloroformate (**C.20**), pyridine, THF, $0\text{ }^\circ\text{C}$, 20 min, then r.t., 1 h. (71 %); (b) Aniline (**C.21-C.33**), triphosgene, Et_3N , THF, r.t., 1 h, then $55\text{ }^\circ\text{C}$, 5 h; then aniline **C.19**, Et_3N , THF, $40\text{-}50\text{ }^\circ\text{C}$, 24 h. (34-92 %).

8.4.3. Biological Evaluation

8.4.3.1. BenzylethoxyAryl Ureas

First, the results obtained for diarylureas family with an oxamethylene group as a linker will be detailed. This family consists of 14 compounds whose general structure can be seen in Scheme 8.5. These 14 compounds are formed by the carbamate **O.1** and a set of 13 benzylethoxyaryl ureas (**O.2-O.14**).

8.4.3.1.1. Cell viability

The ability of compounds **O.1-O.14** to inhibit cell viability was measured by MTT assay. For this assay, cell lines HT-29 and A-549 were used as

cancer lines and HEK-293 and HMEC-1 as healthy cell line to determine the selectivity of the compounds towards tumour cells. From the results shown in Table 6.1 (on page 103) it can be concluded that none of the derivatives showed any activity on the endothelial cell line HMEC-1, while most of the derivatives showed antiproliferative activity in the micromolar range against cancer cell lines HT-29 and A-549. Compounds **O.4** (*m*-F), **O.5** (*o*-F), **O.13** (*m*-OMe) and **O.14** (*o*-OMe) showed no effect on proliferative activity in either of the two cancer lines, while **O.7** (*m*-Cl) was active only in HT-29. Regarding IC₅₀ values obtained for HEK-293, only carbamate **O.1** and the *para*-substituted derivatives (**O.3**, **O.6**, **O.9** and **O.12**) showed values above 100 μM, while the rest have an inhibitory action in the micromolar range. In view of these results, compounds **O.1**, **O.3**, **O.6**, **O.9** and **O.12** were chosen for the calculation of the tumour selectivity index (SI) (see Table 8.2), which is determined by dividing the IC₅₀ value for the HEK-293 cell line by the IC₅₀ value obtained for the cancer cell line.

Table 8.2. Tumour selectivity indexes (SI) for carbamate and *p*-aryl urea derivatives.

Comp.	SI HT-29	SI A-549
	(IC ₅₀ HEK-293/IC ₅₀ HT-29)	(IC ₅₀ HEK-293/A-549)
Sorafenib	0.3	0.2
BMS-8	3	10
O.1	>15	>27
O.3	>18	>29
O.6	>8	>7
O.9	>9	>62
O.12	>50	>9

Derivatives **O.1**, **O.3**, **O.9** and **O.12** with the highest SI were chosen to carry out a more exhaustive study of their biological action. In addition, the working concentration was set at 20 μM.

8.4.3.1.2. Effect on PD-L1 and VEGFR-2 in tumour cells

The ability of the compounds to inhibit PD-L1 and VEGFR-2 was studied by flow cytometry. For this purpose, carbamate **O.1** and *p*-aryl ureas **O.3** (*p*-F), **O.9** (*p*-Br) and **O.12** (*p*-OMe) were incubated at a concentration of 20 μM in HT-29 and A-549 for 24 h. Besides, both membrane and total PD-L1 and VEGFR-2 were studied. Compounds did not show any effect on membrane inhibition so only the total effect results were depicted in Table 6.3 (on page

105) which, in general, shows that the compounds were more active against HT-29; showing only a very weak effect on A-549. Thus, as regards activity on HT-29, compound **O.9** (*p*-Br) stands out as the most active against both targets with inhibition ranges of around 60 % for both PD-L1 and VEGFR-2. Although the effect is smaller, the carbamate **O.1** shows inhibition ranges of 40 % and 60 % for PD-L1 and VEGFR-2 respectively and the *p*-fluoro derivative shows inhibition ranges of around 50 % for both proteins. Compound **O.12**, on the other hand, has no effect on the targets.

8.4.3.1.3. Effect on microvessels formation in Matrigel®

The ability of the compounds to inhibit the formation of new blood vessels was measured in HMEC-1 seeded on Matrigel®. This study was carried out on carbamate **O.1** and *p*-aryl urea **O.9** at different concentrations in order to determine the minimum concentration at which they showed activity, which was 20 μ M for both compounds as it can be seen in Figure 8.7.

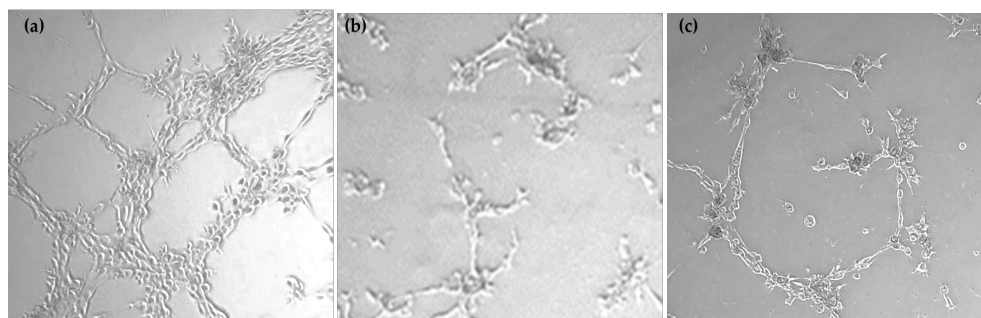


Figure 8.7. Effect on microtube formation: (a) Control; (b) **O.1** at 20 μ M; (c) **O.9** at 20 μ M ($\times 20$ Mag.).

On the other hand, the antivasular capacity of these two derivatives was evaluated, again at different concentrations, after incubating the compounds for 24 h after microtubule formation. From this assay, it was observed that whereas compound **O.9** (*p*-Br) showed no antivasular effect, carbamate **O.1** showed antivasular activity to a minimum concentration of 5 μ M, as it can be seen in Figure 8.8.

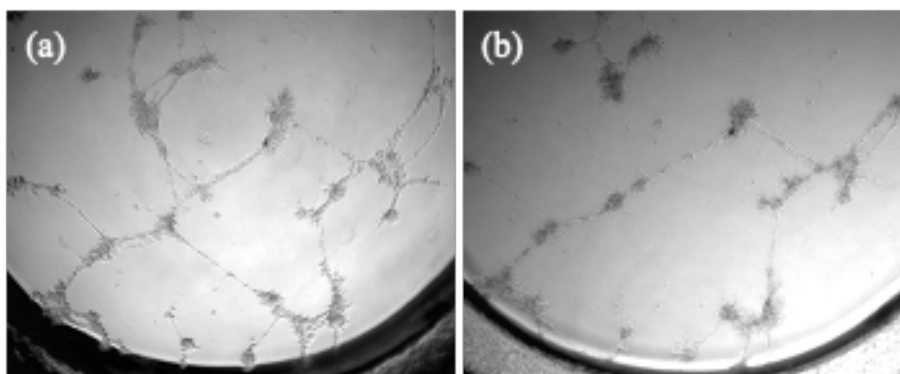


Figure 8.8. Effect on microtubule destruction (a) Control; (b) **O.1** at 5 μM ($\times 20$ Mag).

8.4.3.1.4. Cell viability in co-culture

The action of compounds on HT-29 cell viability in co-culture with THP-1 was performed at two incubation times, 24 and 48 h, and with two ratios of HT-29/THP-1, one with an excess of defensive cells and the other with a more accurate simulation of the situation in the TME (1:5 and 2:1 respectively). Compounds were in general, more active after 24 h of treatment, however, the effect was very mild (see Table 6.6 on page 109).

The effect on the targets was also studied under the same conditions as the viability study, but we found a mild effect on VEGFR-2 and no effect on PD-L1.

8.4.3.1.5. Study of the effect on OT-I T cells

To find out how the compounds affected CD8⁺ cells, we studied by flow cytometry the effect on immune receptors LAG-3, TIM-3, PD-1, CD69 and OX40 on the surface of exhausted T cells. The results obtained are shown in Figure 8.9 as percentages of free protein relative to cells treated with DMSO as a negative control, after incubation of OT-I for 24 h with compounds at 20 μM .

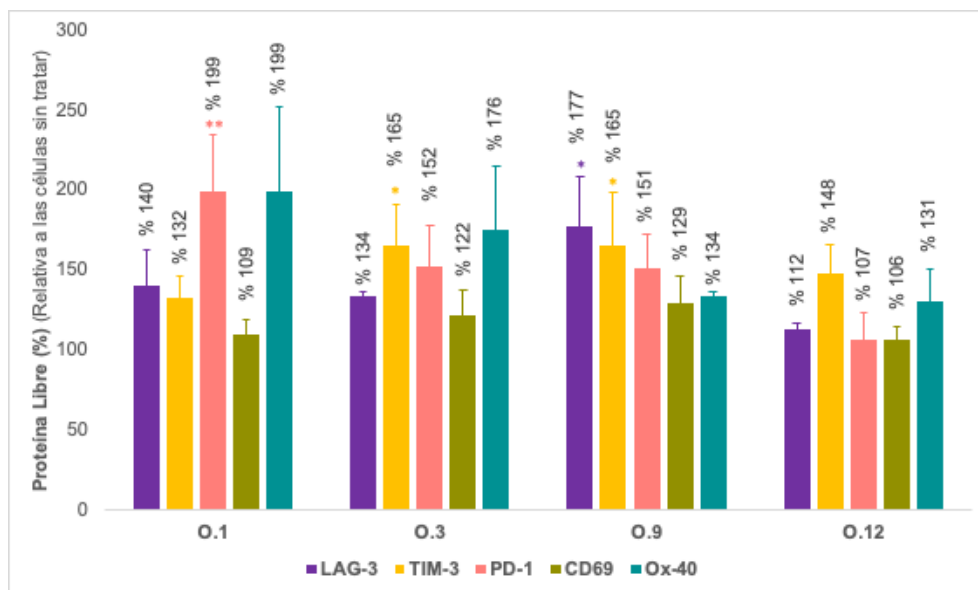


Figure 8.9. Effect on CD8+ membrane immunoreceptors.

Interestingly, three of the four compounds studied promote the expression of some of the co-stimulation and co-inhibitor receptors for the activation of these cells. This may imply an acquired activation state in response to the stimulation produced by these derivatives.

Finally, we also studied by Western blot technique the effect of the selected compounds on the signalling pathway activated by TCR.

In view of the results shown in Figure 8.10, we can conclude that none of the compounds had any effect on FYN, although an opposite result is obtained for the action against LCK and its phosphorylated forms, in which it can be seen that, in general, all the compounds studied increase their response. Regarding the proteins involved in the next steps of the signalling cascade, we see that all the compounds significantly decrease the expression of ZAP70 with respect to control, with inhibition ranges between 50 and 60 %. In addition, they have a more moderate effect on the inhibition of its phosphorylated form, with inhibition ranges of 20-30 %. Finally, the effect on LAT is contrary to that previously seen on ZAP70, with a moderate effect on LAT expression in contrast to the almost complete inhibition of the phosphorylated LAT protein.

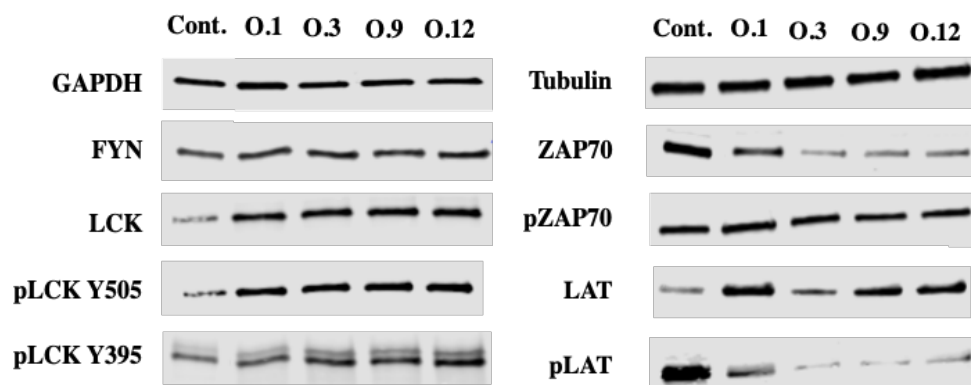


Figure 8.10. Western blot expression of proteins involved in the OT-I signalling cascade.

8.4.3.2. BenzylethyleneAryl Ureas

Finally, the results obtained for the second family of diarylureas with a propyl group as a linker will be detailed. This family consists, as the previous ones, of fourteen compounds whose general structure can be seen in Scheme 8.7 and includes the carbamate **C.1** and a set of thirteen benzylethylenaryl ureas (**C.2-C.14**).

8.4.3.2.1. Cell viability

The ability to inhibit cell viability of compounds **C.1-C.14** was measured by MTT assay, from which IC_{50} parameter was obtained. This assay was carried out for 48 h incubation in HT-29 and A-549 as cancer lines and HEK-293 and HMEC-1 as healthy cell lines to determine the therapeutic margin. Table 6.8 (on page 118) shows the IC_{50} values for the compounds and the reference compounds sorafenib and BMS-8. In order to check the safety margin, the tumour selectivity index (SI) was determined as the ratio of the IC_{50} value for the HEK-293 cell line to the IC_{50} value obtained for the cancer cell line, HT-29 and A-549 (see Table 8.3).

Table 8.3 shows that most of the compounds tested had a very low selectivity margin (SI close to or below 1). Thus, those compounds that had no effect on cell viability in any of the lines studied were chosen. These compounds were the carbamate **C.1**, and the benzylethyleneAryl ureas **C.3** (*p*-F), **C.12** (*p*-OMe) and **C.14** (*o*-Ome) (highlighted in Table 8.3).

Table 8.3. Tumour selectivity indices (SI) for carbamate and benzylethylenaryl urea derivatives.

Comp.	SI HT-29	SI A-549
	(IC ₅₀ HEK293/IC ₅₀ HT-29)	(IC ₅₀ HEK293/ IC ₅₀ A-549)
Sorafenib	0.3	0.2
BMS-8	3	10
C.1	No effect	No effect
C.2	0.5	< 2
C.3	No effect	No effect
C.4	< 0,2	< 0,2
C.5	2,0	0,8
C.6	1,0	0.2
C.7	1,0	1.2
C.8	0.8	< 0,4
C.9	1,1	1,2
C.10	0,8	1,1
C.11	1,8	1,3
C.12	No effect	83
C.13	1,9	0,8
C.14	No effect	No effect

8.4.3.2.2. Effect on PD-L1 and VEGFR-2 in tumour cells

The ability of selected compounds **C.1**, **C.3**, **C.12** and **C.14** to inhibit PD-L1 and VEGFR-2 was studied by flow cytometry in HT-29. For this test, the selected compounds were incubated in HT-29 for 24 h at two different concentrations, 20 and 100 μ M to test the dose/effect correlation. The ability to inhibit, both total and membrane, PD-L1 and VEGFR-2 were measured. However, the compounds showed no significant effect on membrane targets. In that sense, regarding total PD-L1 and VEGFR-2, it can be concluded that the effect of the compounds on both targets does not depend on the dose administered due to these compounds are more active at lower doses. The **C.12** (*p*-OMe) derivative is the most active as a dual inhibitor showing an inhibition range of 75 % on both proteins at a concentration of 20 μ M. Carbamate **C.1** and *p*-fluorophenyl urea **C.3** showed inhibition ranges of 30 and 45 % for PD-L1 and VEGFR-2, respectively. Finally, **C.14** (*o*-OMe) surprisingly shows dose-dependent activity against VEGFR-2 being able to

inhibit 65 % of this protein at 100 μM while against PD-L1 it follows the trend of the rest of the analogues, being able to inhibit this protein by half only at low concentrations (20 μM).

8.4.3.2.3. Effect on microvessels formation in Matrigel®

The ability of the selected compounds to inhibit the formation of new blood vessels was measured using the HMEC-1 endothelial cell line on Matrigel®. This study was carried out at different concentrations to determine the minimum inhibitory concentration.

As can be seen in Table 8.4, carbamate **C.1** is the most active among the derivatives studied inhibiting microtubule formation in HMEC-1 up to a concentration of 5 μM , thereby enhancing the activity of sorafenib. The ureas **C.3** (*p*-F) and **C.12** (*p*-OMe), showed a more moderate activity with minimum activity concentrations of 50 and 20 μM respectively, while **C.14** (*o*-OMe) did not show any antiangiogenic activity. Again, it can be concluded that the results obtained correlate with the results obtained for VEGFR-2 inhibition shown in Table 6.10 (on page 121).

Table 8.4. Minimum active concentration for microtubule formation.

Comp.	Minimum Active Conc. (μM)
Sunitinib	3
Sorafenib	10
C.1	5
C.3	50
C.12	20
C.14	>100

The antivasular capacity of the selected compounds was also measured using Matrigel® after 24 h of incubation of the compounds at concentrations between 20 and 100 μM . Only carbamate **C.1** showed activity and it was able to destroy the microtubule formation at concentrations higher than 50 μM , as can be seen in Figure 8.11.

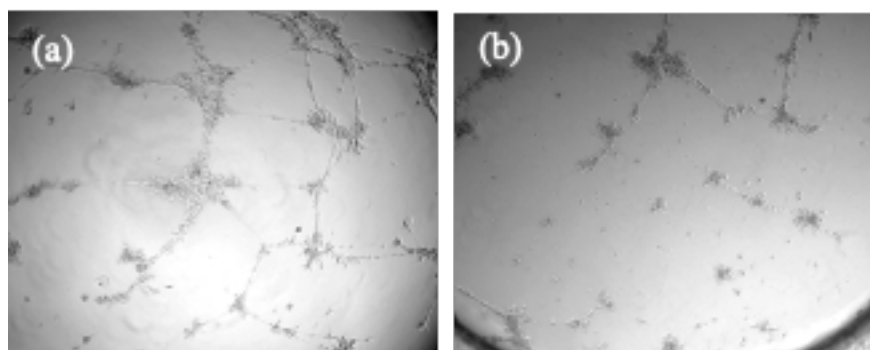


Figure 8.11. Effect on microtubule destruction (a) Control; (b) **C.1** at 50 μM ($\times 20$ Mag.).

8.4.3.2.4. Cell viability in co-culture

The action on HT-29 viability was also measured in co-culture with the monocytic cell line THP-1. The study was performed at two incubation times 24 and 48 h and at 1:5 and 2:1 ratios of HT-29/THP-1 with the selected compounds at a concentration of 100 μM . Table 8.5 shows that compounds are most active after 48 h of incubation irrespective of the cell ratio used. Carbamate **C.1** and diarylurea **C.3** (*p*-F) showed the highest activity with inhibition ranges of 45-50 % in both conditions after 48 h of incubation. **C.12** (*p*-OMe) showed 40 % inhibition after 48 h of incubation at a 1:5 HT-29:THP-1 ratio while **C.14** (*o*-OMe) showed more activity at a 2:1 HT-29:THP-1 ratio.

Table 8.5. Effect on cell viability of HT-29 in co-culture with THP-1.

Comp.	1:5 HT-29:THP-1		2:1 HT-29:THP-1	
	24h	48h	24h	48h
Control	100	100	100	100
BMS-8	11 \pm 6	21 \pm 3	8 \pm 12*	16 \pm 2*
C.1	48 \pm 8	52 \pm 3	70 \pm 8	66 \pm 8
C.3	78 \pm 8	64 \pm 3	67 \pm 9	57 \pm 5
C.12	84 \pm 2	67 \pm 11	93 \pm 8	89 \pm 10
C.14	64 \pm 14	68 \pm 8	82 \pm 7	58 \pm 5

A study of the THP-1 cells was also performed to see the effect of the compound in membrane proteins CD80 and CD11b. Results achieved on CD80 and CD11b in THP-1 incubated for 24 h at a 1:5 HT-29:THP-1 ratio are depicted in Figure 8.12.

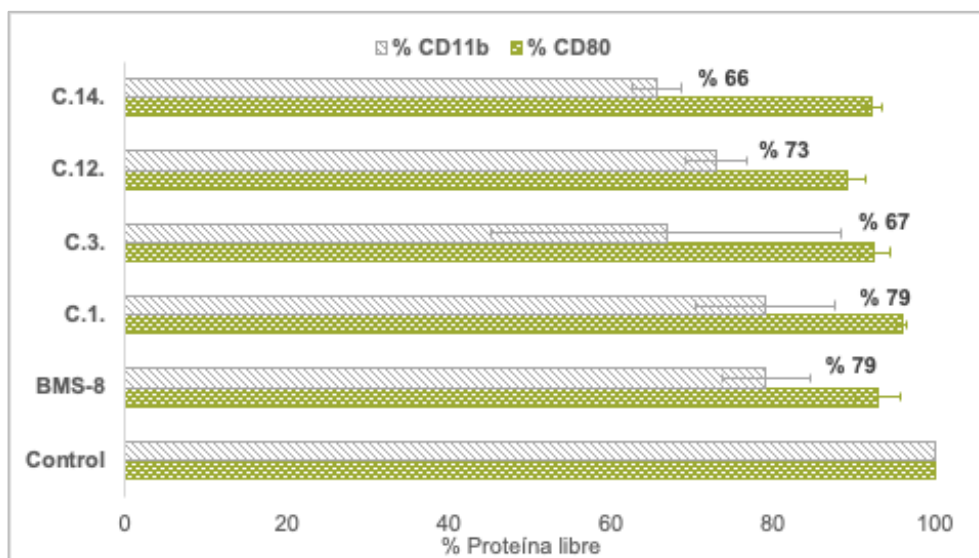


Figure 8.12. Effect on membrane CD80 and CD11b in THP-1 cells co-cultured with HT-29 for 24 h in a 1:5 ratio.

Results in Figure 8.12 show that derivatives do not considerably affect CD80, although they do have greater activity on CD11b, showing results that sometimes improve those obtained for the reference compound. In this regard, **C.3** (*p*-F) and **C.14** (*o*-OMe) stand out with an inhibition range of 35 %.

Finally, to determine whether the effect of the compounds on cancer cell viability and on biological targets, in co-culture with defensive cells, was dependent on the dose administered, we decided to carry out the study again but with 20 μ M compound doses, as this was the most active concentration inhibiting the biological targets of interest (see table 6.10 on page 121). For this study, HT-29 cancer cells were co-cultured with the monocytic THP-1 cell line for 24 h at a 1:5 ratio. The study was performed on both cancer cells and defence cells. Results depicted in Table 6.13 (on page 129) show that the compounds have a very moderate effect, or no effect at all, on the cell viability of both lines and on the proteins studied. Only carbamate **C.1** stands out as being able to reduce HT-29 cell viability by 40 %. In that sense, this compound was selected to complete the study of the different conditions previously studied at 100 μ M. Results depicted in Figure 8.13 show that the action of **C.1** on cell viability is dose-dependent when the co-culture is in a 1:5 HT-29:THP-1 ratio, giving better activity at 100 μ M. However, in an inverted ratio, 2:1 HT-29:THP-1, the activity is practically the same regardless of the dose and at both incubation times.

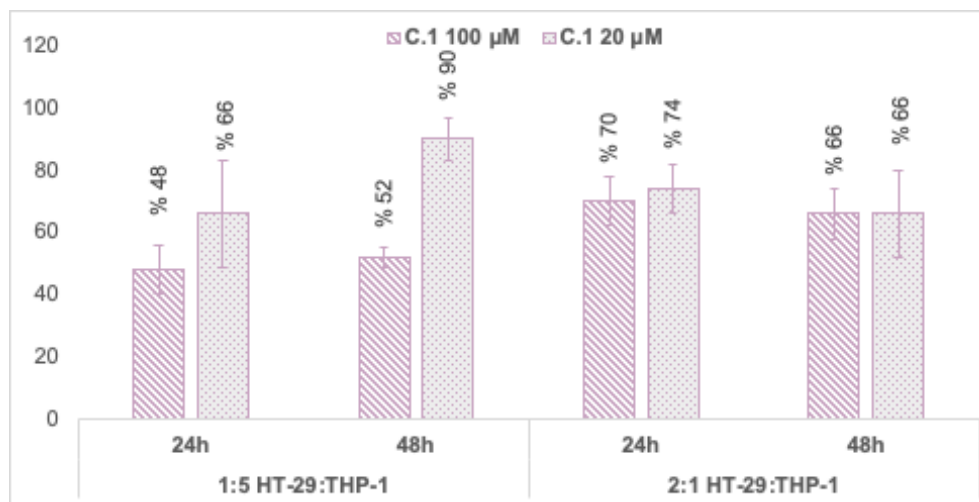


Figure 8.13. Comparison of cell viability of HT-29 treated in co-culture with carbamate C.1 at two concentrations.

8.4.4. Discussion

Once the oxamethylene-bridged and propyl-bridged diarylureas have been evaluated, their action is compared to determine the most active compound. Firstly, in terms of their ability to inhibit cell proliferation, the benzylethoxyaryl derivatives **O.1**, **O.3**, **O.9** and **O.12** stand out as having tumour selectivity indices greater than 10 and the benzylethylenaryl derivatives **C.1**, **C.3**, **C.12** and **C.14** as having no effect on cell viability. Thus, these were the derivatives that were studied in more detail. Figure 8.14 shows the inhibition ratio of both targets of interest, total VEGFR-2 and PD-L1 for each of the derivatives applied at doses of 20 μM. Thus, we can see that the compounds with the greatest dual inhibition are **O.9** (p-Br) and **C.12** (p-OMe), with the latter standing out notably.

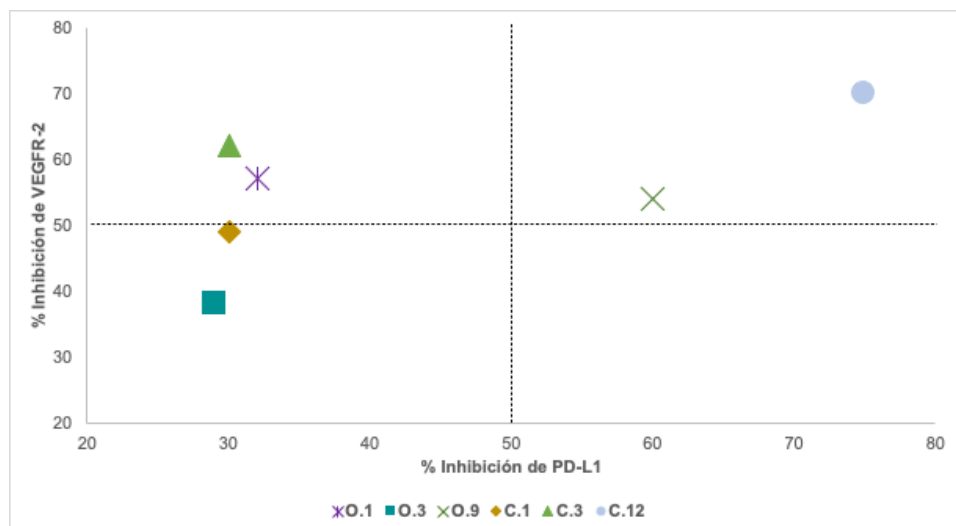


Figure 8.14. Relationship between inhibition of both targets, VEGFR-2 and PD-L1 for each of the diarylureas.

On the other hand, comparing the antiangiogenic capacity of these compounds, the benzyloxyethyl carbamate **C.1** stands out being able to inhibit the formation of microtubules up to a concentration of 5 μM , improving the action of sorafenib. This is followed by the benzyloxyaryl derivatives **O.1** and **O.9** as well as the derivative **C.12** which show anti-angiogenic activity up to a minimum concentration of 20 μM . In terms of antivasular activity, the benzyloxyaryl carbamate **O.1** stands out with a minimum concentration capable of destroying microtubules at 5 μM . Of the rest, only carbamate **C.1** has moderate antivasular activity up to a concentration of 50 μM (see the structure of these derivatives in Figure 8.15).

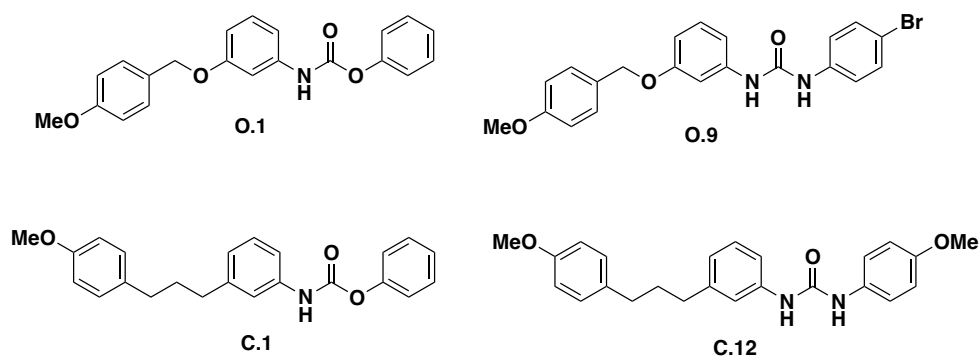


Figure 8.15. The general structure of diarylurea derivatives.

Regarding the co-culture study of HT-29 with THP-1, the following conclusions can be drawn:

□ All benzyloxyaryl derivatives show moderate activity on HT-29 cell viability in co-culture, being higher after 24 h of incubation in a 1:5 HT-29:THP-1 ratio at a concentration of 20 μ M.

□ All benzylethylenaryl derivatives show increased activity on HT-29 cell viability in co-culture with THP-1 after 48 h of incubation, independently of the HT-29/THP-1 ratio studied, with **C.1** carbamate and **C.3** (*p*-F) urea being the most active with inhibition ranges of 45-50 % at a dose of 100 μ M.

□ Only carbamate **C.1** showed a 40 % inhibition of cell viability after 24 h incubation and at a 1:5 ratio at 20 μ M. This makes this compound stand out from the benzyloxyaryl derivatives in terms of its effect on cell viability in co-culture.

□ Regarding the effect on THP-1 membrane protein, CD11b, the benzyloxyaryl carbamate **O.1**, with an inhibition range of 30 % at 20 μ M after 24 h of incubation at a 1:5 ratio and the benzylethylenaryl ureas **C.3** and **C.12** that inhibit this protein by 35 % at 100 μ M under the same conditions, should be highlighted.

Finally, from the study of the effect on CD8⁺ of the selected benzylethyloxyaryl derivatives, it can be concluded that they promote a state of activation of OT-I by favouring the overexpression of both immunostimulatory and immunoinhibitory receptors. This is further corroborated by studying the effect on the TCR signalling cascade.

8.5. General Conclusions

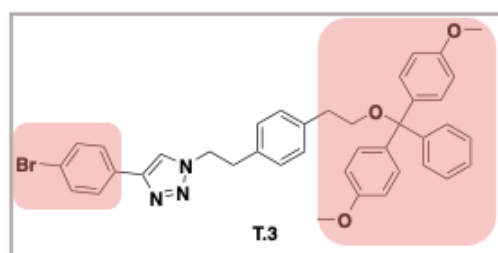
As a final discussion of the results obtained in this thesis, it can be concluded that in general, the established objectives have been achieved, having found new compounds with promising oncoimmunomodulatory activity through the inhibition of the proposed targets of interest, PD-L1, c-Myc and VEGFR-2.

A first family of fourteen compounds has been designed in which a structure based on a triazole ring has been proposed with modifications to the left and right that have conferred different characteristics to the molecule, which have seen will define their activity. In general, from these comparative analyses, we can assume that our compounds and, in particular, the more lipophilic bromo-derivatives **T.3**, **T.5** and **T.7** are capable of regulating not only the total expression of PD-L1 but also that of c-Myc, and, furthermore, their

action influences the behaviour of defensive cells against cancer cells, especially in the breast cancer line MCF-7, which has emerged as the most sensitive line to these compounds.

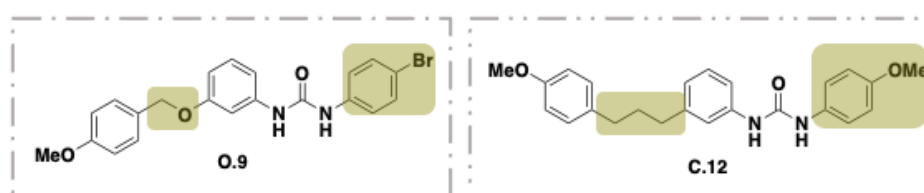
With all the biological studies we have carried out on triazole-type derivatives, we have come to the conclusion that the presence of a hydrophobic and bulky group at one end of the molecule and an electron-acceptor group at the other side, are the optimal combination for the development of agents with a potential oncoimmunomodulatory effect, probably because this combination favoured the entry into the cell.

Among the triazole-type derivatives, compound **T.3** stands out, as it combines the best results in most of the biological actions studied. At non-toxic doses, it is able to inhibit by more than half the proliferation of tumour cells, MCF-7, when cultured in the presence of defensive T cells, Jurkat T, or monocytes, THP-1. In addition, it inhibits the presence of PD-L1 and c-Myc in tumour cells even at low doses, 10 μ M, clarifying that its activity is not dose-dependent, and it is able to inhibit the expression of PD-L1 and c-Myc genes by more than 20 %.

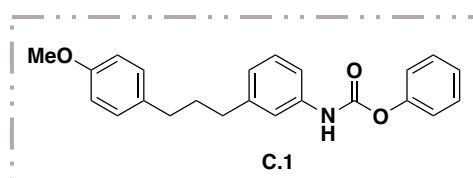


On the other hand, the second family designed has 28 compounds and is based on diarylurea derivatives separated in two groups according to the linker structure between the main functionality and the p-methoxyphenyl part, the first one containing an oxamethylene bridge and the second one a propyl bridge that provides a greater separation and conformational freedom to the molecule. In reference to the study on cell monocultures, most of the benzylethyloxyaryl derivatives are able to inhibit cell proliferation at concentrations in the low micromolar range and with high selectivity towards cancer cells, while the benzylethylenaryl derivatives, in general, do not affect cell proliferation. Thus, the presence of oxygen and the shorter distance between the aromatic ring and the diarylurea rings improves the cytotoxic action of this type of compounds.

Regarding the action against the targets, VEGFR-2 and PD-L1, the fact that their effect is greater on the corresponding total protein than on the surface protein may be due to the fact that, in general, the compounds easily enter into the cell due to their lipophilicity. Compounds **O.9** and **C.12** stand out as the most active, being the latter one the most active. Thus, the presence of an electron-attracting group at the diarylurea end enhances the biological activity against the targets in the benzylethyloxyaryl-type derivatives, whereas, in the case of the benzylethylenaryl-type ureas, it is the presence of an electron-detrilling group in the urea part that leads to greater activity.



The colon cancer line, HT-29, is the most sensitive line to the action of these compounds, and from the study of the effect on the viability of this line in co-culture, it is the benzylethylenaryl derivatives which show the greatest activity, especially carbamate **C.1**, which at doses in the low micromolar range is capable of inhibiting the proliferation of cancer cells by more than 50 % in the presence of defensive cells.



In view of these results, we can deduce that a greater distance between the diarylurea and the aromatic ring at the end of the molecule enhances the effect of the compounds in terms of their modulating action on the immune system against tumour proliferation.

Finally, as a general conclusion to this Thesis, it must be said that after the *in vitro* evaluation it can be concluded that some of the synthesised compounds show a promising anticancer activity that opens the possibility to study their *in vivo* action.

9. EXPERIMENTAL PROCEDURE

9. EXPERIMENTAL PROCEDURE

9.1. Chemistry Part

9.1.1. General Techniques

NMR spectra have been registered in a Varian Unity 400 MHz spectrometer (approximated operating frequency, 400 MHz for ^1H and 100 MHz for ^{13}C). The nature of carbon signals (C, CH, CH_2 , CH_3) has been determined by using the APT technique. The spectrum signals have been allocated using the bidimensional heteronuclear correlations (COSY and HSQC). Spectra have been measured in MeOH- d_4 , CDCl_3 or $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ solution. Chemical shifts (δ) are indicated in ppm using the residual signals of the solvents as a reference. Spectra measured in MeOH- d_4 the reference are for ^1H , $\delta = 3.31$ ppm and for ^{13}C , $\delta = 49.0$ ppm. In the case of spectra measured in CDCl_3 , the reference is $\delta = 7.27$ ppm, for ^1H , and $\delta = 77.0$ ppm, for ^{13}C . And finally, for spectra measured in $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$ solution, the references are $\delta = 2.50$ ppm for ^1H and $\delta = 39.5$ ppm for ^{13}C .

As regards ^1H -NMR multiplicity, "s" has been used when there is a singlet, "d" when there is a doublet, "t" when there is a triplet, "q" when there is a quadruplet, "m" when there is a multiplet.

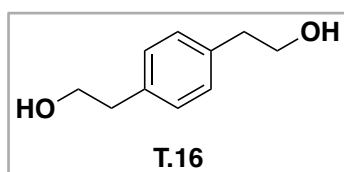
For thin-layer chromatography, silica gel plates of Merck 5554 have been used.

Commercially available reagents have been used directly from commercial suppliers such as Aldrich, Acros or Scharlab without any previous treatment.

9.1.2. Experimental procedure for the synthesis of triazole derivatives

9.1.2.1. Synthesis of 2,2'-(1,4-phenylene)bis(ethan-1-ol), T.16

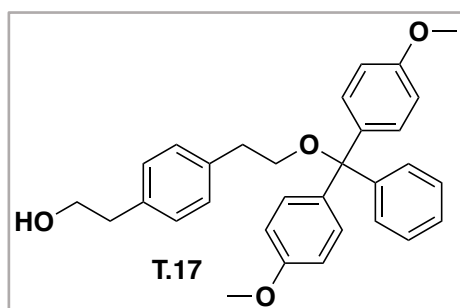
A solution of 2,2'-(1,4-phenylene)diacetic acid **T.15** (1 eq) in anhydrous THF (20 mL) was cooled at 0 °C, and $\text{BH}_3 \cdot \text{SMe}_2$ (3 eq) was added dropwise under nitrogen atmosphere. The mixture was warmed up to room temperature and stirred for 12 h. Then, aqueous HCl 1 M solution was added to the solution, and the organic phase was extracted with AcOEt (3 x 50 mL). The collected organic phases were dried with anhydrous MgSO_4 . After filtration and evaporation of the solvent, compound **T.16** (97%) was obtained.



2,2'-(1,4-phenylene)bis(ethan-1-ol), T.16: Yield 97 %; white solid; m.p. 75.5-82.0 °C; ^1H NMR (400 MHz, MeOH_{d4}) δ 7.14 (s, 4H), 4.77 (s, 2H), 3.72 (t, $J=7.1$ Hz, 4H), 2.78 (t, $J=7.1$ Hz, 4H); ^{13}C NMR (100 MHz, MeOH_{d4}) δ 138.1 (2xC), 129.9 (2xCH), 64.3 (2xCH₂), 39.8 (2xCH₂).

9.1.2.2. Synthesis of 2-(4-(2-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)ethyl)phenyl)ethan-1-ol, T.17

Et_3N (0.3 mL/mmol) and DMAP (0.05 eq) were added to a solution of compound **T.16** (1.1 eq) in anhydrous CH_2Cl_2 (2.5 mL/mmol of **T.16**). Then, a solution of 4,4'-dimethoxytrityl chloride (1 eq) in anhydrous CH_2Cl_2 (1 mL/mmol) was added dropwise with a syringe pump. The resulting mixture was stirred at room temperature under a nitrogen atmosphere for 22 h. Then, the mixture was poured into brine and washed with brine (x3). The organic phase was dried with anhydrous MgSO_4 . After filtration and evaporation of the solvent, the residue was purified by column chromatography on silica gel as the stationary phase and a mixture of Hexanes:AcOEt (4:6, 1 % Et_3N) as the eluent to afford compound **T.17** (35 %).

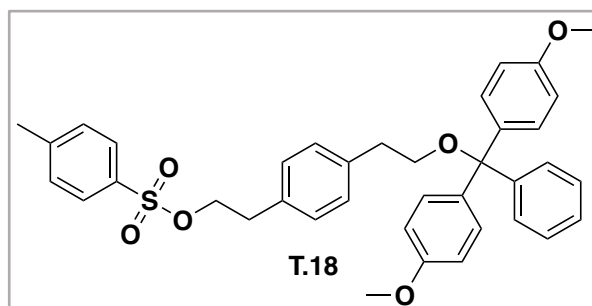


2-(4-(2-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)ethyl)phenyl)ethan-1-ol, T.17: Yield 35 %; Yellow oil; ^1H NMR (400 MHz, DMSO_{d6}) δ 7.30-7.07 (m, 13H), 6.85 (d, $J=8.9$ Hz, 4H), 4.58 (t, $J=5.2$ Hz, 1H), 3.72 (s, 6H), 3.57 (c, $J=7.1$ Hz, 2H), 3.10 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 2.78 (t, $J=6.8$ Hz, 2H), 2.67 (t, $J=7.1$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO_{d6}) δ 157.93 (2xC), 145.02 (C), 137.13 (C), 136.55 (C), 135.86 (2xC), 129.53 (4xCH), 128.74 (2xCH), 128.64

(2xCH), 127.70 (2xCH), 127.60 (2xCH), 126.51 (CH), 113.07 (4xCH), 85.37 (C), 64.65 (CH₂), 62.25 (2xCH₂), 54.96 (2xCH₃), 35.51 (CH₂).

9.1.2.3. Synthesis of 4-(2-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)ethyl)phenethyl 4-methylbenzenesulfonate, T.18

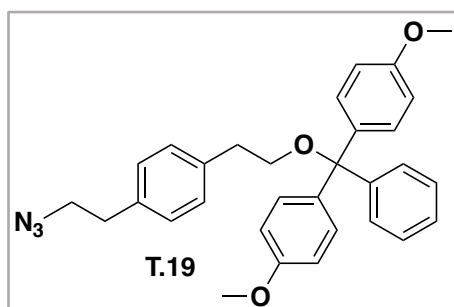
DMAP and Et₃N (1.3 eq) were added to a solution of compound **T.17** (1 eq) in CH₂Cl₂ (5 mL/mmol). Then, TsCl (1.1 eq) was added dropwise and the mixture was stirred for 4 h at room temperature and under a nitrogen atmosphere. Then, the mixture was poured into a saturated aqueous solution of NH₄Cl and extracted with CH₂Cl₂ (x3). The collected organic phases were dried over anhydrous MgSO₄. After filtration and evaporation of the solvent, the residue was purified by column chromatography on silica gel as the stationary phase and a mixture of Hexanes:AcOEt (9:1, 8:2) as the eluent, affording compound **T.18** (62 %).



4-(2-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)ethyl)phenethyl-4-methylbenzenesulfonate, T.18: Yield 62 %; uncoloured oil; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 7.65 (d, J=8.3 Hz, 2H), 7.35 (d, J=7.9 Hz, 2H), 7.30-7.15 (m, 9H), 7.06 (d, J=8.9 Hz, 4H), 6.84 (d, J=9.0 Hz, 4H), 4.20 (t, J=6.5 Hz, 2H), 3.72 (s, 6H), 3.12 (t, J= 6.7 Hz, 2H), 2.85 (t, J=6.5 Hz, 2H), 2.78 (t, J=6.6 Hz, 2H), 2.36 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 158.49 (2xC), 145.51 (C), 145.28 (C), 137.94 (C), 136.36 (2xC), 134.92 (C), 132.73 (C), 130.50 (2xCH), 130.04 (4xCH), 129.46 (2xCH), 129.06 (2xCH), 128.27 (2xCH), 128.13 (2xCH), 127.92 (2xCH), 127.08 (CH), 113.57 (4xCH), 85.93 (C), 71.59 (CH₂), 64.92 (CH₂), 54.47 (2xCH₃), 36.01 (CH₂), 34.43 (CH₂), 21.48 (CH₃).

9.1.2.4. Synthesis of 4,4'-((4-(2-azidoethyl)phenethoxy)(phenyl)methylene-bis(methoxybenzene), T.19

NaN₃ (2 eq) was added to a solution of compound **T.18** (1 eq) in DMF (2.6 mL/mmol). The mixture was stirred for 3 h at 50 °C and under a nitrogen atmosphere. Then, AcOEt was added, and the mixture was washed with brine (x3). The organic phase was dried over anhydrous MgSO₄. After filtration and evaporation of the solvent, the residue was purified by column chromatography on silica gel as the stationary phase and a mixture of Hexanes:AcOEt (9:1, 8:2) as the eluent, affording compound **T.19** (83 %).



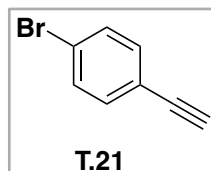
4,4'-((4-(2-azidoethyl)phenethoxy)(phenyl)methylene)bis(methoxybenzene), T.19:

Yield 83 %; uncoloured oil; ¹H NMR (400 MHz, DMSO_{d6}) δ 7.32-7.20 (m, 13H), 6.83 (d, J=8.9 Hz, 4H), 3.72 (s, 6H), 3.54 (t, J=7.0 Hz, 2H), 3.12 (t, J=6.7 Hz, 2H), 2.80 (m, 4H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO_{d6}) δ 158.0 (2xC), 145.1 (C), 137.1 (C), 136.0 (C), 135.8 (2xC), 129.5 (4xCH), 129.0 (2xCH), 128.4 (2xCH), 127.6 (4xCH), 126.4 (CH), 113.1 (4xCH), 85.2 (C), 64.6 (CH₂), 55.0 (CH₂), 51.5 (2xCH₃), 35.5 (CH₂), 33.9 (CH₂); IR ν_{max} (cm⁻¹) 2100 (N₃), 1220 (=C-O-C), 1150 (C-O-C).

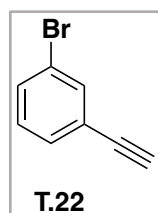
9.1.2.5. Synthesis of the non-commercially available alkynes, T.21-T.26

Kristensen's modification of the Ohira–Bestmann reaction was used for the synthesis of alkynes.¹¹⁰ Thus, dimethyl-2-oxopropylphosphonate (1.2 eq) was added dropwise to a suspension of K₂CO₃ (4.5 eq) and 4-acetamidobenzenesulfonyl azide (ABSA) (1.3 eq) in MeCN (10 mL/mmol). The colourless suspension was stirred at room temperature for 2 h. Then, a solution of the corresponding aldehyde (1 eq) in MeOH (10 mL/mmol) was added to the now pale-yellow suspension and stirred at room temperature under a nitrogen atmosphere for 15 h. Finally, the reaction mixture was

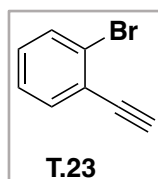
filtered over celite, and the filter was thoroughly washed with diethyl ether (x3). After filtration and evaporation of the solvent, the residue was purified by column chromatography on silica gel as the stationary phase and Hexanes as the eluent, affording alkynes **T.21–T.26**.



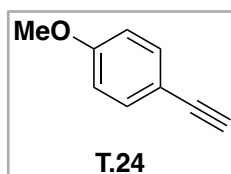
1-bromo-4-ethynylbenzene, T.21: Yield 42 %; white solid; m.p. 74.5-75.0 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.59 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 7.43 (d, $J=8.5$ Hz, 2H), 4.29 (s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6); δ 133.60 (2xCH), 131.71 (2xCH), 122.38 (C), 120.92 (C), 82.34 (C), 82.06 (CH).



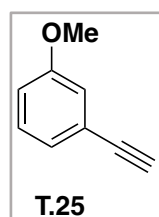
1-bromo-3-ethynylbenzene, T.22: Yield 53 %; uncoloured liquid; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.68 (s, $J=6.1$ Hz, 1H), 7.63 (d, $J=7.7$ Hz, 1H), 7.49 (dt, $J=7.9$ Hz, $J=1.2$ Hz, 1H), 7.35 (t, $J=7.9$ Hz, 1H), 4.32 (s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6); δ 133.90 (CH), 132.01 (CH), 130.76 (CH), 130.72 (CH), 123.90 (C), 121.56 (C), 82.29 (C), 81.77 (CH).



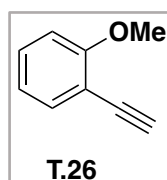
1-bromo-2-ethynylbenzene, T.23: Yield 67 %; uncoloured liquid; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ 7.71 (dd, $J=7.9$ Hz, $J=1.2$ Hz, 1H), 7.60 (dd, $J=7.6$ Hz, $J=1.8$ Hz, 1H), 7.41 (dt, $J=7.5$ Hz, $J=1.3$ Hz, 1H), 7.35 (dt, $J=7.7$ Hz, $J=1.8$ Hz, 1H), 4.55 (s, 1H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO-d_6); δ 133.98 (CH), 132.42 (CH), 130.65 (CH), 127.75 (CH), 124.69 (C), 123.59 (C), 85.36 (C), 81.71 (CH).



1-ethynyl-4-methoxybenzene, T.24: Yield 40 %; white solid; uncoloured liquid; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO_{d6}) δ 7.41 (d, $J=8.9$ Hz, 2H), 6.93 (d, $J=8.9$ Hz, 2H), 3.99 (s, 1H), 3.77 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO_{d6}) δ 159.57 (C), 133.17 (2xCH), 114.25 (2xCH), 113.64 (C), 83.48 (C), 79.08 (CH), 55.21 (CH_3); IR ν_{max} (cm^{-1}) 1220 (=C-O-C).



1-ethynyl-3-methoxybenzene, T.25: Yield 57 %; uncoloured liquid; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO_{d6}) δ 7.29 (t, $J=7.9$ Hz, 1H), 7.05 (dt, $J=7.5$ Hz, $J=1.1$ Hz, 1H), 7.00-6.95 (m, 2H), 4.15 (s, 1H), 3.76 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO_{d6}) δ 159.09 (C), 129.81 (CH), 124.00 (CH), 122.76 (C), 116.53 (CH), 115.35 (CH), 83.35 (C), 79.52 (CH), 55.18 (CH_3); IR ν_{max} (cm^{-1}) 1250 (=C-O-C).

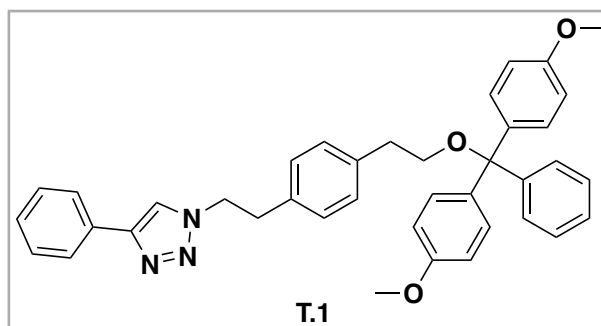


1-ethynyl-2-methoxybenzene, T.26: Yield 52 %; white solid; uncoloured liquid; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO_{d6}) δ 7.40 (dt, $J=7.5$ Hz, $J=2.1$ Hz, 1H), 7.36 (dd, $J=7.1$ Hz, $J=1.3$ Hz, 1H), 7.05 (d, $J=8.1$ Hz, 1H), 6.93 (dt, $J=7.5$ Hz, $J=1.0$ Hz, 1H), 4.20 (s, 1H), 3.81 (s, 3H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, DMSO_{d6}) δ 160.21 (C), 133.44 (CH), 130.42 (CH), 120.34 (CH), 111.29 (CH), 110.69 (C), 84.36 (C), 80.13 (CH), 55.51 (CH_3); IR ν_{max} (cm^{-1}) 1250 (=C-O-C).

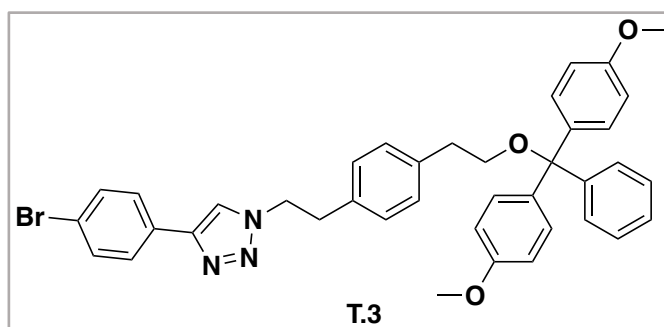
9.1.2.6. Synthesis of triazole derivatives T.1, T.3, T.5, T.7, T.9, T.11, and T.13

Compound **T.19** (1 eq) and the corresponding alkyne (**T.20–T.26**) (1.2 eq) were dissolved in DMF, and on the other hand $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.1 eq) and

ascorbic acid sodium salt (0.1 eq) were dissolved in water, so that the DMF/H₂O ratio was 9:1, respectively (20 mL/mmol). The water solution was added dropwise over the DMF solution, and the resulting mixture was stirred at 60 °C under a nitrogen atmosphere for 2 h. Then, AcOEt was added to the mixture and washed with brine (x3). The organic phase was dried over anhydrous MgSO₄. After filtration and evaporation of the solvent, the residue was purified by column chromatography on silica gel as the stationary phase and a mixture of Hexanes:AcOEt (8:2, 7:3, 1.1, 3:4) as the eluent, affording compounds **T.1**, **T.3**, **T.5**, **T.7**, **T.9**, **T.11**, and **T.13**.

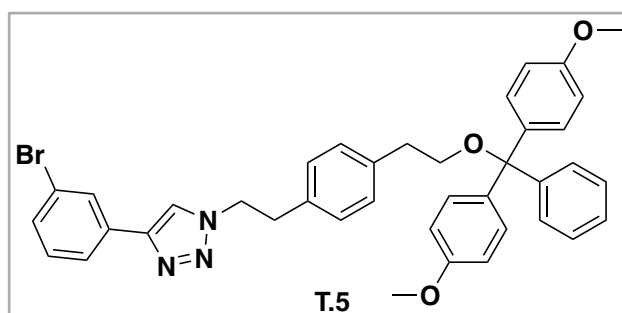


1-(4-(2-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)ethyl)phenethyl)-4-phenyl-1H-1,2,3-triazole, T.1: yield 66 %; colorless oil; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.49 (s, 1H), 7.77 (d, J = 7.0 Hz, 2H), 7.41 (t, 2H), 7.20 (m, 14H), 6.83 (d, J = 9.0 Hz, 4H), 4.63 (t, 2H), 3.72 (s, 6H), 3.19 (t, 2H), 3.11 (t, 2H), 2.77 (t, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 157.98 (C), 146.14 (C), 145.02 (C), 137.42 (C), 135.89 (2xC), 135.32 (C), 130.80 (2xC), 129.57 (4xCH), 129.08 (2xCH), 128.85 (2xCH), 128.50 (2xCH), 127.74 (2xCH), 127.62 (CH), 126.54 (CH), 125.06 (4xCH), 121.22 (CH), 113.10 (4xCH), 85.41 (C), 64.39 (CH₂), 55.00 (2xCH₃), 50.65 (CH₂), 35.51 (CH₂), 35.19 (CH₂).

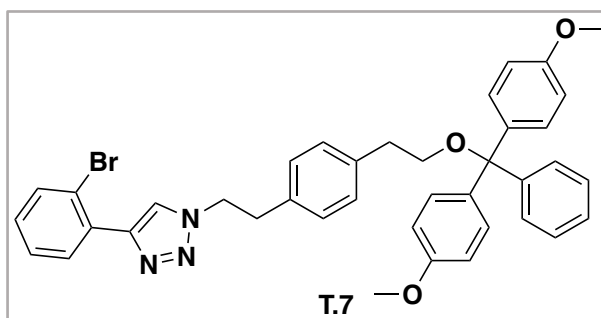


1-(4-(2-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)ethyl)phenethyl)-4-(4-bromo-phenyl)-1H-1,2,3-triazole, T.3: yield 56 %; colorless oil; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.54 (s, 1H), 7.72 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.59 (d, J = 8.7

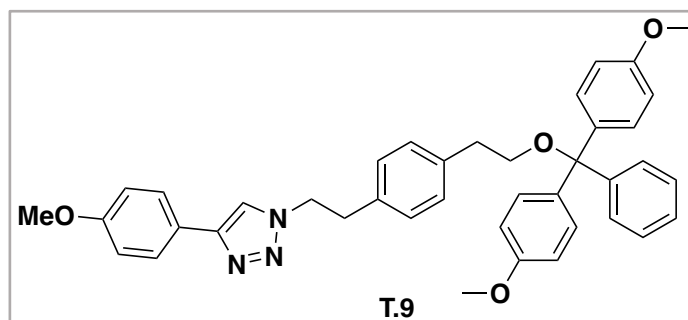
Hz, 2H), 7.26-7.11 (m, 13H), 6.83 (d, $J = 9.0$ Hz, 4H), 4.64 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.72 (s, 6H), 3.19 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.10 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 2.77 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 157.95 (2xC), 145.05 (C), 137.43 (C), 135.86 (2xC), 135.24 (C), 131.80 (2xCH), 130.02 (C), 129.54 (4xCH), 129.09 (CH), 128.48 (CH), 127.72 (CH), 127.59 (CH), 127.00 (2xCH), 126.52 (CH), 121.60 (CH), 120.67 (C), 113.07 (8xCH), 85.37 (C), 64.35 (CH₂), 59.72 (C), 54.98 (2xCH₃), 50.68 (CH₂), 35.49 (CH₂), 35.13 (CH₂); HR ESMS m/z 696.1835 [M-Na]⁺. Calc. for C₃₉H₃₆N₃O₃Br 696.1833.



1-(4-(2-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)ethyl)phenethyl)-4-(3-bromo-phenyl)-1H-1,2,3-triazole, T.5: yield 70 %; colorless oil; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.53 (s, 1H), 7.99 (t, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.78 (dt, $J = 7.9$ Hz, $J = 1.3$ Hz, 1H), 7.51 (dd, $J = 8.0$ Hz, $J = 2.0$ Hz, 1H), 7.37 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H), 7.26-7.09 (m, 13H), 6.84 (d, $J = 8.9$ Hz, 4H), 4.64 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.72 (s, 6H), 3.19 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.10 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 2.77 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 157.96 (2xC), 145.03 (C), 144.67 (C), 137.43 (C), 135.86 (2xC), 135.22 (C), 133.13 (C), 131.10 (CH), 130.41 (CH), 129.56 (4xCH), 129.09 (CH), 128.49 (CH), 127.73 (CH), 127.60 (CH), 127.49 (CH), 126.52 (CH), 123.93 (CH), 122.24 (C), 121.99 (CH), 113.08 (8xCH), 85.38 (C), 64.37 (CH₂), 54.99 (2xCH₃), 50.74 (CH₂), 35.50 (CH₂), 35.07 (CH₂); HR ESMS m/z 696.1835 [M-Na]⁺. Calc. for C₃₉H₃₆N₃O₃Br 696.1833.

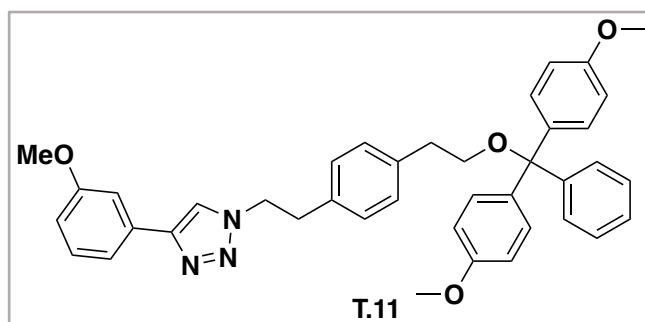


1-(4-(2-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)ethyl)phenethyl)-4-(2-bromo-phenyl)-1H-1,2,3-triazole, T.7: yield 40 %; colorless oil; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.49 (s, 1H), 7.87 (dd, $J = 7.8$ Hz, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.70 (dd, $J = 8.1$ Hz, $J = 1.1$ Hz, 1H), 7.46 (dt, $J = 7.6$ Hz, $J = 1.3$ Hz, 1H), 7.30-7.20 (m, 14H), 6.83 (d, $J = 9.0$ Hz, 4H), 4.68 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.72 (s, 6H), 3.18 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H), 3.11 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 2.77 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 157.95 (2xC), 145.03 (C), 143.85 (C), 137.33 (C), 135.87 (2xC), 135.27 (C), 133.42 (CH), 131.38 (C), 130.32 (CH), 129.67 (CH), 129.56 (4xCH), 129.05 (CH), 128.58 (CH), 127.92 (CH), 127.73 (CH), 127.61 (CH), 126.53 (CH), 124.01 (CH), 120.58 (C), 113.09 (8xCH), 85.41 (C), 64.44 (CH $_2$), 54.98 (2xCH $_3$), 50.64 (CH $_2$), 35.51 (CH $_2$), 35.38 (CH $_2$); HR ESMS m/z 696.1835 $[\text{M}-\text{Na}]^+$. Calc. for $\text{C}_{39}\text{H}_{36}\text{N}_3\text{O}_3\text{Br}$ 696.1833.

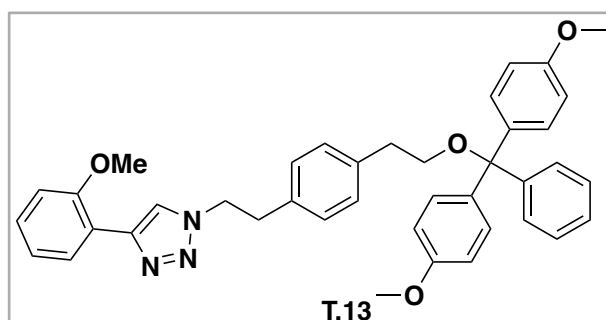


1-(4-(2-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)ethyl)phenethyl)-4-(4-methoxy-phenyl)-1H-1,2,3-triazole, T.9: yield 54 %; yellow oil; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.38 (s, 1H), 7.69 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.29-7.09 (m, 13H), 6.97 (d, $J = 8.9$ Hz, 2H), 6.83 (d, $J = 8.9$ Hz, 4H), 4.61 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.77 (s, 3H), 3.72 (s, 6H), 3.18 (t, $J = 7.3$ Hz, 2H), 3.10 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 2.77 (t, $J = 6.6$ Hz, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 158.92 (C), 157.96 (2xC), 146.07 (C), 145.03 (C), 137.41 (C), 135.88 (2xC), 135.36 (C), 129.56 (6xCH), 129.09 (CH), 128.51 (CH), 127.74 (CH), 127.61 (CH), 126.40 (2xCH), 123.41 (CH), 120.28 (CH), 114.27 (2xCH), 113.10 (6xCH), 85.39

(C), 64.40 (CH₂), 59.75 (C), 55.13 (CH₃), 54.99 (2xCH₃), 50.58 (CH₂), 35.51 (CH₂), 35.21 (CH₂); HR ESMS m/z 648.2838 [M-Na]⁺. Calc. for C₄₀H₃₉N₃O₄ 648.2835.



1-(4-(2-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)ethyl)phenethyl)-4-(3-methoxy-phenyl)-1H-1,2,3-triazole, T.11: yield 74 %; colorless oil; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.53 (s, 1H), 7.38-7.07 (m, 16H), 6.9-6.82 (m, 5H), 4.63 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.71 (s, 6H), 3.19 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 3.11 (t, J = 6.7 Hz, 2H), 2.77 (t, J = 6.6 Hz, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 159.69 (C), 157.99 (2xC), 146.08 (C), 145.05 (C), 137.44 (C), 135.91 (2xC), 135.32 (C), 132.16 (C), 130.03 (CH), 129.59 (4xCH), 129.11 (2xCH), 128.53 (2xCH), 127.76 (2xCH), 127.64 (2xCH), 126.56 (CH), 121.49 (CH), 117.45 (CH), 113.53 (CH), 113.11 (4xCH), 110.30 (CH), 85.43 (C), 64.43 (CH₂), 55.10 (CH₃), 55.00 (2xCH₃), 50.69 (CH₂), 35.54 (CH₂), 35.20 (CH₂); HR ESMS m/z 648.2838 [M-Na]⁺. Calc. for C₄₀H₃₉N₃O₄ 648.2835.

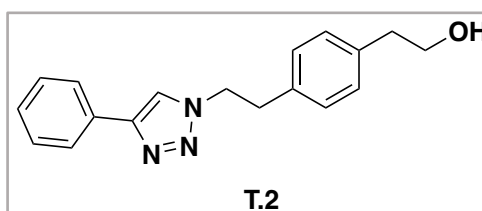


1-(4-(2-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)ethyl)phenethyl)-4-(2-methoxy-phenyl)-1H-1,2,3-triazole, T.13: yield 51 %; colorless oil; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.27 (s, 1H), 8.12 (dd, J=7.7 Hz, J = 1.7 Hz, 1H), 7.32-7.01 (m, 16H), 6.84 (d, J = 9 Hz, 4H), 4.64 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.71 (s, 6H), 3.17 (t, J=7.3 Hz, 2H), 3.11 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.78 (t, J = 6.7 Hz, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO_{d6}) δ 157.99 (2xC), 155.30 (C), 145.05 (C), 141.58 (C), 137.38 (C), 135.90 (2xC), 135.48 (C), 129.59

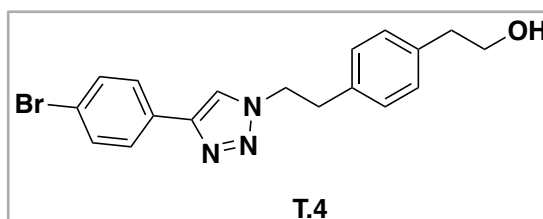
(4xCH), 129.08 (2xCH), 128.81 (CH), 128.60 (2xCH), 127.77 (2xCH), 127.63 (2xCH), 126.54 (2xCH), 123.85 (CH), 120.62 (CH), 119.22 (C), 113.12 (4xCH), 111.54 (CH), 85.44 (C), 64.46 (CH₂), 55.37 (CH₃), 55.01 (2xCH₃), 50.46 (CH₂), 35.54 (CH₂), 30.68 (CH₂); HR ESMS m/z 648.2838 [M-Na]⁺. Calc. for C₄₀H₃₉N₃O₄ 648.2835.

9.1.2.7. Deprotection of triazole derivates

CF₃COOH (0.08 mL/mmol) was added dropwise to a solution of the corresponding triazole derivative (**T.1**, **T.3**, **T.5**, **T.7**, **T.9**, **T.11**, and **T.13**) (1 eq) in MeOH (18.2 mL/mmol). The mixture was stirred at room temperature under a nitrogen atmosphere for 30 min. Then, a NaHCO₃ aqueous solution (2.7 eq) was added to the mixture. After filtration and evaporation of the solvent, the residue was purified by column chromatography on silica gel as the stationary phase and a mixture of Hexane:AcOEt (6:4, 1:1, 3:4) as the eluent, affording compounds **T.2**, **T.4**, **T.6**, **T.8**, **T.10**, **T.11**, and **T.14**.

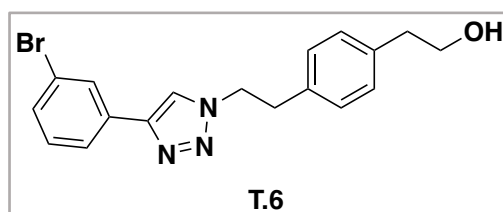


2-(4-(2-(4-phenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethyl)phenyl)ethan-1-ol, T.2: yield 46 %; colorless oil; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 8.51 (s, 1H), 7.80 (d, J = 7.1 Hz, 2H), 7.44 (t, 2H), 7.32 (t, 1H), 7.13 (s, 4H), 4.63 (t, 2H), 3.56 (t, 2H), 3.33 (s, 1H), 3.18 (t, 2H), 2.67 (t, 2H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ 146.11 (C), 137.76 (C), 134.99 (C), 130.81 (C), 128.92 (2xCH), 128.86 (2xCH), 128.44 (2xCH), 127.75 (CH), 125.05 (2xCH), 121.24 (CH), 62.09 (CH₂), 50.65 (CH₂), 38.60 (CH₂), 35.16 (CH₂); HR ESMS m/z 294.1606[M-H]⁺. Calc. for C₁₈H₁₉N₃O 294.1606.

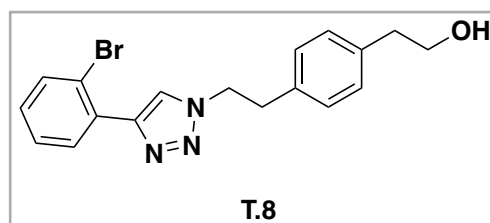


2-(4-(2-(4-(4-bromophenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethyl)phenyl)ethan-1-ol, T.4: yield 52 %; white solid; m.p. 135-140 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-

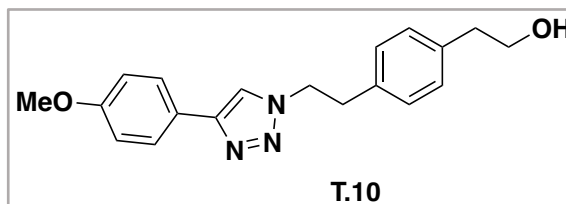
d6) δ 8.57 (s, 1H), 7.76 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.64 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H), 7.12 (s, 4H), 4.63 (t, 2H), 4.57 (t, 2H) 3.56 (m, 2H), 3.17 (t, 2H), 2.67 (t, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 145.04 (C), 137.77 (C), 134.91 (C), 131.82 (2xCH), 130.05 (C), 128.91 (2xCH), 128.40 (2xCH), 127.01 (2xCH), 121.62 (CH), 120.67 (C), 62.07 (CH₂), 50.68 (CH₂), 35.10 (CH₂), 30.68 (CH₂); HR ESMS m/z 372.0710 [M-H]⁺. Calc. for C₁₈H₁₈N₃OBr 372.0711.



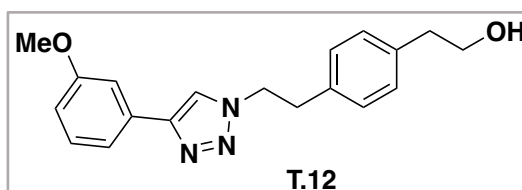
2-(4-(2-(4-(3-bromophenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethyl)phenyl)ethan-1-ol, T.6: yield 64 %; white solid; m.p. 129–131 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.63 (s, 1H), 7.99 (s, 1H), 7.82 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.51 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H), 7.41 (t, 1H), 7.12 (s, 4H), 4.62 (t, 2H), 4.57 (t, 1H) 3.56 (m, 2H), 3.17 (t, 2H), 2.66 (t, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 144.63 (C), 137.77 (C), 134.89 (C), 133.13 (CH), 131.12 (CH), 130.41 (C), 128.91 (2xCH), 128.40 (2xCH), 127.01 (CH), 123.91 (CH), 122.21 (CH), 121.98 (C), 62.07 (CH₂), 50.74 (CH₂), 38.59 (CH₂), 35.05 (CH₂); HR ESMS m/z 372.0708 [M-H]⁺. Calc. for C₁₈H₁₈N₃OBr 372.0711.



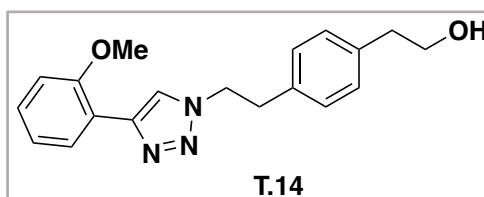
2-(4-(2-(4-(2-bromophenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethyl)phenyl)ethan-1-ol, T.8: yield 75 %; white solid; m.p. 130–133 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.51 (s, 1H), 7.89 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 7.72 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H), 7.48 (t, 1H), 7.30 (t, 1H), 7.12 (s, 4H), 4.68 (t, 2H), 4.50 (t, 1H), 3.56 (m, 2H), 3.17 (t, 2H), 2.67 (t, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 143.87 (C), 137.74 (C), 134.99 (C), 133.46 (CH), 131.39 (C), 130.35 (C), 129.71 (CH), 128.94 (2xCH), 128.54 (2xCH), 127.97 (CH), 124.05 (CH), 120.59 (CH), 62.17 (CH₂), 50.69 (CH₂), 38.64 (CH₂), 35.41 (CH₂); HR ESMS m/z 372.0716 [M-H]⁺. Calc. for C₁₈H₁₈N₃OBr 372.0711.



2-(4-(2-(4-(4-methoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethyl)phenyl)ethan-1-ol, T.10: yield 20 %; white solid; m.p. 172–174 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.40 (s, 1H), 7.72 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.12 (s, 4H), 7.00 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 4.62–4.57 (m, 3H), 3.78 (s, 3H), 3.56 (m, 2H), 3.17 (t, 2H), 2.67 (t, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 158.93 (C), 146.04 (C), 137.75 (C), 135.03 (C), 128.92 (2xCH), 128.43 (2xCH), 126.40 (2xCH), 123.43 (C), 120.29 (CH), 114.29 (2xCH), 62.10 (CH₂), 55.13 (CH₃), 50.58 (CH₂), 38.60 (CH₂), 35.18 (CH₂); HR ESMS m/z 324.1710 [M-H]⁺. Calc. for C₁₉H₂₁N₃O₂ 324.1712.



1-(4-(2-(bis(4-methoxyphenyl)(phenyl)methoxy)-2-(4-(3-methoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethyl)phenyl)ethan-1-ol, T.12: yield 55 %; white solid; m.p. 90–93 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.54 (s, 1H), 7.39–7.32 (m, 3H), 7.13 (s, 4H), 6.89 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 4.62 (t, 2H), 4.57 (t, 1H), 3.81 (s, 3H), 3.56 (c, 2H), 3.18 (t, 2H), 2.67 (t, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 159.65 (C), 145.99 (C), 137.75 (C), 134.96 (C), 132.13 (C), 129.98 (CH), 128.91 (2xCH), 128.41 (2xCH), 121.47 (CH), 117.39 (CH), 113.50 (CH), 110.25 (CH), 62.07 (CH₂), 55.07 (CH₃), 50.64 (CH₂), 38.59 (CH₂), 35.13 (CH₂); HR ESMS m/z 324.1716 [M-H]⁺. Calc. for C₁₉H₂₁N₃O₂ 324.1712.



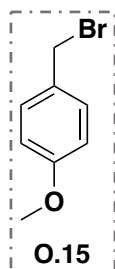
2-(4-(2-(4-(2-methoxyphenyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)ethyl)phenyl)ethan-1-ol, T.14: yield 37 %; white solid; m.p. 76–80 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO-

d6) δ 8.28 (s, 1H), 8.12 (dd, $J = 7.7$ Hz, 1.7Hz, 1H), 7.32 (t, 1H), 7.14 (s, 4H), 7.11 (dd, $J = 8.4$ Hz, 0.8 Hz, 1H), 7.04 (t, 1H), 4.64 (t, 2H), 4.59 (t, 1H), 3.88 (s, 3H), 3.57 (m, 2H), 3.17 (t, 2H), 2.68 (t, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMS = - d6) δ 155.29 (C), 141.54 (C), 137.73 (C), 135.14 (C), 128.91 (2xCH), 128.78 (2xCH), 128.5 (CH), 126.51 (CH), 123.81 (CH), 120.60 (CH), 119.21 (C), 115.55 (CH), 62.12 (CH₂), 55.41 (CH₃), 50.43 (CH₂), 38.62 (CH₂), 35.38 (CH₂); HR ESMS m/z 324.1711 [M-H]⁺. Calc. for C₁₉H₂₁N₃O₂ 324.1712.

9.1.3. Experimental procedure for the synthesis of benzylethoxyaryl-urea derivatives

9.1.3.1. Synthesis of 1-(bromomethyl)-4-methoxybenzene, **O.15**

A solution of 759 μL of PBr₃ (7.83 mmol) in Et₂O (15.7 mL, 2 mL/mmol PBr₃) was added dropwise, at 0 °C under a N₂ atmosphere, to a solution of (4-methoxyphenyl)methanol (2.05 g, 14.51 mmol) in Et₂O (2.9 mL). The mixture was stirred at room temperature for 2 h. Then, the solution was poured into ice and the organic layer was separated and treated with an aqueous saturated solution of NaHCO₃, washed with brine and dried over Na₂SO₄. Evaporation of the solvent afforded compound **O.15** (12.8 g, 96 %) as a pale yellow oil which was used directly without further purification for the following reaction.

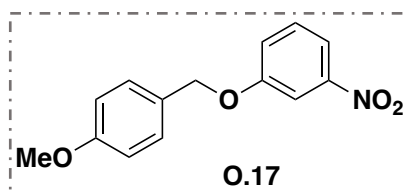


1-(bromomethyl)-4-methoxybenzene, O.15: Yield 96 %; yellow oil; ^1H NMR (400 MHz, CDCl₃); δ 7.34 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.88 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 4.52 (s, 2H), 3.82 (s, 3H).; ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 159.66 (C), 130.39 (2CH), 129.93 (C), 114.19 (2CH), 55.28 (CH₂), 33.90 (CH₃).

9.1.3.2. 1-((4-methoxybenzyl)oxy)-3-nitrobenzene, **O.17**

A mixture of 1-(bromomethyl)-4-methoxybenzene, **O.15** (2.8 g, 13.93 mmol), 3-nitrophenol **O.16** (3.53 g, 17.41 mmol) and K₂CO₃ (2.9 g, 20.89 mmol) in acetone (52 mL) was stirred for 16 h at room temperature. After removal of the solvent, the residue was taken up in ethyl acetate, washed

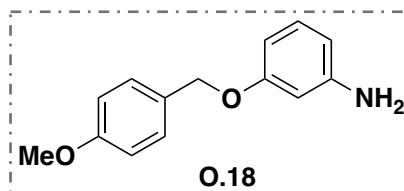
with aqueous 1M NaOH solution and brine and dried over Na₂SO₄. After filtration and removal of the solvent compound **O.17** (3.25 g, 90 %) was obtained as a crystalline yellow solid.



1-((4-methoxybenzyl)oxy)-3-nitrobenzene, O.17: Yield 90 %; yellow solid; m.p.80-84 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃); δ 7.76 – 7.69 (m, 2H), 7.37 – 7.30 (m, 1H), 7.28 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.21 – 7.17 (m, 1H), 6.85 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 4.98 (s, 2H), 3.74 (s, 3H).; ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 159.79 (C), 159.27 (C), 149.22 (C), 129.91 (CH), 129.36 (2CH), 127.73 (C), 122.01 (CH), 115.89 (CH), 114.18 (2CH), 109.22 (CH), 70.46 (CH₂), 55.31 (CH₃).

9.1.3.3. 3-((4-methoxybenzyl)oxy)aniline, O.18

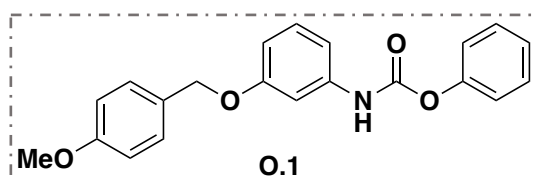
A solution of 1-((4-methoxybenzyl)oxy)-3-nitrobenzene, **O.17** (1.72 g, 6.61 mmol) in AcOEt (40 mL) was added to AcOEt (6.85 mL) containing Pd/C (10%) (343 mg, 20 % by weight). The resulting mixture was stirred overnight under H₂ atmosphere and then filtered through Celite, yielding 1,27 g (84 %) of compound **O.18** as a brown solid.



1-((4-methoxybenzyl)oxy)aniline, O.18: Yield 84 %; brown solid; m.p.106-108 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃); δ 7.26 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.97 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 6.83 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.31 (ddd, J = 8.2, 2.3, 0.9 Hz, 1H), 6.26 – 6.19 (m, 2H), 4.86 (s, 2H), 3.73 (s, 3H), 3.39 (s, 2H).; ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 160.07 (C), 159.39 (C), 147.71 (C), 130.07 (CH), 129.27 (C), 129.14 (2CH), 113.97 (2CH), 108.11 (CH), 104.92 (CH), 102.08 (CH), 69.60 (CH₂), 55.28 (C₃); HR ESMS *m/z* 230.1174 [M-H]⁺. Calc. for C₁₄H₁₅N₁O₂ 230.1181.

9.1.3.4. Synthesis of (phenyl (3-((4-methoxybenzyl)oxy)phenyl)carbamate), O.1

A solution of 3-((4-methoxybenzyl)oxy)aniline, **O.18** (407 mg, 1.78 mmol) in dry THF (8.0 mL) was cooled at 0 °C and then anhydrous pyridine (357 μ L, 4.44 mmol) and phenyl chloroformate, **O.19** (344 μ L, 2.66 mmol) were added under nitrogen atmosphere. The resulting mixture was stirred for 20 min at 0 °C and at room temperature for 1 h. Then, water (8.88 mL) and 1M aqueous HCl (4.44 mL) were added and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 20 mL). The combined organic phases were washed with brine and dried over Na_2SO_4 . The solvent was removed *in vacuo* and the residue was purified by silica gel chromatography using Hexane: AcOEt (95:5) as eluent yielding 483 mg (78 %) of carbamate **O.1** as a white solid.

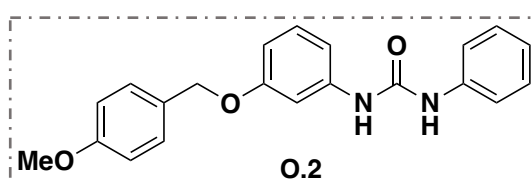


Phenyl (3-((4-methoxybenzyl)oxy)phenyl)carbamate, O.1: Yield 78 %; white solid; m.p.170.3 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3); δ 7.42 (t, J = 7.8 Hz, 2H, CH-23,24), 7.37 (d, J = 8.4 Hz, 2H, CH-1,5), 7.31 (s, 1H, NH), 7.27 (d, J = 6.3 Hz, 2H, CH-22,26), 7.22 (t, J = 7.6 Hz, 2H, CH-24,16), 6.98-6.87 (m, 4H, CH-2,4,13,14), 6.74 (dd, J = 8.3, 2.4 Hz, 1H, CH-12), 5.00 (s, 2H, O-CH₂-Ar), 3.83 (s, 3H, OCH₃).; ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 159.62(C), 159.48(C), 151.51(C), 150.54(C), 138.58(C), 129.85(CH), 129.41(2CH), 129.22(2CH), 128.87(C), 125.73(CH), 121.63(2CH), 114.01(2CH), 111.10(CH), 110.86(CH), 105.34(CH), 69.83(CH₂), 55.29(CH₃); IR ν_{max} (cm⁻¹) 3240 (N-H), 1703 (C=O), 1542 (N-H amide), 1445 (N-C=O), 1235,1205,1008 (C-O); HR ESMS m/z 372.1211 [M-Na]⁺. Calc. for $\text{C}_{21}\text{H}_{19}\text{N}_1\text{O}_4$ 372.1212.

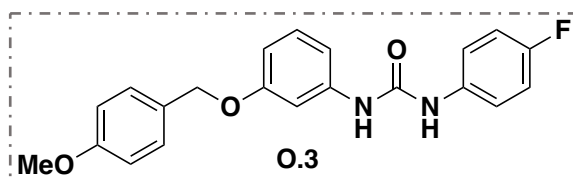
9.1.3.5. Synthesis of benzylethoxyarylureas, O.2–O.14.

A solution of the corresponding aniline, **O.20–O.32** (1.0 mmol) dissolved in dry THF (5.0 mL) was slowly dripped into a stirred solution of triphosgene (303 mg, 1.0 mmol) in dry THF (5.0 mL). Then, Et_3N (279 μ L, 2.0 mmol) was then added slowly to the reaction mixture. The resulting mixture was stirred at room temperature for 1 h and then refluxed for 5 h under nitrogen atmosphere. After this, the reaction mixture was cooled to room temperature

and the solid was filtered-off. After evaporation of the solvent *in vacuo*, the residue was taken up in dry THF (5.0 mL) and a THF solution (5.0 mL) of 3-((4-methoxybenzyl)oxy)aniline, **O.18** (229 mg, 1.0 mmol) was directly added followed by Et₃N (139 μ L, 1.0 mmol) addition. The resulting mixture was refluxed under nitrogen atmosphere overnight. Then, the solvent was removed *in vacuo* and AcOEt (20 mL) was added. The organic phase was washed with aqueous HCl 10 % (2 x 20 mL) and brine and dried over Na₂SO₄. Then, the solvent was removed *in vacuo* and the residue was recrystallized from acetonitrile and dried under vacuum to give ureas **O.2** – **O.14** as white solids (41-99 %).

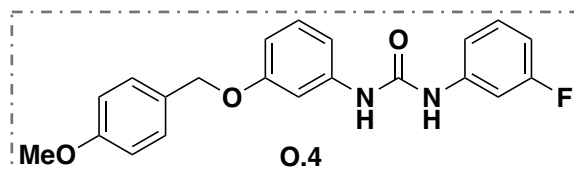


1-(3-((4-methoxybenzyl)oxy)phenyl)-3-phenylurea, O.2: Yield 95 %; white solid; m.p. 199-200 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO); δ 8.63 (s, 2H), 7.44 (dd, J = 8.6, 1.1 Hz, 2H), 7.38 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.31 – 7.24 (m, 2H), 7.23 (t, J = 2.2 Hz, 1H), 7.16 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 7.00 – 6.91 (m, 4H), 6.61 (dd, J = 8.2, 2.5 Hz, 1H), 4.99 (s, 2H), 3.76 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ 158.93 (C), 158.81 (C), 152.40 (C), 140.86 (C), 139.59 (2CH), 129.46 (CH), 129.35 (2CH), 128.96 (C), 128.72 (2CH), 121.80 (CH), 118.19 (2CH), 113.77 (2CH), 110.64 (CH), 108.06 (CH), 104.88 (CH), 68.83 (CH₂), 55.06 (CH₃); IR ν_{max} (cm⁻¹) 3296 (N-H), 1633 (C=O), 1558 (N-H amide), 1515, 1489 (N-C=O), 1249, 1176, 1028 (C-O); HR ESMS *m/z* 349.1552 [M-Na]⁺. Calc. for C₂₁H₂₀N₂O₃ 349.1552.

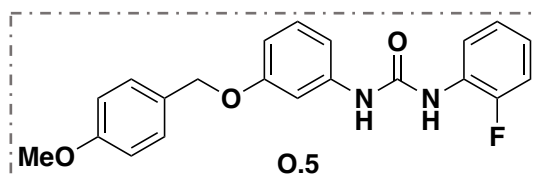


1-(4-fluorophenyl)-3-(3-((4-methoxybenzyl)oxy)phenyl)urea, O.3: Yield 61 %; white solid; m.p. 201-205 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO); δ 8.68 (s, 1H), 8.64 (s, 1H), 7.45 (dd, J = 9.2, 4.9 Hz, 2H), 7.37 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.22 (t, J = 2.2 Hz, 1H), 7.16 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 7.11 (t, J = 8.9 Hz, 2H), 6.97 – 6.90 (m, 3H), 6.61 (ddd, J = 8.2, 2.5, 0.8 Hz, 1H), 4.98 (s, 2H), 3.76 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ 158.93 (C), 158.81 (C), 152.40 (C), 140.86 (C), 139.59 (2CH), 129.46 (CH), 129.35 (2CH), 128.96 (C), 128.72

(2CH), 121.80 (CH), 118.19 (2CH), 113.77 (2CH), 110.64 (CH), 108.06 (CH), 104.88 (CH), 68.83 (CH₂), 55.06 (CH₃); ¹⁹F NMR (377 MHz, DMSO) δ -121.49.; IR ν_{\max} (cm⁻¹) 3292 (N-H), 1633 (C=O), 1563 (N-H amide), 1508 (N-C=O), 1249,1172,1009 (C-O).; HR ESMS m/z 367.1457 [M-H]⁺. Calc. for C₂₁H₁₉N₂O₃F 367.1458.

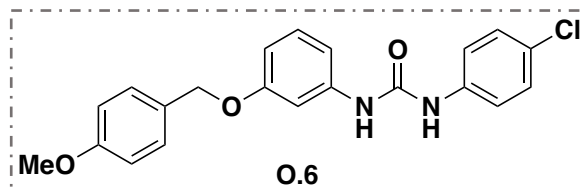


1-(3-fluorophenyl)-3-(3-((4-methoxybenzyl)oxy)phenyl)urea, O.4: Yield 80 %; white solid; m.p. 202-203 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO); δ 8.90 (s, 1H), 8.73 (s, 1H), 7.48 (dt, J = 12.0, 2.3 Hz, 1H), 7.38 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.30 (td, J = 8.2, 7.0 Hz, 1H), 7.22 (t, J = 2.2 Hz, 1H), 7.17 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 7.11 (dd, J = 8.2, 1.1 Hz, 1H), 6.95 (d, J = 8.7 Hz, 3H), 6.77 (td, J = 8.5, 2.6 Hz, 1H), 6.63 (dd, J = 8.1, 2.4 Hz, 1H), 4.99 (s, 2H), 3.76 (s, 3H).; ¹³C NMR (100 MHz, DMSO)) δ 162.36 (C, d, J = 240.6 Hz), 158.94 (C), 158.80 (C), 152.25 (C), 141.50 (C, d, J = 11.5 Hz), 140.57 (C), 130.25 (d, J = 9.9 Hz), 129.49 (CH), 129.36 (2CH), 128.94 (C), 113.90 (CH, d, J = 2.4 Hz), 113.77 (2CH), 110.80 (CH), 108.32 (CH), 108.10 (CH, d, J = 21.2 Hz), 105.07 (CH), 104.83 (CH, d, J = 26.4 Hz), 68.85 (CH₂), 55.06 (CH₃); ¹⁹F NMR (377 MHz, DMSO) δ -112.29.; IR ν_{\max} (cm⁻¹) 3292 (N-H), 1630 (C=O), 1558 (N-H amide), 1508 (N-C=O), 1244,1176,1009 (C-O).; HR ESMS m/z 367.1457 [M-H]⁺. Calc. for C₂₁H₁₉N₂O₃F 367.1458.

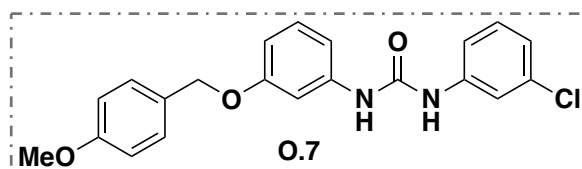


1-(2-fluorophenyl)-3-(3-((4-methoxybenzyl)oxy)phenyl)urea, O.5: Yield 41 %; white solid; m.p. 185-186 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO); δ 9.04 (s, 1H), 8.52 (d, J = 2.2 Hz, 1H), 8.14 (td, J = 8.3, 1.5 Hz, 1H), 7.38 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.27 – 7.20 (m, 2H), 7.20 – 7.16 (m, 1H), 7.13 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.04 – 6.97 (m, 1H), 6.95 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 6.90 – 6.93 (m, 1H), 6.64 (dd, J = 8.2, 2.4 Hz, 1H), 4.99 (s, 2H), 3.76 (s, 3H).; ¹³C NMR (100 MHz, DMSO)) δ 158.94 (C), 158.85 (C), 152.06 (C), 151.99 (C, d, J = 241.2 Hz), 140.58 (C), 129.56 (CH), 129.35 (2CH), 128.93 (C), 127.45 (CH, d, J = 10.3 Hz),

124.45 (CH, d, J = 3.4 Hz), 122.44 (CH, d, J = 7.4 Hz), 120.58 (CH), 114.90 (CH, d, J = 19.1 Hz), 113.78 (CH), 110.56 (CH), 108.34 (CH), 104.81 (CH), 68.84 (CH₂), 55.06 (CH₃); ¹⁹F NMR (377 MHz, DMSO) δ -129.97.; IR ν_{max} (cm⁻¹) 3292 (N-H), 1633 (C=O), 1563 (N-H amide), 1508 (N-C=O), 1249,1172,1009 (C-O).; HR ESMS *m/z* 367.1457 [M-H]⁺. Calc. for C₂₁H₁₉N₂O₃F 367.1458.

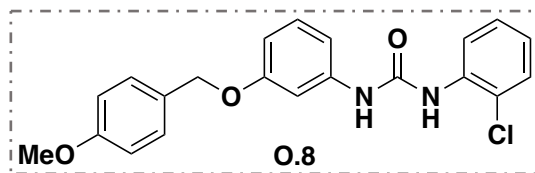


1-(4-chlorophenyl)-3-(3-((4-methoxybenzyl)oxy)phenyl)urea, O.6: Yield 90 %; white solid; m.p. 213-215 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO); δ 8.80 (s, 1H), 8.69 (s, 1H), 7.48 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.38 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 8.9 Hz, 2H), 7.22 (t, J = 2.2 Hz, 1H), 7.17 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 6.98 – 6.90 (m, 3H), 6.62 (dd, J = 8.2, 2.4 Hz, 1H), 4.98 (s, 2H), 3.75 (s, 3H).; ¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ 158.96 (C), 158.82 (C), 152.34 (C), 140.71 (C), 138.66 (C), 129.53 (CHs), 129.43 (2CH), 128.95 (C), 128.61 (2CH), 125.34 (C), 119.72 (2CH), 113.79 (2CH), 110.76 (CH), 108.22 (CH), 104.98 (CH), 68.84 (CH₂), 55.09 (CH₃).; IR ν_{max} (cm⁻¹) 3292 (N-H), 1627 (C=O), 1561 (N-H amide), 1512 (N-C=O), 1249,1173,1009 (C-O).; HR ESMS *m/z* 383.1163 [M-H]⁺. Calc. for C₂₁H₁₉N₂O₃Cl 383.1162.

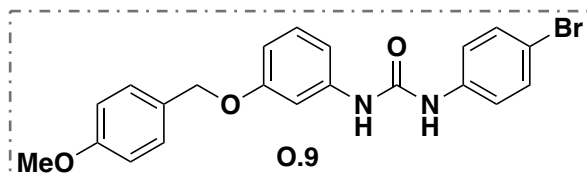


1-(3-chlorophenyl)-3-(3-((4-methoxybenzyl)oxy)phenyl)urea, O.7: Yield 80 %; white solid; m.p. 203-205 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO); δ 8.91 (s, 1H), 8.77 (s, 1H), 7.71 (t, J = 1.9 Hz, 1H), 7.38 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.33 – 7.27 (m, 1H), 7.27 – 7.25 (m, 1H), 7.23 (t, J = 2.2 Hz, 1H), 7.17 (t, J = 8.1 Hz, 1H), 7.01 (ddd, J = 7.6, 2.0, 1.4 Hz, 1H), 6.95 (d, J = 8.7 Hz, 3H), 6.63 (dd, J = 8.2, 2.4 Hz, 1H), 4.99 (s, 2H), 3.76 (s, 3H).; ¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ 158.93 (C), 158.80 (C), 152.26 (C), 141.20 (C), 140.57 (C), 133.14 (C), 130.32 (CH), 129.49 (CH), 129.36 (2CH), 128.94 (C), 121.40 (CH), 117.53 (CH), 116.62 (CH), 113.77 (2CH), 110.82 (CH), 108.35 (CH), 105.08 (CH), 68.85 (CH₂), 55.06 (CH₃).; IR ν_{max} (cm⁻¹) 3309 (N-H), 1643

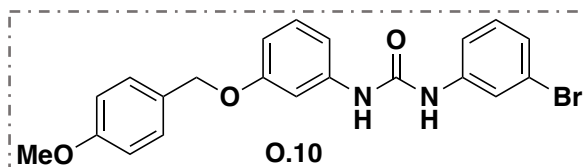
(C=O), 1551 (N-H amide), 1515 (N-C=O), 1249,1182,1009 (C-O).; HR ESMS m/z 383.1162 [M-H]⁺. Calc. for C₂₁H₁₉N₂O₃Cl 383.1162.



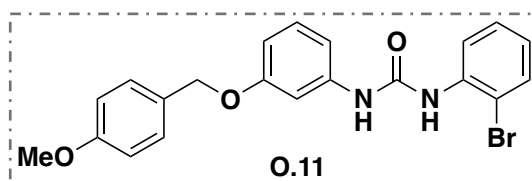
1-(2-chlorophenyl)-3-(3-((4-methoxybenzyl)oxy)phenyl)urea, O.8: Yield 44 %; white solid; m.p. 183.4 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO); δ 9.38 (s, 1H), 8.29 (s, 1H), 8.15 (dd, *J* = 8.3, 1.5 Hz, 1H), 7.45 (dd, *J* = 8.0, 1.4 Hz, 1H), 7.38 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.30 (td, *J* = 7.7, 1.3 Hz, 1H), 7.25 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.19 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.03 (ddd, *J* = 8.0, 7.5, 1.6 Hz, 1H), 6.99 – 6.89 (m, 3H), 6.64 (dd, *J* = 8.2, 2.4 Hz, 1H), 5.00 (s, 2H), 3.76 (s, 3H).; ¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ 158.94 (C), 158.85 (C), 140.59 (C), 135.87 (C), 129.58 (C), 129.34 (2CH), 129.15 (CH), 128.93 (CH), 127.52 (CH), 123.29 (CH), 121.94 (C), 121.35 (CH), 113.78 (2CH), 110.64 (CH), 108.46 (CH), 104.88 (CH), 68.84 (CH₂), 55.06 (CH₃).; IR ν_{\max} (cm⁻¹) 3292 (N-H), 1640 (C=O), 1554 (N-H amide), 1515 (N-C=O), 1249,1186,1014 (C-O).; HR ESMS m/z 383.1164 [M-H]⁺. Calc. for C₂₁H₁₉N₂O₃Cl 383.1162.



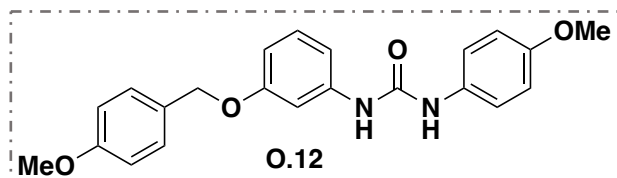
1-(4-bromophenyl)-3-(3-((4-methoxybenzyl)oxy)phenyl)urea, O.9: Yield 80 %; white solid; m.p. 224.3 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO); δ 8.77 (s, 1H), 8.66 (s, 1H), 7.50 – 7.39 (m, 4H), 7.37 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.22 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 7.17 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H), 6.99 – 6.89 (m, 3H), 6.63 (dd, *J* = 8.2, 2.4 Hz, 1H), 4.99 (s, 2H), 3.76 (s, 3H).; ¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ 158.93 (C), 158.79 (C), 152.26 (C), 140.65 (C), 139.05 (C), 131.45 (2CH), 129.48 (C), 129.36 (2CH), 128.94 (C), 120.11 (2CH), 113.77 (2CH), 113.17 (CH), 110.75 (CH), 108.25 (CH), 105.00 (CH), 68.83 (CH₂), 55.06 (CH₃).; IR ν_{\max} (cm⁻¹) 3289 (N-H), 1630 (C=O), 1587 (N-H amide), 1518 (N-C=O), 1249,1176,1005 (C-O).; HR ESMS m/z 427.0655 [M-H]⁺. Calc. for C₂₁H₁₉N₂O₃Br 427.0657.



1-(3-bromophenyl)-3-(3-((4-methoxybenzyl)oxy)phenyl)urea, O.10: Yield 96 %; white solid; m.p. 198.5 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO); δ 8.83 (s, 1H), 8.70 (s, 1H), 7.85 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.38 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.29 (ddd, $J = 8.1, 1.9, 1.2$ Hz, 1H), 7.26 – 7.20 (m, 2H), 7.17 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 7.16 – 7.12 (m, 1H), 6.98 – 6.91 (m, 3H), 6.63 (dd, $J = 8.2, 2.4$ Hz, 1H), 4.99 (s, 2H), 3.76 (s, 3H).; ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO)) δ 158.93 (C), 158.80 (C), 152.23 (C), 141.32 (C), 140.55 (C), 130.64 (CH), 129.49 (CH), 129.35 (2CH), 128.93 (C), 124.33 (CH), 121.67 (C), 120.39 (CH), 117.02 (CH), 113.76 (2CH), 110.83 (CH), 108.37 (CH), 105.08 (CH), 68.85 (CH₂), 55.06 (CH₃).; IR ν_{max} (cm⁻¹) 3305 (N-H), 1647 (C=O), 1551 (N-H amide), 1518 (N-C=O), 1248,1182,1009 (C-O).; HR ESMS m/z 427.0654 [M-H]⁺. Calc. for C₂₁H₁₉N₂O₃Br 427.0657.

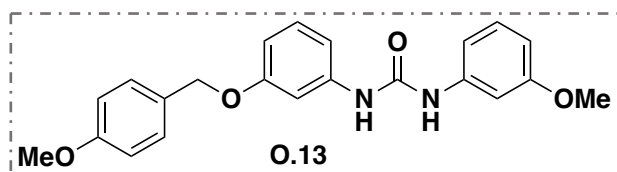


1-(2-bromophenyl)-3-(3-((4-methoxybenzyl)oxy)phenyl)urea, O.11: Yield 92 %; white solid; m.p. 198.5 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO); δ 9.43 (s, 1H), 8.11 (s, 1H), 8.06 (dd, $J = 8.3, 1.5$ Hz, 1H), 7.61 (dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz, 1H), 7.38 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.36 – 7.30 (m, 1H), 7.25 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.19 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.01 – 6.97 (m, 1H), 6.95 (d, $J = 8.8$ Hz, 3H), 6.64 (dd, $J = 8.2, 2.4$ Hz, 1H), 4.99 (s, 2H), 3.76 (s, 3H).; ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO)) δ 158.93 (C), 158.84 (C), 152.06 (C), 140.63 (C), 136.97 (C), 132.42 (CH), 129.57 (C), 129.34 (2CH), 128.93 (C), 128.01 (CH), 124.06 (CH), 122.26 (CH), 113.77 (2CH), 113.05 (CH), 110.65 (CH), 108.45 (CH), 104.89 (CH), 68.84 (CH₂), 55.06 (CH₃).; IR ν_{max} (cm⁻¹) 3279 (N-H), 1640 (C=O), 1558 (N-H amide), 1551, 1440 (N-C=O), 1248,1179,1011 (C-O).; HR ESMS m/z 427.0654 [M-H]⁺. Calc. for C₂₁H₁₉N₂O₃Br 427.0657.



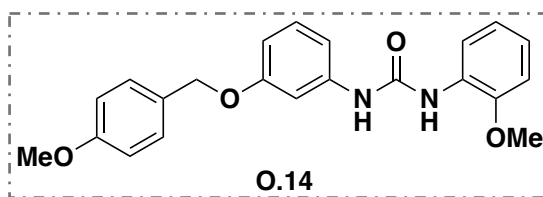
1-(3-((4-methoxybenzyl)oxy)phenyl)-3-(4-methoxyphenyl)urea, O.12:

Yield 94 %; white solid; m.p. 187.9-188.3 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO); δ 8.53 (s, 1H), 8.42 (s, 1H), 7.37 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.34 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 7.22 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.15 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H), 6.94 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 6.93 – 6.90 (m, 1H), 6.86 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 6.60 (dd, $J = 8.2, 2.5$ Hz, 1H), 4.98 (s, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.71 (s, 3H).; ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 158.92 (C), 158.79 (C), 154.47 (C), 152.59 (C), 141.05 (C), 132.60 (C), 129.41 (CH), 129.34 (2CH), 128.98 (C), 120.03 (2CH), 113.96 (2CH), 113.76 (2CH), 110.54 (CH), 107.86 (CH), 104.77 (CH), 68.80 (CH₂), 55.14 (CH₃), 55.06 (CH₃).; IR ν_{max} (cm⁻¹) 3289 (N-H), 1637 (C=O), 1597 (N-H amide), 1508 (N-C=O), 1241, 1182, 1031 (C-O).; HR ESMS m/z 401.1471 [M-Na]⁺. Calc. for C₂₂H₂₂N₂O₃ 401.1477.



1-(3-((4-methoxybenzyl)oxy)phenyl)-3-(3-methoxyphenyl)urea, O.13:

Yield 80 %; white solid; m.p. 137.5-168.9 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO); δ 8.64 (s, 1H), 8.61 (s, 1H), 7.38 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.22 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.20 – 7.13 (m, 3H), 6.98 – 6.89 (m, 4H), 6.62 (dd, $J = 8.2, 2.5$ Hz, 1H), 6.55 (dd, $J = 8.3, 2.5$ Hz, 1H), 4.99 (s, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.73 (s, 3H).; ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 159.67 (C), 158.94 (C), 158.82 (C), 152.34 (C), 140.82 (C), 140.80 (C), 129.50 (CH), 129.48 (CH), 129.37 (2CH), 128.97 (C), 113.78 (2CH), 110.71 (CH), 110.53 (CH), 108.09 (CH), 107.24 (CH), 104.96 (CH), 104.01 (CH), 68.85 (CH₂), 55.07 (CH₃), 54.90 (CH₃).; IR ν_{max} (cm⁻¹) 3289 (N-H), 1624 (C=O), 1561 (N-H amide), 1515 (N-C=O), 1258, 1169, 1028 (C-O).; HR ESMS m/z 379.1659 [M-H]⁺. Calc. for C₂₂H₂₂N₂O₃ 379.1658.



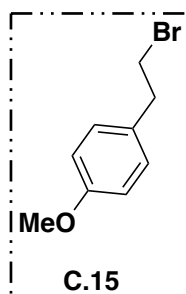
1-(3-((4-methoxybenzyl)oxy)phenyl)-3-(2-methoxyphenyl)urea, O.14:

Yield 44 %; white solid; m.p. 160.0-161.6 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO); δ 9.28 (s, 1H), 8.20 (s, 1H), 8.12 (dd, $J = 7.9, 1.8$ Hz, 1H), 7.38 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.25 (t, $J = 2.2$ Hz, 1H), 7.16 (t, $J = 8.1$ Hz, 1H), 7.01 (dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz, 1H), 6.98 – 6.91 (m, 4H), 6.91 – 6.86 (m, 1H), 6.61 (dd, $J = 8.2, 2.5$ Hz, 1H), 4.99 (s, 2H), 3.88 (s, 3H), 3.76 (s, 3H).; ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 158.93 (C), 158.83 (C), 152.27 (C), 147.63 (C), 141.00 (C), 129.49 (CH), 129.34 (2CH), 128.97 (C), 128.58 (C), 121.78 (CH), 120.50 (CH), 118.30 (CH), 113.77 (CH), 110.71 (CH), 110.39 (CH), 108.02 (CH), 104.62 (CH), 68.81 (CH₂), 55.74 (CH₃), 55.06 (CH₃).; IR ν_{max} (cm⁻¹) 3329 (N-H), 1650 (C=O), 1541 (N-H amide), 1518, 1466 (N-C=O), 1245, 1156, 1031 (C-O).; HR ESMS m/z 379.1656 [M-H]⁺. Calc. for C₂₂H₂₂N₂O₃ 379.1658.

9.1.4. Experimental procedure for the synthesis of benzyloxyethylurea derivatives

9.1.4.1. 1-(Bromoethyl)-4-methoxybenzene, C.15

To a solution of 2-(4-methoxyphenyl)ethan-1-ol (3.88 g, 25.3 mmol) in toluene (33 mL) was added PBr₃ (856 μL , 8.8 mmol, 0.35 eq) under nitrogen atmosphere and the resulting mixture was refluxed for 2 hr. After cooling to room temperature the mixture was washed with an aqueous saturated solution of Na₂S₂O₃/NaHCO₃ (1:1) (3 x 20 mL), dried over MgSO₄ and concentrated *in vacuo* to give 5.12 g (94 %) of compound **C.15** as a clear oil.

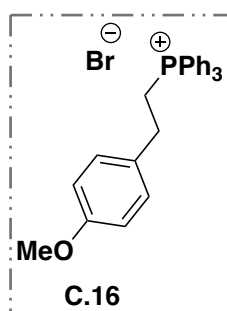


1-(2-Bromoethyl)-4-methoxybenzene, C.15: Yield 94 %; clear oil; ^1H NMR (400 MHz, CDCl₃); δ 7.15 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.89 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 3.82 (s, 3H), 3.55 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 3.13 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H).; ^{13}C NMR (100 MHz,

CDCl_3) δ 158.52 (C), 130.97 (C), 129.59 (2CH), 113.97 (2CH), 55.18 (CH₃), 38.53 (CH₂), 33.29 (CH₂).

9.1.4.2. (4-Methoxyphenethyl)triphenylphosphonium bromide, C.16

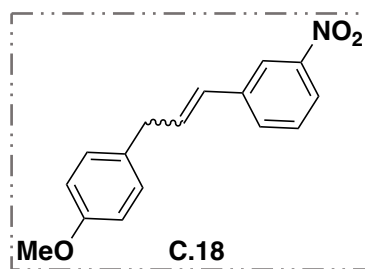
To a solution of 1-(2-bromoethyl)-4-methoxybenzene **C.15** (5.12 g, 23.80 mmol) in EtOH (240 mL) was added PPh_3 (7.00 g, 26.20 mmol, 1.1 eq). The mixture was refluxed for 6 days under nitrogen atmosphere. Then, the solvent was removed *in vacuo* and the crude product was purified on silica gel chromatography using dichloromethane and dichloromethane:MeOH (9:1) to give 9.44 g (83 %) of **C.16** as a clear oil.



(4-Methoxyphenethyl)triphenylphosphonium bromide, C.16: Yield 94%; clear oil; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.89 – 7.76 (m, 9H), 7.73 – 7.66 (m, 6H), 7.22 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.77 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 4.16 – 4.05 (m, 2H), 3.75 (s, 3H), 3.07 – 2.95 (m, 2H).; ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 158.65 (C), 135.00 (3CH, d, J = 3.0 Hz), 133.77 (6CH, d, J = 10.1 Hz), 130.47 (6CH, d, J = 12.6 Hz), 130.14 (C, d, J = 13.6 Hz), 129.70 (2CH), 118.22 (3C, d, J = 85.7 Hz), 114.27 (2CH), 55.29 (CH₃), 27.61 (CH₂, d, J = 3.7 Hz), 24.87 (CH₂, d, J = 47.4 Hz).

9.1.4.3. (E/Z)-1-(3-(4-Methoxyphenyl)prop-1-en-1-yl)-3-nitrobenzene, C.18

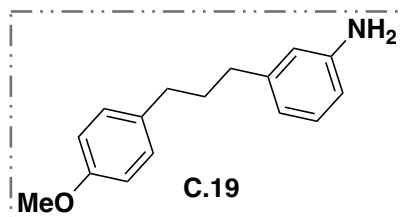
To a solution of (4-methoxyphenethyl)triphenylphosphonium bromide **C.16** (3.11 g, 6.51 mmol) in dichloromethane (40 mL) was added 3-nitrobenzaldehyde **C.17** (994 mg, 6.51 mmol), K_2CO_3 (7.16 mmol, 1.1 eq) and 18-crown-6 (310 mg, 0.18 eq). The mixture was refluxed for 24 h and then filtered and concentrated *in vacuo*. The crude product was purified on silica gel chromatography using Hexane:AcOEt (9:1) to give 1.38 g (79 %) of compound **C.18** as an orange oil.



(Z)-1-(3-(4-Methoxyphenyl)prop-1-en-1-yl)-3-nitrobenzene + (E)-1-(3-(4-methoxyphenyl)prop-1-en-1-yl)-3-nitrobenzene (42:58), C.18: Yield 91 %; orange oil; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.23 – 8.16 (m, 2H), 8.12 (ddd, $J = 8.2, 2.2, 1.0$ Hz, 1H-cis), 8.05 (ddd, $J = 8.2, 2.3, 1.0$ Hz, 1H-trans), 7.64 (ddd, $J = 7.7, 3.3, 2.1$ Hz, 2H), 7.52 (t, $J = 7.9$ Hz, 1H-cis), 7.45 (t, $J = 8.0$ Hz, 1H-trans), 7.17 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H-trans), 7.14 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H-cis), 6.89 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H-trans), 6.87 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H-cis), 6.60 (d, $J = 11.5$ Hz, 1H-cis), 6.51 (dd, $J = 15.3, 9.2$ Hz, 1H-trans), 6.46 (d, $J = 15.9$ Hz, 1H-trans), 6.04 (dt, $J = 11.5, 7.6$ Hz, 1H-cis), 3.82 (s, 3H-trans), 3.81 (s, 3H-cis), 3.61 (dd, $J = 7.6, 1.6$ Hz, 2H-cis), 3.54 (d, $J = 5.7$ Hz, 2H-trans).; ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 158.29 (C), 158.20 (C), 148.60 (C), 148.29 (C), 139.32 (C), 138.82 (C), 134.57 (CH), 134.02 (CH), 133.29 (CH), 131.88 (CH), 131.78 (C), 131.20 (C), 129.63 (2CH), 129.31 (CH), 129.17 (CH), 129.13 (2CH), 128.49 (CH), 127.40 (CH), 123.45 (CH), 121.62 (CH), 121.60 (CH), 120.67 (CH), 114.10 (2CH), 114.07 (2CH), 55.28 (CH₃), 55.26 (CH₃), 38.34 (CH₂), 33.65 (CH₂); HR ESMS m/z 292.0956 [M-Na]⁺. Calc. for C₁₆H₁₅NO₃ 292.0950.

9.1.4.4. 3-(3-(4-Methoxyphenyl)propyl)aniline, C.19

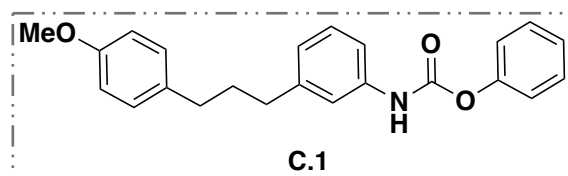
A solution of (*E/Z*)-1-(3-(4-methoxyphenyl)prop-1-en-1-yl)-3-nitrobenzene **C.18** (860 mg, 3.19 mmol) in AcOEt (19 mL) was added to a mixture of Pd/C (10%, 172 mg) in AcOEt (3.5 mL). The resulting mixture was stirred overnight under H₂ atmosphere and then filtered through Celite yielding 602 mg (78 %) of compound **C.19** as a brown oil.



3-(3-(4-Methoxyphenyl)propyl)aniline, C.19: Yield 78 %; brown oil; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.12 (d, $J = 8.8$ Hz, 2H), 7.10 – 7.05 (m, 1H), 6.85 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.62 (d, $J = 7.8$ Hz, 1H), 6.57 – 6.52 (m, 2H), 3.81 (s, 3H), 3.52 (s, 2H), 2.64 – 2.52 (m, 4H), 1.98 – 1.85 (m, 2H).; ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 157.64 (C), 146.30 (C), 143.56 (C), 134.40 (C), 129.23 (2CH), 129.09 (CH), 118.77 (CH), 115.22 (CH), 113.66 (2CH), 112.57 (CH), 55.16 (CH₃), 35.30 (CH₂), 34.46 (CH₂), 32.93 (CH₂); HR ESMS m/z 242.1540 [M-H]⁺. Calc. for C₁₆H₁₉NO 242.1545.

9.1.4.5. Phenyl (3-(3-(4-methoxybenzyl)oxy)phenyl)carbamate, C.1

A solution of 3-(3-(4-methoxyphenyl)propyl)aniline **C.19** (361 mg, 1.5 mmol) in dry THF (7.5 mL) was cooled at 0 °C and then anhydrous pyridine (301 μL , 3.74 mmol) and phenyl chloroformate **C.20** (291 μL , 2.25 mmol) were added. The resulting mixture was stirred under nitrogen atmosphere for 20 min at 0°C and at room temperature for 1 h. Then, water (7.5 mL) and 1M aqueous HCl (3.75 mL) were added and the mixture was extracted with CH_2Cl_2 (3 x 20 mL). The combined organic phases were washed with brine and dried over Na_2SO_4 . The solvent was removed *in vacuo* and the residue was purified on silica gel chromatography using Hexane:AcOEt (9:1) as eluent yielding 384 mg (71 %) of carbamate **C.1** as a white solid.

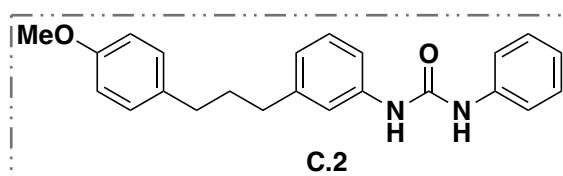


Phenyl (3-(3-(4-methoxyphenyl)propyl)phenyl)carbamate, C.1: Yield 71 %; white solid; m.p. 89-91 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.37 – 7.29 (m, 2H), 7.26 (s, 1H), 7.22 – 7.10 (m, 5H), 7.03 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.96 – 6.83 (m, 2H), 6.77 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 3.72 (s, 3H), 2.61 – 2.48 (m, 4H), 1.86 (tt, $J = 9.1, 6.9$ Hz, 2H).; ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 157.69 (C), 151.63 (C), 150.56 (C), 143.60 (C), 137.31 (C), 134.21 (C), 129.35 (2CH), 129.27 (2CH), 128.96 (CH), 125.63 (CH), 124.08 (CH), 121.62 (2CH), 118.78 (CH), 116.18

(CH), 113.72 (2CH), 55.21 (CH₃), 35.32 (CH₂), 34.44 (CH₂), 33.00 (CH₂).; IR ν_{max} (cm⁻¹) 3296 (N-H), 1706 (C=O), 1545 (N-H amide), 1202, 1172, 1028 (C-O).; HR ESMS m/z 384.1579 [M-Na]⁺. Calc. for C₂₃H₂₃NO₃ 384.1576.

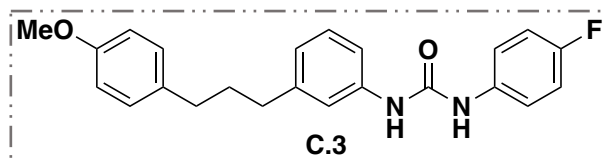
9.1.4.6. Synthesis of benzylethylenearyl-ureas, C.2–C.14.

A solution of the corresponding aniline (**C.21–C.33**) (1.0 mmol) dissolved in dry THF (5.0 mL) was slowly dripped into a stirred solution of triphosgene (303 mg, 1.0 mmol) in dry THF (5.0 mL). Then, Et₃N (279 μ L, 2.0 mmol) was slowly added to the reaction mixture and the resulting mixture was stirred at room temperature for 1 h and then refluxed for 5 h under nitrogen atmosphere. After this time, the reaction mixture was cooled to room temperature and the solid was filtered-off. After evaporation of the solvent *in vacuo*, the residue was taken up in dry THF (5.0 mL) and a THF solution (5.0 mL) of 3-(3-(4-methoxyphenyl)propyl)aniline, **C.19** (241 mg, 1.0 mmol) was directly added followed by Et₃N (139 μ L, 1.0 mmol) addition. The resulting mixture was refluxed under nitrogen atmosphere overnight. Then, solvent was removed *in vacuo* and AcOEt (20 mL) was added. The organic phase was washed with aqueous HCl 10 % (2 x 20 mL) and brine and dried over Na₂SO₄. Then, the solvent was removed *in vacuo* and the residue was recrystallized from acetonitrile and dried under vacuum to give ureas **C.2–C.14** as white solids (34-92 %).



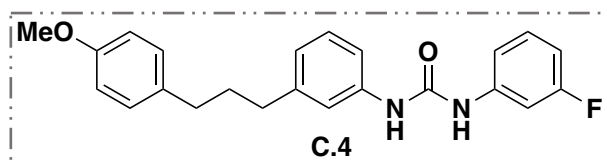
1-(3-(3-(4-Methoxyphenyl)propyl)phenyl)-3-phenylurea, C.2: Yield 52 %; white solid; m.p. 157-159 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO); δ 8.60 (s, 1H), 8.57 (s, 1H), 7.45 (dd, J = 8.6, 1.1 Hz, 2H), 7.32 (d, J = 1.7 Hz, 1H), 7.30 – 7.21 (m, 3H), 7.17 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.12 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.00 – 6.92 (m, 1H), 6.84 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.80 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 2.54 (dd, J = 13.4, 5.7 Hz, 4H), 1.84 (dq, J = 15.3, 7.7 Hz, 2H).; ¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ 157.34 (C), 152.48 (C), 142.55 (C), 139.68 (C), 139.62 (C), 133.74 (C), 129.14 (2CH), 128.71 (2CH), 128.61 (CH), 121.85 (CH), 121.72 (CH), 118.14 (2CH), 118.02 (CH), 115.68 (CH), 113.67 (2CH), 54.91 (CH₃), 34.74 (CH₂), 33.77 (CH₂), 32.82 (CH₂).; IR ν_{max} (cm⁻¹) 3299 (N-H), 1643 (C=O),

1554 (N-H amide), 1446 (N-C=O), 1242,1041 (C-O).; HR ESMS m/z 383.1728 [M-Na]⁺. Calc. for C₂₃H₂₄N₂O₂ 383.1736.



1-(4-Fluorophenyl)-3-(3-(3-(4-methoxyphenyl)propyl)phenyl)urea, C.3:

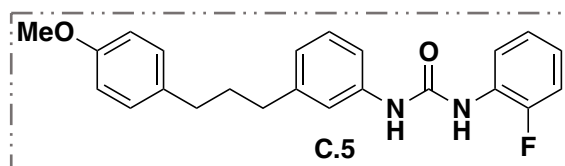
Yield 91 %; white solid; m.p. 181-183 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO); δ 8.63 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 7.45 (dd, J = 9.2, 4.9 Hz, 2H), 7.31 (t, J = 1.7 Hz, 1H), 7.25 – 7.20 (m, 1H), 7.17 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.14 – 7.05 (m, 4H), 6.87 – 6.82 (m, 2H), 6.80 (d, J = 7.4 Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 2.57 – 2.52 (m, 4H), 1.89 – 1.76 (m, 2H).; ¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ 157.86 (s), 157.80 (C, J = 238.0 Hz), 153.10 (C), 143.06 (C), 140.11 (C), 136.55 (C), 134.26 (C), 129.66 (2CH), 129.12 (CH), 122.40 (CH), 120.43 (2CH, d, J = 7.7 Hz), 118.60 (CH), 116.26 (CH), 115.71 (2CH, d, J = 22.2 Hz), 114.19 (2CH), 55.43 (CH₃), 35.25 (CH₂), 34.29 (CH₂), 33.33 (CH₂).; ¹⁹F NMR (377 MHz, DMSO) δ -121.58; IR ν_{\max} (cm⁻¹) 3292 (N-H), 1637 (C=O), 1561 (N-H amide), 1508 (N-C=O), 1212, 1041 (C-O).; HR ESMS m/z 401.1636 [M-Na]⁺. Calc. for C₂₃H₂₃N₂O₂F 401.1642.



1-(3-Fluorophenyl)-3-(3-(3-(4-methoxyphenyl)propyl)phenyl)urea, C.4:

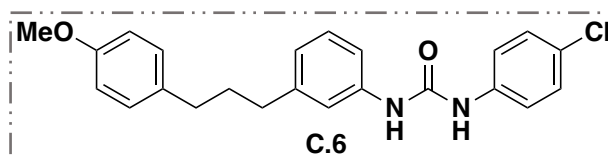
Yield 88 %; white solid; m.p. 154 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO); δ 8.87 (s, 1H), 8.67 (s, 1H), 7.49 (dt, J = 12.1, 2.3 Hz, 1H), 7.32 (t, J = 2.0 Hz, 1H), 7.31 – 7.26 (m, 1H), 7.23 (tt, J = 4.5, 2.2 Hz, 1H), 7.18 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.12 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.11 – 7.07 (m, 1H), 6.84 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.83 – 6.80 (m, 1H), 6.80 – 6.72 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 2.55 (t, J = 7.6 Hz, 4H), 1.90 – 1.77 (m, 2H).; ¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ 162.37 (C, J = 240.7 Hz), 157.35 (C), 152.34 (C), 142.59 (C), 141.60 (C, d, J = 11.4 Hz), 139.34 (C), 133.74 (C), 130.22 (CH, d, J = 9.8 Hz), 129.15 (2CH), 128.64 (CH), 122.11 (CH), 118.20 (CH), 115.87 (CH), 113.85 (CH, d, J = 2.6 Hz), 113.67 (2CH), 108.01 (CH, d, J = 21.4 Hz), 104.79 (CH, d, J = 26.5 Hz), 54.91 (CH₃), 34.72 (CH₂), 33.77 (CH₂), 32.81 (CH₂).; ¹⁹F NMR (377 MHz, DMSO) δ -112.31; IR ν_{\max} (cm⁻¹) 3292 (N-H), 1640 (C=O), 1554 (N-H amide), 1508 (N-C=O),

1245, 1143, 1035 (C-O).; HR ESMS m/z 401.1640 [M-Na]⁺. Calc. for C₂₃H₂₃N₂O₂F 401.1642.



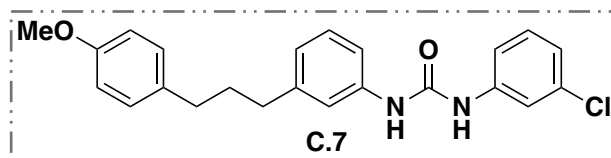
1-(2-Fluorophenyl)-3-(3-(3-(4-methoxyphenyl)propyl)phenyl)urea, C.5:

Yield 92 %; white solid; m.p. 152 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO); δ 9.00 (s, 1H), 8.49 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 8.15 (td, J = 8.3, 1.7 Hz, 1H), 7.32 (t, J = 1.7 Hz, 1H), 7.27 – 7.21 (m, 2H), 7.20 – 7.14 (m, 2H), 7.12 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 7.04 – 6.95 (m, 1H), 6.84 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.82 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 2.60 – 2.52 (m, 4H), 1.90 – 1.76 (m, 2H).; ¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ 157.35 (C), 152.14 (C), 151.96 (C, d, J = 241.1 Hz), 142.68 (C), 139.36 (C), 133.75 (C), 129.15 (2CH), 128.72 (CH), 127.54 (d, J = 10.3 Hz), 124.44 (s), 122.35 (d, J = 7.5 Hz), 122.12 (s), 120.54 (C), 117.94 (CH), 115.61 (CH), 114.89 (CH, d, J = 19.1 Hz), 113.68 (2CH), 54.92 (CH₃), 34.73 (CH₂), 33.77 (CH₂), 32.81 (CH₂).; IR ν_{\max} (cm⁻¹) 3302 (N-H), 1647 (C=O), 1554 (N-H amide), 1508 (N-C=O), 1238, 1196, 1047 (C-O).; HR ESMS m/z 401.1639 [M-Na]⁺. Calc. for C₂₃H₂₃N₂O₂F 401.1641.



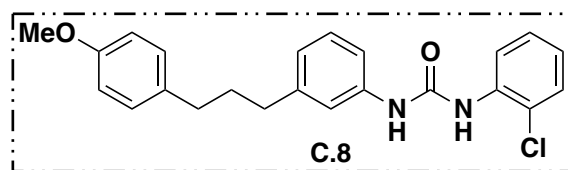
1-(4-Chlorophenyl)-3-(3-(3-(4-methoxyphenyl)propyl)phenyl)urea, C.6:

Yield 66 %; white solid; m.p. 179-182 °C; ¹H NMR (400 MHz, DMSO); δ 8.75 (s, 1H), 8.61 (s, 1H), 7.48 (d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.34 – 7.28 (m, 3H), 7.25 – 7.21 (m, 1H), 7.18 (t, J = 7.7 Hz, 1H), 7.12 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.84 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 6.83 – 6.79 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 2.55 (t, J = 7.7 Hz, 4H), 1.89 – 1.78 (m, 2H).; ¹³C NMR (100 MHz, DMSO) δ 157.34(C), 152.38 (C), 142.57(C), 139.43(C), 138.70 (C), 133.74 (C), 129.14 (2CH), 128.62 (C), 128.54 (2CH), 122.54(CH), 122.03 (CH), 119.67 (2CH), 118.15 (CH), 115.81 (CH), 113.67 (2CH), 54.91 (CH₃), 34.71 (CH₂), 33.76 (CH₂), 32.80 (CH₂).; IR ν_{\max} (cm⁻¹) 3289 (N-H), 1637 (C=O), 1558 (N-H amide), 1505 (N-C=O), 1244, 1044 (C-O).; HR ESMS m/z 417.1339 [M-Na]⁺. Calc. for C₂₃H₂₃N₂O₂Cl 417.1346.



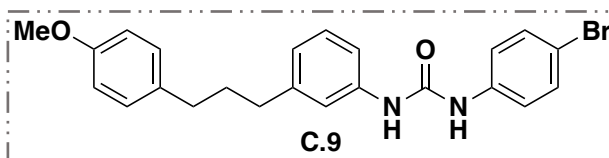
1-(3-Chlorophenyl)-3-(3-(3-(4-methoxyphenyl)propyl)phenyl)urea, C.7:

Yield 69 %; white solid; m.p. 143-147 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO); δ 8.83 (s, 1H), 8.66 (s, 1H), 7.72 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.33 (t, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.32 – 7.27 (m, 1H), 7.27 – 7.22 (m, 2H), 7.22 – 7.16 (m, 1H), 7.13 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.01 (ddd, $J = 7.6, 2.1, 1.4$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.84 – 6.79 (m, 1H), 3.73 (s, 3H), 2.55 (t, $J = 7.6$ Hz, 4H), 1.91 – 1.77 (m, 2H).; ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 157.87 (C), 152.85 (C), 143.11 (C), 141.80 (C), 139.85 (C), 134.25 (C), 133.67 (C), 130.83 (CH), 129.67 (2CH), 129.15 (CH), 122.65 (CH), 121.85 (CH), 118.75 (CH), 118.01 (CH), 117.09 (CH), 116.41 (CH), 114.19 (2CH), 55.43 (CH₃), 35.24 (CH₂), 34.29 (CH₂), 33.33 (CH₂).; IR ν_{max} (cm⁻¹) 3299 (N-H), 1637 (C=O), 1547 (N-H amide), 1511 (N-C=O), 1244, 1035 (C-O).; HR ESMS m/z 417.1341 [M-Na]⁺. Calc. for C₂₃H₂₃N₂O₂Cl 417.1346.



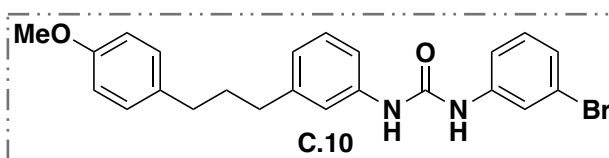
1-(2-Chlorophenyl)-3-(3-(3-(4-methoxyphenyl)propyl)phenyl)urea, C.8:

Yield 92 %; white solid; m.p. 134-136 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO); δ 9.34 (s, 1H), 8.26 (s, 1H), 8.16 (dd, $J = 8.3, 1.5$ Hz, 1H), 7.45 (dd, $J = 8.0, 1.4$ Hz, 1H), 7.33 (t, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.32 – 7.27 (m, 1H), 7.27 – 7.23 (m, 1H), 7.20 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.12 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 7.02 (ddd, $J = 8.0, 7.4, 1.6$ Hz, 1H), 6.85 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H), 6.83 – 6.81 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 2.55 (td, $J = 7.8, 4.0$ Hz, 4H), 1.91 – 1.76 (m, 2H).; ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 157.35 (C), 152.07 (C), 142.66 (C), 139.37 (C), 135.96 (C), 133.73 (C), 129.14 (3CH), 128.73 (CH), 127.50 (CH), 123.19 (CH), 122.18 (CH), 121.83 (C), 121.26 (CH), 118.02 (CH), 115.68 (CH), 113.68 (2CH), 54.91 (CH₃), 34.72 (CH₂), 33.76 (CH₂), 32.80 (CH₂).; IR ν_{max} (cm⁻¹) 3266 (N-H), 1647 (C=O), 1561 (N-H amide), 1508 (N-C=O), 1249, 1041 (C-O).; HR ESMS m/z 417.1340 [M-Na]⁺. Calc. for C₂₃H₂₃N₂O₂Cl 417.1346.



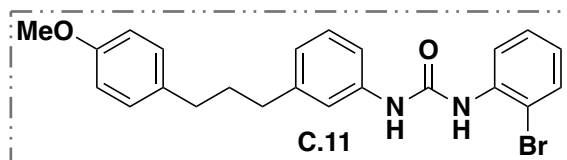
1-(4-Bromophenyl)-3-(3-(3-(4-methoxyphenyl)propyl)phenyl)urea, C.9:

Yield 51 %; white solid; m.p. 191-196 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO); δ 8.75 (s, 1H), 8.61 (s, 1H), 7.43 (s, 4H), 7.31 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.25 – 7.20 (m, 1H), 7.18 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.12 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.84 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.81 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 2.54 (dd, $J = 13.0, 5.2$ Hz, 4H), 1.91 – 1.76 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 156.29 (C), 151.29 (C), 141.52 (C), 138.36 (C), 138.09 (C), 132.69 (C), 130.39 (2CH), 128.09 (2CH), 127.58 (CH), 121.00 (CH), 119.03 (2CH), 117.11 (CH), 114.77 (CH), 112.62 (2CH), 112.04 (C), 53.86 (CH₃), 33.67 (CH₂), 32.72 (CH₂), 31.75 (CH₂); IR ν_{max} (cm⁻¹) 3296 (N-H), 1640 (C=O), 1548 (N-H amide), 1508 (N-C=O), 1244, 1041 (C-O); HR ESMS m/z 461.0838 [M-Na]⁺. Calc. for C₂₃H₂₃N₂O₂Br 461.0841.



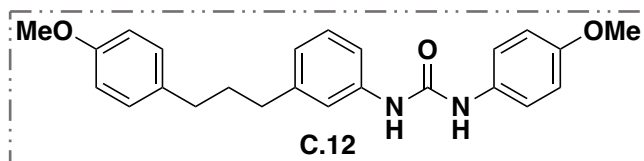
1-(3-Bromophenyl)-3-(3-(3-(4-methoxyphenyl)propyl)phenyl)urea, C.10:

Yield 34 %; white solid; m.p. 141-144 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO); δ 8.81 (s, 1H), 8.65 (s, 1H), 7.86 (t, $J = 1.9$ Hz, 1H), 7.32 (t, $J = 1.5$ Hz, 1H), 7.29 (dd, $J = 8.2, 2.0$ Hz, 1H), 7.26 – 7.22 (m, 1H), 7.22 – 7.20 (m, 1H), 7.20 – 7.16 (m, 1H), 7.16 – 7.13 (m, 1H), 7.12 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.84 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.81 (s, 1H), 3.72 (s, 3H), 2.55 (t, $J = 7.6$ Hz, 4H), 1.90 – 1.78 (m, 2H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 157.34 (C), 152.31 (C), 142.59 (C), 141.41 (C), 139.31 (C), 133.73 (C), 130.62 (CH), 129.15 (2CH), 128.63 (CH), 124.24 (CH), 122.14 (CH), 121.67 (C), 120.34 (CH), 118.24 (CH), 116.97 (CH), 115.89 (CH), 113.67 (2CH), 54.91 (CH₃), 34.72 (CH₂), 33.76 (CH₂), 32.81 (CH₂); IR ν_{max} (cm⁻¹) 3296 (N-H), 1637 (C=O), 1554 (N-H amide), 1508 (N-C=O), 1244, 1037 (C-O); HR ESMS m/z 461.0839 [M-Na]⁺. Calc. for C₂₃H₂₃N₂O₂Br 461.0841.



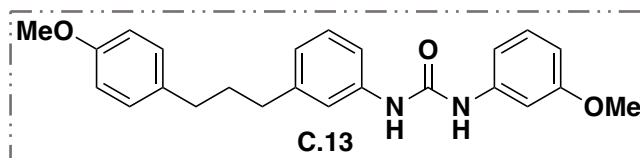
1-(2-Bromophenyl)-3-(3-(3-(4-methoxyphenyl)propyl)phenyl)urea, C.11:

Yield 64 %; white solid; m.p. 137-140 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO); δ 9.40 (s, 1H), 8.09 (s, 1H), 8.07 (dd, $J = 8.3, 1.6$ Hz, 1H), 7.61 (dd, $J = 8.0, 1.5$ Hz, 1H), 7.37 – 7.30 (m, 2H), 7.29 – 7.23 (m, 1H), 7.20 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.12 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.97 (ddd, $J = 8.0, 7.4, 1.6$ Hz, 1H), 6.84 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.83 – 6.80 (m, 1H), 3.72 (s, 3H), 2.55 (td, $J = 7.9, 3.6$ Hz, 4H), 1.91 – 1.78 (m, 2H).; ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 157.34 (C), 152.12 (C), 142.65 (C), 139.41 (C), 137.07 (C), 133.73 (C), 132.41 (CH), 129.14 (2CH), 128.71 (CH), 127.99 (CH), 123.95 (CH), 122.17 (2CH), 118.05 (CH), 115.70 (CH), 113.67 (2CH), 112.95 (C), 54.91 (CH₃), 34.72 (CH₂), 33.76 (CH₂), 32.80 (CH₂).; IR ν_{max} (cm⁻¹) 3270 (N-H), 1643 (C=O), 1558 (N-H amide), 1508 (N-C=O), 1249, 1041 (C-O).; HR ESMS m/z 461.0842 [M-Na]⁺. Calc. for C₂₃H₂₃N₂O₂Br 461.0841.



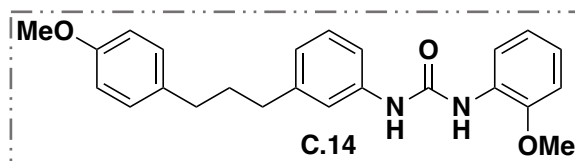
1-(4-Methoxyphenyl)-3-(3-(3-(4-methoxyphenyl)propyl)phenyl)urea,

C.12: Yield 34 %; white solid; m.p. 181-183 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO); δ 8.48 (s, 1H), 8.40 (s, 1H), 7.34 (d, $J = 9.1$ Hz, 2H), 7.30 (t, $J = 1.7$ Hz, 1H), 7.25 – 7.20 (m, 1H), 7.19 – 7.14 (m, 1H), 7.12 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.86 (d, $J = 9.0$ Hz, 3H), 6.84 (d, $J = 8.6$ Hz, 3H), 6.78 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 3.72 (s, 3H), 3.71 (s, 3H), 2.59 – 2.52 (m, 4H), 1.88 – 1.77 (m, 2H).; ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 154.42 (C), 152.68 (C), 142.50 (C), 139.81 (C), 133.75 (C), 132.70 (C), 129.14 (2CH), 128.57 (CH), 121.65 (CH), 119.97 (2CH), 117.92 (CH), 115.58 (CH), 113.94 (2CH), 113.67 (2CH), 55.14 (CH₃), 54.91 (CH₃), 34.74 (CH₂), 33.77 (CH₂), 32.82 (CH₂).; IR ν_{max} (cm⁻¹) 3289 (N-H), 1633 (C=O), 1554 (N-H amide), 1508 (N-C=O), 1238, 1179, 1021 (C-O).; HR ESMS m/z 391.2024 [M-H]⁺. Calc. for C₂₄H₂₆N₂O₃ 391.2022.



1-(3-Methoxyphenyl)-3-(3-(3-(4-methoxyphenyl)propyl)phenyl)urea,

C.13: Yield 90 %; white solid; m.p. 107-110 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8.62 (s, 1H), 8.56 (s, 1H), 7.31 (t, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.26 – 7.20 (m, 1H), 7.20 – 7.14 (m, 3H), 7.12 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.92 (dd, $J = 8.1, 1.9$ Hz, 1H), 6.84 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.81 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H), 6.54 (ddd, $J = 8.2, 2.5, 0.8$ Hz, 1H), 3.73 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 2.58 – 2.52 (m, 4H), 1.84 (dq, $J = 15.3, 7.7$ Hz, 2H).; ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 159.67 (C), 157.34 (C), 152.41 (C), 142.57 (C), 140.92 (C), 139.55 (C), 133.74 (C), 129.46 (CH), 129.14 (2CH), 128.61 (CH), 121.90 (CH), 118.05 (CH), 115.72 (CH), 113.67 (2CH), 110.45 (CH), 107.20 (CH), 103.88 (CH), 54.91 (CH₃), 54.89 (CH₃), 34.74 (CH₂), 33.77 (CH₂), 32.83 (CH₂).; IR ν_{max} (cm⁻¹) 3282 (N-H), 1640 (C=O), 1551 (N-H amide), 1508 (N-C=O), 1241, 1153, 1038 (C-O).; HR ESMS m/z 391.2024 [M-H]⁺. Calc. for C₂₄H₂₆N₂O₃ 391.2022.



1-(2-Methoxyphenyl)-3-(3-(3-(4-methoxyphenyl)propyl)phenyl)urea,

C.14: Yield 78 %; white solid; m.p. 82-85 °C; ^1H NMR (400 MHz, DMSO) δ 9.24 (s, 1H), 8.19 (s, 1H), 8.14 (dd, $J = 7.8, 1.8$ Hz, 1H), 7.33 (t, $J = 1.6$ Hz, 1H), 7.27 – 7.22 (m, 1H), 7.18 (t, $J = 7.7$ Hz, 1H), 7.12 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H), 7.01 (dd, $J = 8.0, 1.6$ Hz, 1H), 6.94 (td, $J = 7.7, 1.8$ Hz, 1H), 6.88 (td, $J = 8.1, 2.1$ Hz, 1H), 6.84 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H), 6.80 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.72 (s, 3H), 2.55 (t, $J = 7.6$ Hz, 4H), 1.90 – 1.76 (m, 2H).; ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO) δ 157.34 (C), 152.35 (C), 147.59 (C), 142.58 (C), 139.79 (C), 133.75 (C), 129.14 (2CH), 128.70 (C), 128.65 (CH), 121.77 (CH), 121.67 (CH), 120.50 (CH), 118.25 (CH), 117.76 (CH), 115.42 (CH), 113.67 (2CH), 110.68 (CH), 55.73 (CH₃), 54.90 (CH₃), 34.76 (CH₂), 33.78 (CH₂), 32.82 (CH₂).; IR ν_{max} (cm⁻¹) 3302 (N-H), 1647 (C=O), 1541 (N-H amide), 1515 (N-C=O), 1244, 1218, 1172, 1021 (C-O).; HR ESMS m/z 391.2015 [M-H]⁺. Calc. for C₂₄H₂₆N₂O₃ 391.2022.

9.2. Biological evaluation

9.2.1. Cell culture

Cell culture media were purchased from Gibco (Grand Island, NY). Fetal bovine serum (FBS) was obtained from Harlan-Seralab (Belton, U.K.). Supplements and other chemicals not listed in this section were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Plastics for cell culture were supplied by Thermo Scientific BioLite. For tube formation assay, an IBIDI μ -slide angiogenesis (IBIDI, Martinsried, Germany) were used. All tested compounds were dissolved in DMSO at a concentration of 10 mM and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until use.

HT-29, MCF-7, A549, HEK-293 and Jurkat cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing glucose (1 g/L), glutamine (2 mM), penicillin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), streptomycin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and amphotericin B (1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), supplemented with 10 % FBS. HMEC-1 cell line was maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/Low glucose containing glutamine (2 mM), penicillin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), streptomycin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and amphotericin B (1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$), supplemented with 10 % FBS. For the development of tube, formation assays in Matrigel, HMEC-1 cells were cultured in EGM-2MV Medium supplemented with EGM-2MV SingleQuots.

To carry out the *ex vivo* experiments CD8+ cell line was maintained in Iscove's Modified Dulbecco's media (IMDM) supplemented with 10 % FBS, L-glutamine (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$), Penicillin/streptomycin (10 $\mu\text{L}/\text{mL}$) and β -Mercaptoethanol (50 μM).

9.2.2. Cell viability study by MTT assay

In 96-well plates, 5×10^3 (HT-29, MCF-7, A-549, HMEC-1 and HEK-293) cells per well were incubated with serial dilutions of the tested compounds in a total volume of 100 μL of their respective growth media. The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma Chemical Co.) dye reduction assay in 96-well microplates was used. After 2 days of incubation ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 in a humid atmosphere), 10 μL of MTT (5 mg/mL in phosphate-buffered saline, PBS) was added to each well, and the plate was incubated for a further 3 h ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$). After that, the supernatant was discarded and replaced by 100 μL of DMSO to dissolve formazan crystals. The absorbance was then read at 550 nm by spectrophotometry.

For all concentrations of the compound, cell viability was expressed as the percentage of the ratio between the mean absorbance of treated cells and the mean absorbance of untreated cells. Three independent experiments were performed, and the IC₅₀ values (i.e., concentration half inhibiting cell proliferation) were graphically determined using GraphPad Prism 4 software.

9.2.3. Target proteins relative quantification by Flow Cytometry

To study the effect of the compounds on every biological target in cancer cell lines the compounds were used at their corresponding dose.

For the assay, 10⁵ cells per well were incubated for 24 h with the corresponding dose of the tested compound in a total volume of 500 µL of their growth media.

On the one hand, to detect total PD-L1, c-Myc and VEGFR-2, after the cell treatments, they were collected and fixed with 4 % in PBS paraformaldehyde. After fixation, a treatment with 0,5 % in PBS Triton™ X-100 was performed and finally, cells were stained, depending on the study with Alexa Fluor® 647 Rabbit monoclonal Anti-PD-L1 (ab215251), for PD-L1 study; FITC Mouse monoclonal Anti-c-Myc (ab223913), for c-Myc study; and FITC Mouse monoclonal Anti-Human VEGFR-2 (ab184903), for VEGFR-2 study. Having into account that c-Myc and VEGFR-2 cannot be studied together.

On the other hand, to detect membrane PD-L1 and VEGFR-2, the process was the same avoiding the treatment with 0,5 % in PBS Triton™ X-100 step.

9.2.4. Direct protein interaction by Thermal shift assay, TSA

The TSA assay was performed according to the protocol given in the Protein Thermal Shift™ Dye kit (Applied Biosystems ref. 4461146). 2 µL of an aqueous solution of PD-L1 (ref. ab167713) or c-Myc (ref. ab169901) at 0.1 mg/mL and 1.5 µL of the corresponding product at 0.1 mg/mL were used. Melting curves were recorded using the StepOne™ Real-Time PCR system.

9.2.5. Proteins expression determination by RT-qPCR assay

MCF-7 cells at 70 – 80 % confluence were collected, and 1.5 x10⁵ cells were placed in a six-well plate in 1.5 mL of medium. After 24 h, cells were incubated with the corresponding compounds for 24 h. Cells were collected, and the total cellular RNA from MCF-7 cells was isolated using the Ambion RNA extraction kit according to the manufacturer's instructions. The cDNA

was synthesized by MMLV-RT with 1 – 21 µg of extracted RNA and oligo(dT)₁₅ according to the manufacturer's instructions. Genes were amplified by a thermal cycler and StepOnePlus™ TaqMan® probes. TaqMan® Gene Expression Master Mix Fast containing the appropriate buffer for the amplification conditions, dNTPs, thermostable DNA polymerase enzymes, and a passive reference probe was used. To amplify each of the genes, the predesigned primers sold by Life Technologies TaqMan® Gene Expression Assays, Hs99999903-m1 (β-actin), Hs00153408-m1 (c-Myc), and Hs00204257-m1, (PD-L1) were used.

9.2.6. Fluorescence microscopy

For immunofluorescence microscopy of the microtubule network, 106 cells were plated on the cover glass and incubated with the selected compounds. Cells were then fixed in 4% formaldehyde (in PBS pH 7.4) for 20 min at room temperature and permeabilized with PBS-Triton X-100 0.5% for 1 min at room temperature. Direct immunostaining was carried out for 1 h at room temperature with FITC Mouse monoclonal Anti-c-Myc (ab223913) and Alexa Fluor® 647 Rabbit monoclonal Anti-PD-L1 (ab215251) or with FITC Mouse monoclonal Anti-Human VEGFR-2 (ab184903), depending on the assay. Then, cells were washed in PBS, and cover glasses were mounted with a drop of ProLong® antifade solution (Invitrogen). The cytoskeleton was imaged by a confocal laser scanning microscope (CLSM) Leica SP5 with a Leica inverted microscope, equipped with 20x objective. Each image was recorded with the CLSM's spectral mode selecting specific domains of the emission spectrum. The FITC fluorophore was excited at 488 nm with an argon laser, and its fluorescence emission was collected between 496 nm and 535 nm.

9.2.7. Cell viability evaluation in monoculture and in co-cultures by Flow Cytometry

Firstly, to study the effect of the compounds on the cell viability in monoculture, 10⁵ cancer cell lines per well were seeded and incubated for 24 h, then, the corresponding compound at the corresponding dose or DMSO for the positive control was added. After 24 h of incubation, cancer cells were collected with trypsin. and fixed with 4 % in PBS paraformaldehyde and counted by flow cytometry.

On the other hand, to study the effect of the compounds on the cell viability in co-culture with both JURKAT and THP-1 cells, 10^5 or 2×10^5 of the corresponding cancer cell line per well were seeded and incubated for 24 h then the medium was changed by one cell culture medium supplemented with IFN- γ (10 ng/ml; human, Invitrogen®) and containing 5×10^5 or 10^5 respectively of JURKAT or THP-1 per well and the corresponding compound at the corresponding dose or DMSO for the positive control. After 24 h/ 48 h of incubation, supernatants were collected to determine JURKAT or THP-1 living cells. Besides, stain cancer cells were collected with trypsin. Both types of suspension cells were fixed with 4 % in PBS paraformaldehyde and counted by flow cytometry.

9.2.8. Protein Targets relative quantification by Flow Cytometry in co-cultures

To study the effect of the compounds on every biological target in co-cultured cancer cell lines with JURKAT or THP-1 immune cells, the compounds were incubated under the conditions previously explained (see section 9.2.7).

To detect membrane PD-L1 and VEGFR-2, after the cell treatments, cancer cells were collected, fixed with 4% in PBS paraformaldehyde, and stained with FITC Mouse monoclonal Anti-Human VEGFR-2 (ab184903) and Alexa Fluor® 647 Rabbit monoclonal Anti-PD-L1 (ab215251).

On the other hand, to detect membrane CD11b and CD80, after the cell incubation, JURKAT T cells or THP-1 were collected, fixed with 4 % in PBS paraformaldehyde and stained with FITC Mouse monoclonal Anti-Human CD80 (sigma-aldrich SAB4700142) and Alexa Fluor® 647 Rabbit monoclonal Anti-CD11b (Merck #MABF366).

9.2.9. Proteins and cytokines detection by ELISA test

Media from the monoculture and coculture viability studies previously explained (See section 9.2.7) was collected and keep it for the ELISA Test. IL-6, TNF- α and VEGF were studied following the indications of the corresponding test.

For IL-6 detection, Abcam Human IL-6 SimpleStep ELISA® Kit (ref. Ab 178013) was used. For TNF- α detection, Invitrogen™ Human TNF- α ELISA

Kit (ref. KHC3012) was used and finally, for VEGF detection Invitrogen™ Human VEGF ELISA Kit (ref. KHG0111) was used.

9.2.10. Microvessels formation inhibition and destruction assay

Wells of an IBIDI μ -slide angiogenesis (IBIDI, Martinsried, Germany) were coated with 15 μ L of Matrigel® (10 mg/mL, BD Biosciences) at 4 °C. After gelatinization at 37 °C for 30 min, HMEC-1 cells were seeded at 2×10^4 cells/well in 25 μ L of culture medium on top of the Matrigel and were incubated 30 min at 37 °C while are attached. Then, for antiangiogenic study compounds were added and dissolved in 25 μ L of culture medium and after 24 h of incubation at 37 °C, tube formation was evaluated. On the other hand, for the antivasular effect study, once HMEC-1 cells were seeded plate were incubated for 24 h at 37 °C, at this point, compounds were added and dissolved in 25 μ L of culture medium and after 24 h of incubation at 37 °C, tube destruction was evaluated.

9.2.11. Generation of CTLs cells from OT-1 mice

CD8⁺ cells were obtained from the inguinal, axillary, brachial and mesenteric lymph nodes previously collected from OT-1 mice. Lymph node cells were isolated by mashing through a 70 μ M cell strainer. Cells were resuspended in IMDM cell media at a concentration of 0.3 million cells/mL. N4 ovalbumin peptide was added at a concentration of 10 nM and cells were incubated for 48 h at 5% CO₂, 37 °C. on day 2 from recollection, cells were pelleted at 1300 rpm for 5 minutes and washed with PBS to remove N4 peptide. The cell pellet was resuspended in fresh IMDM media in a new flask in a 0.3 million cells/mL and supplemented with IL-2 at 20 ng/mL. After incubation for a further 48 h (day 4), cells were re-seeded in fresh IMDM media at a concentration of 0.3 million cells/mL supplemented with IL-2 at 20 ng/mL. Cells were cultured for a further 48 h prior to use on day 6 in functional assays.

9.2.12. Ex-vivo study of CTLs exhaustion receptors by flow cytometry

After the generation of CTLs, 5×10^5 of these cells were seeded into individual flasks in a final volume of 2.5 mL, to this, compounds were added in a final concentration of 20 μ M. After 24 h of incubation, the resulting single-cell suspension was washed with PBS twice. The resulting cell pellet was re-suspended in PBS containing Zombie NIR viability dye [1:2000 dilution

(BioLegend)] and incubated at 4 °C for 15 min, then pelleted by centrifugation at 1300 rpm for 5 min at 4 °C. Cells were washed with FACS buffer and pelleted by centrifugation twice. Cell pellets were resuspended in 100 µl of Fc block [1:200 dilution of Fc antibody (eBioscience) in FACS buffer] and incubated for 15 min. Then, 100 µl of antibody mixture [diluted in FACS buffer (antibody details listed in Table 9.1)] was added to each well and the samples were incubated for 20 min in the dark. The cells were then pelleted by centrifugation at 1300 rpm for 5 min at 4 °C and washed twice with FACS buffer as above. Finally, cells were re-suspended in FACS buffer and analyzed using a BD Fortessa. Data analysis was performed using FlowJo software. Statistics and graphs were calculated using Prism (GraphPad).

Table 9.1. Antibody details for the *ex vivo* study of CTLs exhaustion receptors by flow cytometry.

Marker	Fluorophore	Source
CD8	PE	eBioscience
CD45	AF488	eBioscience
CD69	E450	eBioscience
LAG-3	BV711	BD Bioscience
OX40	PerCP/Cy5.5	BioLegend
TIM-3	PE-Dazzle	BioLegend
PD-1	APC	Invitrogen
Viability	Zombie NIR	BioLegend

9.2.13. Effect on proteins implicated in TCR signalling pathway by Immunoblotting

To study the effect of the compounds in the signalling pathway of CTLs, the compound was incubated for 24 h at 20 µM. After this time, cells were collected and washed twice in PBS and lysed in radioimmunoprecipitation assay (RIPA) lysis buffer (50 mM tris-HCl at pH 7.4, 150 mM sodium chloride, 5 mM EGTA, 0.1 % SDS, 1 % NP-40, and 1 % deoxycholate) supplemented with a protease and phosphatase inhibitor cocktail (mini complete ULTRA Protease tablet and phosSTOP tablet from Roche). Lysates were clarified by high-speed centrifugation (17000 rpm for 15min at 4°C). Protein concentration was measured using a Micro BCA Protein Assay (Thermo Scientific), and 10 to 30 µg of total protein were supplemented with 2X SDS sample buffer [tris (pH 6.8), 20 % glycerol, 5 % SDS, b-mercaptoethanol, and

bromophenol blue) and boiled at 95 °C for 5 min. Samples were separated by polyacrylamide gel electrophoresis using 4 to 15 % Mini-PROTEANTGX gels (Bio-Rad), proteins transferred to nitrocellulose, blocked [5 % bovine serumalbumin (BSA) in PBS–Tween 20 (BSA/PBS-T)], and probed with either anti–glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; Cell Signaling Technology), anti-tubulin (Cell Signaling Technology), anti–LCK (Biolegend), anti–phospho-LCK (Y394; Biolegend), anti-phospho-LCK (Y505; Cell Signaling Technology), anti-phospho-FYN (Cell Signaling Technology), anti-ZAP70 (Cell Signaling Technology), anti-phospho-ZAP70 (Cell Signaling Technology), anti-LAT (Cell Signaling Technology) or anti-phospho-LAT (Cell Signaling Technology). Bound Ab was detected by incubation with anti-rabbit and anti-mouse horseradish peroxidase secondary Ab (Cell Signaling Technology) and visualized using the Bio-Rad ChemiDoc MP Imaging System.

**10. PRODUCTIONS DERIVED FROM
THIS DOCTORAL THESIS**

10. PRODUCTIONS DERIVED FROM THIS DOCTORAL THESIS

10.1. Congress Communications

- Oral communication: “Multitarget Inhibitors as anticancer agents with oncoimmunomodulatory Properties” Gil-Edo, R.; Falomir, E.; Carda, M. International Conference on Cancer Biology and Therapeutics, webinar, May **2023**.
- Oral Communication: “Multitarget Inhibitors as Anticancer Agents with Immunomodulatory and Antiangiogenic Properties.” Gil-Edo, R.; Falomir, E.; Carda, M. The 3rd Molecules Medicinal Chemistry Symposium, Shaping Medicinal Chemistry for the New Decade, Rome (Italy), July **2022**.
- Poster: “Design of Multitarget Anticancer Agents with Immunomodulatory Effect.”, Gil-Edo, R.; Falomir, E.; Carda, M. European School of Medicinal Chemistry (XXXX Advanced Course of Medicinal Chemistry and “E.Duranti” National Seminar for PhD students), Virtual edition, July **2021**.
- Poster: “Synthesis and Biological Evaluation of Multitarget Anticancer Agents with Immunomodulatory Effect.”, Gil-Edo, R.; Falomir, E.; Murga, J.; Carda, M.; Marco, J.A. European School of Medicinal Chemistry (XXXIX Advanced Course of Medicinal Chemistry and “E.Duranti” National Seminar for PhD students), Urbino (Italy), July **2019**.

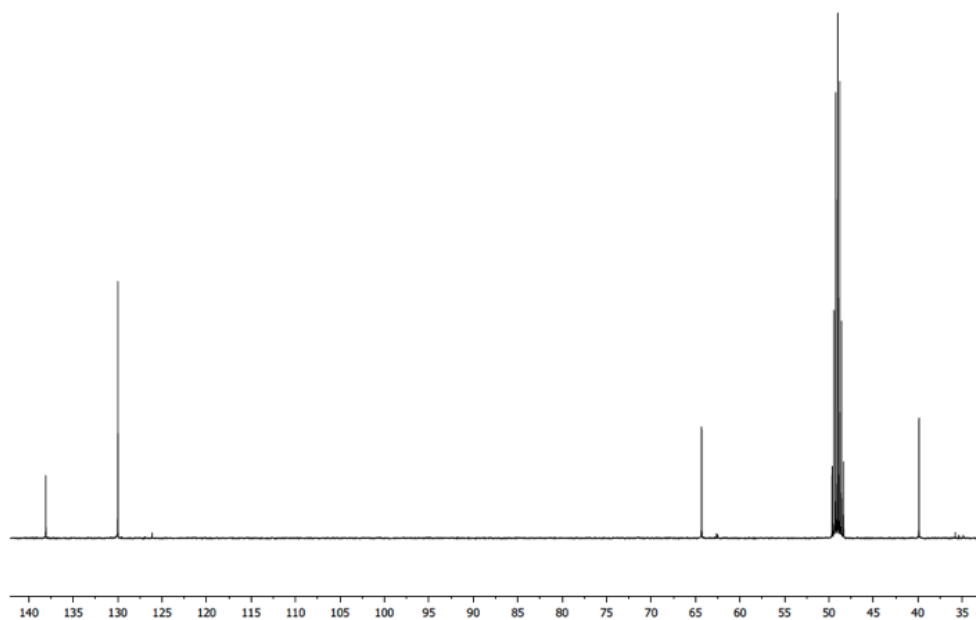
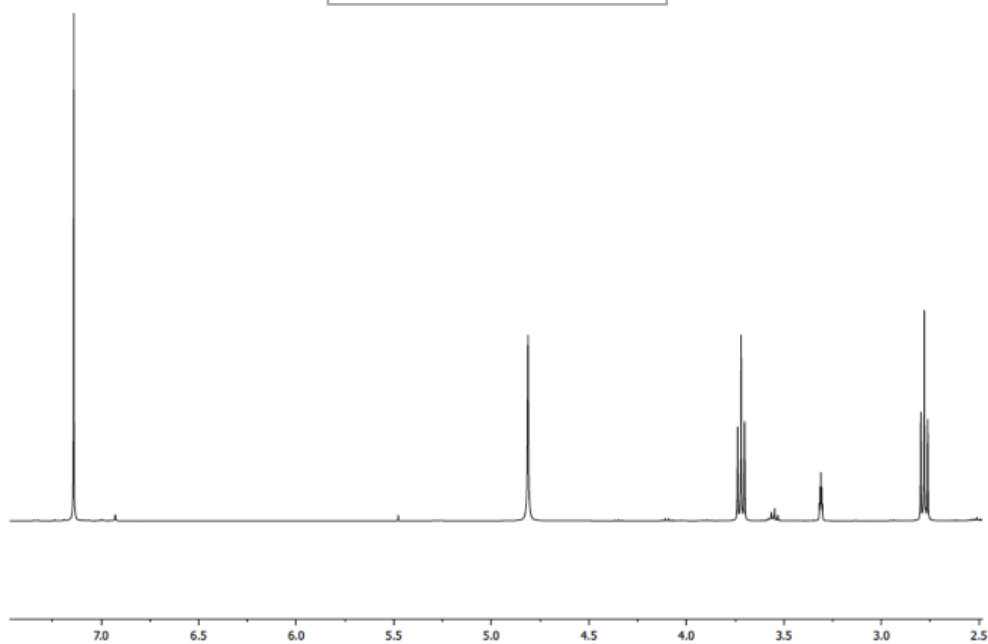
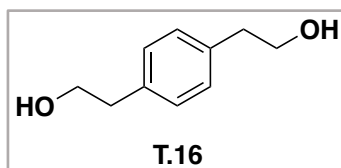
10.2. Publications

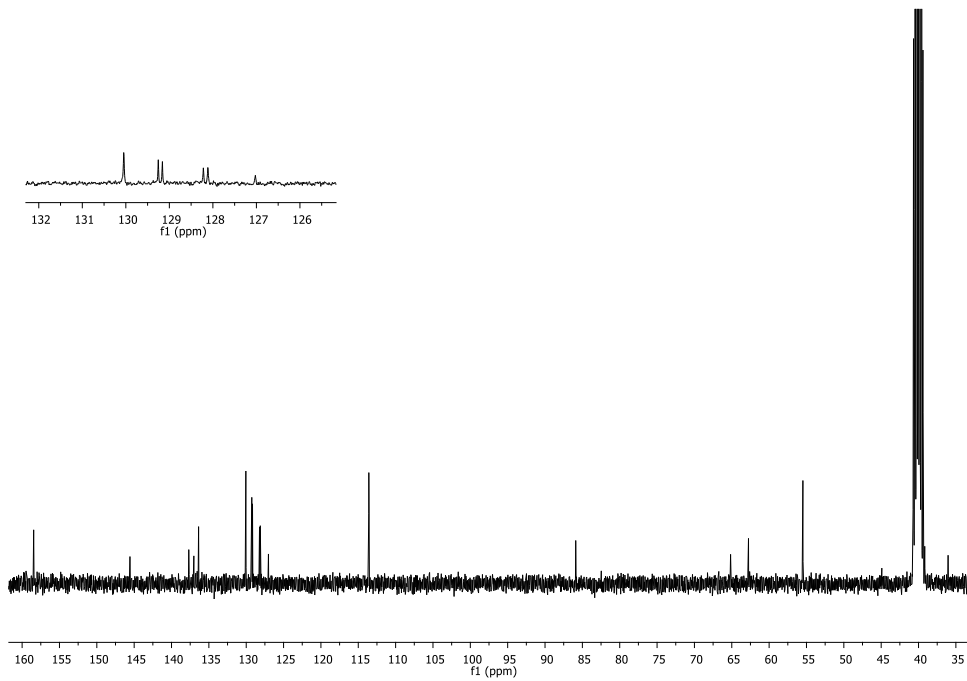
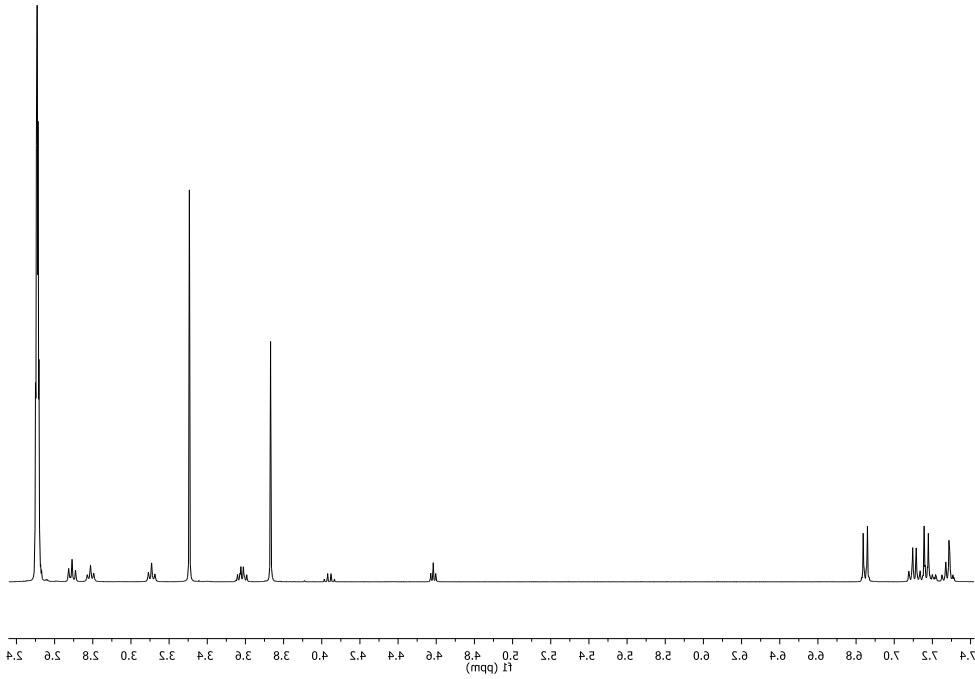
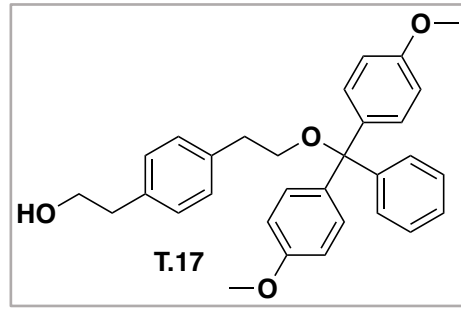
- Gil-Edo, R.; Espejo, S.; Falomir, E.; Carda, M. Synthesis and Biological Evaluation of Potential Oncoimmunomodulator Agents. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, 24, 2614. Doi: 10.3390/ijms24032614.
- Gil-Edo, R.; Hernández-Ribelles, G.; Royo, S.; Thawait, N.; Serrels, A.; Carda, M.; Falomir, E. Exploring BenzylethoxyAryl Urea Scaffolds for Multitarget Immunomodulation Therapies. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, 24, 8582. Doi: 10.3390/ijms24108582.
- Gil-Edo, R.; Royo, S.; Carda, M.; Falomir, E. Unveiling the Potential of BenzylethyleneAryl–Urea Scaffolds for the Design of New Onco Immunomodulating Agents. *Pharmaceuticals*. **2023**, 16, 808. Doi:10.3390/ph16060808.

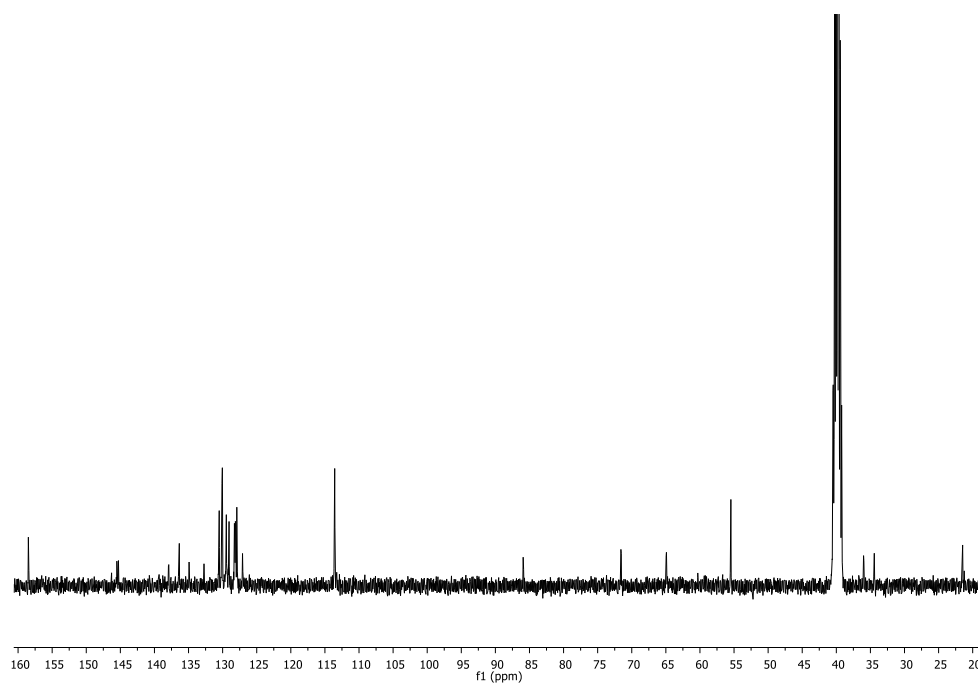
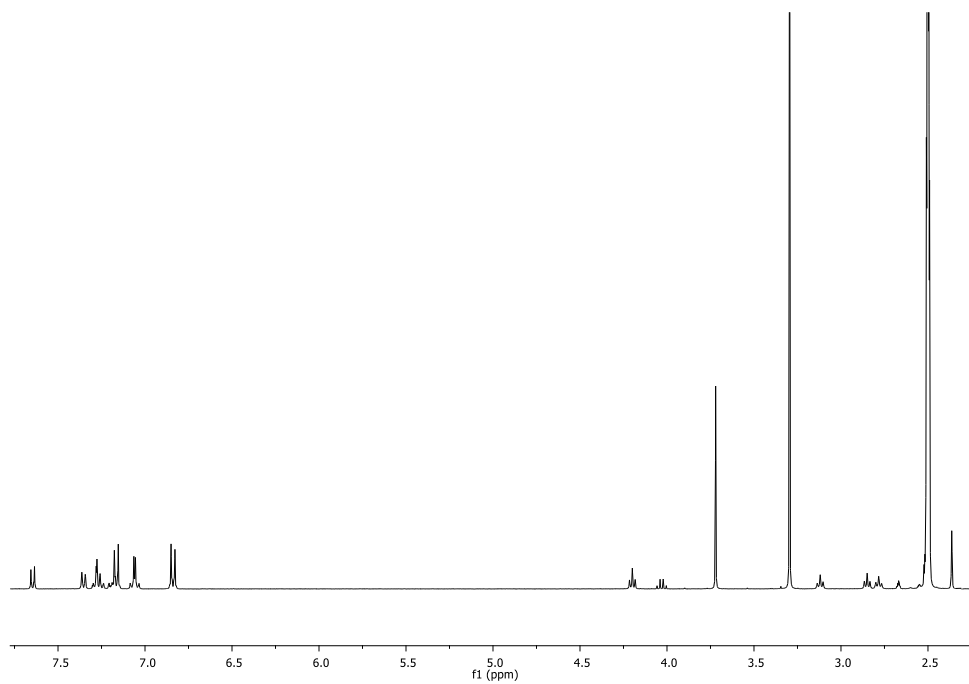
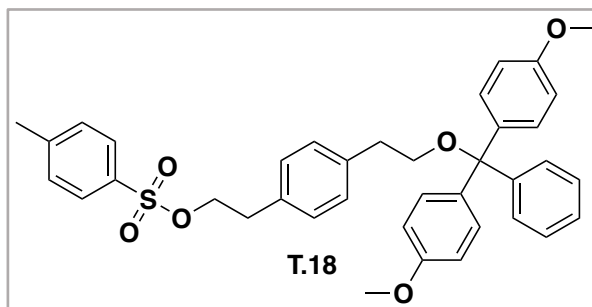
11. SELECTED SPECTRA

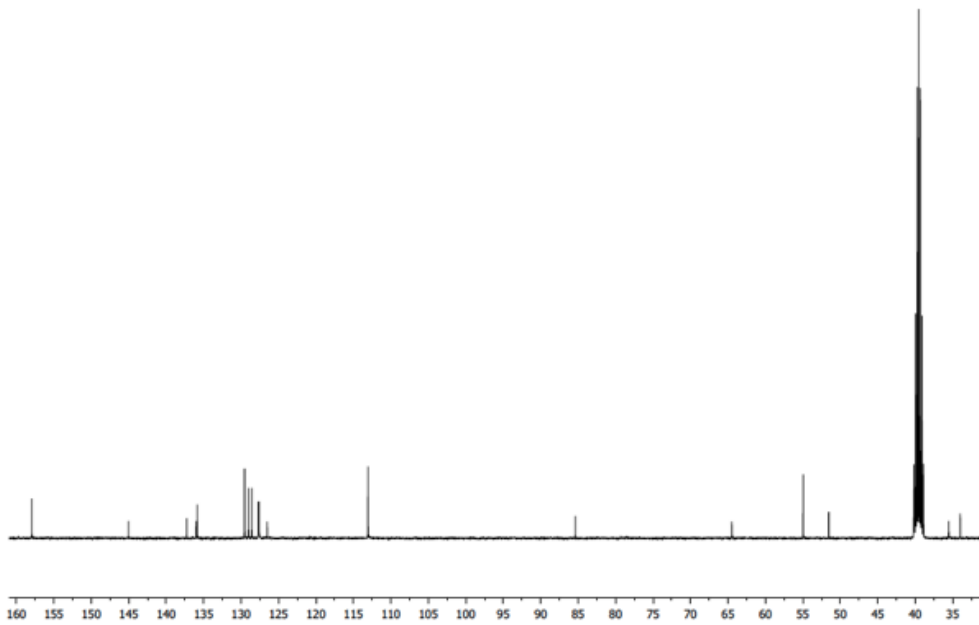
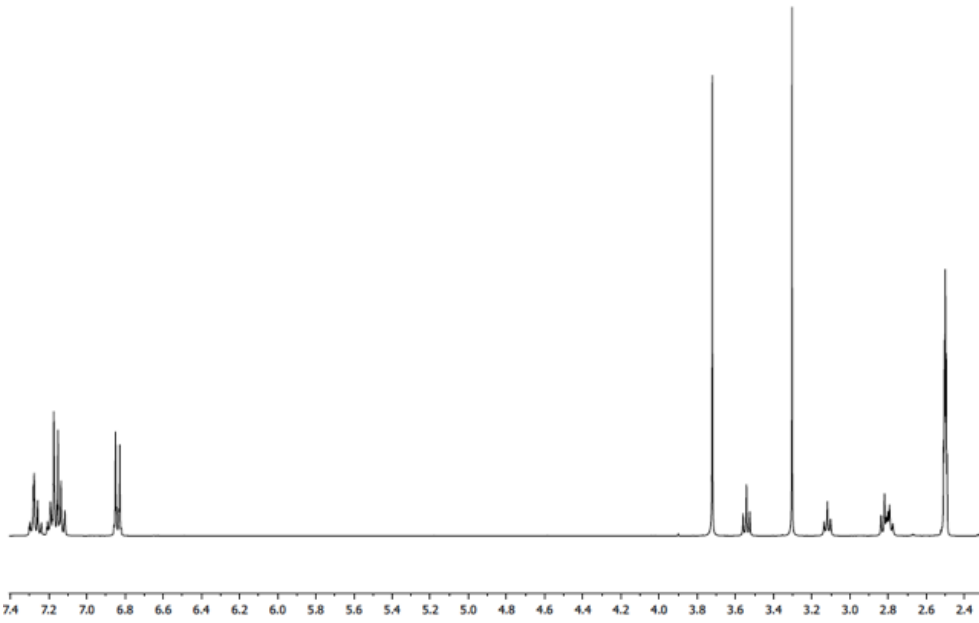
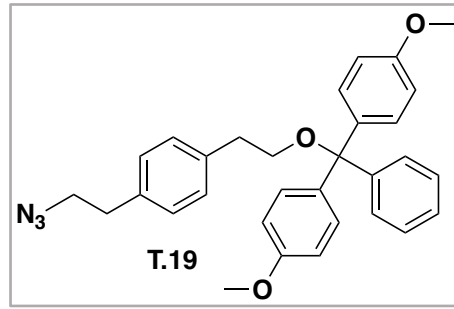
11. SELECTED SPECTRA

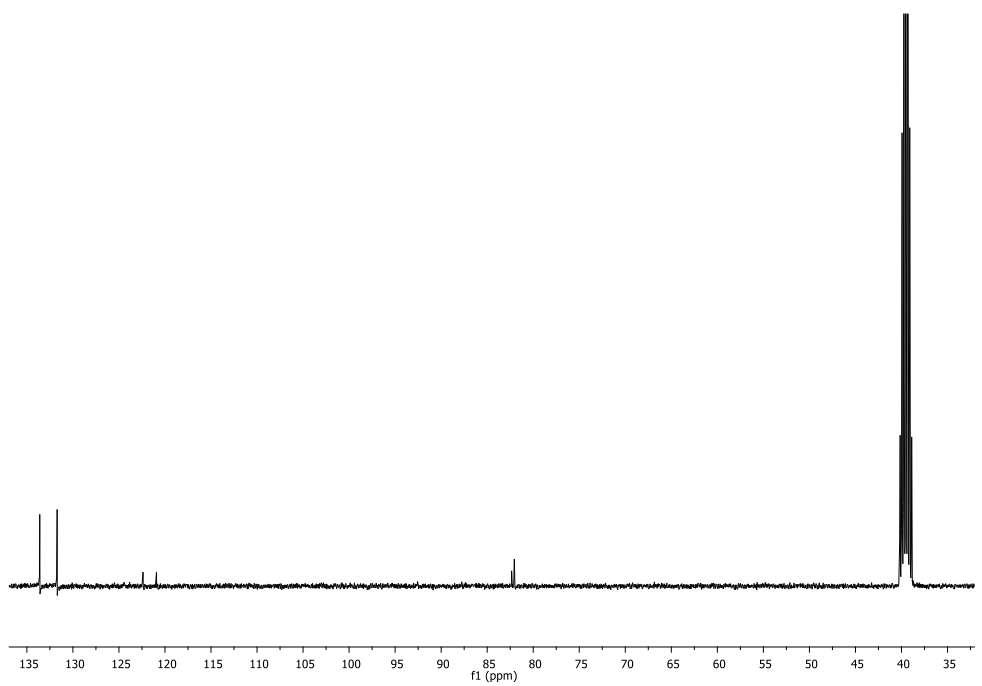
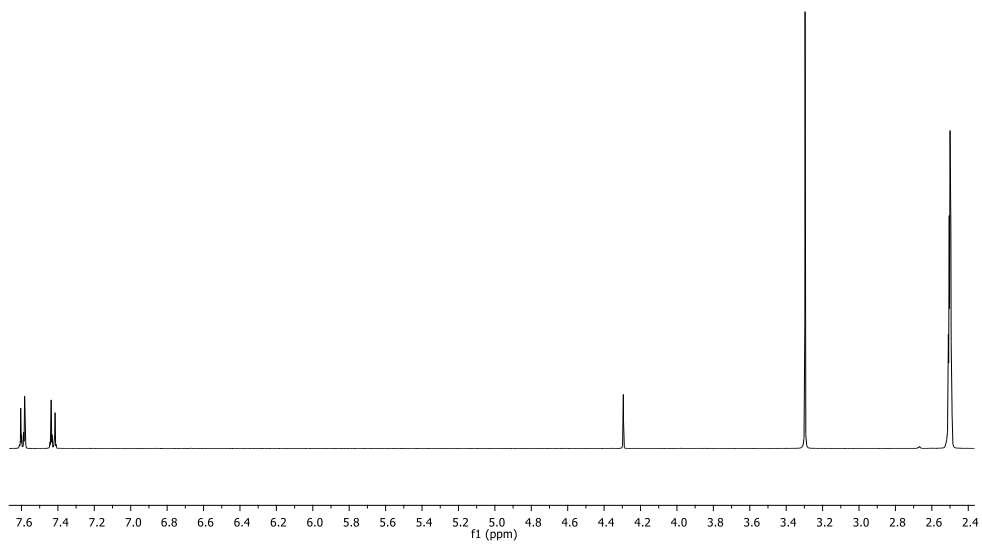
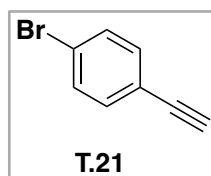
11.1. Triazole derivatives

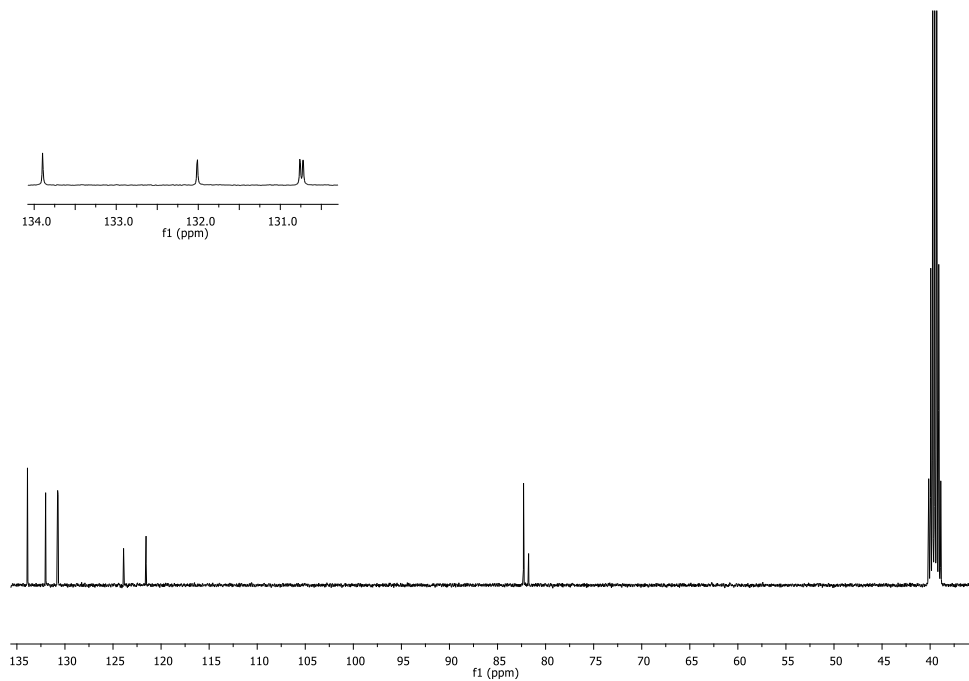
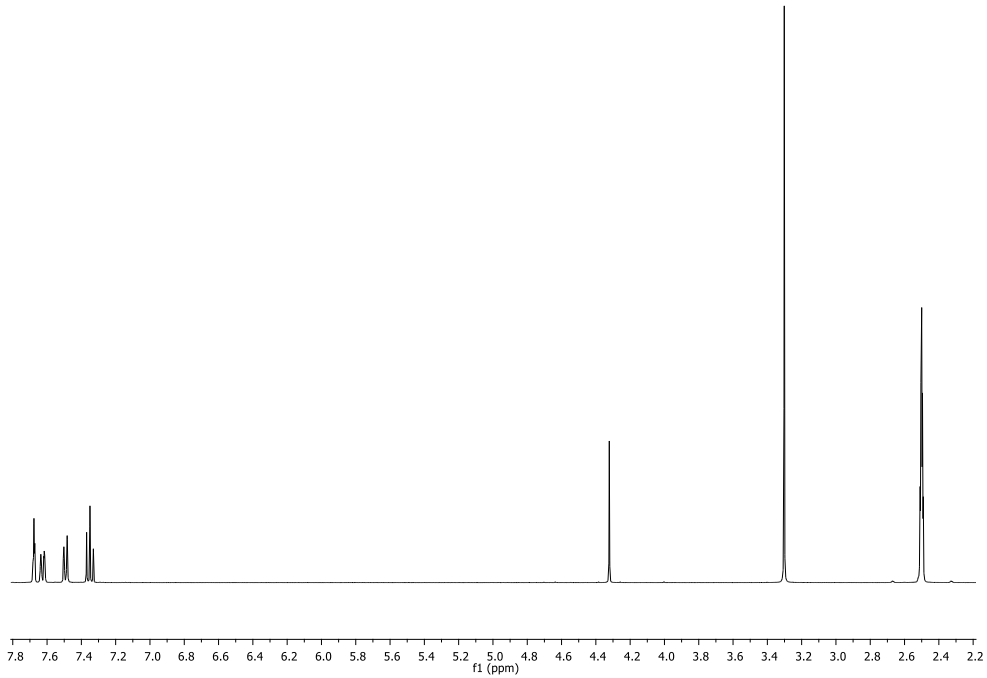
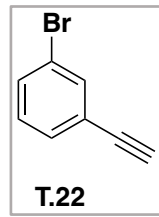


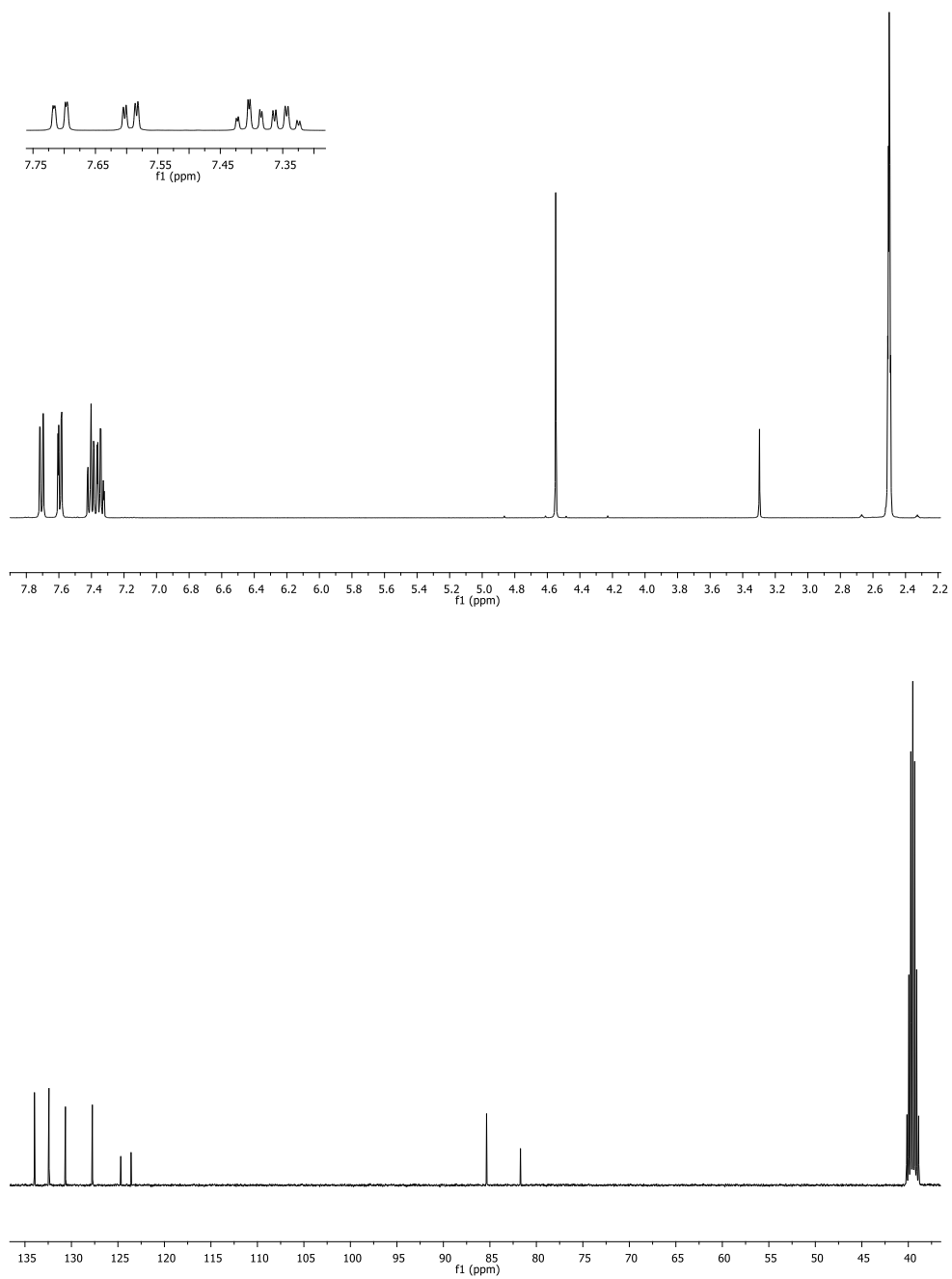
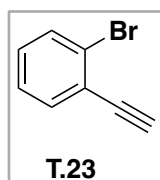


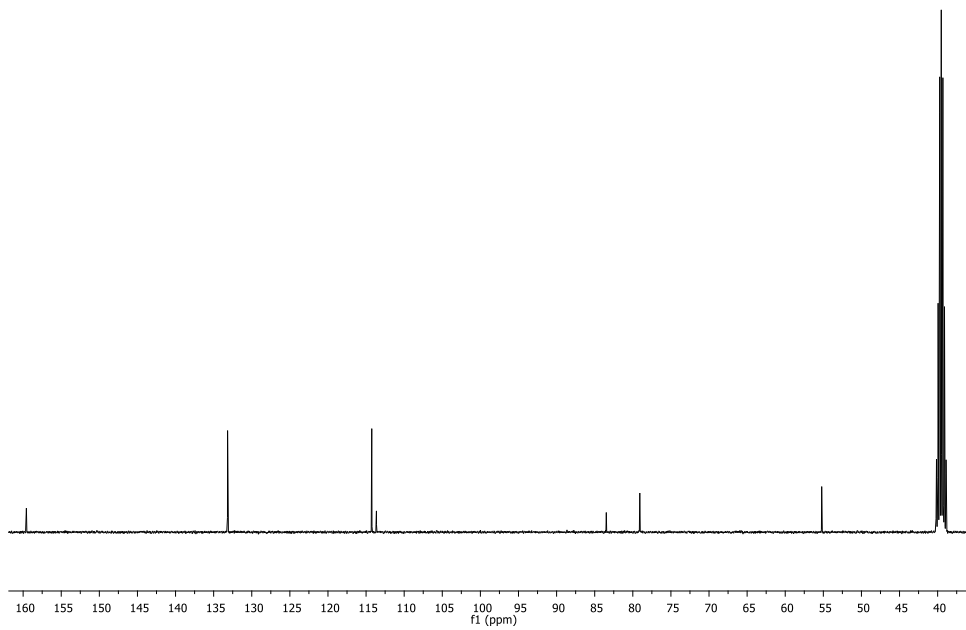
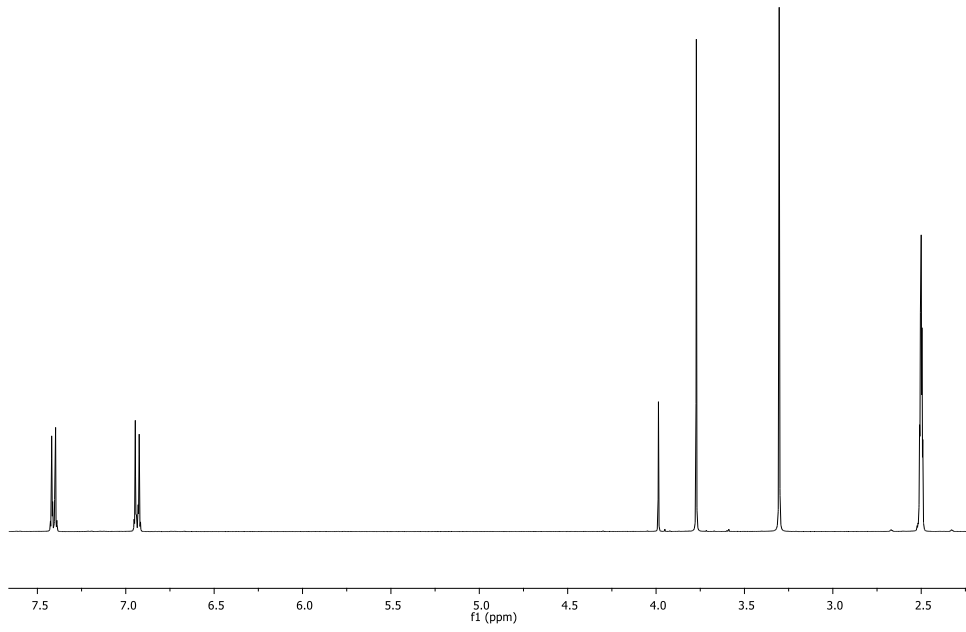
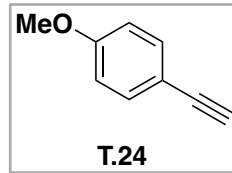


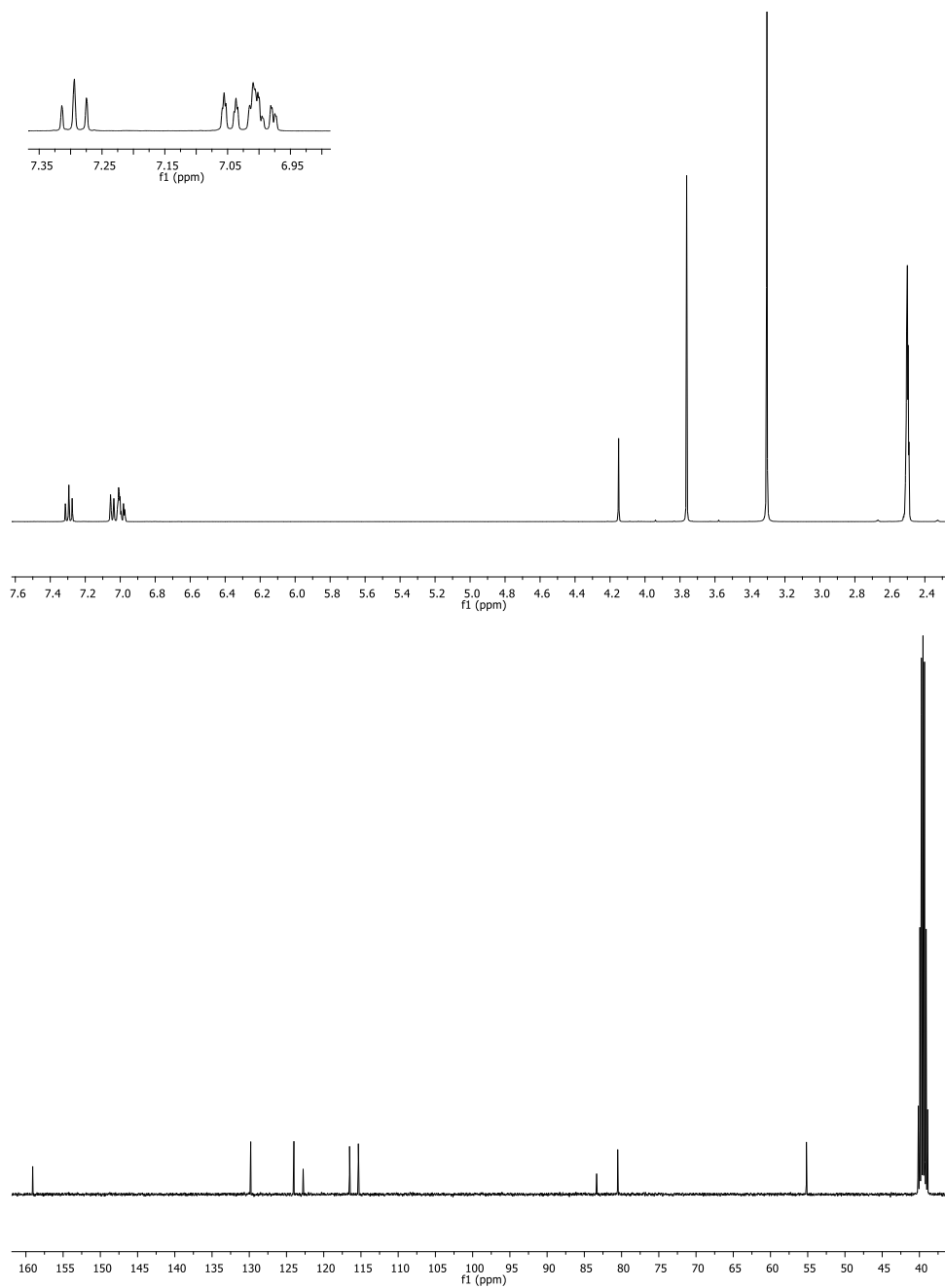
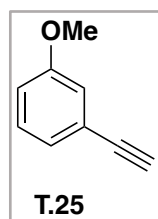


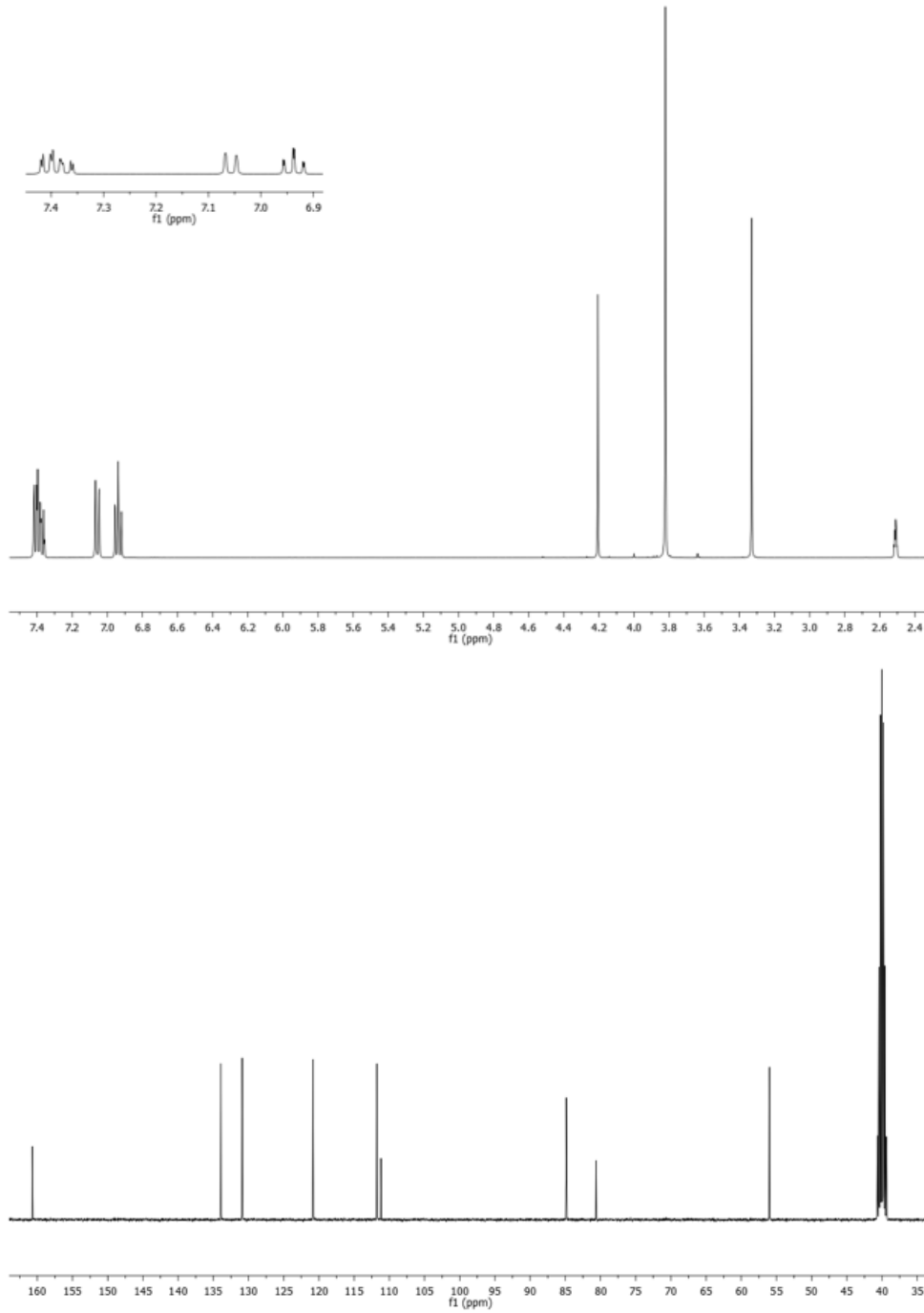
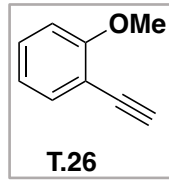


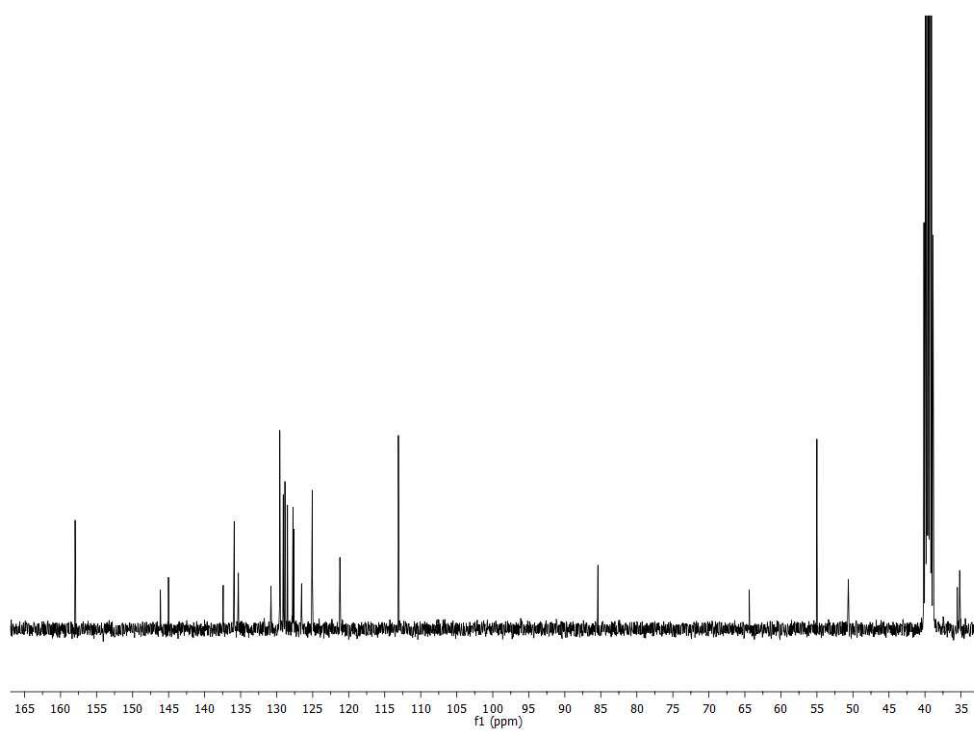
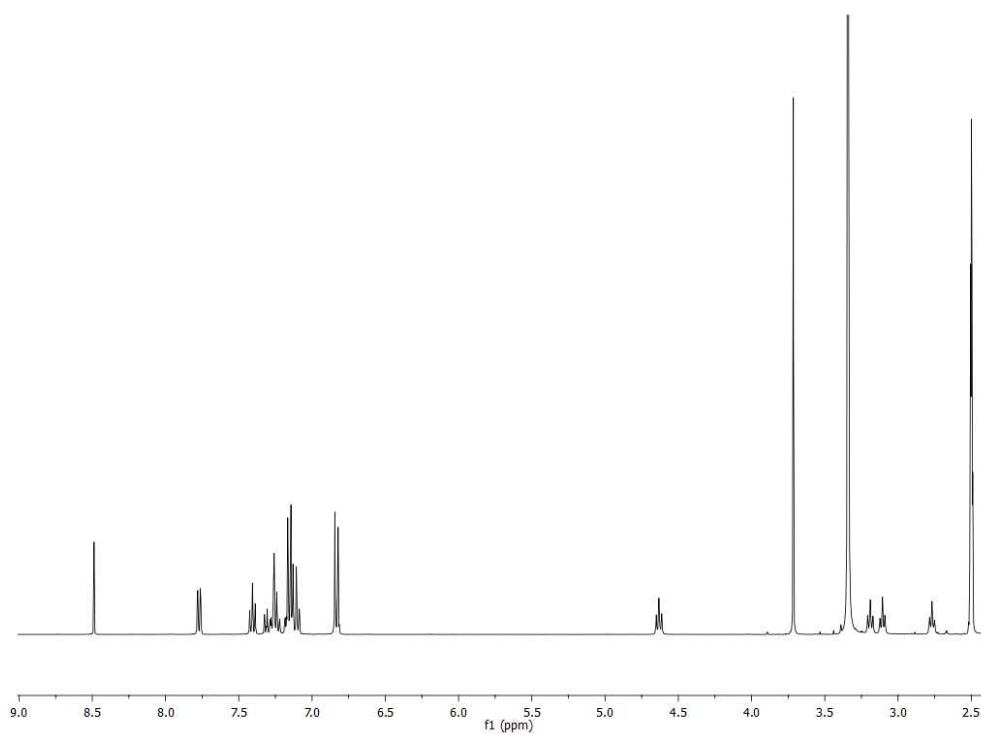
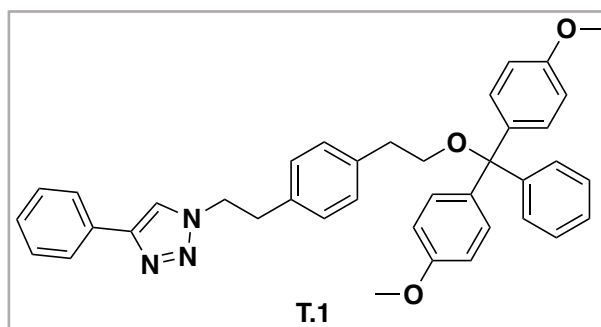


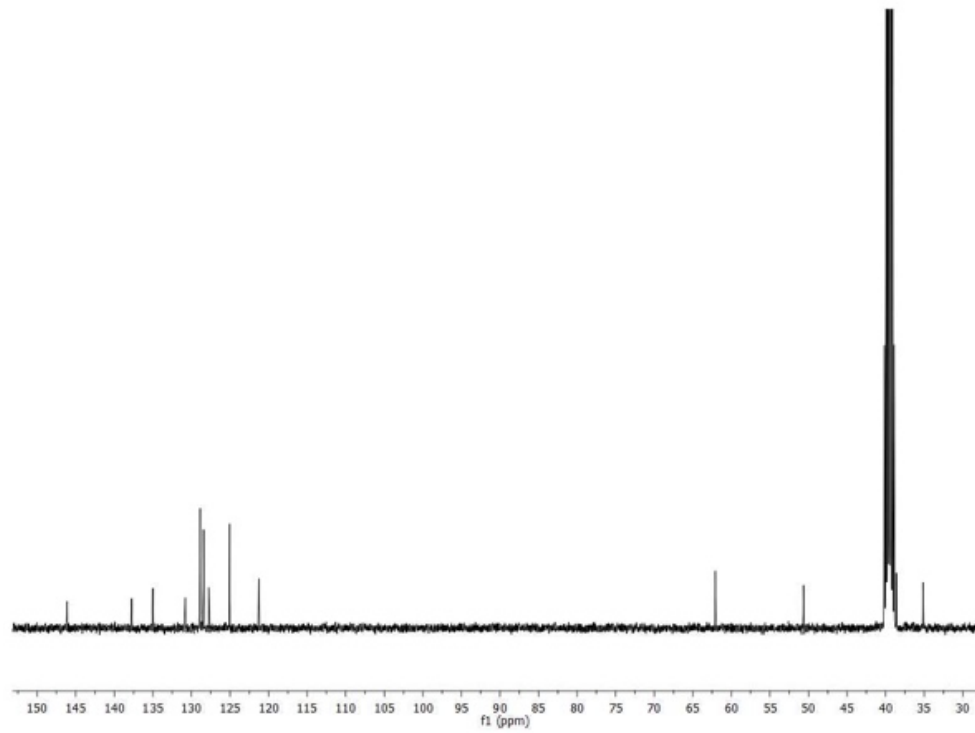
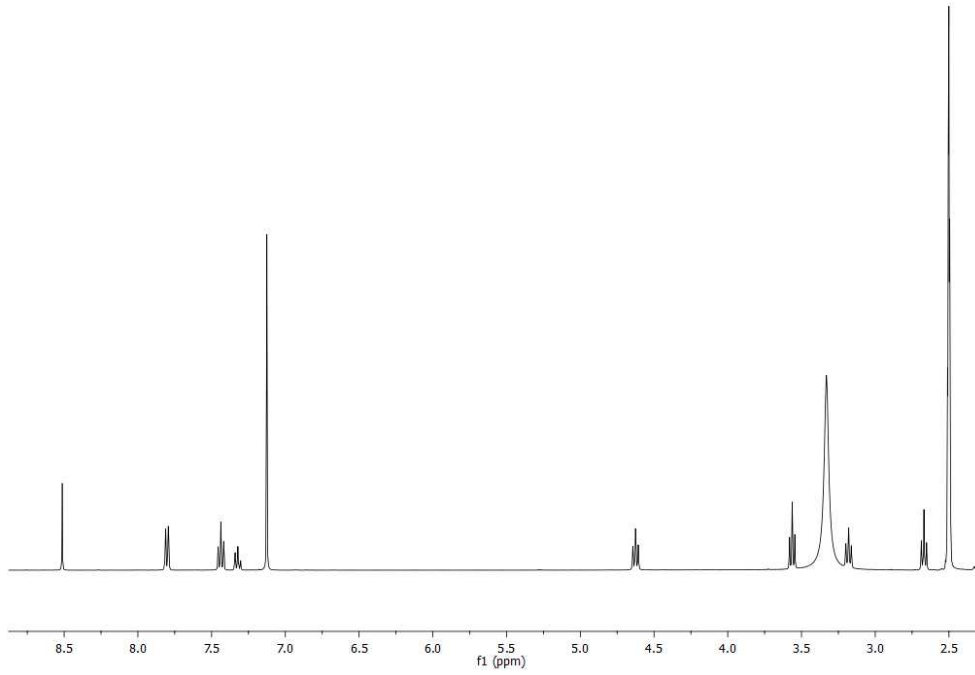
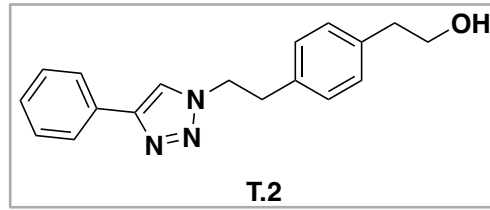


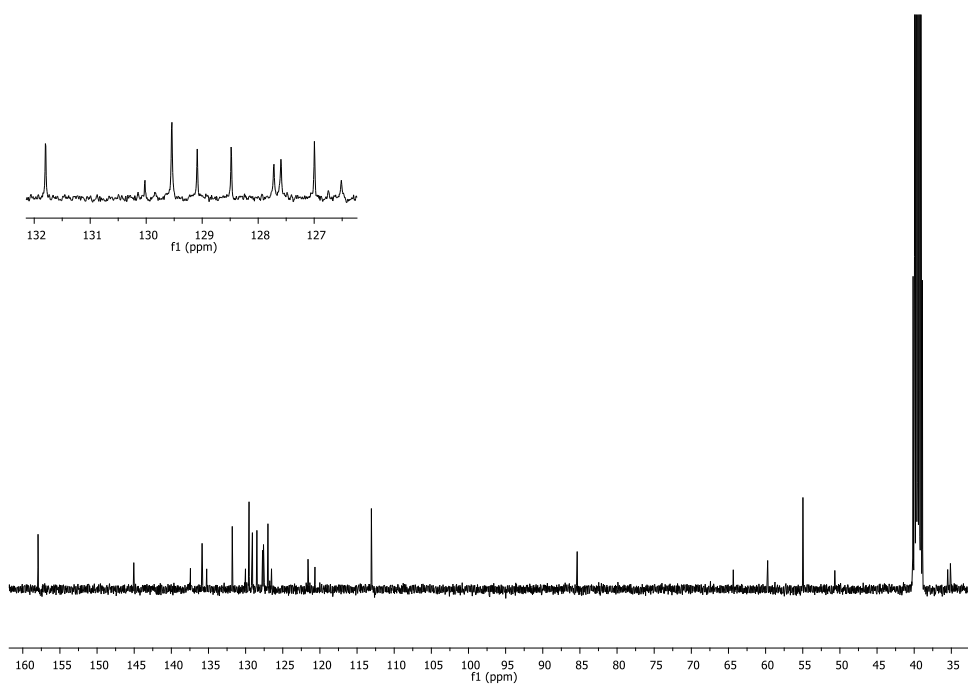
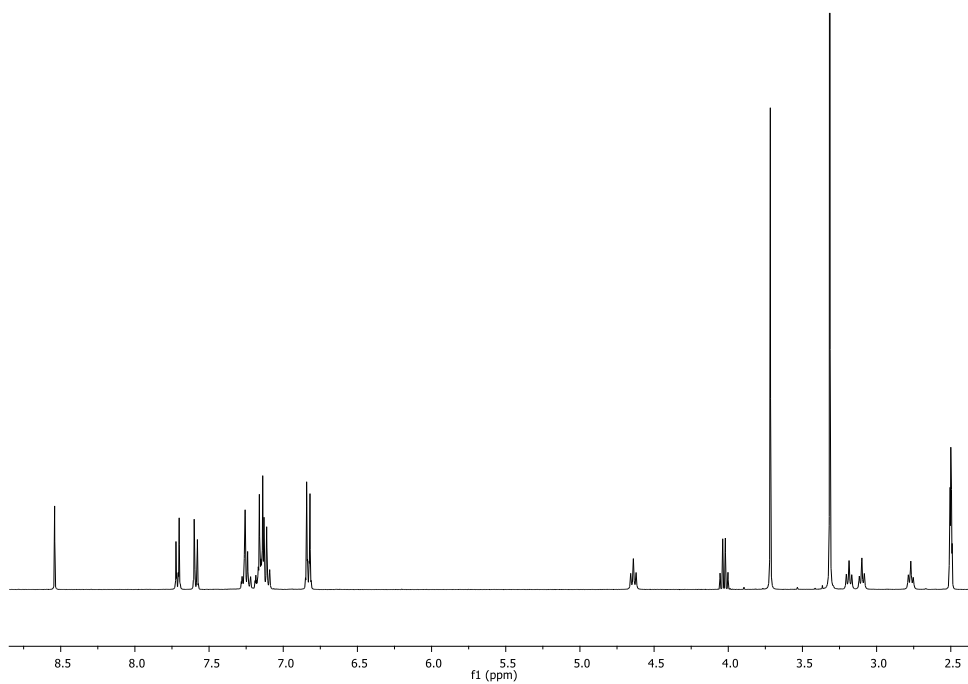
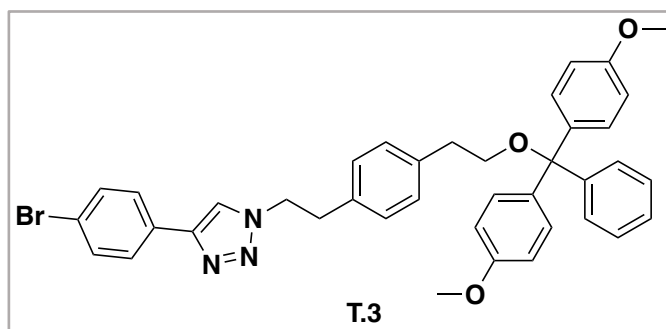


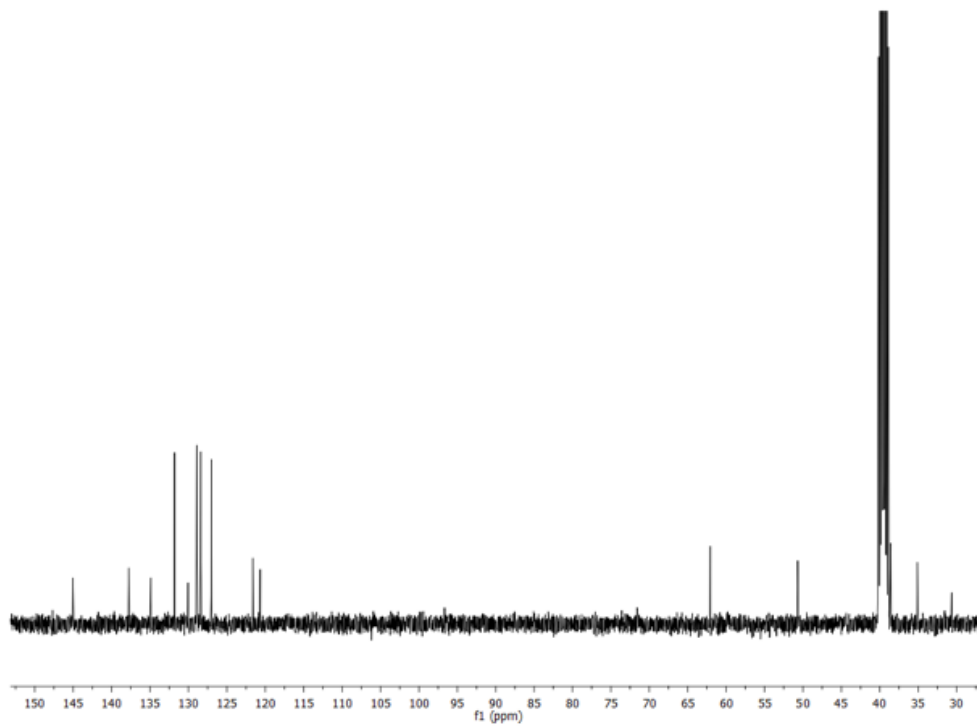
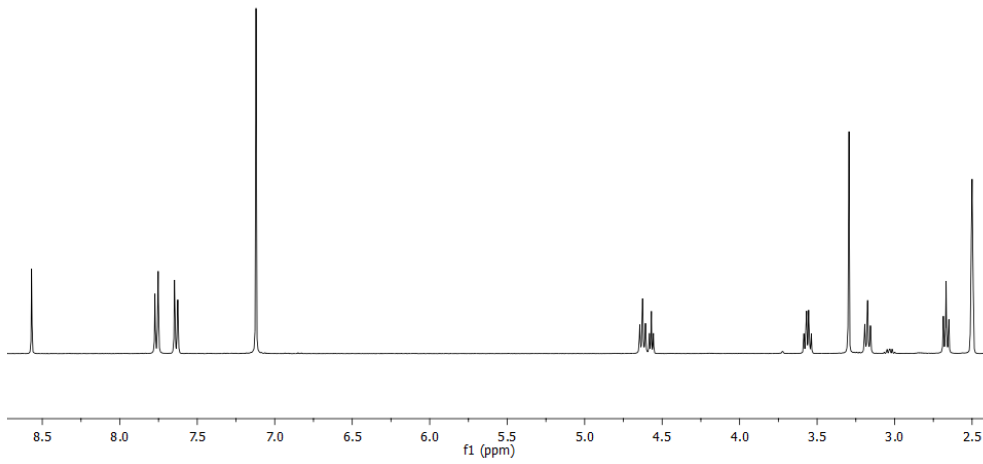
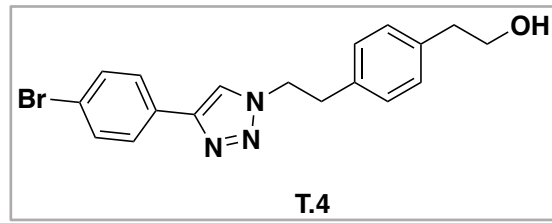


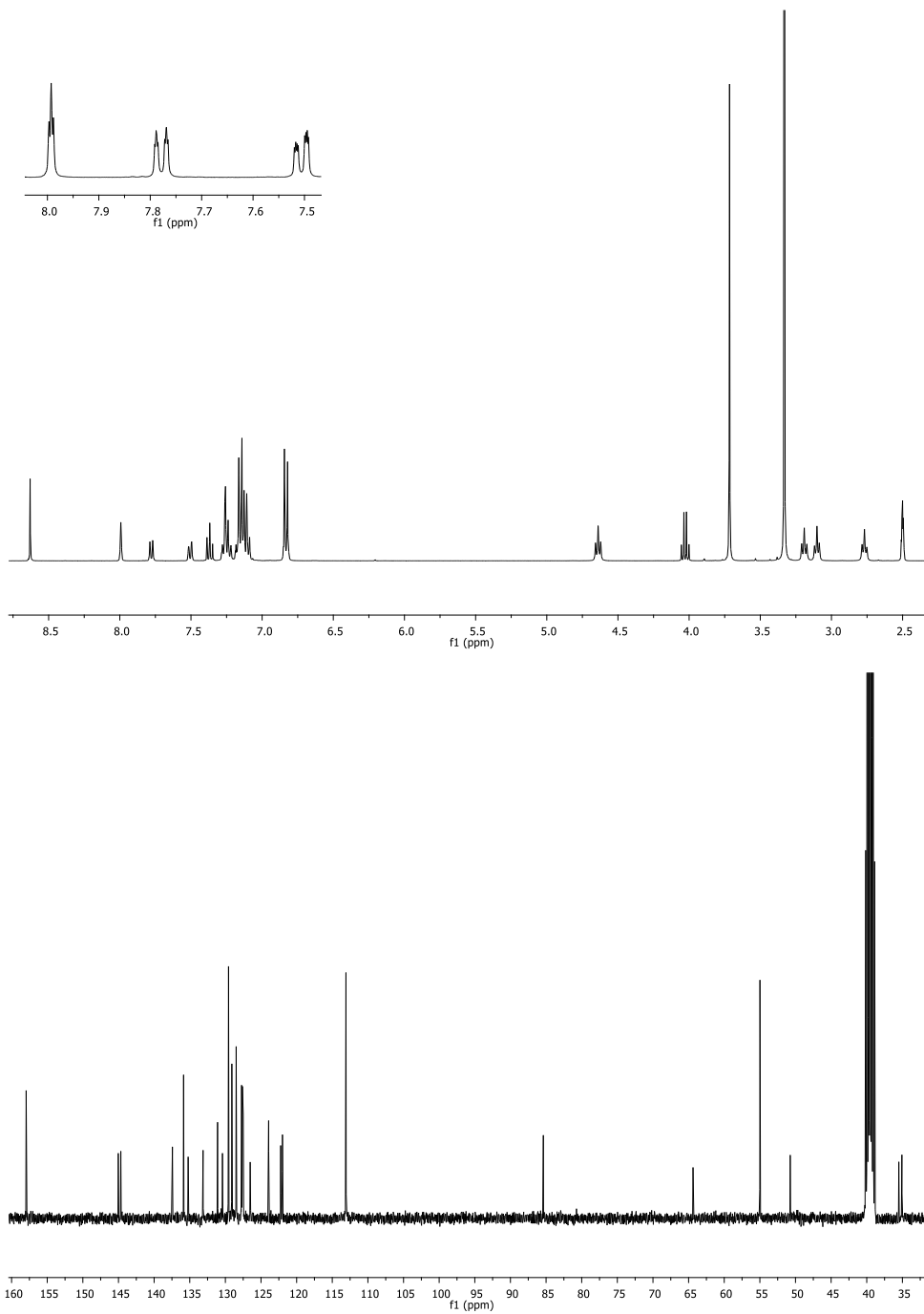
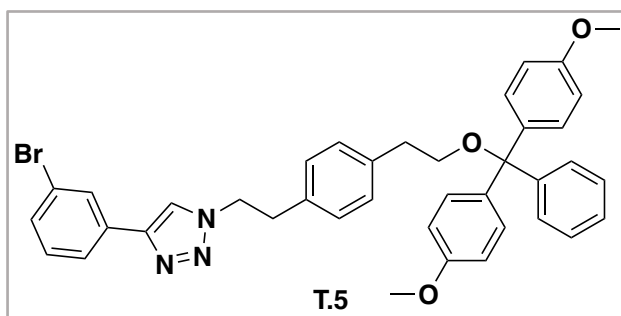


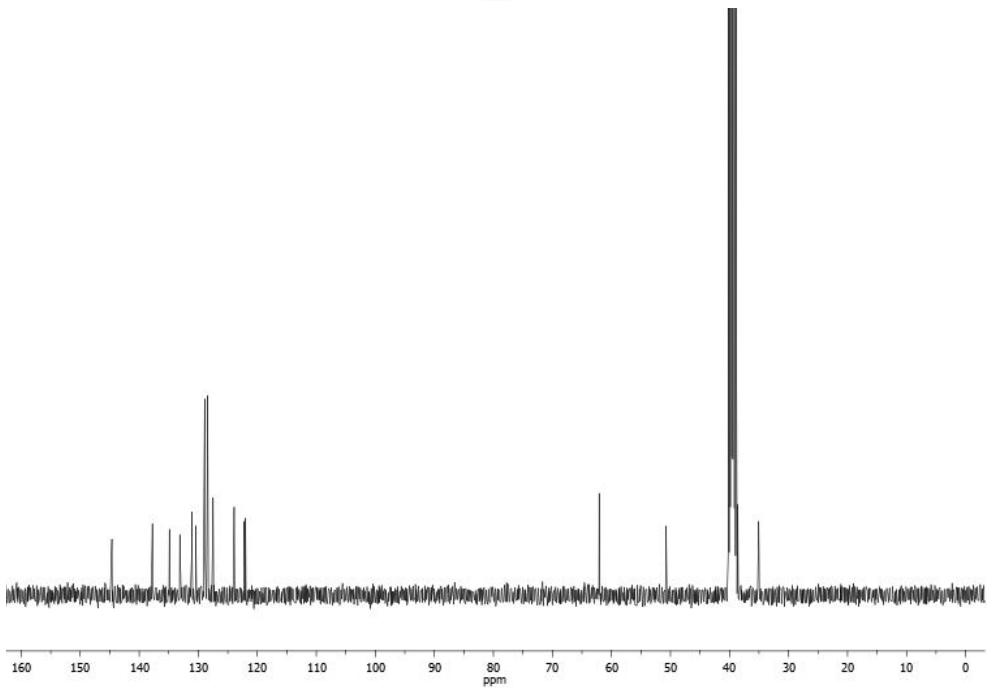
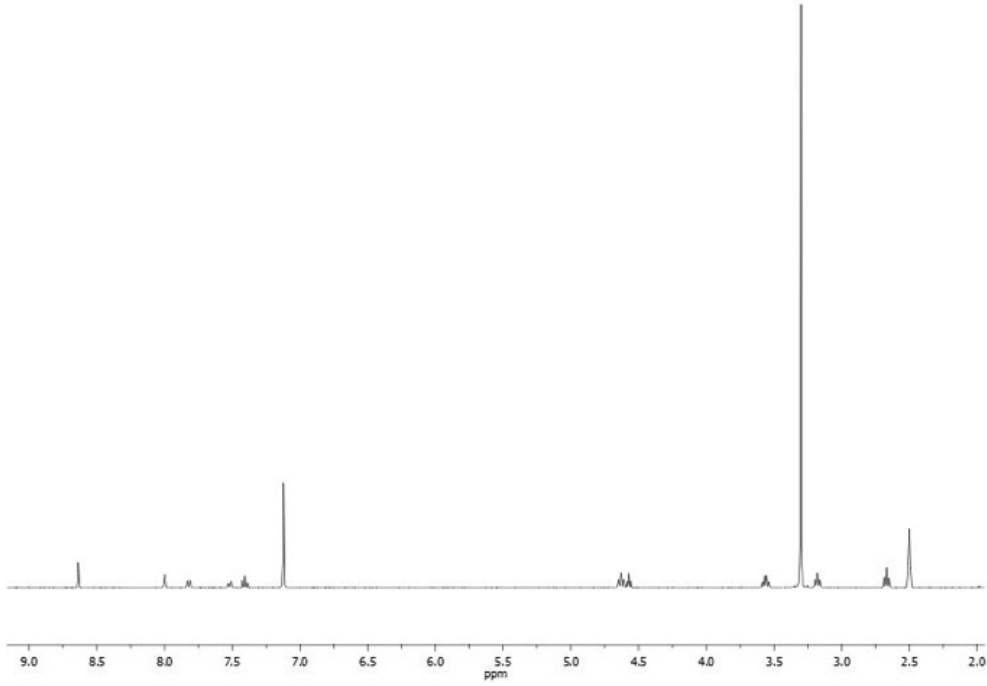
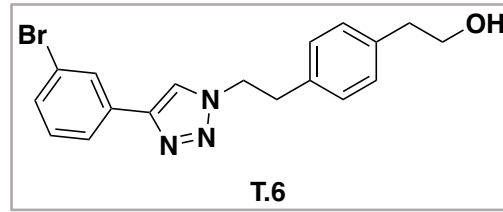


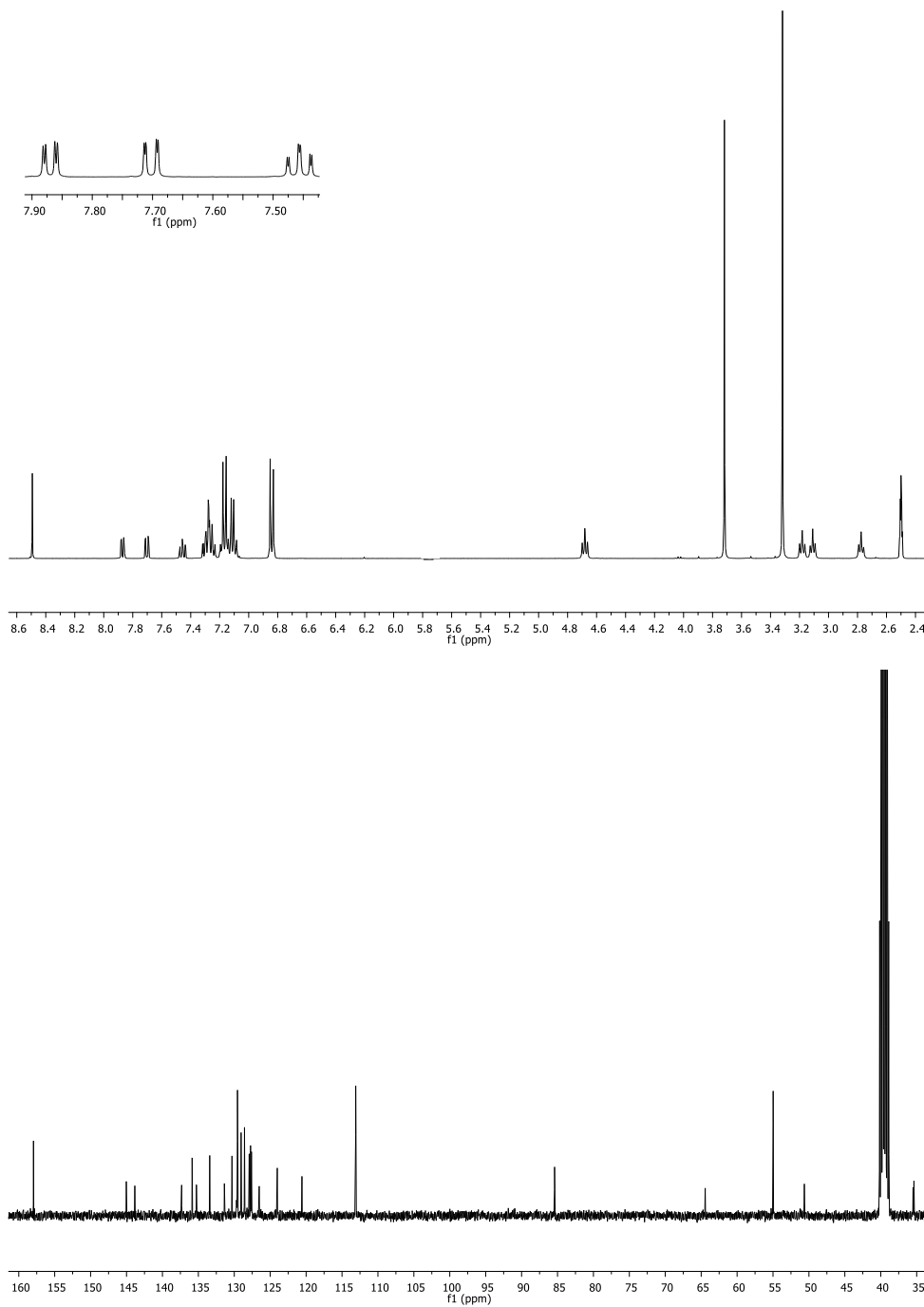
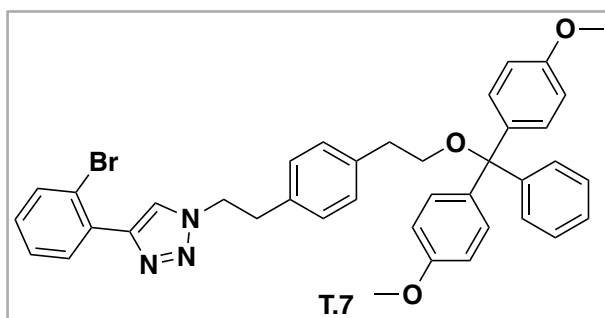


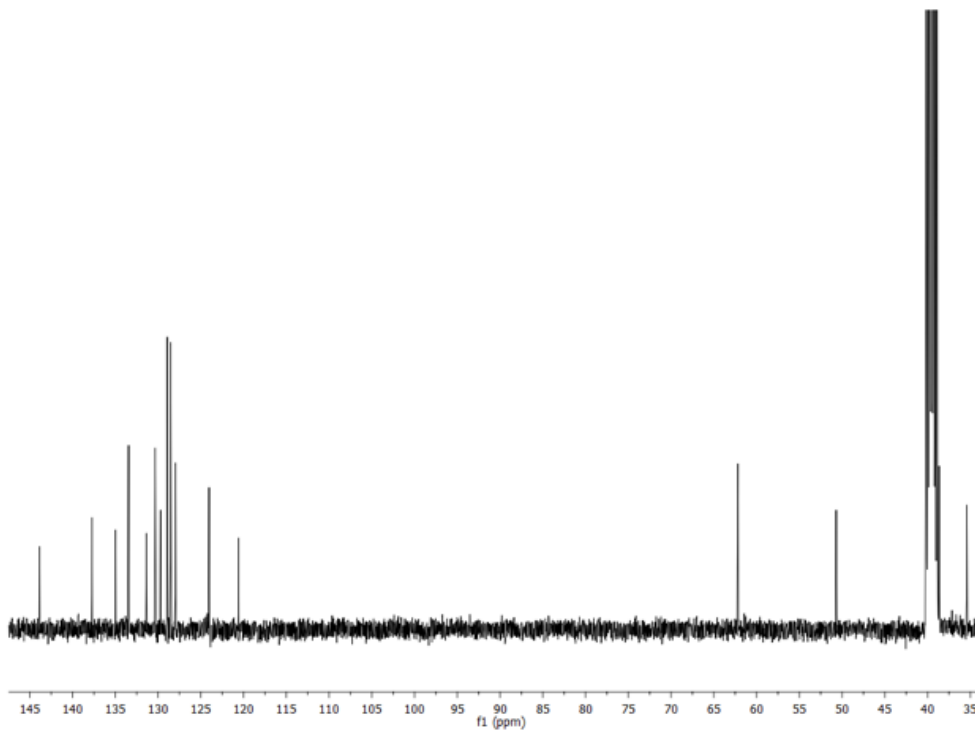
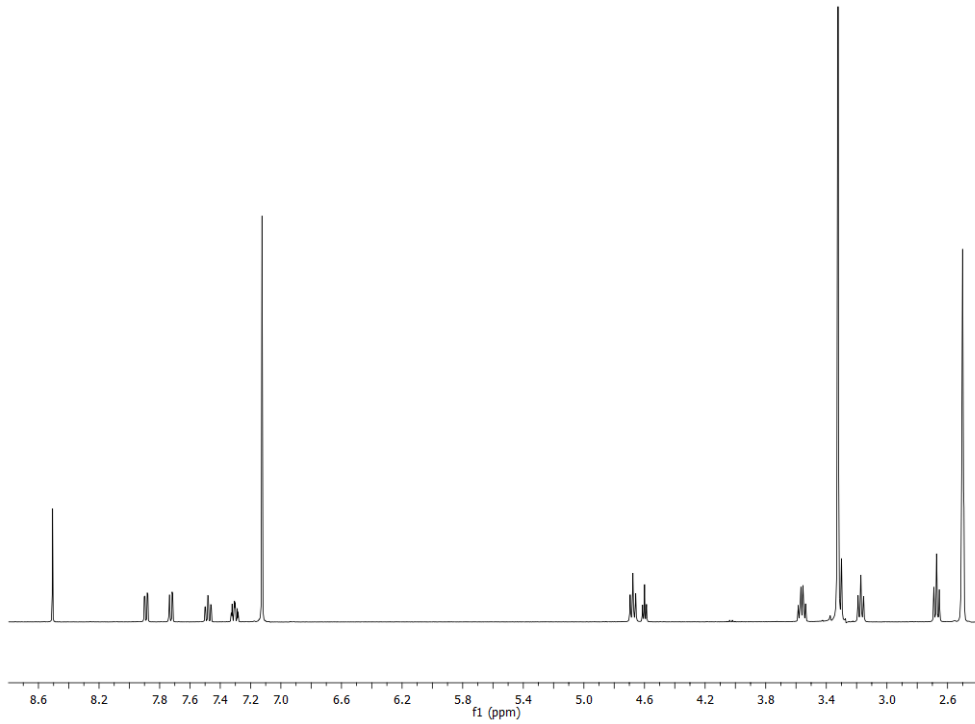
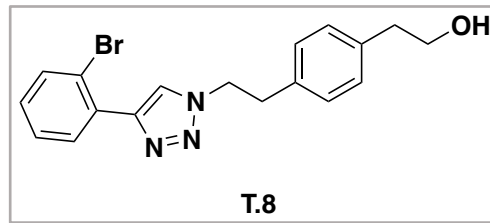


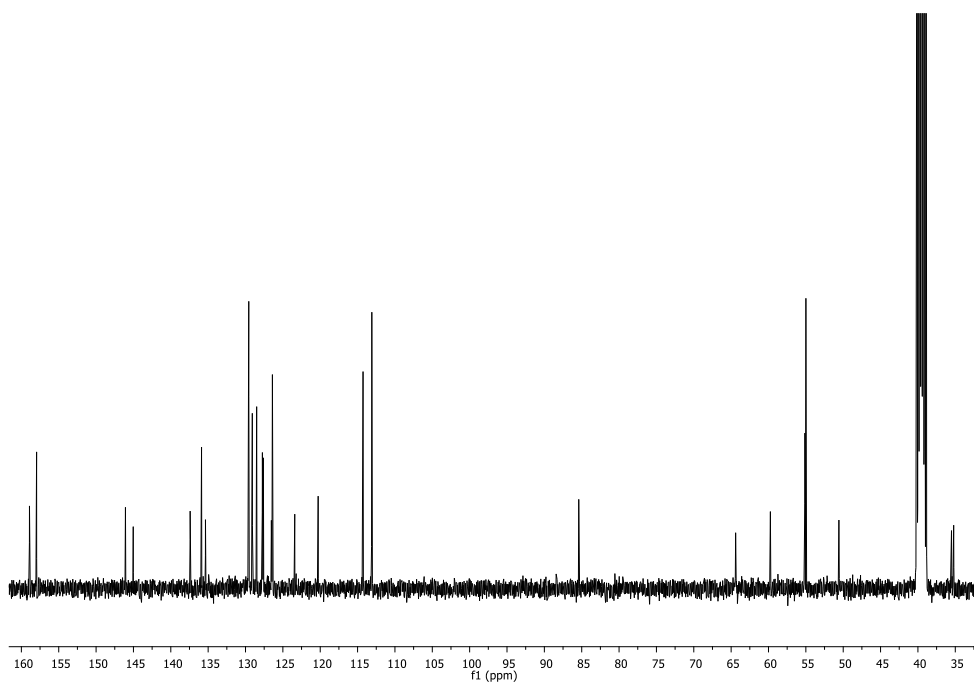
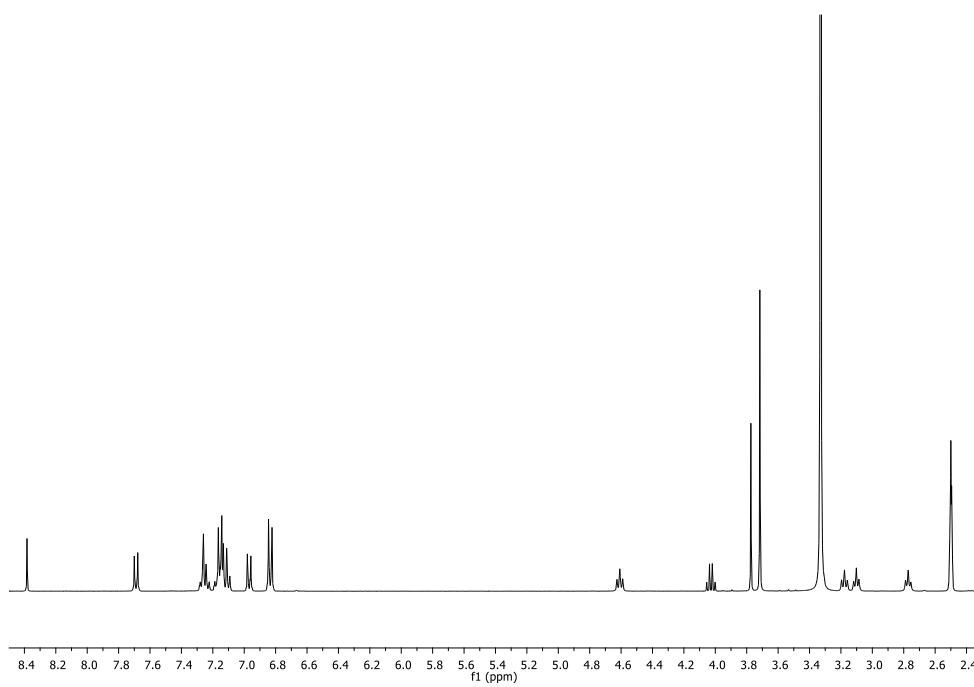
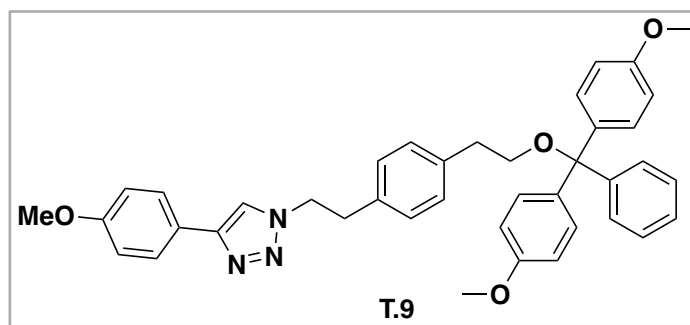


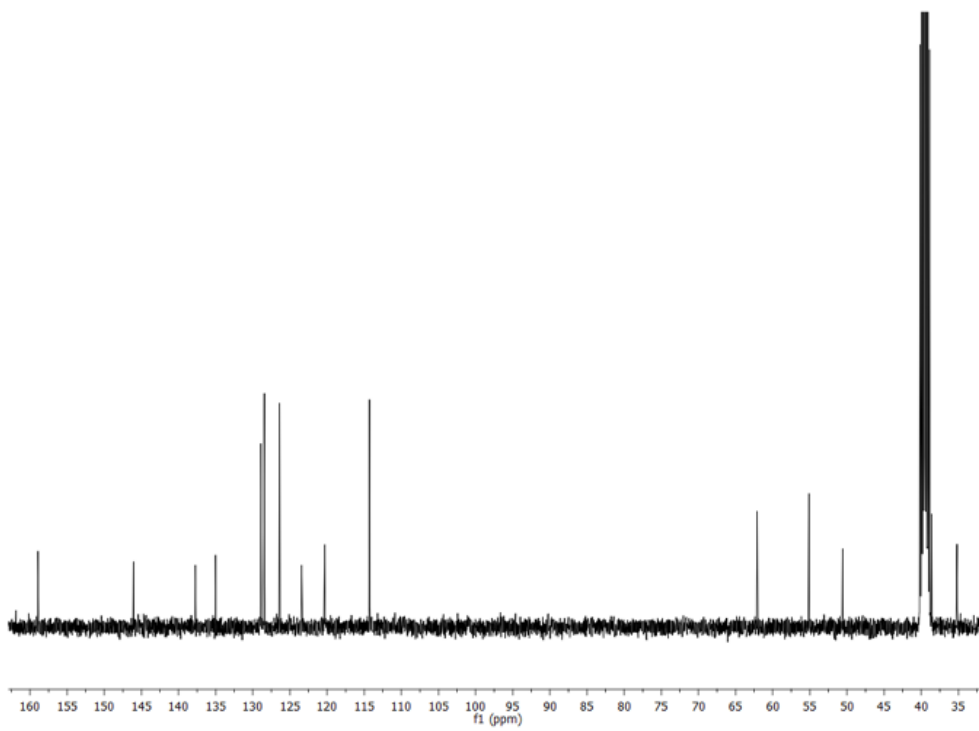
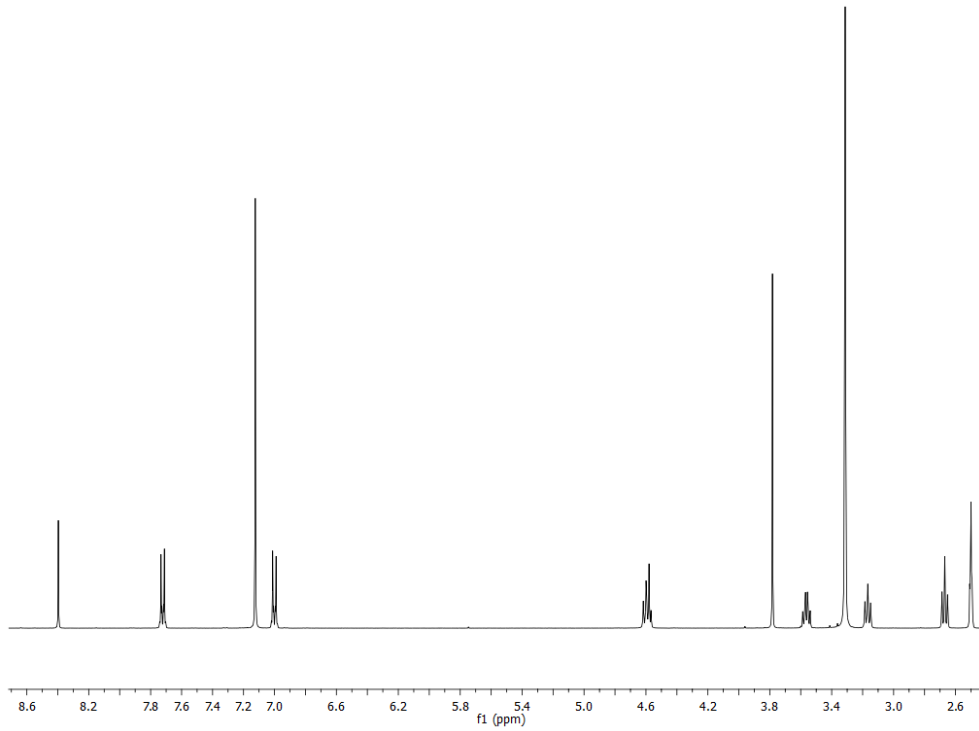
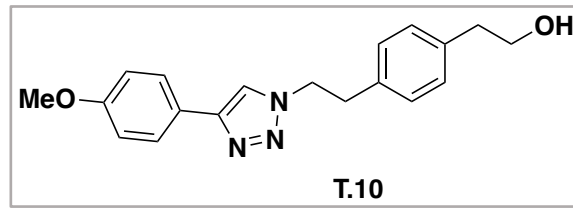


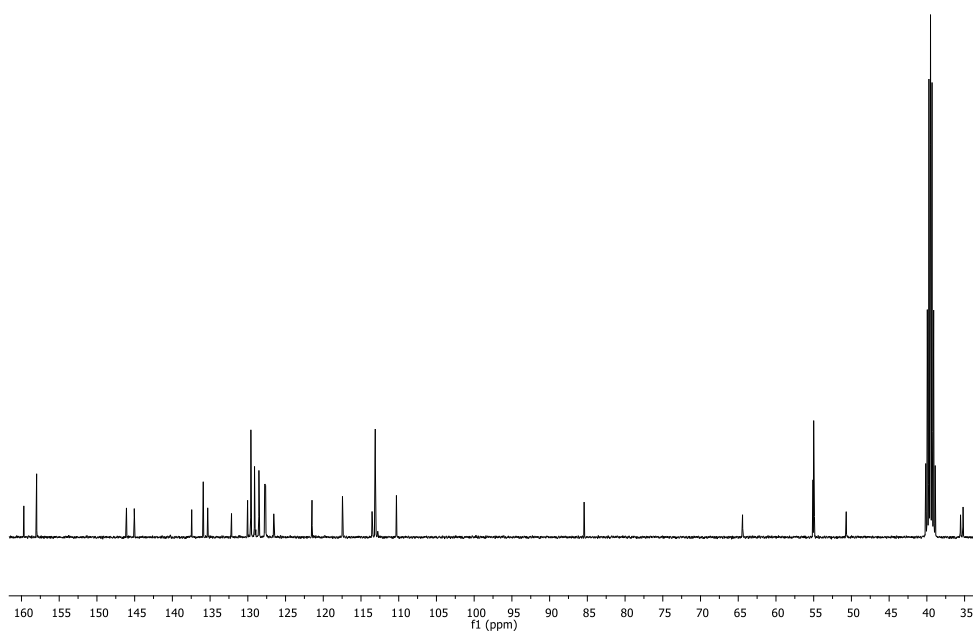
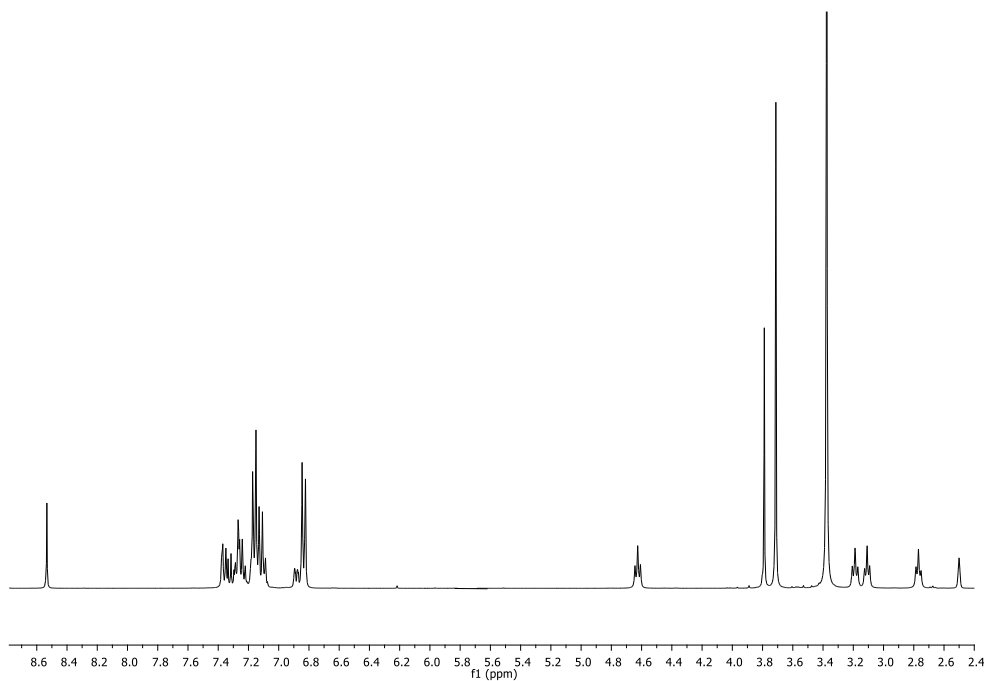
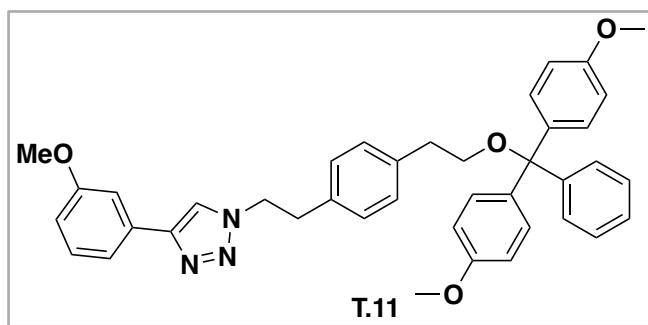


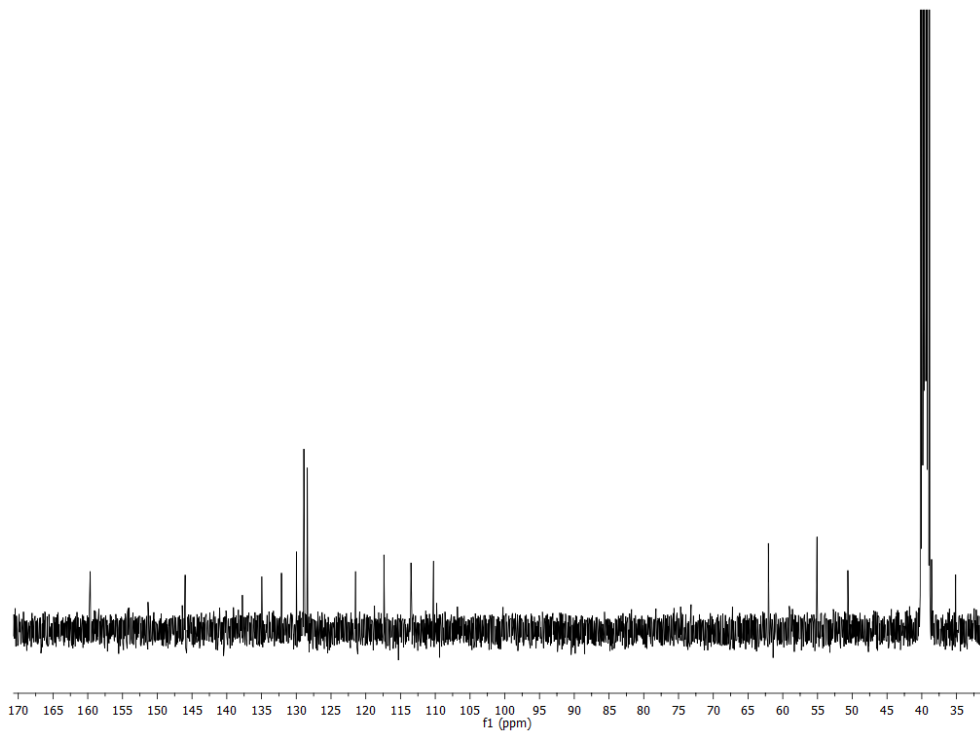
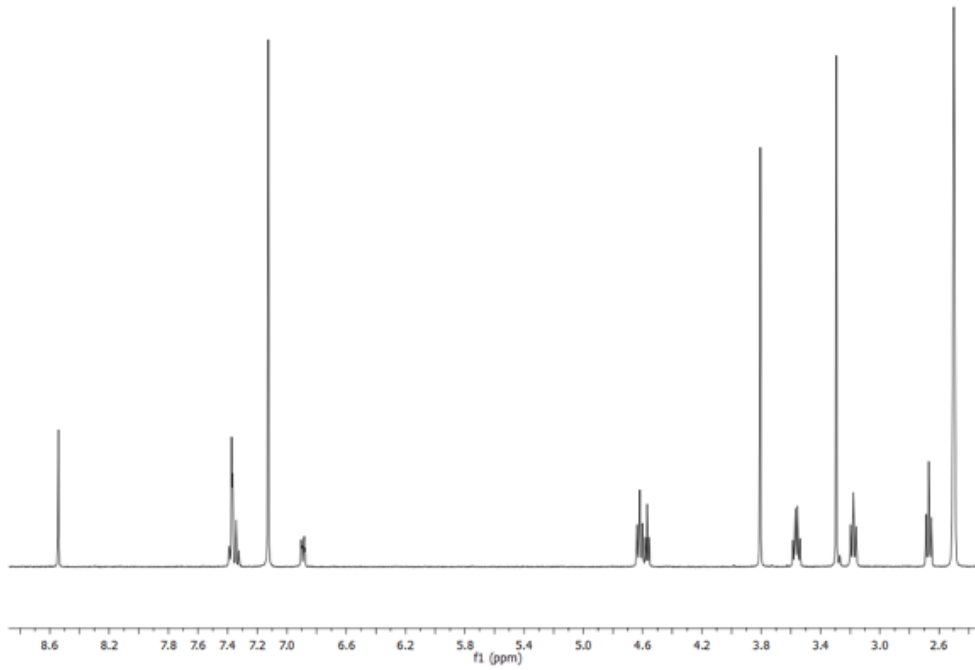
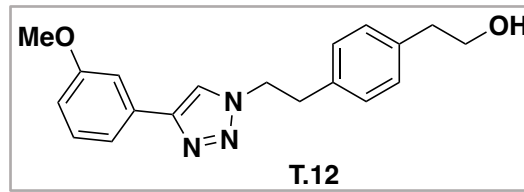


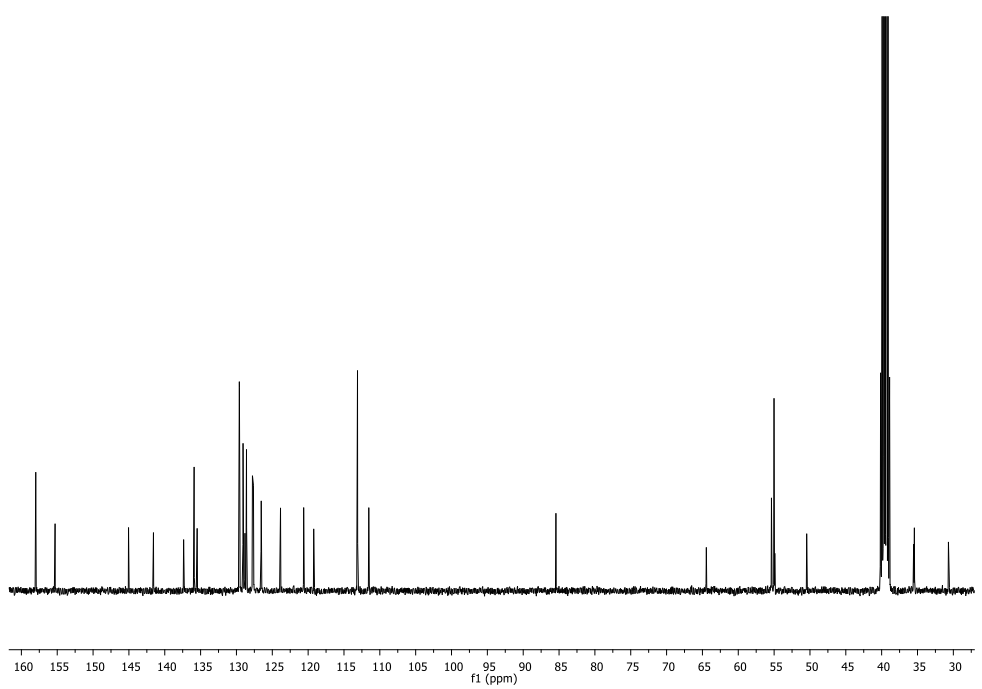
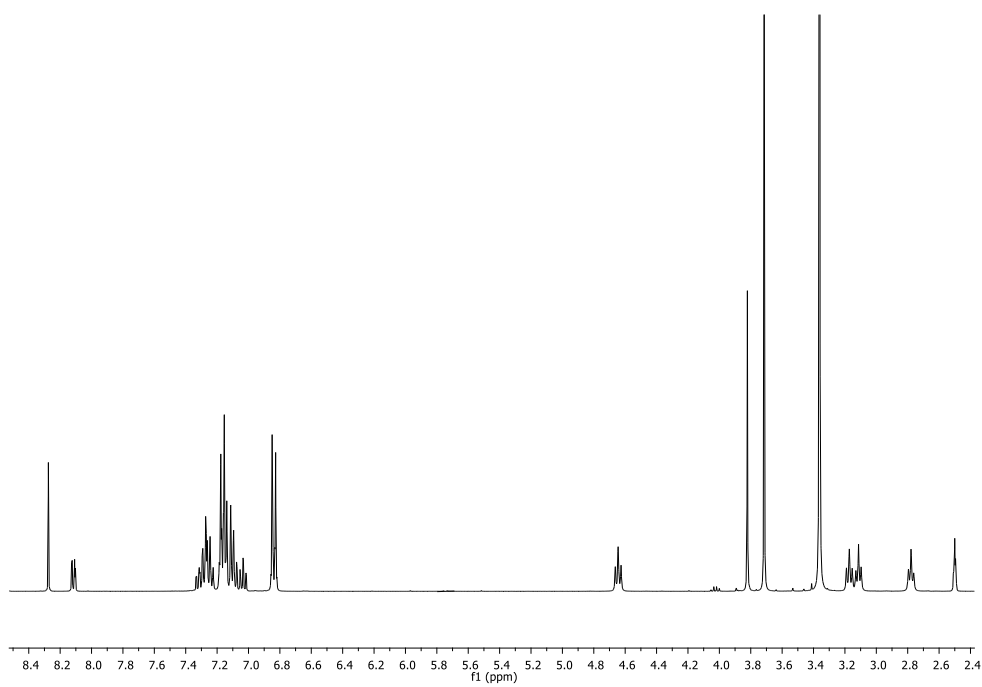
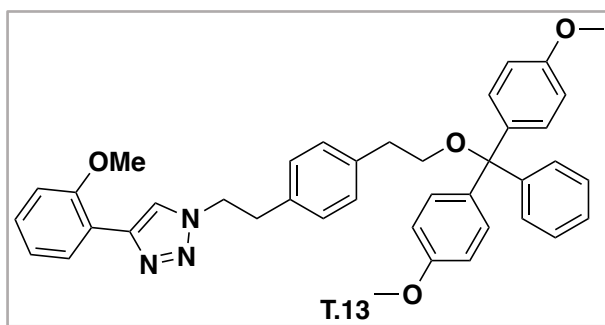


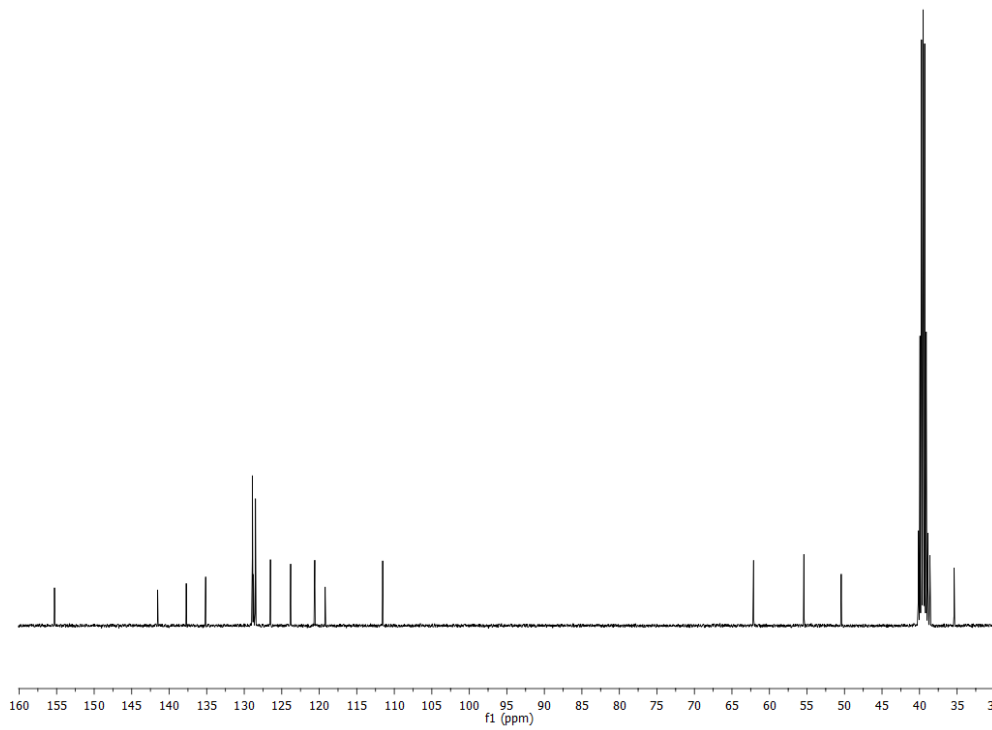
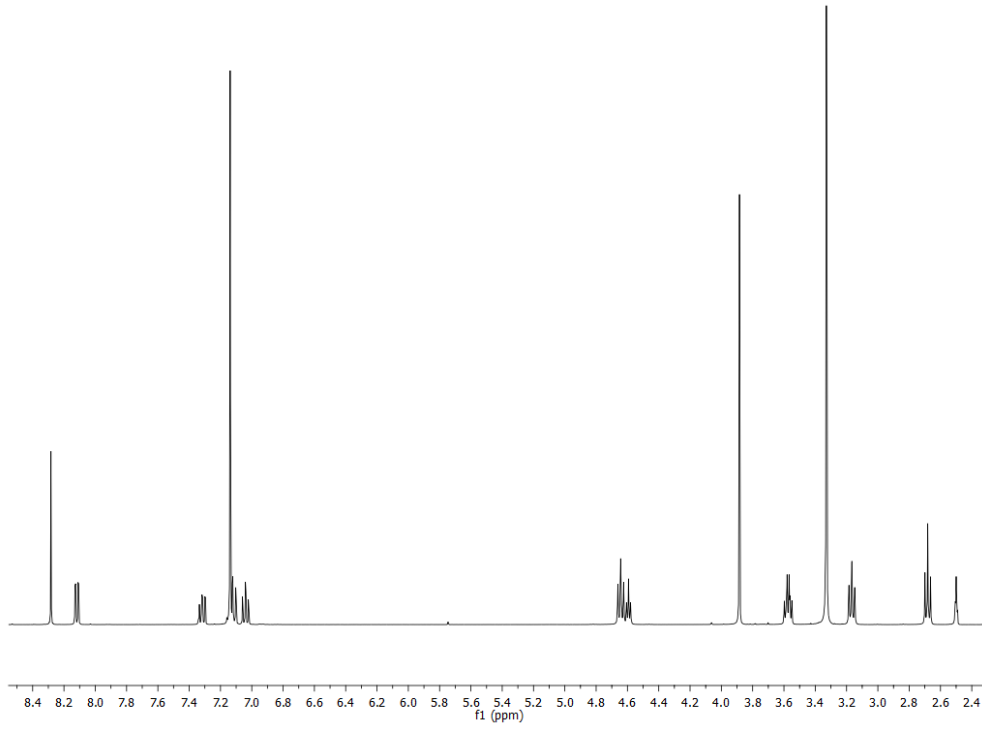
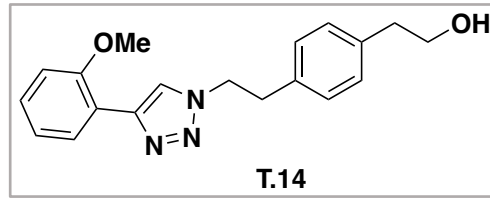






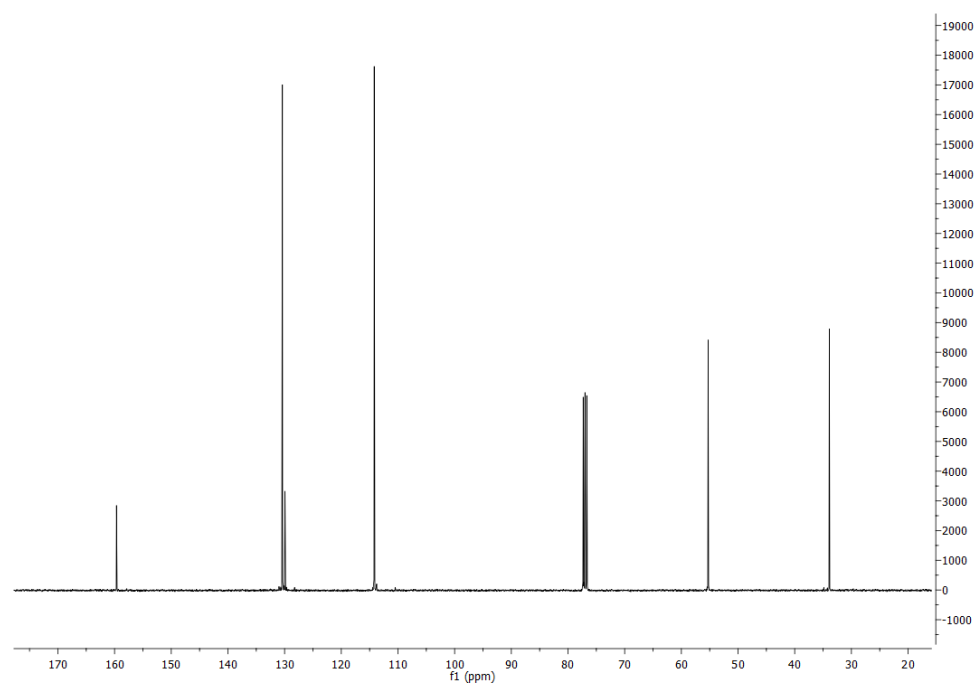
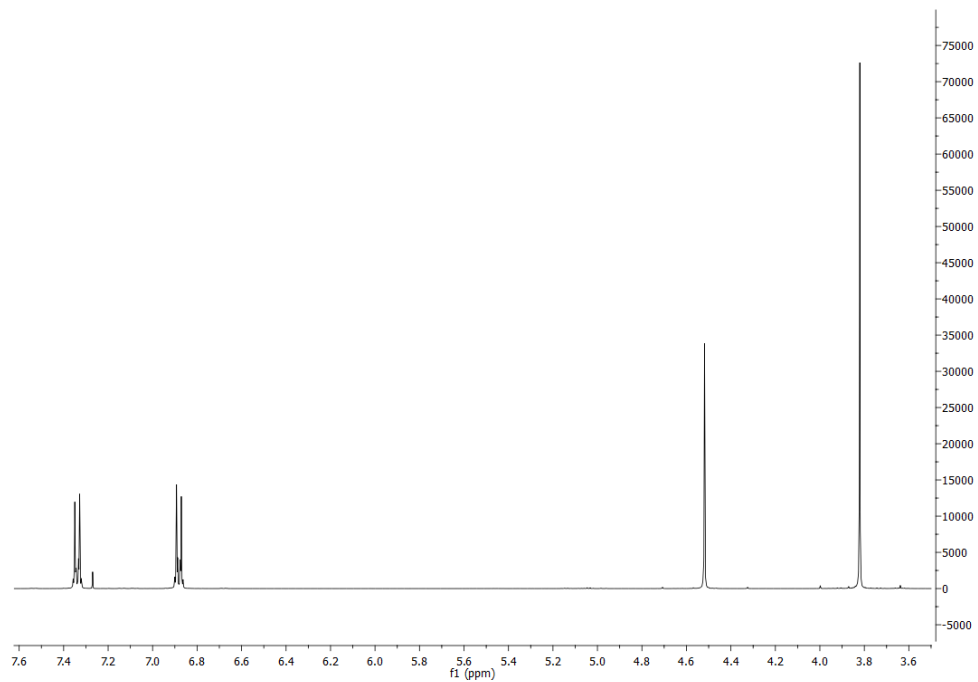
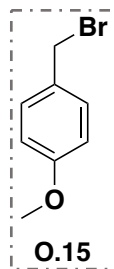


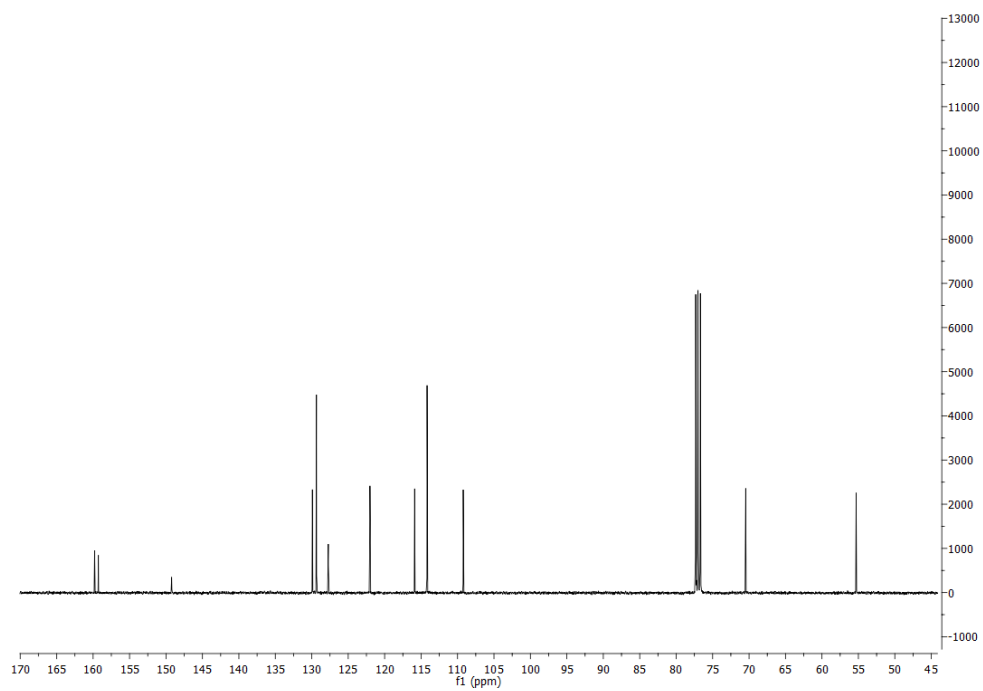
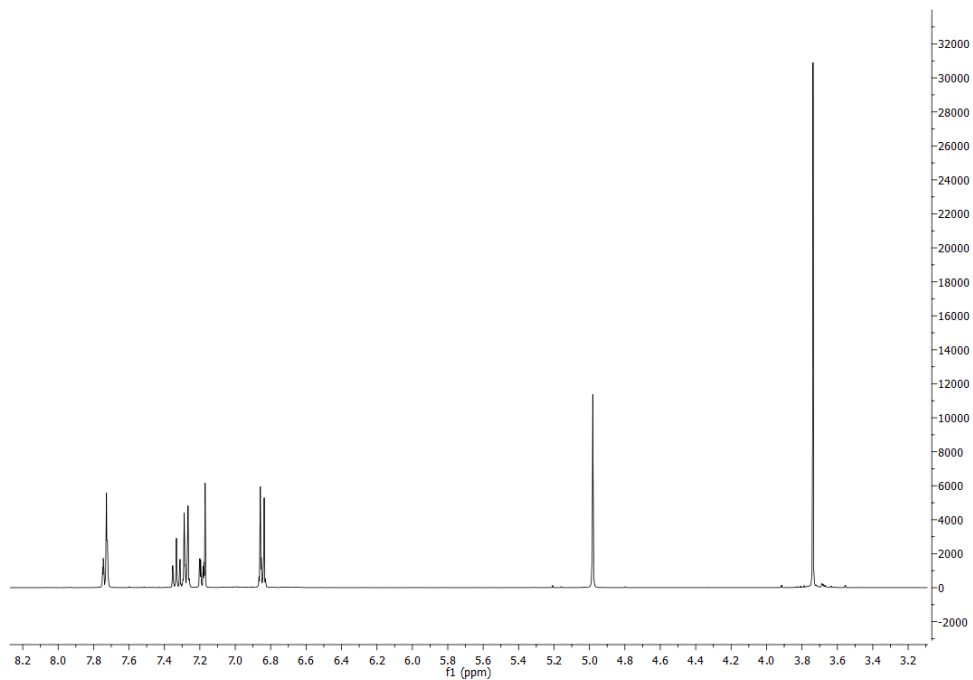
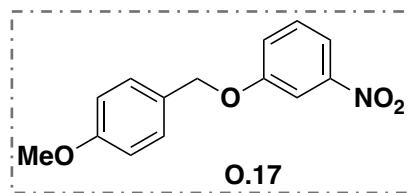


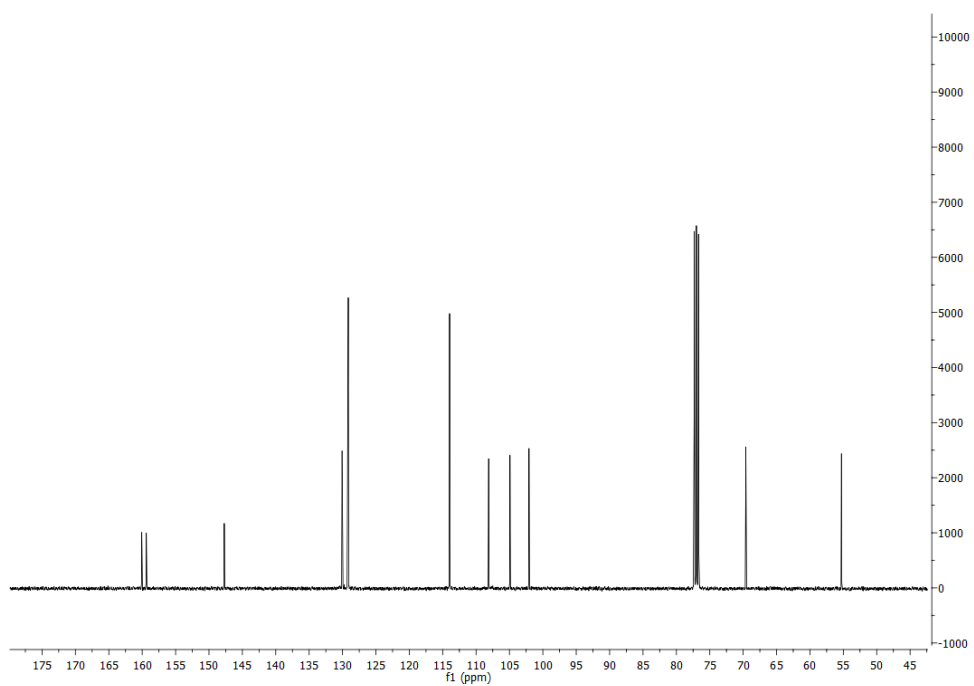
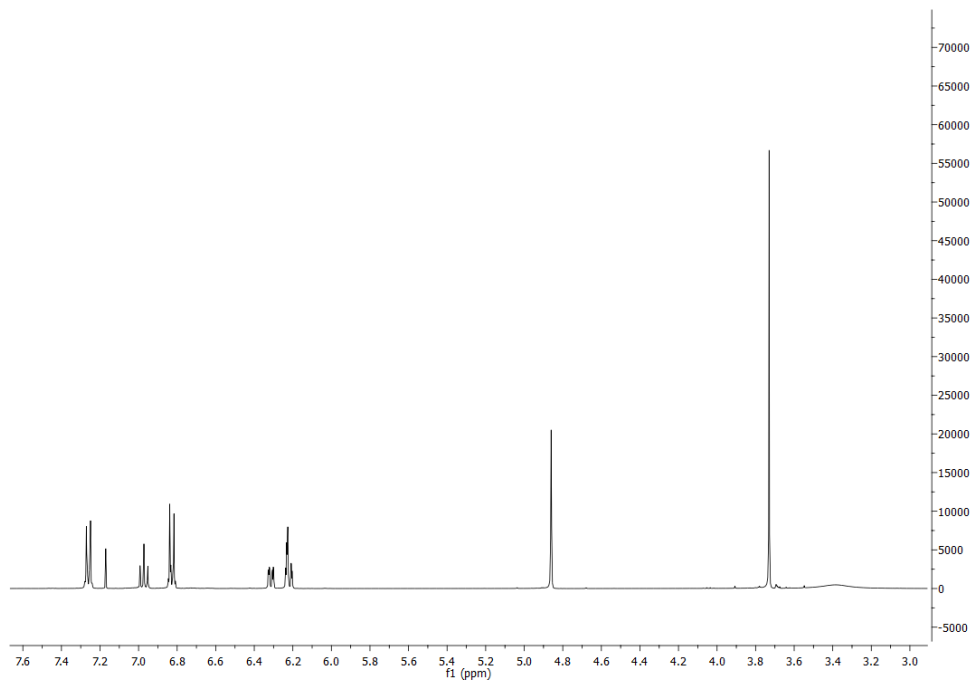
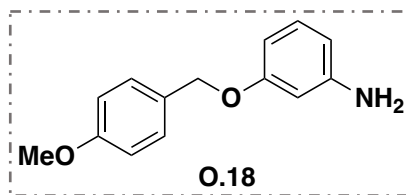


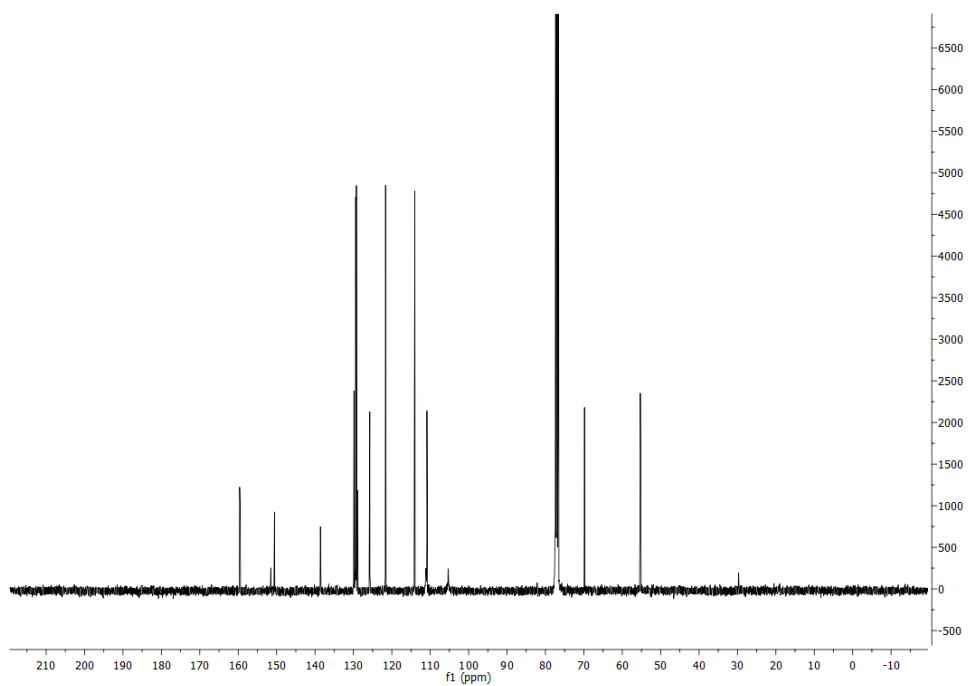
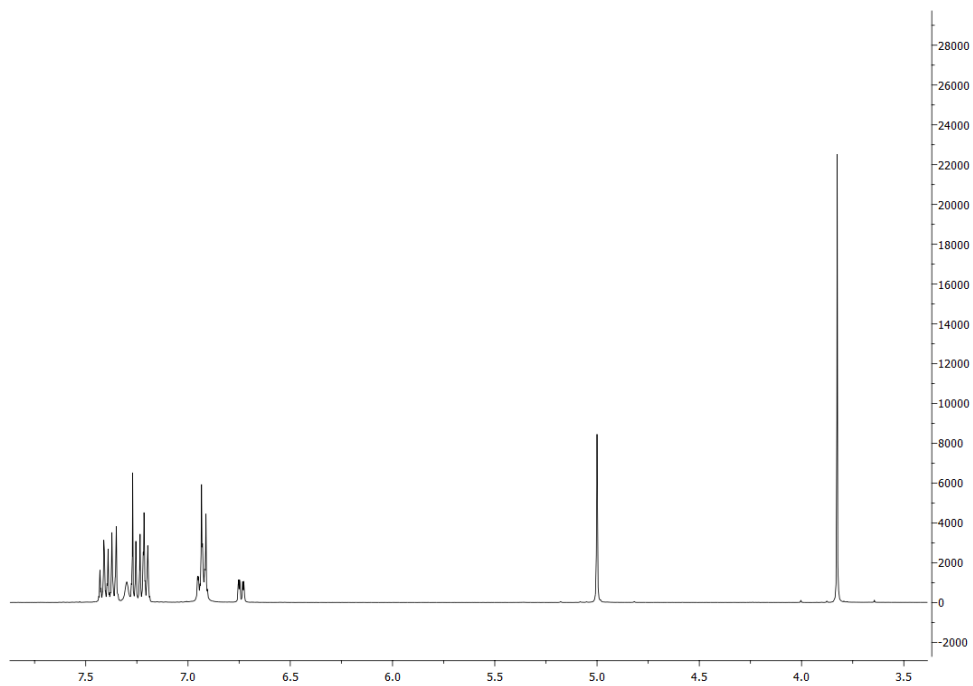
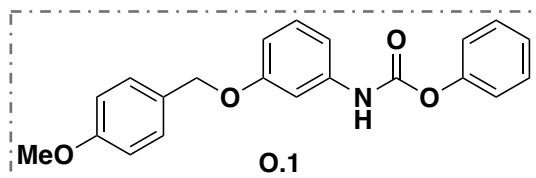
11.2. Diarilurea derivatives

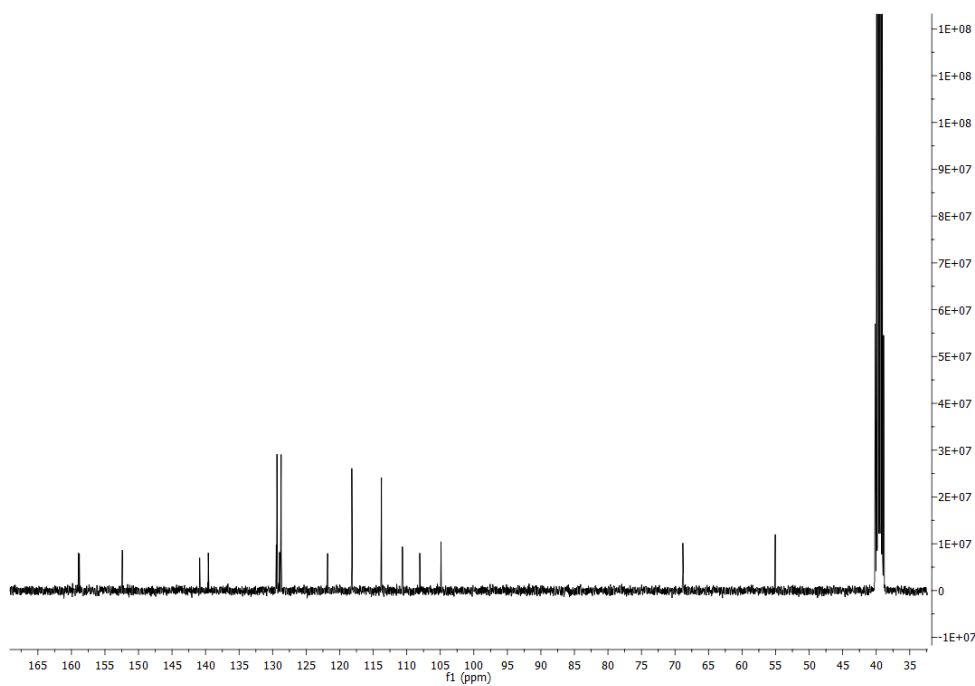
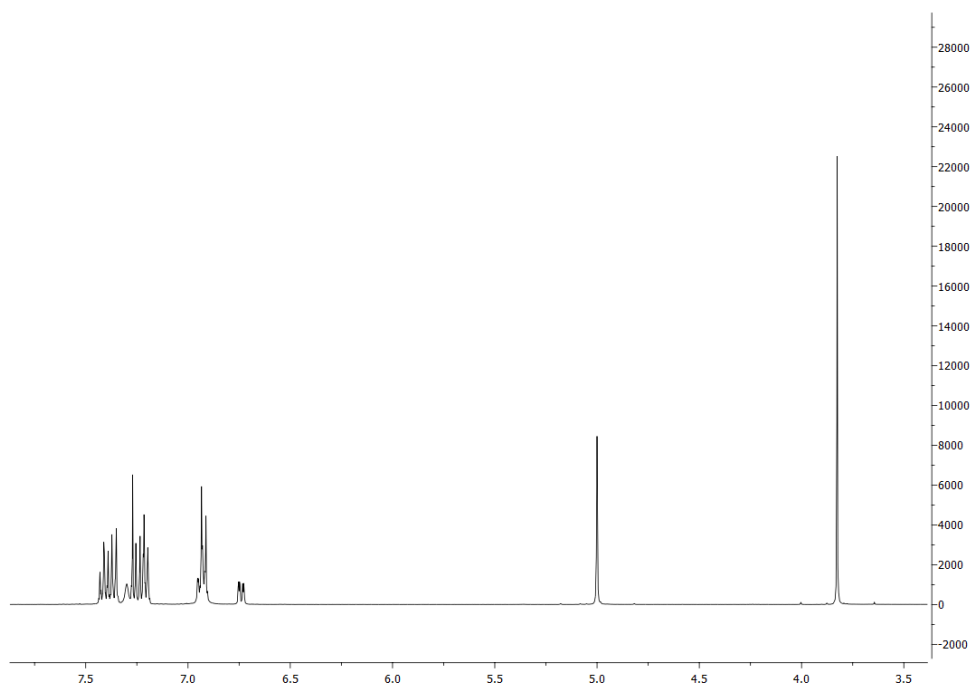
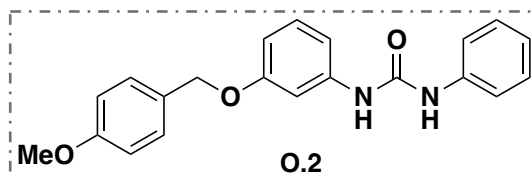
11.2.1. BenzylethoxyAryl-Ureas derivate

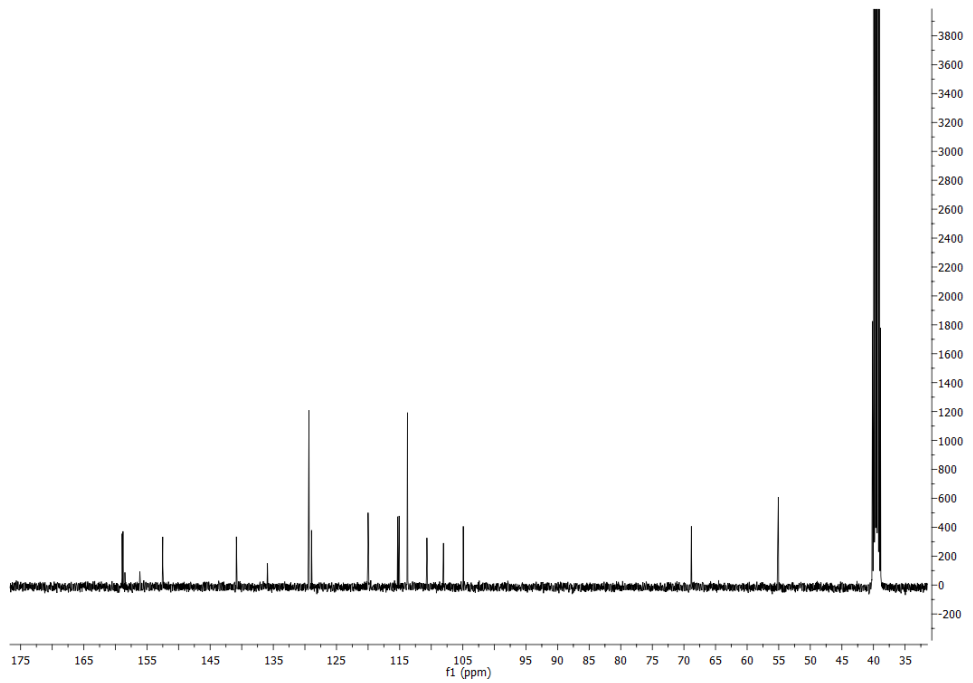
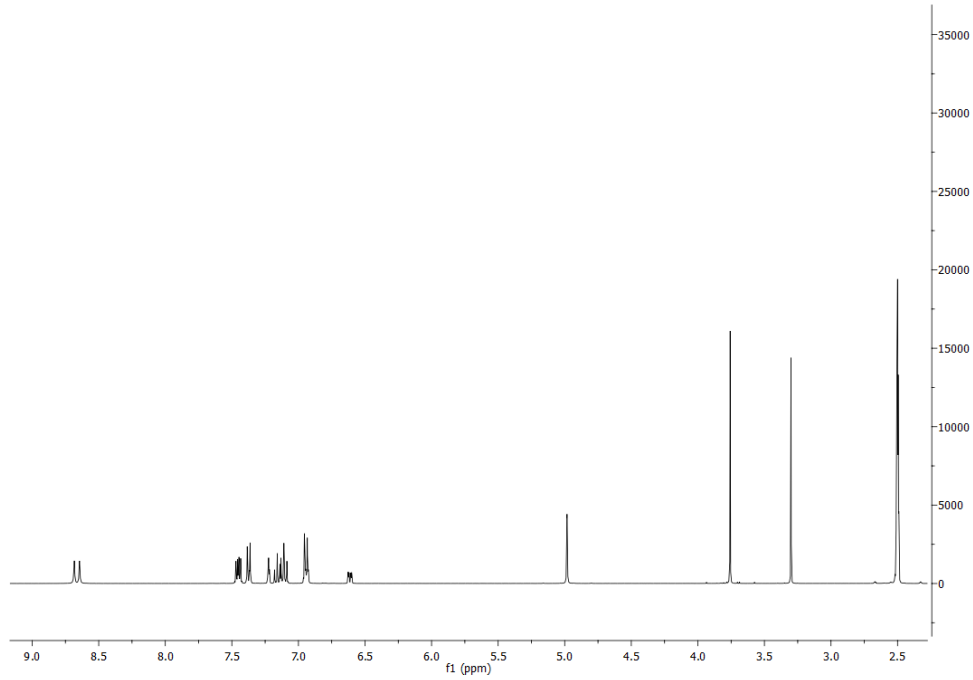
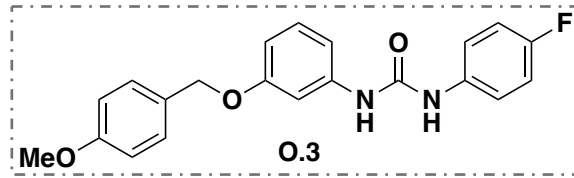


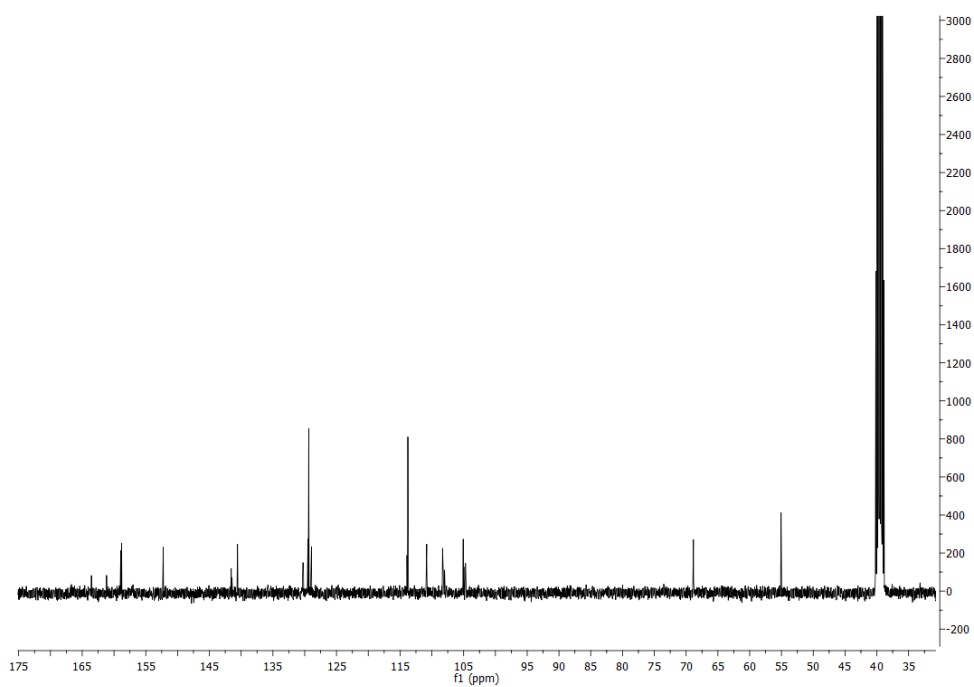
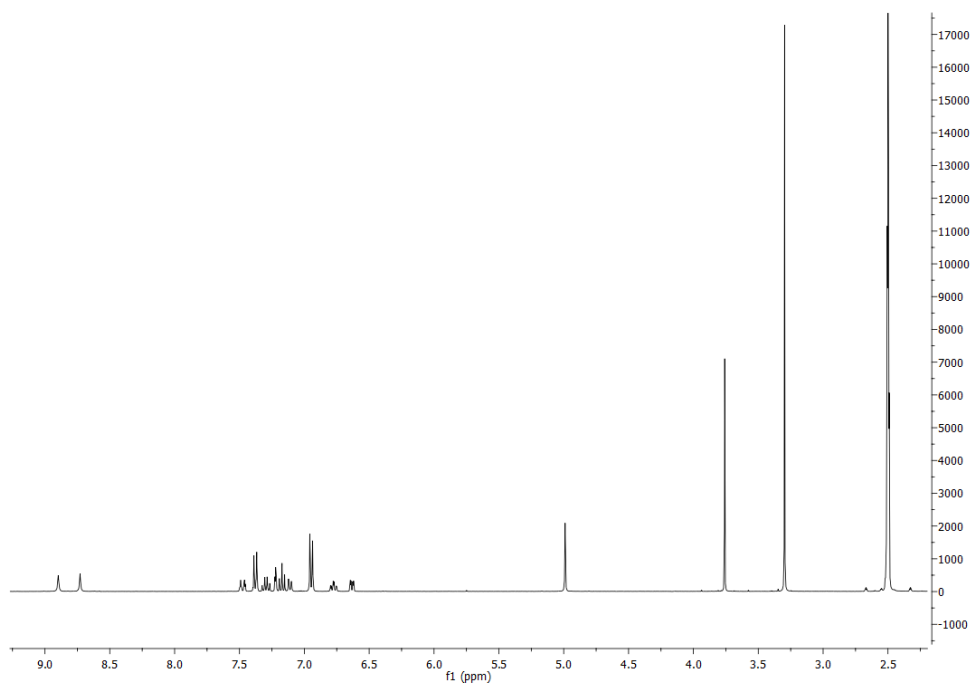
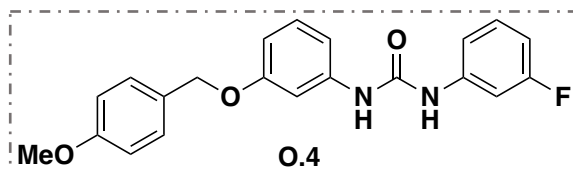


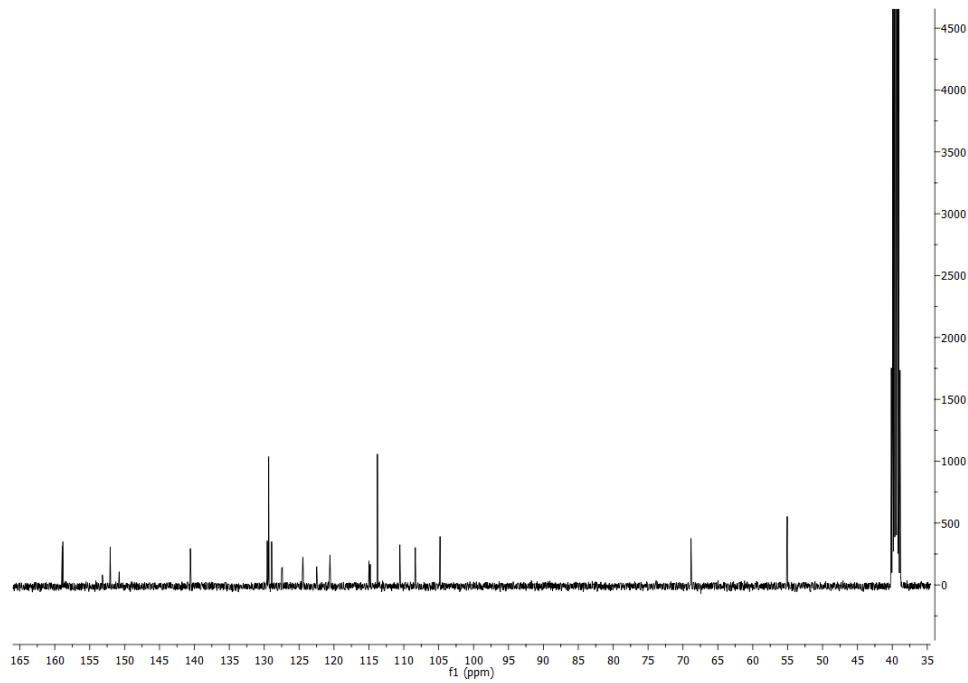
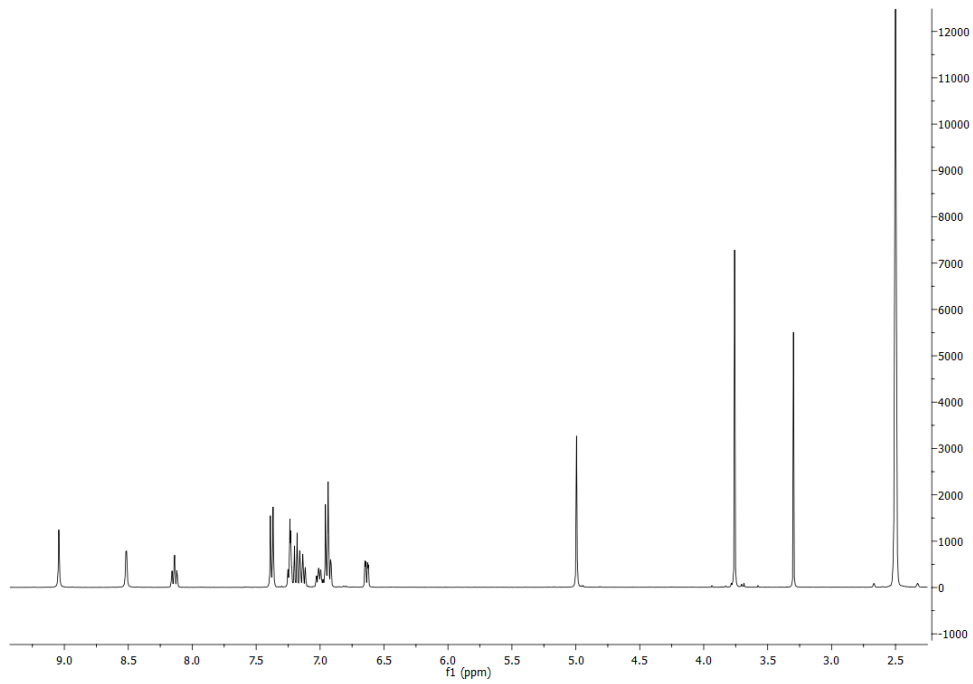
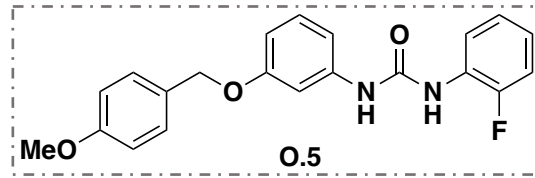


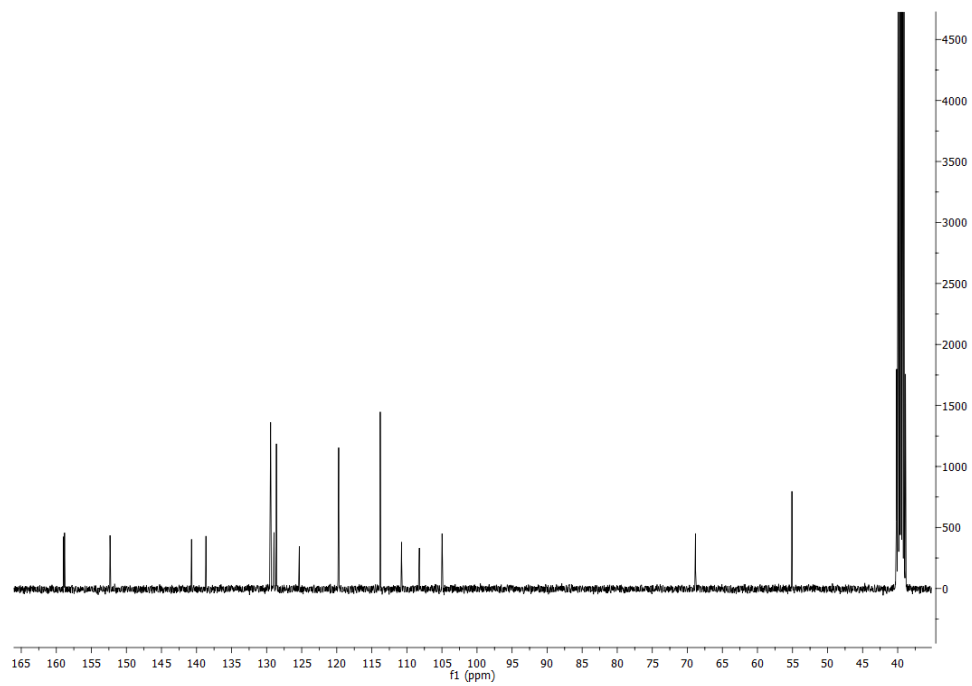
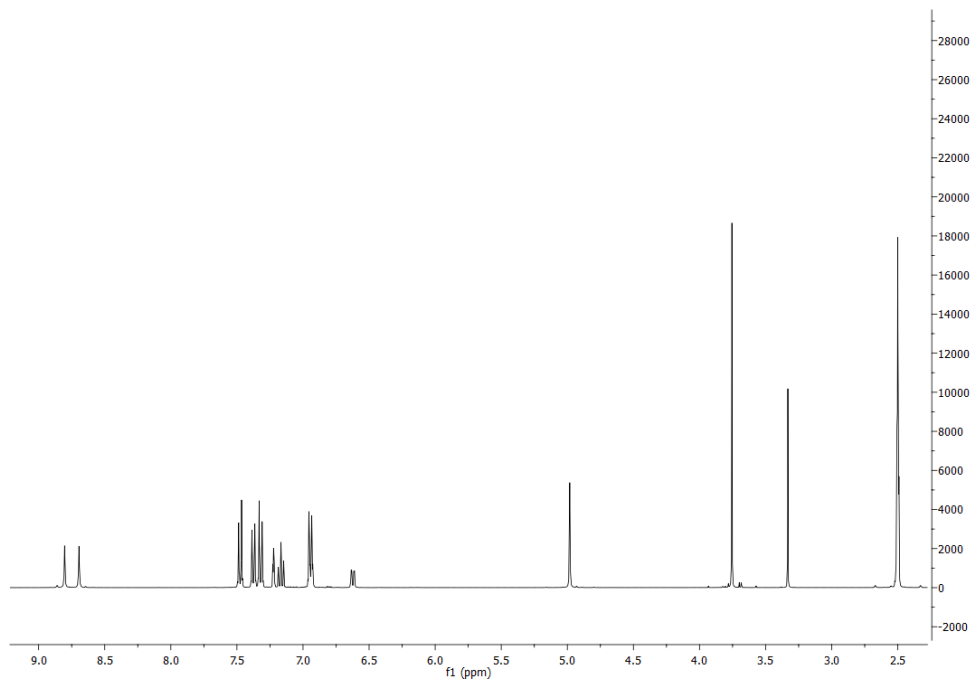
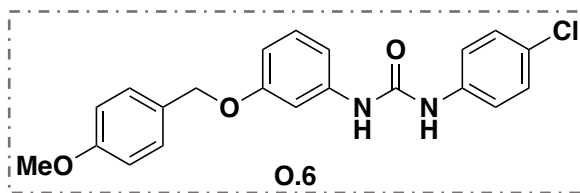


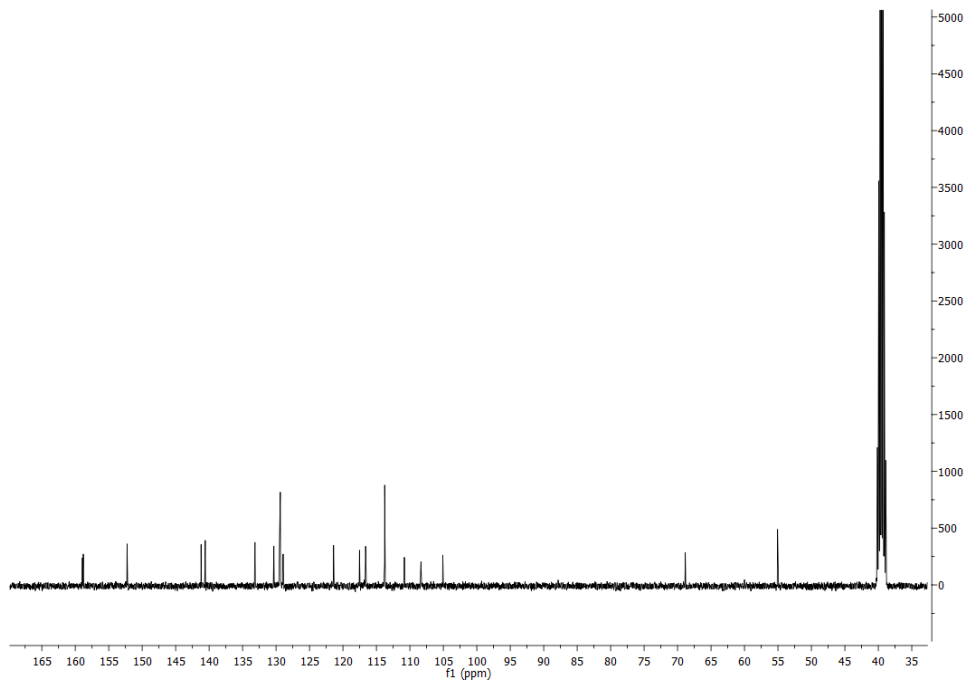
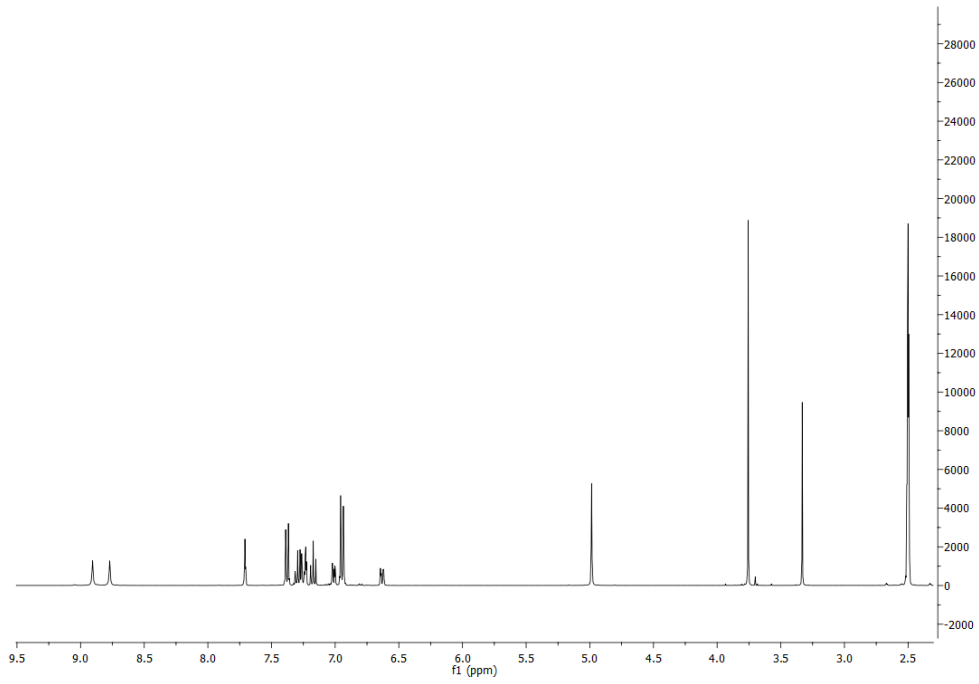
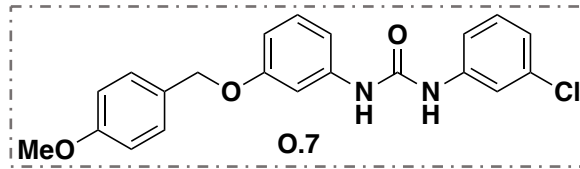


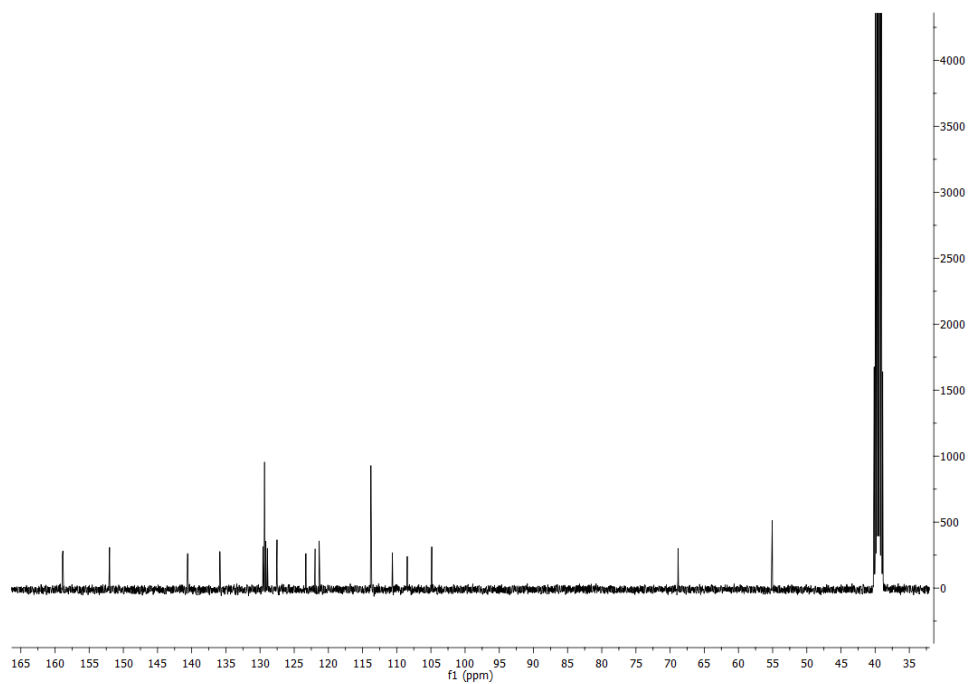
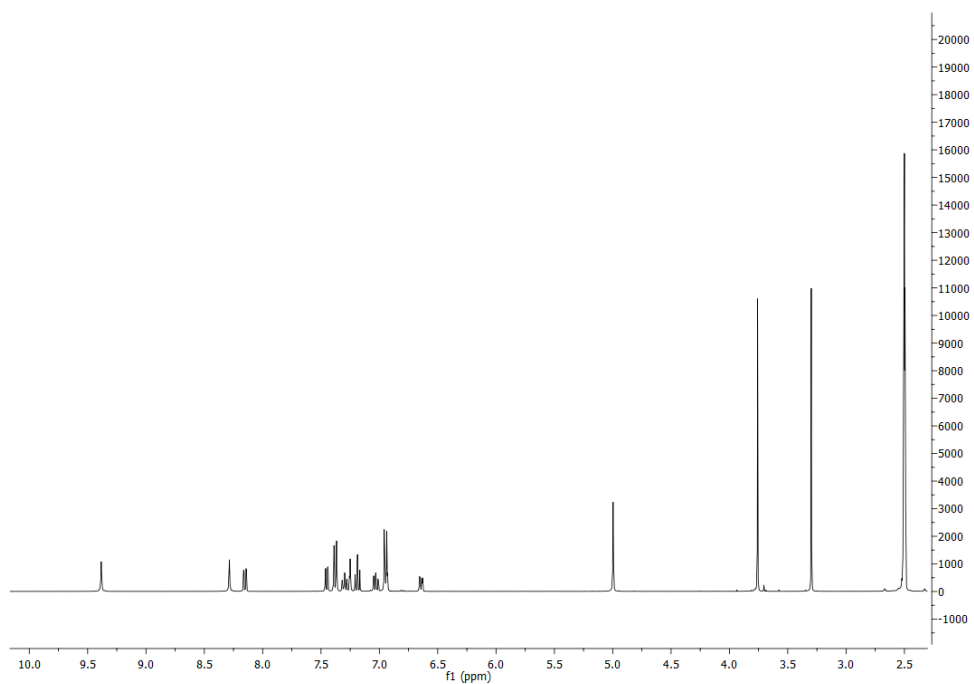
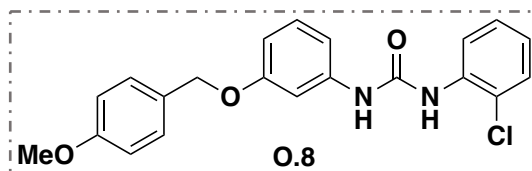


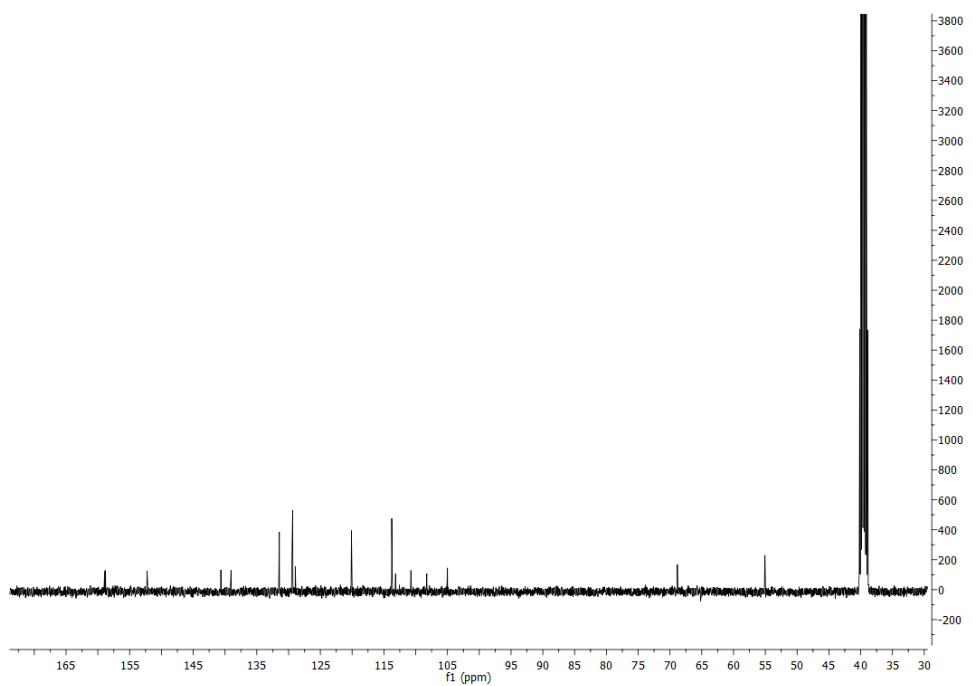
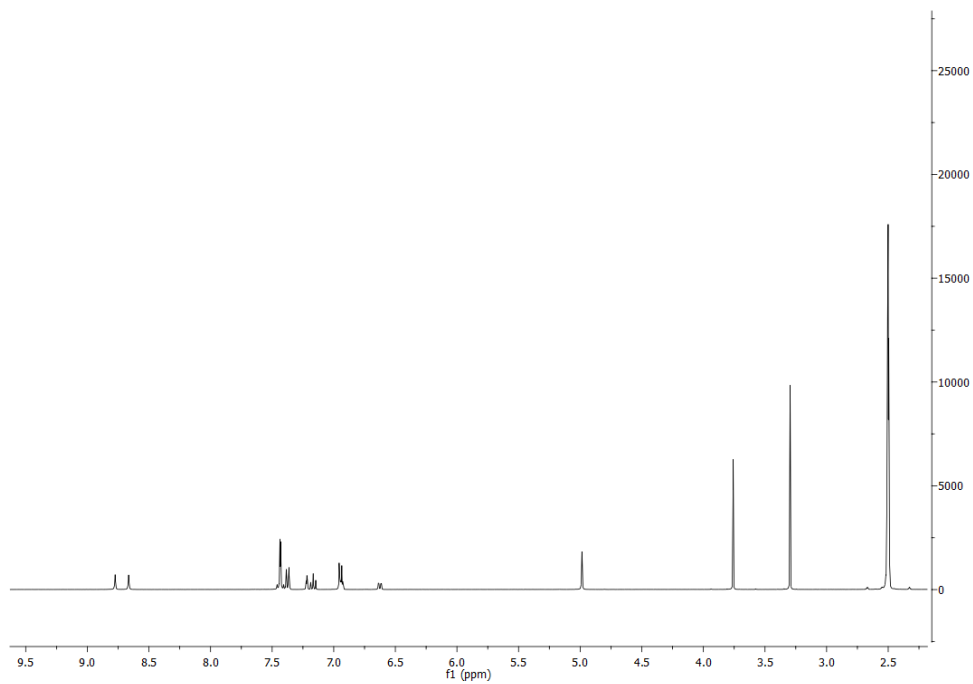
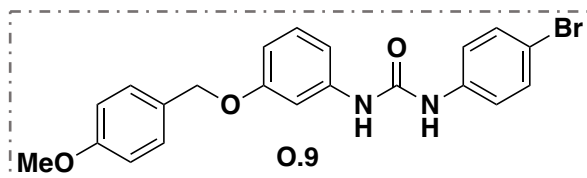


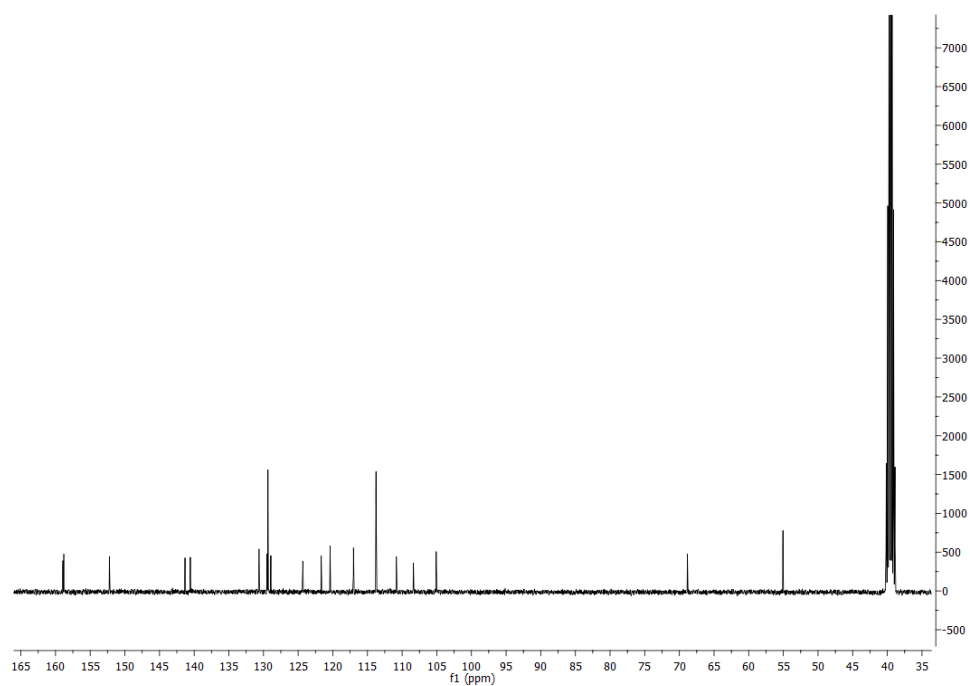
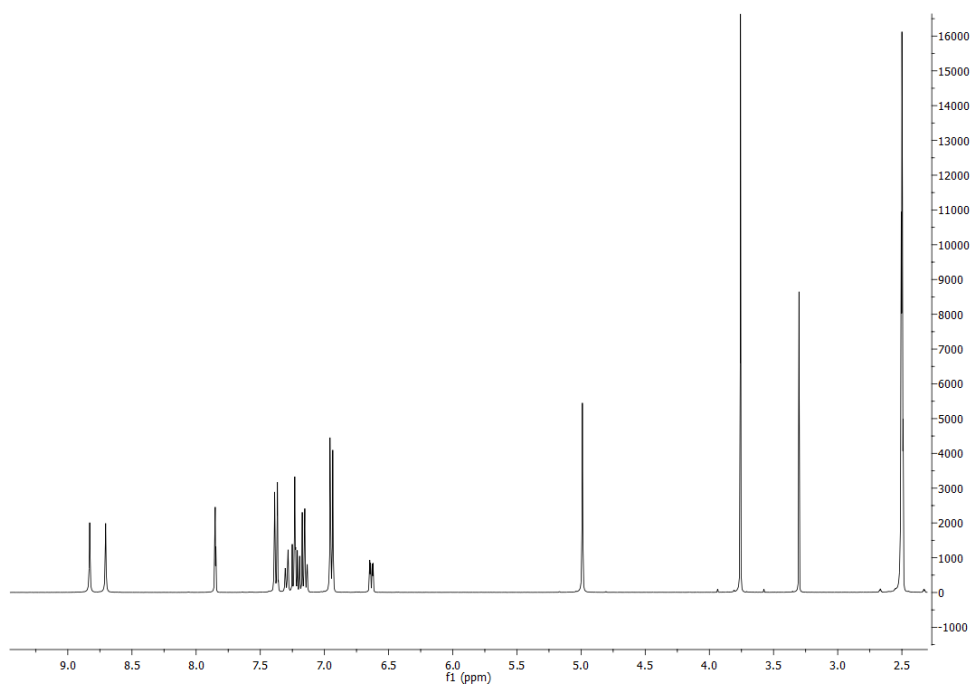
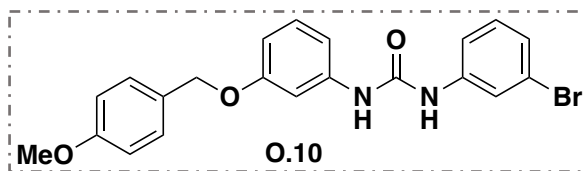


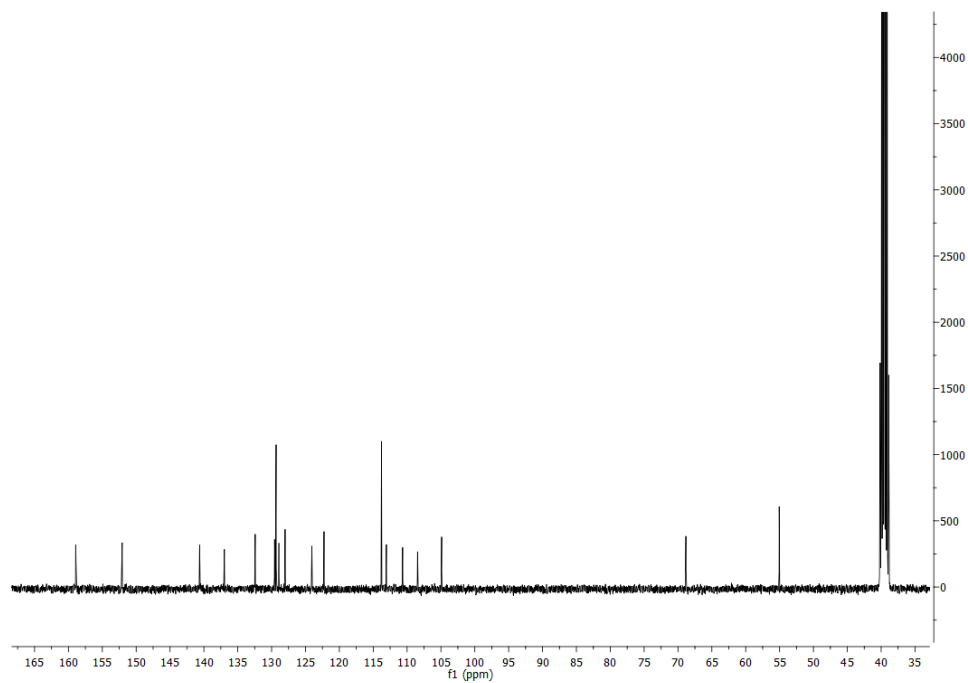
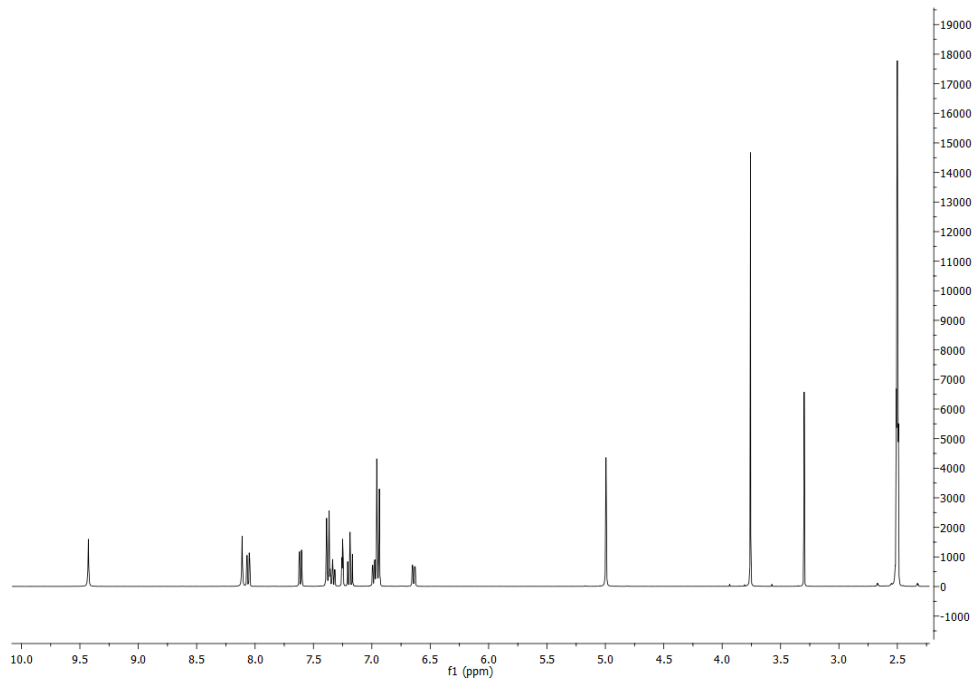
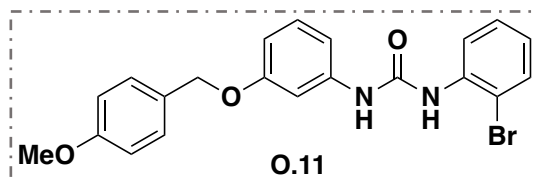


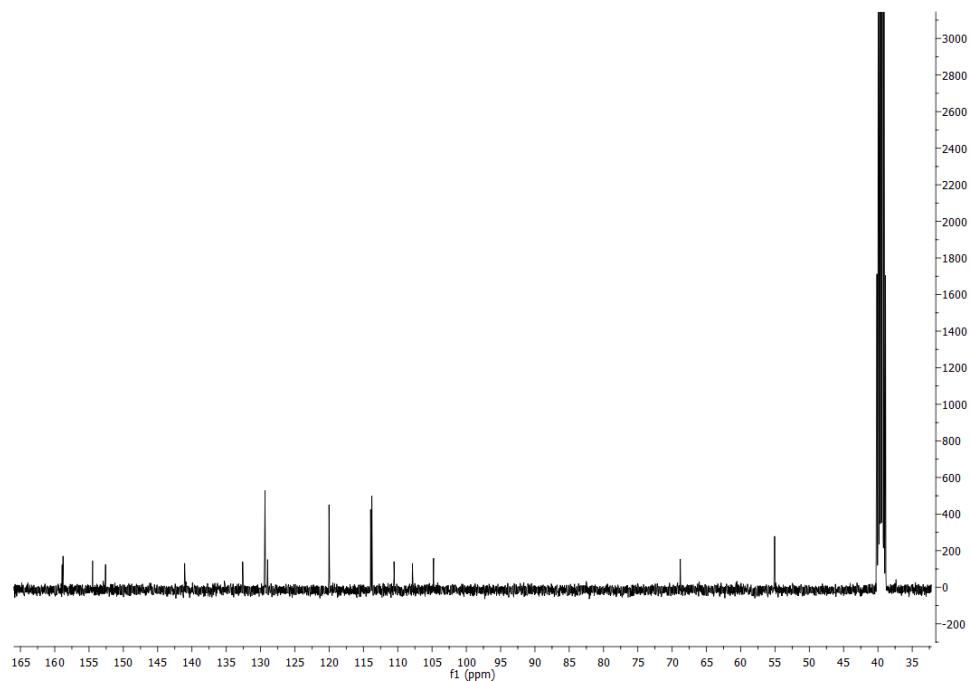
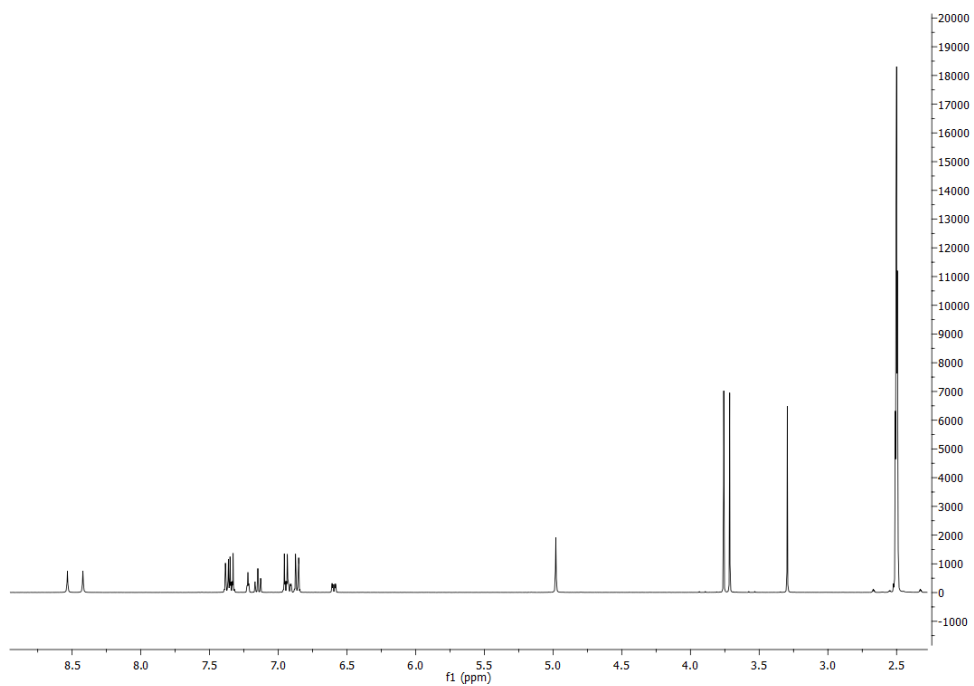
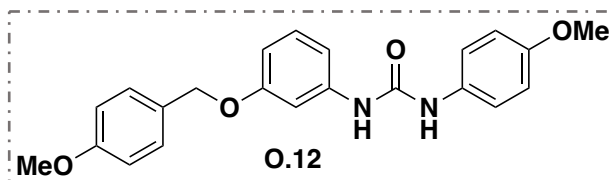


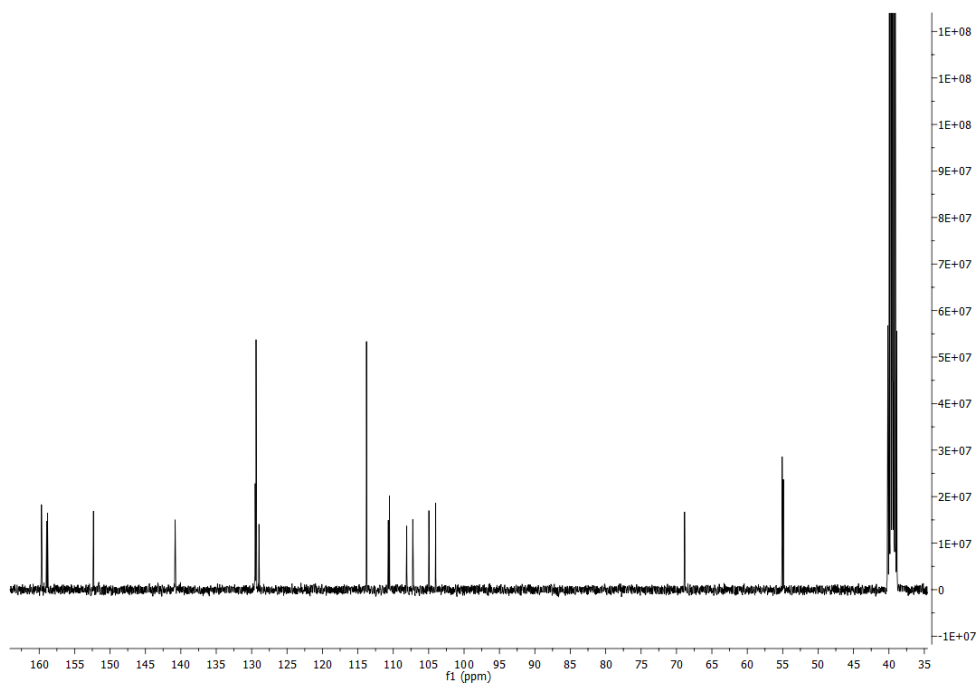
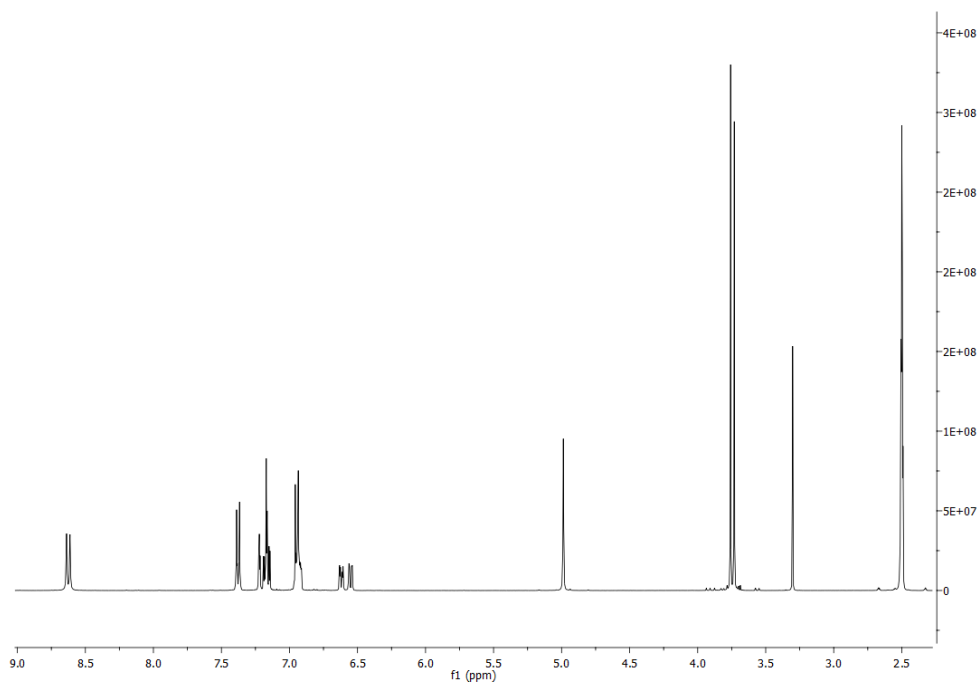
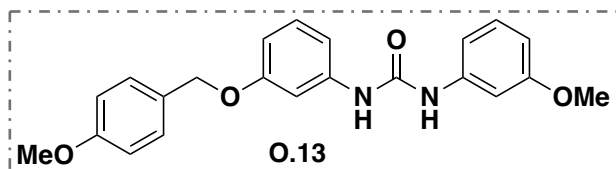


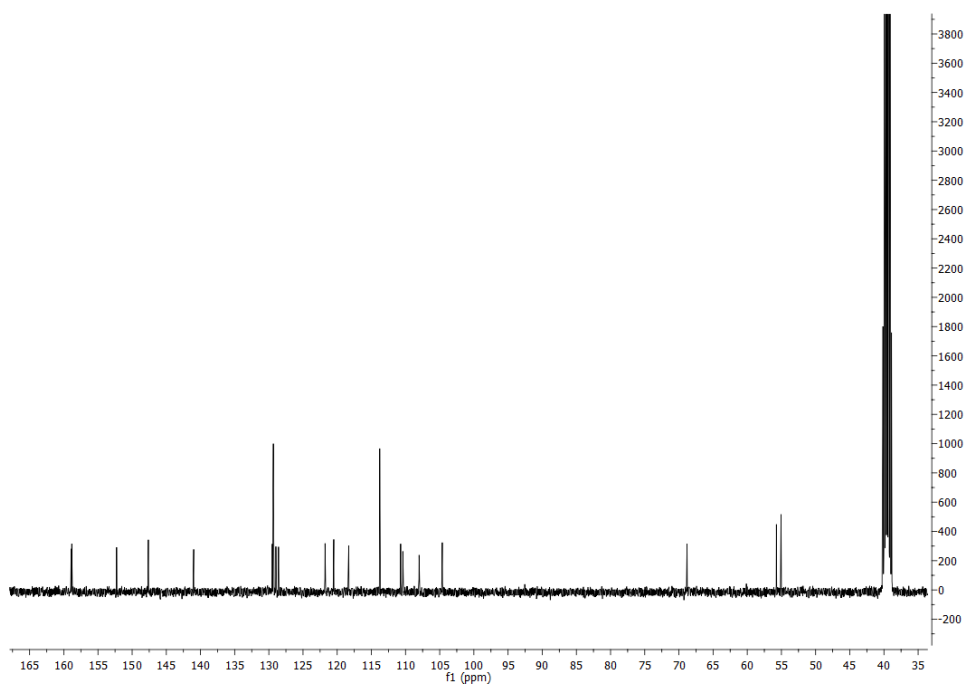
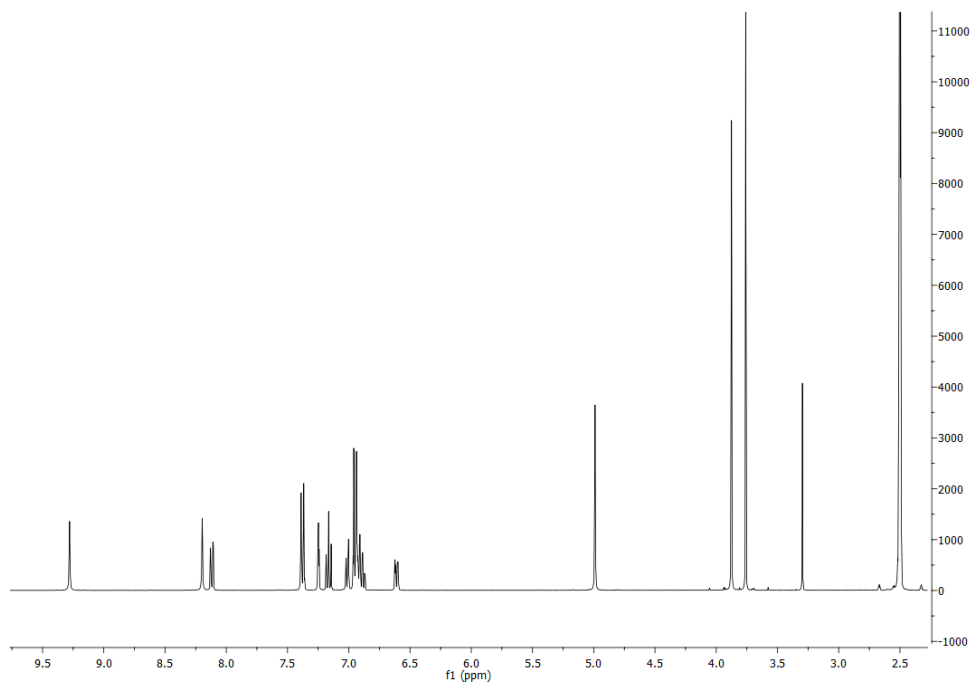
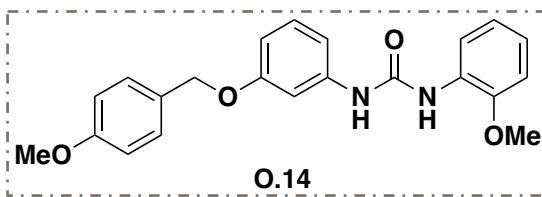












11.2.2. BenzylethyleneAryl-Ureas derivates

